

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

Análisis filogeográfico de *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae)
recolectados en *Phytelephas aequatorialis* en diferentes
áreas del Occidente del Ecuador.

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

JUAN JOSÉ BUSTILLOS HERRERA

Quito, 2016

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Juan José Bustillos Herrera, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Anita G. Villacís

Directora de la Disertación

Quito 2016

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a toda mi familia por el apoyo brindado durante toda mi etapa estudiantil, ya que sin el apoyo incondicional de cada uno, no hubiese sido posible cumplir con mis metas y anhelos. Especialmente agradezco a mis padres que constituyen el pilar fundamental de mi formación tanto como persona, inculcándome los valores necesarios para poder desempeñarme de manera correcta en la sociedad. A mi madre por los consejos brindados y por velar en todo momento por mi bienestar; a mi padre por enseñarme el respeto hacia los demás y a ser perseverante, e impulsarme a cumplir todos mis objetivos con responsabilidad. A mi hermano, por su cariño y su ayuda en los momentos difíciles, y por compartir a mi lado los momentos de alegría, siendo un amigo incondicional.

Mi más sincero agradecimiento al Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Crónicas (CIEIC), y a todas las personas que forman parte del mismo, que constituyeron un grupo de amigos que me brindaron siempre su apoyo cuando lo necesité, en especial a la Dra. Anita Villacís, por su ayuda, su predisposición a siempre compartir su conocimiento y por permitirme formar parte de este centro. De poder ser parte de un grupo de personas que día a día brinda lo mejor de cada uno para que mediante la investigación; y de esta manera poder mejorar las condiciones de vida de muchas personas.

A mis amigos del laboratorio: Alex Aguirre, Anabel Padilla, Santiago Cadena, Ignacio Pacheco, Soledad Santillán y al MSc. César Yumiseva, por convertirse en las personas que día a día estuvieron dispuestos a ayudarme en todos los aspectos y por brindarme su amistad incondicional.

Al Lcdo. Dino Sánchez, por ser una persona que me brindó su total apoyo y su amistad desinteresada, desde el primer día que empezó mi labor en el CIEIC y por su gran aporte en la realización de esta tesis, compartiendo los conocimientos y experiencia para la fase de campo y la recolección de triatominos en palmeras.

A la MSc. Ana Troya por su amistad y su ayuda en el área de laboratorio y en el análisis de los resultados obtenidos en esta investigación. A la Dra. Frédérique Brenière, por sus consejos y su ayuda durante las diferentes etapas de la investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xiii
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. Reseña histórica de la ECh (enfermedad de Chagas).....	5
3.1.1. Enfermedad de Chagas en el Ecuador	6
3.2. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas	8
3.2.1. Etiología de la Enfermedad de Chagas.....	9
3.2.2. Rutas de transmisión de la Enfermedad de Chagas	10
3.2.3. Sintomatología de la Enfermedad de Chagas	13
3.2.4. Diagnóstico y tratamiento para la Enfermedad de Chagas.....	15
3.3. Triatomíneos como vectores de la enfermedad de Chagas	16
3.3.1. Palmeras y su relación con los triatomíneos	17
3.3.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> en el hábitat silvestre	18

3.3.3. <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> : El vector más importante de la Enfermedad de Chagas en Ecuador.....	19
3.4. <i>Phytelephas aequatorialis</i> y su relación con <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	20
3.4.1. Riesgo de reinfestación en lugares con poblaciones silvestres de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	22
3.5. Importancia del análisis filogeográfico	23
3.5.1. Uso de marcadores moleculares	24
3.5.2. Importancia del estudio biogeográfico de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en el occidente del Ecuador.....	25
3.6. Objetivo General.....	27
3.6.1. Objetivos Específicos	27
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1. Área de estudio	29
4.1.1. Manabí.....	29
4.1.2. Santo Domingo de los Tsáchilas	30
4.1.3. Los Ríos.....	30
4.1.4. Guayas	31
4.2. Recolección de Triatomíneos	32
4.2.1. Permisos de Investigación.	34
4.3. Extracción de ADN de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	35
4.4. Cuantificación y dilución de ADN	36
4.5. Amplificación de ADN.....	37

4.6. Secuenciación y análisis del ADN de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	38
5. RESULTADOS	41
5.1. Recolección y selección de muestras para el análisis de la zona occidental del Ecuador (Manabí, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas)	41
5.2. Estimadores de la variabilidad genética de individuos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo y Guayas), mediante el uso de los marcadores moleculares mt Cyt B y mtlurRNA	42
5.3. Test de neutralidad selectiva Tajima's D en tres provincias de la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas)	43
5.4. Análisis filogenético de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en tres provincias de la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas).....	44
5.4.1. Filogenia mediante Neighbour Joining.....	45
5.4.2. Filogenia mediante método Bayesiano.....	47
5.5. Relación entre haplotipos de la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas)	48
5.7. Análisis de los haplotipos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en 14 cantones de la provincia de Manabí	51
5.8. Comparación entre individuos recolectados en hábitat silvestre y peridomiciliar	53
6. DISCUSIÓN.....	55
6.1. Variabilidad genética de <i>R. ecuadoriensis</i> en la zona occidental (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas), mediante el marcador mt Cyt B	55
6.2. Variabilidad genética de <i>R. ecuadoriensis</i> en la zona occidental (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas), mediante el marcador mtlurRNA.....	58

6.3. Relación entre los haplotipos encontrados en la zona occidental del Ecuador	59
6.3.1. Haplotipos mediante el mt Cyt B	60
6.3.2. Haplotipos mediante el mtlurRNA	61
6.4. Relación filogenética de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en la zona occidental	61
6.5. Diferenciación entre Cantones dentro de la Provincia de Manabí	62
6.6. Similitud entre los marcadores moleculares utilizados (mt Cyt B y mtlurRNA)....	64
6.7. Influencia Antropogénica en la distribución y variación genética de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	66
6.8. Relación entre individuos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> , recolectados en hábitat peridomiciliar y silvestre	68
6.9. Estrategias de control fundamentadas en la variación genética	69
7. BIBLIOGRAFÍA	73
8. FIGURAS	85
9. TABLAS.....	106
10. ANEXOS	118
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de la enfermedad de Chagas.....	86
Figura 2. Transmisión vectorial de <i>Trypanosoma cruzi</i>	87
Figura 3. Hábitats de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en la región occidental del Ecuador.....	88
Figura 4. Estadios de desarrollo de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	89
Figura 5. Palmeras de <i>Phytelephas aequatorialis</i> , pertenecientes a la región occidental del Ecuador en la parroquia de Alluriquín, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.....	90
Figura 6. Importancia económica de <i>Phytelephas aequatorialis</i>	91
Figura 7. Búsqueda de triatomíneos en <i>Phytelephas aequatorialis</i>	92
Figura 8. Mapa de la provincia de Manabí con las diferentes comunidades en las que se realizó la búsqueda de individuos de <i>R. ecuadoriensis</i> en palmeras de tagua.....	93
Figura 9. Árbol establecido para la región occidental mediante el mt Cyt B utilizando el algoritmo de Neighbour Joinig (NJ).....	94
Figura 10. Árbol establecido para la región occidental mediante el mtlsurRNA utilizando el algoritmo de Neighbour Joinig (NJ).....	95
Figura 11. Filogenia establecida para la región occidental mediante el mt Cyt B utilizando análisis bayesiano	96
Figura 12. Filogenia establecida para la región occidental mediante el mtlsurRNA utilizando análisis bayesiano	97
Figura 13. Filogenia establecida mediante ambos marcadores moleculares (mt Cyt B) y (mtlsurRNA).....	98
Figura 14. Red haplotípica para la región occidental mediante el marcador mt Cyt B.....	99
Figura 15. Red haplotípica para la región occidental mediante el marcador mtlsurRNA.	100
Figura 16. Red haplotípica para los 14 cantones de la provincia de Manabí, mediante el marcador mt Cyt B	101

Figura 17. Red haplotípica para los 14 cantones de la provincia de Manabí, mediante el marcador mtlurRNA	102
Figura 18. Test de Mantel para evaluar la correlación entre distancias genéticas y geográficas.....	103
Figura 19. Red haplotípica mediante el mt Cyt B para evidenciar la relación entre los hábitats peridomiciliar y silvestre.....	104
Figura 20. Comparación entre <i>R. ecuadoriensis</i> recolectados en la provincia de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas	105

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de secuencias utilizadas para los análisis con cada uno de los marcadores moleculares.....	107
Tabla 2. Índices de variabilidad genética, establecidos mediante el programa DnaSP (Rozas <i>et al.</i> , 2009), en el análisis del fragmento mt Cyt B	108
Tabla 3. Índices de variabilidad genética, establecidos mediante el programa DnaSP (Rozas <i>et al.</i> , 2009), en el análisis del fragmento mtlstrRNA	109
Tabla 4. Distancias genéticas establecidas mediante el programa MEGA v6.0, para el análisis del fragmento mt Cyt B	110
Tabla 5. Distancias genéticas establecidas mediante el programa MEGA v6.0, para el análisis del fragmento mtlstrRNA	111
Tabla 6. Lista de haplotipos encontrados mediante el marcador mt Cyt B, con su número de secuencias y lugares a donde corresponden.....	112
Tabla 7. Lista de haplotipos encontrados mediante el marcador mt Cyt B.....	115
Tabla 8. Distancias genéticas calculadas entre cantones de la provincia de Manabí, mediante el número promedio de substitución de bases por cada sitio (Tamura, 1992; Tamura <i>et al.</i> , 2013) dentro del fragmento mt Cyt B	116
Tabla 9. Distancias genéticas calculadas entre cantones de la provincia de Manabí, mediante el número promedio de substitución de bases por cada sitio (Tamura 1992; Tamura <i>et al.</i> , 2013) dentro del fragmento mtlstrRNA	117

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Preferencia de hábitat por parte de algunos géneros de triatominos.....	119
Anexo 2. Medidas de acumulación de materia orgánica en palmeras.....	120
Anexo 3. Correlaciones entre materia orgánica presente en las palmeras y la presencia de triatominos.....	121
Anexo 4. Permiso de colección para las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos.....	122
Anexo 5. Tabla de individuos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> , recolectados <i>Phytelephas aequatorialis</i>	125
Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN para patas de triatominos mediante el Kit DNeasy.....	134
Anexo 7. Protocolo de PCR y condiciones de temperatura para el marcador mt Cyt B ...	136
Anexo 8. Protocolo de PCR y condiciones de temperatura para el marcador mtl surRNA	137
Anexo 9. Confirmación de los resultados de PCR para los marcadores utilizados, mediante geles de agarosa al 1%.....	138
Anexo 10. Cromatograma de una de las secuencias obtenidas del mt Cyt B y del mtl surRNA, para poder constatar su calidad y aplicarla en el análisis.....	142
Anexo 11. El programa MEGA v6.0, permite realizar el alineamiento de las secuencias mediante una interfaz sencilla.....	143
Anexo 12. El programa DnaSP v5.0, nos permite determinar los índices de variabilidad genética, realizar el Test de neutralidad Tajimas' D, y la lista de haplotipos de nuestras secuencias.....	144

Anexo 13. El programa Network (Fluxus Techonolgy Ltd.) nos permite elaborar las diferentes redes haplotípicas, para poder establecer las conexiones entre los grupos establecidos.....	145
--	-----

1. RESUMEN

En el Ecuador la enfermedad de Chagas (ECh), ha sido considerada como un grave problema de salud pública. La presencia de triatomíneos hematófagos que actúan como vectores del parásito *Trypanosoma cruzi* son la principal causa de la infección en personas. Por este motivo, los mecanismos de prevención y control de la enfermedad se enfocan en su gran mayoría a eliminar los triatomíneos y evitar el contacto de estos insectos con el ser humano. En la región occidental del Ecuador, encontramos la presencia de *Rhodnius ecuadoriensis*, considerado el principal vector de la ECh para el país, asociado al hábitat silvestre, especialmente a palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*), palmeras que económicamente son muy importantes para los habitantes de la zona. Razón por la que, el riesgo de contacto de estos vectores con los seres humanos aumenta, en algunas provincias. Se analizaron individuos de *R. ecuadoriensis* recolectados principalmente en 14 cantones de la provincia de Manabí, además de individuos de Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas con el objetivo de establecer la variabilidad genética en esta zona y relacionar los resultados con la importancia económica y distribución de las palmeras de tagua. Este estudio se realizó, mediante el uso de dos marcadores moleculares mitocondriales: citocromo B (mt Cyt B) y el fragmento denominado "mitochondrial large subunit ribosomal RNA" (mtlsurRNA). Los índices elevados de diversidad haplotípica fueron $Hd_{TOTAL} = 0,877 \pm 0,021$ para mt Cyt B y $Hd_{TOTAL} = 0,669 \pm 0,027$ para el mtlsurRNA, mientras que la diversidad nucleotídica (π) fue baja: $\pi_{TOTAL} = 0,0085$ y $\pi_{TOTAL} = 0,0029$, respectivamente para los marcadores antes mencionados. Estos resultados sugieren que *R. ecuadoriensis* es una especie de origen reciente. El análisis de neutralidad selectiva Tajima's D, nos indica que la población se encuentra en crecimiento. Mediante el uso de redes haplotípicas, se estableció que no existen diferencias genéticas considerables entre

los individuos de las tres provincias. Tampoco hubo diferencias entre los cantones dentro de la provincia de Manabí. Los dendrogramas nos ayudaron a observar el origen monofilético de los individuos en esta zona, además de no presentar una estructura intraespecífica. La baja variabilidad genética encontrada en estas tres provincias nos sugiere que futuras estrategias de control pueden tener una efectividad considerable. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales relacionados con este tema.

Palabras Clave: *Rhodnius ecuadoriensis*, *Phytelephas aequatorialis*, Enfermedad de Chagas, Filogeografía, mt Cyt B, mtlurRNA.

2. ABSTRACT

In Ecuador Chagas disease (CD) is considered as a serious public health problem. The presence of hematophagous triatomines that acts like vectors of the protozoan, *Trypanosoma cruzi*, is the principal route of transmission to humans. For that reason, the most important prevention and control mechanisms of Chagas disease is to eliminate or reduce the number of triatomines and prevent the contact of this insects with human being. In the Western region of Ecuador, we find *Rhodnius ecuadoriensis*, which is considered the main Chagas disease vector in the country, associated to the sylvatic habitat especially to tagua palms (*Phytelephas aequatorialis*), that are economically important for the people who lives in this zone. We analyzed two mitochondrial molecular markers –cytochrome B (mt Cyt B) and the mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtlsurRNA) of *R. ecuadoriensis*, recollected principally inside of fourteen counties of Manabí province. We also included samples from Santo Domingo de los Tsáchilas and Guayas. The aim of this study was to evaluate the genetic variability level in the zone and to found relationship of this results with the economic importance and distribution of the tagua palm, considered the most important refuge for this vector. We found high haplotype diversity indexes: $Hd_{TOTAL} = 0,877 \pm 0,021$ for the mt Cyt B and $Hd_{TOTAL} = 0,669 \pm 0,027$ for the mtlsurRNA, while the nucleotide diversity (π) was very low: $\pi_{TOTAL} = 0,0085$ y $\pi_{TOTAL} = 0,0029$ respectively for each marker. It suggests a recent origin, and the selective neutrality analysis Tajima's D showed a growing population. By the Network method, we couldn't establish significant differences between the three provinces and among the fourteen counties within Manabí. Neighbor Joining and Bayesian trees, helped us to understand the monophyletic origin of the samples in the zone. We couldn't find an intraspecific structure of the specie. Low variability found in the zone, suggest that future control strategies need

to be more effective in this region. However, further studies like this are needed to complete the knowledge of this specie.

Key words: *Rhodnius ecuadoriensis*, *Phytelephas aequatorialis*, Enfermedad de Chagas, Filogeografía, mt Cyt B, mtlstrRNA.

3. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (ECh) es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, mediante la defecación de su vector natural, los triatomíneos (Schofield, 2003). Es una enfermedad de importancia en salud pública en Latinoamérica. Presenta un esquema epidemiológico complicado, con base en número de vectores, genotipos del parásito, diversidad de reservorios, ciclos y formas de transmisión; lo que ha dificultado un abordaje efectivo.

3.1. Reseña histórica de la ECh (enfermedad de Chagas)

"La historia natural de la enfermedad de Chagas se remonta a millones de años en el pasado, como una enfermedad enzoótica, esto significa que únicamente se encontraba dentro de poblaciones de animales silvestres" (Rodrigues-Coura, 2007).

Desde hace un par de siglos con la colonización de nuevos territorios, la tala indiscriminada de bosques y el aumento acelerado de la población humana, muchas áreas en el pasado consideradas silvestres en donde la ECh se mantenía principalmente en mamíferos pequeños como roedores, fueron alteradas y los triatomíneos (vectores del parásito causante de la enfermedad) se vieron obligados a adaptarse a nuevas fuentes de alimento, debido a que la alteración causada por el ser humano reducía cada vez más la presencia de mamíferos y aves silvestres, que por millones de años fueron la única fuente de alimento para estos insectos.

Es así, como las nuevas fuentes emergentes de alimento son encontradas en los animales domésticos, o cuando los refugios de dichas personas son de condiciones precarias, y la necesidad de alimento por parte de los triatominos, lo amerita. Los humanos también son utilizados como fuente de alimento y es así, como una enfermedad que se mantenía en un ciclo enzoótico en mamíferos y aves silvestres en zonas con poca o casi ninguna influencia del ser humano, pasa a convertirse en una zoonosis; esto quiere decir, una enfermedad que tiene como reservorio natural a ciertos animales silvestres, y se transmite a los seres humanos (Fitzpatrick *et al.*, 2008).

El médico de origen brasileño Carlos Chagas fue quién en 1909 se encargó de publicar sus resultados a cerca de una infección en humanos conocida en ese entonces como tripanosomiasis americana. Dio a conocer de esta manera: **(i)** una descripción del parásito causante de la enfermedad *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplástida: Trypanosomatidae), **(ii)** el insecto transmisor del parásito (triatominos), **(iii)** los mamíferos que cumplen la función de reservorio de la enfermedad, y **(iv)** los síntomas que se presentan cuando se produce la infección (Villacís *et al.*, 2008).

3.1.1. Enfermedad de Chagas en el Ecuador

Según Aguilar *et al.* (2009), "Durante mucho tiempo la enfermedad de Chagas fue un complejo problema de salud pública, subestimado en el Ecuador". En las zonas donde se encuentran distribuidos los vectores (triatominos), se encuentran de igual manera seres humanos, realizando actividades cotidianas, y colonizando nuevas áreas; incrementando así la posibilidad de contraer el mal de Chagas por contacto con estos insectos. Los más

afectados, son los campesinos de las zonas rurales, es decir, los que viven en localidades o caseríos, en los cuales el poco o nulo control que ha existido desde hace tiempo, en el que se dieron estos asentamientos contribuye a un encuentro entre los vectores de la enfermedad y las personas (Gürtler *et al.*, 2006).

Se tiene registros de seres humanos infectados con *Trypanosoma cruzi* en el país desde el año de 1927, y entre los años de 1940 y 1950 se obtuvieron registros de nuevos focos de la enfermedad que correspondieron a Provincias de Guayas, Manabí y El Oro; por lo que fueron consideradas las principales zonas endémicas para la enfermedad de Chagas (Black *et al.*, 2009). Pese a estos registros que datan de mediados del siglo XX, estudios previos (entre 1840 y 1920) de médicos ecuatorianos e investigadores que tenían al Ecuador como ruta frecuente de visita, reportan la presencia de triatomíneos vectores de la ECh en el litoral Ecuatoriano, siendo la ciudad de Guayaquil uno de los lugares con presencia de especies como *Triatoma dimidiata* y *Triatoma carrioni*. De esta manera, en esa época ya se trabajaba en el país identificando todos los aspectos sintomatológicos que sufren las personas infectadas con el parásito, reconociendo claramente una infección por tripanosomas, pero con la incógnita de que dicha infección sea la misma que paralelamente en ese momento Carlos Chagas terminaba de describir en el Brasil (León, 1949).

De esta manera, entre 1940 y 1945 empiezan estudios por parte de dos médicos: el mexicano Luis Mazzoti y el ecuatoriano Luis León, donde capturan 19 triatomíneos de la especie *Triatoma dimidiata* en la provincia del Azuay, en los cuales la revisión muestra que no poseen la infección del parásito, sin embargo en un individuo de estadio ninfal que fue alimentado con sangre de un ratón infectado evidenciaron la presencia del

Trypanosoma. Una vez registrado este interesante suceso, se reporta el caso de una persona que presenta tripanosomiasis en la ciudad de Bahía de Caráquez en la provincia de Manabí, estos sucesos posteriormente ameritaron una Conferencia Universitaria Pública para informar sobre estos hallazgos y la presencia de triatominos vectores de la enfermedad en esta provincia (Mazzoti, 1943).

3.2. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

"Todas las iniciativas sobre medidas preventivas y/o de control se han enfocado hacia la reducción de la población vectorial" (Guhl, 2009).

La enfermedad de Chagas (ECh) es una enfermedad tropical, cuya distribución se centra endémicamente en el continente americano donde se extiende desde la región sur de los Estados Unidos, pasando por Centro América, y llegando hasta Argentina y Chile (Figura 1). Se reportó hasta el año 2009, que alrededor de 90 millones de personas se encontraban bajo riesgo de infección en las regiones antes mencionadas (Rodrigues-Coura & Pinto, 2009). A partir del año 2000 gracias a los controles que se implementaron en el cono sur del continente, se logró bajar los índices de infección de la ECh por medio de la interrupción de la transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi* hacia los seres humanos. Obteniendo como resultado, que los países como: Argentina, Brasil, Uruguay y Paraguay reduzcan considerablemente el índice de personas infectadas (Oscherov, 2003).

Según Moncayo *et al.*, (2009), el número de casos reportados en el continente ha ido decreciendo desde 1983 donde se registraba un promedio de 700.000 nuevos casos de personas infectadas cada año, a menos de 200.000 casos nuevos por año en el 2000, hasta llegar a 41.200 casos de personas infectadas en el 2006.

La gran mayoría de personas que han sido infectadas con el parásito, y por ende sufren de los síntomas de la ECh, pertenecen a personas de bajos recursos económicos en zonas rurales, las cuales potencialmente son más propensas a estar pobladas por: **(i)** animales silvestres, como ardillas y/o aves, **(ii)** insectos, como los triatominos, y **(iii)** por consiguiente que pueden llegar a tener el parásito dentro del ciclo enzoótico (Abad-Franch, 2009).

3.2.1. Etiología de la Enfermedad de Chagas

El *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplástida: Trypanosomatidae) es un parásito hemoflagelado, perteneciente a los protozoarios que puede infectar la células de una gran variedad de hospederos, muchos de ellos son vertebrados como mamíferos y aves que cumplen muchas veces el rol de reservorios de éste parásito; aunque también puede llegar a infectar a los seres humanos mediante diferentes rutas de transmisión, entre ellas la más importante es la vectorial (Villacís *et al.*, 2008).

Posee un flagelo para su locomoción y una estructura denominada kinetoplasto, que es un organelo especializado en el que se encuentra el DNA del parásito (WHO, 2002). La

población de *Trypanosoma cruzi*, no es una población homogénea, es decir, que está compuesta por diferentes cepas, cada una posee características que difieren entre sí, como por ejemplo su origen (Brener, 1992).

Este parásito adopta diferentes formas durante su ciclo vital, dependiendo del tipo del tejido en el que se encuentre y del hospedero en el que se localice (Marquardt *et al.*, 2000). Se pueden diferenciar cuatro estadios: 1) **tripomastigote sanguíneo**.- es la forma del parásito, ingerida por los insectos vectores, al alimentarse de animales infectados. 2) **epimastigotes**.- son las formas multiplicativas del parásito, que se alojan en el intestino de los insectos, 3) **tripomastigotes metacíclicos**.- son la forma que adopta el parásito al llegar a la porción posterior del intestino del vector. Esta forma del parásito es la que se encuentra en las heces de los insectos transmisores, y la que puede llegar a infectar a los animales hospederos y/o a las personas y 4) **amastigotes**.- son las formas no móviles del parásito, ya que carecen de flagelo y se alojan dentro de las células de los individuos infectados; en este lugar, el parásito empieza de nuevo con su transformación a tripomastigote sanguíneo para poder salir a las regiones extracelulares, y moverse a través del torrente sanguíneo (Brener, 1992; Marquardt *et al.*, 2000).

3.2.2. Rutas de transmisión de la Enfermedad de Chagas

Los mecanismos de transmisión de la ECh son: **(i) vectorial**, por medio de los triatominos hematófagos que pueden ser potenciales portadores del parásito, *Trypanosoma cruzi*, en su sistema digestivo (Figura 2). Estos insectos con hábitos de alimentación nocturna son los que mantienen el ciclo enzoótico en las zonas silvestres, ya que su fuente de alimento es la

sangre de mamíferos y algunas aves. Sin embargo, el contacto con los humanos puede darse en especial en zonas rurales, y es ahí, cuando la fuente de alimento de los triatominos cambia, y son los seres humanos los infectados mediante las heces que estos insectos pueden dejar durante el proceso de alimentación (WHO, 2002). Este mecanismo de transmisión es el más frecuente. **(ii) Transfusiones sanguíneas**, cuando la sangre donada a pacientes en centros de salud se encuentra infectada por el parásito, *Trypanosoma cruzi*. Debido a los movimientos migratorios y a los procesos de urbanización de los seres humanos, puede evidenciarse este tipo de mecanismo de transmisión, ya que las personas de zonas rurales que potencialmente pueden llevar la infección en su organismo migran hacia zonas urbanas, como son las grandes ciudades (Guhl *et al.*, 2007). También el ineficiente control, al no aplicar en muchos de los casos un tamizaje para poder identificar si la sangre que se recibe en los diferentes centros de salud, y/o bancos de sangre se encuentra con la presencia de parásitos causantes de la ECh (Schofield *et al.*, 2006).

En el año de 1930, se estimaba que un 70% de la población de Latinoamérica se encontraba domiciliada en zonas rurales, mientras que en la actualidad el 70% de la población latinoamericana ocupa las grandes ciudades y las zonas urbanas, evidenciando así la proporción de personas que en pocas décadas han pasado de una zona rural, a una zona urbana (WHO, 2002; WHO, 2015). **(iii) Congénita**, cuando mujeres de las zonas rurales, en la gran mayoría se encuentran infectadas con el parásito, y/o por lesiones placentarias; la infección puede ser adquirida por los neonatos. Los casos evidenciados en zonas urbanas son relativamente escasos, y cuando esto ocurre, se debe a mujeres que llegan desde las zonas rurales y están en estado de gestación (WHO, 2002; Rassi *et al.*, 2007). **(iv) Trasplante de órganos**, han sido reportados casos en los que la infección ha ocurrido debido al trasplante de algún órgano infectado con *T. cruzi*. La mayoría de casos

por medio de este mecanismo se dan en trasplantes de riñón, sin embargo, los trasplantes de corazón, médula ósea u otros órganos tanto de pacientes vivos, como de donantes fallecidos, también están bajo riesgo de infección (WHO, 2002; WHO, 2009). (v) **Accidental**, menos común, por accidentes en laboratorios donde se trabaja con agentes infecciosos, tales como vectores o el propio parásito, en los cuales la mala manipulación de dichos agentes infecciosos puede resultar en la infección de las personas que trabajan con este tipo de material (Dias & Schofield, 1999). Finalmente (vi) **Oral**, mediante la ingesta de alimentos contaminados, siendo casos recientemente documentados en los cuales ciertos frutos como por ejemplo, los que se cosechan en palmeras o árboles con la presencia de triatomíneos son utilizados para la elaboración de jugos y/o comidas, y que son procesados por error con triatomíneos o sus heces presentes, lo que puede causar una infección con el parásito (Toso *et al.*, 2011). Estos casos han sido documentados principalmente en la región Amazónica de Sudamérica (Guhl, 2009).

La mayoría de casos en los que se presenta la ECh en los seres humanos, son causados mediante el mecanismo de transmisión vectorial. Para que esto pueda ocurrir, es necesario, que el parásito causante de la enfermedad, *T. cruzi*, ingrese dentro del organismo de una persona por medio de la infección, a través de las heces del triatomíneo, cumpliendo el rol de vector (Panzera *et al.*, 2004). Para que dicho contacto ocurra, y se dé la infección en las personas, se requiere de un conjunto de condiciones ambientales y sociales que permitan que esos tres factores puedan encontrarse en un mismo tiempo y espacio (Briceño-León, 2009).

Esta circunstancia del encuentro es una contingencia de los procesos históricos que rodean la inevitable relación del ser humano con la naturaleza, del modo cómo el ser humano en la búsqueda por su sobrevivencia, se apropia, usa y modifica el medio ambiente. En su empeño por sobrevivir, el ser humano busca en la naturaleza alimento y cobijo, para ello caza, recolecta, siembra, domestica animales y construye viviendas para sí mismos y corrales para sus animales. En esta actividad el hombre se introduce en el medio natural donde el vector, y el parásito se hallan, y así permiten el encuentro. El ser humano al modificar la naturaleza, atraen o transportan hacia ellos mismos los vectores que pueden ser portadores de los parásitos, y así abren la puerta y favorecen el encuentro, y por consecuencia la enfermedad (Briceño-León, 2009).

3.2.3. Sintomatología de la Enfermedad de Chagas

Se considera a la enfermedad de Chagas como un serio problema de salud pública debido a que se puede evidenciar en cierto grado la facilidad con la que un ser humano puede llegar a infectarse sin siquiera darse cuenta de que esto sucedió (Aguilar *et al.*, 1999). Una vez que el parásito, *Trypanosoma cruzi*, logra ingresar en el organismo de una persona existe un periodo de incubación, el cual puede variar en duración dependiendo del mecanismo por el cual la persona fue infectada.

Cuando la transmisión se da por mecanismo vectorial, el periodo de incubación puede durar de 7 a 10 días. Mientras que en casos ocasionados por otros mecanismos como, por ejemplo, la infección mediante una transfusión con sangre que no pasó por un proceso de

tamizaje para la ECh, el periodo de incubación toma de 7 a 40 días (WHO, 1991; Sherlock, 1999).

La ECh muestra diversas manifestaciones, afectando diferentes aparatos y sistemas de la persona infectada como pueden ser: el aparato digestivo (intestinos), el aparato circulatorio, principalmente el corazón y el sistema nervioso a nivel general (Texeira *et al.*, 2006). La ECh posee dos fases que se reconocen por sus diferentes síntomas y que se presentan, o inician una vez que el parásito se encuentra dentro del organismo.

La fase aguda es la primera fase que se presenta de manera casi inmediata, luego de que ocurre la infección, dicha fase tiene como características principales la aparición de una inflamación en la zona por donde el parásito ingresó que se denomina chagoma. Además presenta síntomas como: malestar general, fiebre, falta de apetito, escalofrío, miocarditis severa, hepatoesplenomegalia y meningoencefalitis (Guevara, 1997; Pita, 2013).

Cuando los síntomas y las manifestaciones de haber contraído la enfermedad ameritan tratamiento clínico, es decir que la persona sea hospitalizada por presentar deterioro en su salud, estamos frente a la fase crónica de la enfermedad. En dicha fase, son evidentes en la persona infectada trastornos cardiacos y del aparato digestivo en ciertos segmentos como el colon y el esófago (Guevara, 1997). Estos síntomas se observan cuando ha pasado un tiempo considerable después de que la persona ha sufrido la infección con el parásito, es decir, aproximadamente entre 10 y 20 años luego de aparecidos los primeros síntomas que corresponden a la fase aguda de la enfermedad. El factor que desencadena la fase crónica,

es la acumulación de lesiones y daños en los tejidos del corazón y en ciertas partes del sistema digestivo (WHO, 1991).

3.2.4. Diagnóstico y tratamiento para la Enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la ECh está basado principalmente en pruebas serológicas, debido a que los métodos parasitológicos directos, carecen de la sensibilidad necesaria para detectar la infección (Dopico *et al.*, 2011). Dentro de las principales pruebas serológicas que se utilizan tenemos:

Hemaglutinación indirecta (HAI).- evalúa la presencia de antígenos en los glóbulos rojos de la sangre, capaces de reaccionar con anticuerpos y proteínas específicas.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).- en esta prueba se emplean dos antígenos, el primero son epimastigotes de *T. cruzi*, mientras que el segundo antígeno es un fluoróforo.

Test ELISA.- es un ensayo enzimático para la detección cualitativa de anticuerpos contra *T. cruzi*, es un ensayo que permite evaluar con rapidez un gran número de muestras de suero o plasma, lo que lo hace ideal para ser aplicado en bancos de sangre y laboratorios clínicos (Dopico *et al.*, 2011).

Mientras más rápido se logre identificar la ECh, será de mayor ayuda la administración de medicamentos para contrarrestar los efectos a corto y largo plazo de la infección. Además, se logrará eliminar la totalidad de los parásitos que ingresaron dentro del organismo del individuo infectado (WHO, 2015). La administración de estos medicamentos depende directamente de las condiciones en las que se encuentre la infección en el individuo, se sugiere el uso de drogas tripanocidas (para matar tripanosomas) mientras dure la fase aguda de la ECh y en menores de 12 años, los cuales presentan una mejor tolerancia (Abad-Franch & Aguilar, 2000; Villacís, 2006). Existen dos drogas comerciales que se recomiendan para tratar la ECh: el Benznidazol (ROCHE®) y el Nifurtimox (BAYER®), que a pesar de ser los utilizados en el tratamiento pueden llegar a presentar problemas de tolerancia por parte de los individuos infectados. El fármaco puede eliminar la totalidad de parásitos dentro de los tejidos infectados (Abad-Franch & Aguilar, 2000).

3.3. Triatominos como vectores de la enfermedad de Chagas

Triatominae (subfamilia) clasificados como la familia Reduviidae (Hemiptera, Heteroptera), se caracterizan por sus adaptaciones morfológicas para encontrar hospederos y para alimentarse de sangre. Entre las principales características que presentan se destaca un desarrollo hemimetábolo, es decir que pasan por cinco estadios ninfales muy similares a los adultos, pero con la diferencia en que poseen un menor tamaño y carecen de alas, hasta llegar a un estadio adulto en el cual se define su sexo (Cuba, 1975). Se conocen un total de 140 especies (Schofield & Galvao, 2009), las cuales pueden ser potenciales vectores en la transmisión de *Trypanosoma cruzi*, tanto para mantener el ciclo enzoótico de la enfermedad, como para transmitirla a los seres humanos. "La presencia de al menos 16

especies de triatominos ha sido reportada en el Ecuador" (Villacís *et al.*, 2010), considerados como potenciales vectores de la enfermedad de Chagas, donde hasta el año de 1999, alrededor de tres millones de personas se encontraban bajo un alto riesgo de infección y aproximadamente 150.000 personas se encontraban infectadas (Aguilar *et al.*, 1999).

Muchos de estos insectos pueden encontrarse distribuidos en tres diferentes hábitats: **(i) Domiciliar**, cuando se encuentra dentro de viviendas. **(ii) Peridomiciliar**, cuando habita áreas alrededor de una vivienda ya establecida, en un radio menor a cien metros en los cuales pueden existir refugios para los vectores (Abad-Franch, 2001). Por último **(iii) Silvestre**, cuando se encuentra en zonas relacionadas con nidos de animales salvajes que mayoritariamente ocupan ciertas especies de palmeras como refugio (Fitzpatrick *et al.*, 2008) (Figura 3).

3.3.1. Palmeras y su relación con los triatominos

Si bien la mayoría de triatominos son de hábitos terrestres, muchas especies del género *Rhodnius* se caracterizan por tener hábitos arborícolas (Barret, 1991). Según Abad-Franch (2005) encontró una alta relación entre ciertas especies de *Rhodnius* con algunas especies de palmeras presentes en zonas tropicales de América (Anexo 1). Dependiendo de cada especie el grado de asociación puede variar, es así como, por ejemplo, *Rhodnius colombiensis* muestra una aparente especialización para habitar en la palmera *Attalea butyracea*; mientras que *Rhodnius neglectus* se muestra como una especie más generalista para elegir un lugar de refugio y alimentación. Adicionalmente, existen registros de que se

ha encontrado en por lo menos siete especies de palmeras, y puede establecerse en nidos de mamíferos o aves para obtener su alimento (Abad-Franch *et al.*, 2005; Abad-Franch *et al.*, 2015). También se ha llegado a analizar las características de algunas especies de *Rhodnius* de acuerdo a la palmera en la que se encuentra. Algunas especies presentan una coloración similar a la tonalidad de las hojas secas, y la materia orgánica en descomposición de la palmera en la cual fueron encontrados (Gaunt & Miles, 2000).

A pesar de las diferencias en cuanto al nivel de asociación de las diferentes especies del género *Rhodnius* con distintas especies de palmeras, estos insectos prefieren establecerse en estas plantas. Esto se debe a las características singulares que presentan y que brindan, como condiciones adecuadas para su refugio, alimentación y desarrollo. De esta manera, permitirá que estos triatomíneos cumplan con el papel fundamental de mantener el ciclo enzoótico de la ECh en hábitats silvestres (Guarneri *et al.*, 1998).

3.3.2. *Trypanosoma cruzi* en el hábitat silvestre

Mediante el uso de técnicas moleculares y la caracterización de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* (se presentan 3 principales: Tc1, Tc2 y Tc3), se ha establecido una relación mediante el aislamiento del parásito a mamíferos y su relación con los triatomíneos y el hábitat. De esta manera, se aislaron varias muestras de tripanosomas, provenientes de zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*), encontrando únicamente la cepa Tc1 para estos mamíferos que habitaban en nidos establecidos en palmeras. Lo que sugiere una muy cercana pero, sin embargo no absoluta asociación entre lo que sería el parásito que causa la enfermedad, *T. cruzi*, con la cepa Tc1 de mamíferos del género *Didelphis* como los

reservorios del parásito, los triatomíneos del género *Rhodnius*, como los vectores del parásito y las palmeras como el hábitat en el que se da esta relación (Gaunt & Miles, 2000; Texeira *et al.*, 2001).

3.3.3. *Rhodnius ecuadoriensis*: El vector más importante de la Enfermedad de Chagas en Ecuador

Basándose en estudios recientes, la especie más importante como vector de la enfermedad de Chagas para el Ecuador es *Rhodnius ecuadoriensis* (Villacís *et al.*, datos no publicados). Esta especie ha sido reportada para la región costa del país y en los valles temperados de la provincia de Loja (Grijalva *et al.*, 2005). Las hembras de esta especie depositan huevos, que luego de eclosionar pasan por cinco estadios ninfales hasta llegar al estado adulto (Figura 4) (Grijalva *et al.*, 2005). El tiempo que le toma a un huevo de esta especie desarrollarse hasta llegar a ser adulto es de aproximadamente 189,9 días en la región Costa (provincia de Manabí), y de 181,3 días para individuos de la región sur del Ecuador, (provincia de Loja) (Villacís *et al.*, 2008). *Rhodnius ecuadoriensis* puede encontrarse distribuido en los tres tipos de ambientes y/o hábitats anteriormente mencionados.

Los primeros estudios realizados en la zona sur del Ecuador en la provincia de Loja arrojaron resultados de presencia de esta especie en hábitats domiciliarios y peridomiciliarios únicamente, por lo que se pensaba que en esta zona, la especie había sido introducida (Abad-Franch *et al.*, 2001). Posteriores estudios, han encontrado que si existe presencia de *Rhodnius ecuadoriensis* en ambientes silvestres en la provincia de Loja, por lo que la incógnita de conocer de dónde proviene ésta especie, sigue todavía sin ser

esclarecida (Grijalva y Villacís, 2009; Grijalva *et al.*, 2012). En la región costa del país usualmente se los puede encontrar en asociación con *Phytelephas aequatorialis* (palmera de tagua o cade), y otras especies de palmas endémicas de la zona en las que se encuentran establecidos nidos de mamíferos pequeños como zarigüeyas y ratones, que son hospederos naturales de estos insectos (Villacís *et al.*, 2008). En provincias donde no hay estas especies de palmeras, *R. ecuadoriensis* puede encontrarse asociado con nidos de ardilla en árboles (Grijalva y Villacís, 2009; Suarez-Dávalos *et al.*, 2010).

3.4. *Phytelephas aequatorialis* y su relación con *Rhodnius ecuadoriensis*.

La tagua (*Phytelephas aequatorialis*), es una especie de palmera endémica del occidente ecuatoriano (Brokamp *et al.*, 2014), donde el norte de su distribución se limita a la zona de transición entre el bosque húmedo y el bosque pluvial (Figura 5) (Ferreira *et al.*, 2008). En un rango altitudinal, se las encuentra desde los 500 hasta los 1500 metros sobre el nivel del mar (Borchsenius & Moraes, 2006). Son plantas dioicas, es decir que poseen dos géneros bien definidos (macho y hembra) (Dransfield *et al.*, 2005), su tamaño varía desde 1 m cuando son juveniles, hasta llegar aproximadamente a los 10 metros de altura. En ciertos casos se ha observado que pueden llegar a 13 metros, y su tallo presenta un diámetro que varía entre los 20 y 30 centímetros (Barford, 1991).

Es abundante en la Provincia de Manabí y en Santo Domingo de los Tsáchilas, en estos lugares se utiliza las hojas de esta palmera, denominadas cade, para elaborar techos de cabañas y viviendas; mientras que las semillas se emplean en el diseño de artesanías que se comercializan en varios lugares del país y del mundo (Figura 6) (Henderson *et al.*, 1995;

Balslev *et al.*, 2015). En la región costa del Ecuador, estudios realizados indican que las palmeras distribuidas en lugares relacionados con presencia del hombre, son las que frecuentemente se encuentran infestadas con *Rhodnius ecuadoriensis* (Abad-Franch *et al.*, 2005). La frondosidad y cantidad de materia orgánica que las palmeras pueden presentar es de gran importancia para la formación de nidos de ciertas especies de aves, y mayormente común de mamíferos (Anexo 2). Es por eso, que didélfidos como zarigüeyas y roedores (ratas y ratones) que se establecen y forman sus nidos en palmeras, son los que presentan en su mayoría triatominos en sus nidos (Miles *et al.*, 1983). En hábitats silvestres, los triatominos (en este caso *Rhodnius ecuadoriensis*) colonizan estos nidos de mamíferos para refugiarse y disponer de una fuente de alimento relativamente fácil, pero consecuentemente en ausencia de estas condiciones físicas óptimas para su desarrollo o por cambios en las condiciones del medio, pueden llegar a nuevas áreas, en donde establecerse y buscar alimento (Anexo 3). Los domicilios y sectores aledaños (peridomicilio) no son lugares de preferencia natural para estos insectos, sin embargo, la necesidad de alimento y una zona de refugio puede llevarlos a colonizar estos lugares, potencialmente acarreado consigo el parásito causante de la enfermedad (Guhl, 2009).

Es esta razón la que hace de las palmeras un factor de riesgo importante para la transmisión del *T. cruzi* en humanos (Grijalva *et al.*, 2005). En el caso de *P. aequatorialis* (palmera de tagua) en la costa ecuatoriana, por su importancia tanto económica como para la construcción, se encuentran cercanas a viviendas (entre 10 y 20 m) lo que facilita que en casos de condiciones adversas, un nido abandonado por parte del mamífero en donde habitaba individuos de *R. ecuadoriensis* busquen refugiarse y alimentarse de la sangre del mamífero. De la misma manera, por la falta de información de las personas de las comunidades en las cuales *P. aequatorialis* está presente y se utiliza como un recurso para

la construcción, muchas veces no se realiza el debido control y limpieza de las hojas que se utiliza para la elaboración de techos y cabañas. Por lo que se puede de manera involuntaria acarrear junto con la materia vegetal, a los triatominos que pueden habitar en estas palmeras, y así introducirlos dentro de los domicilios exponiendo a los habitantes a una potencial infección por vía vectorial (Sánchez-Martin *et al.*, 2006).

Phytelephas aequatorialis, constituye una fuente de ingresos económicos para los habitantes de las comunidades (Suarez-Dávalos, 2010); ya que los frutos de estas palmeras contienen un semilla dura conocida como marfil negro o marfil vegetal (Velásquez, 1998), el cual se utiliza en la elaboración de artesanías. Igualmente posee una importancia económica a gran escala dentro de esta provincia, ya que hasta la actualidad y desde los años 1960 y 1970, se han mantenido empresas que se dedican a la exportación de las semillas de tagua hacia Europa, principalmente para que sean utilizadas como materia prima en la elaboración de botones en la industria textil. Según datos del INEC para el año 2004, de las aproximadamente 100 000 toneladas de tagua que se produjo en el país, 50 000 fueron pertenecientes a la provincia de Manabí; donde alrededor de 35 000 habitantes se vieron involucrados en dicha actividad (Barford *et al.*, 1990; Brokamp *et al.*, 2014).

3.4.1. Riesgo de reinfestación en lugares con poblaciones silvestres de *Rhodnius ecuadoriensis*

Las iniciativas por parte de los organismos de control de salud en cada país, han sido muy importantes para tratar de reducir en cierta manera la incidencia de la ECh, los esfuerzos se basan principalmente en el control de la población vectorial, es decir, en reducir la

posibilidad de contacto con el vector (triatominos), y los seres humanos (Dias, 1994). Este control se basa principalmente en la aplicación de insecticidas dentro de las viviendas y en zonas peridomiciliarias. Sin embargo, estos controles se ven opacados por los riesgos de reinfestación que ocurren comúnmente debido a las poblaciones silvestres de vectores (Gürtler *et al.*, 1999).

Una vez que desaparecen las colonias establecidas en domicilio y peridomicilio debido a la aplicación de insecticidas, nuevas colonias provenientes de individuos que habitaban en ambientes silvestres, pueden llegar a establecerse de nuevo en los sitios donde se eliminó al vector (Abad Franch & Monteiro, 2005), haciendo que la efectividad de los controles, muchas veces sea temporal, y no definitiva.

3.5. Importancia del análisis filogeográfico

La filogeografía es considerada como el análisis espacial de linajes génicos (Avice *et al.*, 1987), y puede ser aplicada tanto a nivel interespecífico (con especies cercanamente emparentadas) como también intraespecífico (Lanteri & Confalonieri, 2003). Se busca utilizar a la filogeografía como la herramienta que nos permite realizar estudios de la distribución espacial de cierta característica de los individuos de una especie, ya sea morfológica o etológica (Lanteri & Confalonieri, 2003).

Por la relativa preferencia de *Rhodnius ecuadoriensis* hacia ocupar palmeras de tagua en algunas provincias del occidente del país, como Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas,

Los Ríos y Guayas, es importante lograr conocer cómo se relaciona la distribución espacial de estos insectos con referencia a la distribución de esta especie de palmera. Es decir, se aplica el estudio filogenético con respecto a la distribución espacial de una característica etológica como es, la preferencia de hábitat.

3.5.1. Uso de marcadores moleculares

Una de las características fundamentales de la biogeografía es que esta se basa principalmente en el estudio de ADN mitocondrial (ADNmt) para las especies animales y ADN cloroplástico (ADNcp) en plantas (Harrison, 1989). Entre las características principales del ADN mitocondrial se destaca, que es una molécula circular de ADN ubicada dentro de las mitocondrias de las células animales que no posee histonas en su estructura, lo que le permite tener una alta tasa de mutación a diferencia del ADN nuclear, además de no recombinar y ser de herencia casi exclusivamente materna (Lanteri & Confalonieri, 2003; Gillespe, 1986).

Uno de los marcadores predilectos para realizar estudios en el área de biogeografía es el citocromo B (mt Cyt B). La ventaja se encuentra en el hecho de que todas las mitocondrias de las células de un individuo poseen el mismo ADNmt, y gracias a que no tiene recombinación cada individuo presenta un haplotipo preponderante. Esta característica denominada homoplasmia, es determinante al momento de realizar análisis filogeográficos que tienen como unidad de estudio a cada individuo de una población, con la ventaja adicional de que las mutaciones en el material genético mitocondrial se fijan de una manera rápida, por un proceso similar a la deriva génica (Lanteri & Confalonieri, 2003).

Por este motivo, se ha utilizado este marcador molecular en triatominos para realizar análisis filogenéticos y establecer relaciones entre especies cercanas (Monteiro *et al.*, 2000), y de la misma forma para poder determinar el origen de la diversificación de especies pertenecientes a un complejo muy cercanas entre ellas (Díaz *et al.*, 2014)

Otro marcador utilizado para realizar este tipo de estudios es mtlsurRNA (mitochondrial large subunit ribosomal RNA), que al igual que el marcador mtCytB, es un marcador mitocondrial que en triatominos ha sido de mucha ayuda para poder establecer relaciones filogenéticas entre diferentes especies, y para poder comparar la variación que tienen las secuencias mitocondriales dentro del grupo de los triatominos vectores de la ECh (Lyman *et al.*, 1999).

Ambos genes o marcadores moleculares antes mencionados, se encuentran involucrados en cumplir funciones metabólicas básicas dentro de la célula. Por dichas razones se encuentran sometidos a una intensa presión de selección externa (Monteiro *et al.*, 2000). Razón por la cual, se considera el análisis de estos fragmentos de mucha ayuda para establecer relaciones taxonómicas entre especies de la tribu Rhodini (Lyman *et al.*, 1999).

3.5.2. Importancia del estudio biogeográfico de *Rhodnius ecuadoriensis* en el occidente del Ecuador

Es muy importante mejorar el conocimiento de la variación genética entre individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, con la distribución de los mismos en zonas donde se encuentran

palmeras de *Phytelephas aequatorialis*, esto servirá para evaluar la condición actual en la que esta especie se encuentra, los acontecimientos históricos que influenciaron en su distribución actual y establecer las relaciones que existen entre las posibles poblaciones que puedan evidenciarse.

También es fundamental lograr identificar el patrón de distribución de *Rhodnius ecuadoriensis* a lo largo de las zonas que presentan *Phytelephas aequatorialis*, con el fin de determinar nuevas zonas en las que puede estar presente este insecto, y qué tan expuestas se encuentran las personas que habiten en esos lugares.

Finalmente, la determinación de índices de variación genética, serán de mucha utilidad para los controles que se realicen; y así, en un futuro permitir el planteamiento de nuevos métodos de control, que no solamente se enfoquen en los hábitats peridomiciliar y domiciliar, sino también en buscar métodos de control y/o vigilancia silvestre que aseguren de cierta manera la disminución definitiva de la incidencia de la ECh en estos lugares. De esta forma permite conocer cuán efectivo va a ser el control según el sector en el que sea aplicado, es decir, que si un mecanismo de control es adecuado para todos los lugares donde está presente *Rhodnius ecuadoriensis*, o si la variación entre individuos de acuerdo al lugar donde se encuentran es lo suficientemente significativa, como para que un control sirva en ciertos lugares, mientras que en otros, sea ineficaz.

3.6. Objetivo General

- Determinar la relación filogeográfica entre localidades que presentan *Rhodnius ecuadoriensis* encontrados en las palmeras *Phytelephas aequatorialis* en la parte Occidental del Ecuador, mediante el uso de dos marcadores moleculares: **(i)** mt Cyt B y **(ii)** mtlsurRNA.

3.6.1. Objetivos Específicos

- Establecer la estructura genética de *Rhodnius ecuadoriensis* recolectados en hábitats silvestres y peridomiciliares de la parte occidental del Ecuador, mediante una red de haplotipos.
- Determinar la relación filogeográfica de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectadas en el hábitat silvestre, palmeras *Phytelephas aequatorialis*, en un gradiente latitudinal norte-sur de la región occidental de Ecuador, mediante el uso del marcador mitocondrial mt Cyt B.
- Establecer la relación filogeográfica de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectadas en el hábitat silvestre, palmeras *Phytelephas aequatorialis*, en un gradiente latitudinal norte-sur de la región occidental de Ecuador, mediante el uso del marcador mtlsurRNA.

- Comparar los resultados que se obtendrán mediante el uso de los dos marcadores moleculares (mt Cyt B y mtlsurRNA), para establecer si existen o no diferencias significativas entre ambos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Área de estudio

La región occidental del Ecuador, en la que se realizó la búsqueda de los individuos de *Rhodnius ecuadoriensis* en palmeras de *Phytelephas aequatorialis*, comprende las provincias de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos y Guayas; en un rango altitudinal que va desde los 500 hasta los 1500 metros sobre el nivel del mar en la zona tropical y subtropical.

Esta es una de las zonas de mayor influencia de comercio y paso de vehículos en todo el Ecuador, debido a la importancia agrícola y ganadera del sector, que hacen que el transporte pesado y liviano en toda la zona sea continuo durante todo el día (Withaker *et al*, 1990).

4.1.1. Manabí

La provincia de Manabí se encuentra al noroccidente del Ecuador y ocupa una extensión territorial de 18.400 Km². Esta provincia posee varias zonas que difieren entre sí, en cuanto a condiciones como temperatura y humedad; por consiguiente presentan ciertas diferencias en flora y fauna (Sierra, 1999). Políticamente se divide en 22 cabeceras cantonales las cuales poseen comunidades rurales en las que habitan personas mayoritariamente de bajos recursos económicos, la mayoría de estas personas, emplean para la construcción de sus

viviendas la caña guadua (*Guadua angustifolia*) para las paredes de las mismas, y para los techos se utiliza zinc en ciertos casos; mientras que en otros, las hojas extraídas de las palmeras (*Phytelephas aequatorialis*) son la opción más económica y rápida para terminar una vivienda (Grijalva *et al.*, 2011).

4.1.2. Santo Domingo de los Tsáchilas

La Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas se encuentra ubicada en las estribaciones externas de la cordillera occidental de los Andes, y su territorio ocupa una superficie de 3.857 km². Es una provincia caracterizada por su alta pluviosidad, de manera que consta de varios ríos que van a lo largo de todo su territorio, con un clima subtropical en zonas cercanas a las cadenas montañosas de la cordillera de los Andes y tropical en las zonas más cercanas a la costa; es una de las provincias que se incluye dentro de la distribución de la palmera *Phytelephas aequatorialis* gracias a sus características en cuanto a humedad y temperatura.

4.1.3. Los Ríos

Los Ríos es una provincia ubicada en la zona centro occidental del Ecuador que comprende una superficie de 6.254 km², caracterizada por ser una zona de planicies vastas donde su altura máxima, en cuanto al nivel del mar no sobrepasa los 500 metros en ciertas elevaciones.

Su nombre se debe a la amplia red de fuentes hidrográficas que atraviesan su territorio, haciendo de esta provincia una de las más importantes en cuanto a producción agrícola se refiere. Igualmente, su clima cálido y la humedad del ambiente contribuyen para una diversidad de flora y fauna en ciertas zonas. En esta provincia se emplea las semillas de tagua de *Phytelephas aequatorialis* para la exportación como materia prima utilizada en la elaboración de productos para la industria textil.

4.1.4. Guayas

La provincia de Guayas se encuentra ubicada en la parte sur occidental del Ecuador, con una extensión de 17.139 Km²; en una zona de la llanura central del litoral ecuatoriano y se encuentra a su vez atravesada por una cadena montañosa denominada, Chongón Colonche; que se extiende hasta la provincia de Manabí, sin embargo dichas elevaciones no sobrepasan los 1.000 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Holguín Arias, 2003).

Su temperatura promedio es de 25 °C con una mayor evaporación, que precipitación en su zona costera, por lo que ciertas zonas son de tipo desértico. Sin embargo, en ciertas regiones más cercanas a la zona central del Ecuador existen mayores niveles de humedad, que al mismo tiempo son condiciones necesarias para poder encontrar ciertos lugares en los que se encuentran palmeras, entre ellas las palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*).

4.2. Recolección de Triatominos

El método de recolección consiste en la búsqueda de palmeras en un rango de hasta 500 metros de distancia de los domicilios (Sánchez, 2015), de las comunidades visitadas durante los años 2010 y 2011 cuando se realizaron búsquedas domiciliarias y peridomiciliarias. Una vez establecida la palmera en la cual se va a realizar la colecta, se determina: **(i)** La cantidad de materia orgánica que la palmera presenta, observando si existe suficiente material orgánico acumulado alrededor de la palmera que puedan representar un potencial refugio para mamíferos; **(ii)** Búsqueda de nidos de mamíferos entre las hojas de las palmeras y **(iii)** Altura de la palmera, para determinar su accesibilidad.

Se procedió a posicionar de manera adecuada una escalera y evaluar la posición de la persona que va a empezar la búsqueda en la parte superior. Antes de iniciar, la persona a cargo de la revisión de la palmera, debe colocarse prendas de protección como guantes de látex y cuero, chaqueta con mangas largas para la protección de los brazos, gafas y mascarilla; además de un arnés de seguridad perfectamente colocado para evitar accidentes (Sánchez, 2015).

La búsqueda se realizó en la parte superior de la palmera y en las coyunturas de las hojas con el tallo, para poder sacar materia orgánica y nidos de mamíferos que posteriormente se analizaron en un plástico ubicado en la base del tallo de la palmera, el cual fue de color rojo o de un color que contraste con la materia orgánica recogida (Sánchez, 2015). Una vez que los nidos y la materia orgánica fueron colectados se procedió a su análisis en el

plástico de color, mediante el método de muestreo directo se procedió a desarmar los nidos formados por materia vegetal con el fin de dejar sin refugio a los triatomíneos y facilitar que estos insectos sean visibles (Villacís, 2011).

De la misma manera se examinó la materia orgánica (hojarasca) que cayó durante la búsqueda con el fin de encontrar el máximo o la totalidad de triatomíneos presentes en cada palmera (Suárez- Dávalos, 2010). Los triatomíneos encontrados fueron almacenados en frascos estériles, cada uno correctamente etiquetado con la información del lugar de colección, la fecha, coordenadas, comunidad y un código que se le asignó a cada una de las palmeras analizadas (Sánchez, 2015) (Figura 7).

En el año 2013, dentro de la provincia de Manabí se recolectaron individuos de *Rhodnius ecuadoriensis* en 284 palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*), las cuales se encontraban distribuidas en 74 comunidades. Se realizó una búsqueda manual a las palmeras antes mencionadas, las cuales albergaban nidos de ratas (*Rattus rattus*), zorros (*Didelphis marsupialis*) y otros mamíferos. Como resultado de este estudio se recolectó un total de 791 individuos de *Rhodnius ecuadoriensis* (de todos los estadios), los cuales fueron llevados al Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Crónicas (CIEIC) para su posterior almacenamiento y registro (Sánchez, 2015).

En el caso de las provincias de Los Ríos y Santo Domingo de los Tsáchilas, en el año 2015, las palmeras fueron escogidas tomando en cuenta su altura, la frondosidad que presentaban, la presencia de plantas epífitas y/o parásitas y la presencia de nidos de aves o

mamíferos; esto con el fin de examinar las palmeras en las que exista la mayor probabilidad de encontrar triatomos.

Las muestras de la provincia de Guayas, fueron recolectadas de acuerdo a la publicación de Grijalva *et al.*, (2010), la recolección se realizó en el año 2003. Los individuos de *R. ecuadoriensis* pertenecientes al hábitat peridomiciliar que fueron utilizados para realizar la comparación con el hábitat silvestre, fueron recolectados en el cantón Portoviejo, Manabí en los años 2006 y 2007 tal como se menciona en Villacís *et al.*, (2010) y Grijalva *et al.*, (2011).

4.2.1. Permisos de Investigación.

En la Provincia de Manabí, los triatomos fueron recolectados en las diferentes comunidades bajo el permiso de colección N°005-12-IC-FAU-DNB/MA (Sánchez, 2015). Para la recolección de Triatomos que se efectuaron en las Provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos, se realizó los trámites pertinentes, y se logró obtener el permiso de investigación N°004-15-IC-FAU-FLO-DNB/MA (Anexo 4), con el fin de obtener muestras que representen otras zonas de la región occidental del Ecuador que no correspondan a la Provincia de Manabí e ingresarlas en la base de datos de estudio (Anexo 5).

4.3. Extracción de ADN de *Rhodnius ecuadoriensis*

Se procedió a extraer el ADN a partir de patas, de aproximadamente de 100 individuos adultos de *Rhodnius ecuadoriensis* correspondientes a las provincias antes mencionadas, utilizando el kit de extracción de ADN de sangre y tejido (Qiagen) (Anexo 6) (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Se procedió a extraer las patas de los insectos, procurando que no se pierda ninguna y que se encuentren completas, las patas fueron lavadas con alcohol al 70% y secadas con papel absorbente, posteriormente se empezó a cortar las patas de cada individuo con ayuda de una hoja de bisturí en cajas petri de vidrio individuales, hasta obtener pequeños pedazos. Estos pedazos fueron trasladados a tubos ependorf de 1,5 ml debidamente etiquetados con el código de cada insecto, se agregaron 200 ul de tampón ATL y se utilizó el vórtex para mezclar la muestra durante 10 segundos. Luego se añadió 20 ul de proteinasa K en cada muestra, se mezcló nuevamente mediante vórtex, durante 10 segundos, y se procedió a la maceración mediante el uso de un pistilo estéril. Luego de aproximadamente 2 minutos de maceración con el pistilo en cada muestra y de obtener turbidez en el tubo, se llevó las muestras a una incubadora para dejarlas a 55° C durante toda la noche, para lograr una lisis completa de todos los compuestos proteicos que componen las patas de los insectos. Transcurrido este tiempo se retiró las muestras de la incubadora y fueron mezcladas por vórtex durante 15 segundos. Después se agregó 200 ul de búfer AL a cada muestra e inmediatamente fueron sometidas al vórtex por 10 segundos. Se incubó las muestras a 70° C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K, una vez realizado este proceso se retiraron las muestras de la incubadora y se les agregó 200 ul de etanol al 100% y se mezcló todo mediante vórtex. Se procedió a pasar toda la cantidad posible de muestra líquida, evitando tomar los pedazos de patas, a la columna debidamente etiquetada; posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm durante un

minuto. Se descartó el tubo que contenía el líquido que bajo de la columna y se colocó la misma en un nuevo tubo de recolección; se añadió 500 ul de búffer AW1 en la columna para luego centrifugar a 8000 rpm durante un minuto. Los tubos de recolección fueron desechados y la columna fue nuevamente trasladada a un nuevo tubo; posterior a esto, se añadió 500 ul de búffer AW2 y se centrifugó durante tres minutos a máxima velocidad. Una vez finalizado este proceso se desechó de nuevo el tubo de recolección y se pasó la columna a un nuevo tubo (definitivo) con tapa, debidamente etiquetado en el cual se almacenó el ADN. Por último, se agregó 50 ul de búffer AE, se dejó incubar a condiciones ambientales durante 1 minuto con la tapa abierta y se centrifugó las muestras a 8000 rpm durante 1 minuto, se repitió el mismo paso una segunda vez, para que al final podamos desechar la columna y conservar el tubo en el cual se obtuvieron 100 ul de ADN suspendido en búffer AE. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

4.4. Cuantificación y dilución de ADN

Una vez realizadas las extracciones de ADN se procedió a la cuantificación de las muestras mediante el uso de un espectrofotómetro (NanoDrop 1000 Thermo Scientific), para determinar la concentración (ng/ul) de material genético de cada individuo.

Una vez conocida la concentración de cada muestra, se procedió a realizar diluciones a 5 ng/ul de las mismas, para tener un stock que posea la misma concentración y de esta manera, lograr mejores resultados en el momento de la amplificación.

4.5. Amplificación de ADN

Para la amplificación del citocromo B (mt Cyt B) se utilizó un volumen final de 50 μ l, que contenían 25 μ l Green Master Mix (Promega), 9 μ l H₂O ultra pura, 4 μ l de cada primer (Forward y Reverse) a una concentración de 10 μ M y 8 μ l de ADN a una concentración de 5 ng/ μ l. El mt Cyt B fue amplificado usando los primers: Cyt b7432F, 5'-GGAC-(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC, y Cyt b7433R 5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA (Monteiro *et al.*, 2003), en las siguientes condiciones: 1 ciclo 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 45°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto y finalmente 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos (Anexo 7).

Para el análisis del mtlsurRNA, se realizaron reacciones de PCR en un volumen final de 30 μ l, que contenía: 5 μ l de buffer Go green (Promega), 2 μ l de cloruro de magnesio MgCl 25 mM (Promega), 0,5 μ l de DNTp Mix (Promega), 1,5 μ l de cada primer (Forward y Reverse), 0,2 μ l de GoTaq Flexi DNA (Promega), 12,3 μ l de H₂O y 7 μ l de ADN de concentración 5 ng/ μ l (Anexo 10). Las secuencias utilizadas para los primers mtlsurRNA fueron: LRN Forward (LRN13393A): 5'-CATCTGTTTAWCAAARACAT-3' y LRN Reverse (LRJ12966): 5'-AAAAAATAACGCTGTTATCCCTAAAGTAA-3' (Monteiro *et al.*, 2000). Las condiciones para la amplificación del fragmento fueron las siguientes:

1 ciclo a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 47°C durante 30 segundos y 72°C durante un minuto, y finalmente, 1 ciclo a 72°C durante 7 minutos (Monteiro *et al.*, 2000) (Anexo 8).

4.6. Secuenciación y análisis del ADN de *Rhodnius ecuadoriensis*

Una vez que se realizó la amplificación con los distintos marcadores moleculares establecidos para este análisis y de confirmar dichos resultados mediante un gel de agarosa al 1% (Anexo 9), se procedió a enviar las muestras a MACROGEN (Corea del Sur) para su posterior purificación y secuenciación (Anexo 10).

Para esto se procedió a enviar un volumen de 25 ul de cada uno de los productos de la PCR en tubos ependorf de 1,5 ml, para que sean purificados antes del proceso de secuenciación. Una vez que las muestras fueron secuenciadas, se procedió a la revisión de la calidad de las mismas mediante el uso del software UGENE 1.17.0 (Unipro, 2015). Para la obtención de la secuencia consenso se empleó el Software DNA Baser Assembler v4 (Heracle Biosoft), y para la verificación de los fragmentos correctos para el estudio se procedió a realizar un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI, 2015) de cada una de las secuencias recibidas de los dos marcadores utilizados.

El alineamiento fue realizado mediante el software Mega v6.0 (Tamura *et al.*, 2013) (Anexo 11), se realizó un alineamiento general con todas las secuencias en un solo análisis. Una vez concluida esta fase, las secuencias se encontraron listas para realizar los posteriores análisis utilizando diferentes programas computacionales según nuestro interés.

Se trabajó en el programa DnaSP v5.0 (Rozas *et al.*, 2009), para obtener: **(i)** la composición nucleotídica promedio, **(ii)** el número de sitios polimórficos (variables sites),

(iii) el número de sitios únicos (singleton sites), (iv) asignación de número de haplotipos (h), y (v) se evaluó estimadores de variabilidad genética como: (a) La diversidad haplotípica (H_d), (b) el índice de diversidad nucleotídica (π), (c) el índice de polimorfismo de nucleótidos. Mediante el programa J Model Test v2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012), se procedió a establecer estadísticamente cual era el mejor modelo de sustitución nucleotídica al que se ajustaban nuestros datos (Anexo 12).

El Software MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013), nos permitió estimar la distancia genética estándar (d), distancia genética dentro y entre poblaciones, mediante modelo que presente el mejor criterio de optimalidad basado en el menor valor para el criterio de información bayesiano (BIC), siendo el T92 (+G) (Tamura 3 parámetros) y el TN93 (Tamura-Nei) los modelos que mejor se adaptaron a nuestros datos para el mt Cyt B y para el mtlsurRNA respectivamente. También se pudo determinar las frecuencias de los haplotipos que se encontraron y finalmente, se realizó la construcción de dendrogramas utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (1000 repeticiones).

Se utilizó el programa BEAST v1.8.2 (Drummond & Bouckaert, 2015), para realizar análisis bayesianos y obtener un árbol filogenético. Para ello, se empleó los resultados del análisis del programa BEAST v1.8.2 (Drummond & Bouckaert, 2015) y se los editó mediante la extensión del mismo software denominado Tree annotator v1.8.2, para finalmente graficar el árbol filogenético mediante el programa FigTree v1.4.2. (Rambaut, 2014).

Para establecer conexiones de red (Median Joining Networks) entre los haplotipos de las diferentes localidades en las que se recolectaron los individuos de *Rhodnius ecuadoriensis* se utilizó el programa Network v5.0 (Fluxus Techonolgy Ltd.) (Anexo 13). También mediante el software Arlequin v3.5.2 (L. Excoffier, Universidad de Berne) se realizaron los análisis antes mencionados para establecer la mejor opción.

Con el fin de comparar diferentes zonas dentro del sector occidental del Ecuador, los análisis que se realizaron fueron establecidos de la siguiente manera: **(i)** La comparación general de todos los individuos de hábitat silvestre, que fueron recolectados en palmeras de *Phytelephas aequatorialis*, y para los cuales se tienen secuencias datos en las tres provincias (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas), **(ii)** El análisis de las poblaciones de *Rhodnius ecuadoriensis* recolectados en hábitat silvestre en la provincia de Manabí en 32 comunidades de 14 cantones (Figura 8).

Lo anteriormente planteado, nos permitirá conocer el nivel de variabilidad genética de esta especie de triatomino en la zona occidental del Ecuador, en su hábitat silvestre. Además nos ayudará a comprender de mejor manera las diferencias que puedan existir entre los individuos recolectados en diferentes cantones y provincias para relacionar estos resultados con la importancia económica que tiene en esta zona *P. aequatorialis*, que a su vez es el principal micro hábitat de esta especie de insecto. De la misma manera, es muy importante establecer si existen diferencias genéticas entre individuos recolectados en hábitat silvestre con individuos de peridomicilio, para poder comprender el proceso de colonización que se puede dar hacia los hábitats sinantrópicos a partir de las zonas silvestres, y por ende el incremento del riesgo de infección en los seres humanos.

5. RESULTADOS

5.1. Recolección y selección de muestras para el análisis de la zona occidental del Ecuador (Manabí, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas)

Se lograron recolectar 6 individuos de *Rhodnius ecuadoriensis* dentro de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas en dos localidades: Las Orquídeas y La Unión del Toachi, en un total de 11 palmeras. Para la provincia de Los Ríos, no se encontraron individuos de *R. ecuadoriensis* en 10 palmeras que se realizó la búsqueda.

Las extracciones de ADN se realizaron exitosamente utilizando patas de 68 individuos de *Rhodnius ecuadoriensis* que se recolectaron en la provincia de Manabí en el año 2013 (Sánchez, 2015), también se extrajo ADN de individuos recolectados en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas en el 2015, además de utilizar muestras de la Provincia de Manabí, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas; obtenidas en: Villacís, 2011 y Abad-Franch, datos no publicados, que se tenían como archivo y que corresponden al fragmento mt Cyt B. Todas estas muestras fueron reunidas con el fin de alcanzar aproximadamente 105 individuos para el análisis (Tabla 1). La amplificación de los fragmentos de interés por medio de los dos marcadores moleculares se comprobó mediante geles de agarosa al 1% en el caso del mt Cyt B; y con geles al 3% para el mtlurRNA.

5.2. Estimadores de la variabilidad genética de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis* en la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo y Guayas), mediante el uso de los marcadores moleculares mt Cyt B y mtlurRNA

Para obtener los índices de variabilidad genética en el marcador mt Cyt B se utilizaron un total de 105 individuos de *R. ecuadoriensis*, recolectados en palmeras de tagua. Se pudo observar que no existen inserciones, ni deleciones dentro del total de secuencias analizadas. Se encontraron un total de 29 sitios variables o polimórficos $S_{TOTAL} = 29$, de los cuales 28 fueron mutaciones sinónimas y una no sinónima, lo que equivale al 4,82% de la longitud total del fragmento analizado (600 bp). El número de sitios informativos de parsimonia fue 22 y dentro de los individuos en esta zona se obtuvo 7 sitios únicos o "singleton sites" en las posiciones 127, 164, 178, 496, 532, 541 y 562.

Dentro de los principales índices de variabilidad genética, podemos destacar una diversidad haplotípica (H_d) de los individuos de la zona, que en este caso fue $H_{dTOTAL} = 0,877 \pm 0,021$; mientras que la diversidad nucleotídica fue de $\pi_{TOTAL} = 0,0085$ (Tabla 2). La composición nucleotídica se distribuyó de la siguiente manera: Citosina (C = 18,9%), Adenina (A = 31,6%), Timina (T = 37,3%) y Guanina (G = 12,2%).

Para el análisis del fragmento mtlurRNA, se utilizaron las secuencias de los individuos de la provincia de Manabí recolectados en *P. aequatorialis* durante el año 2013. Además se utilizó un back up de ADN almacenado en el CIEIC perteneciente a la misma provincia, que también incluyó dos secuencias: dos de Guayas y otra de Santo Domingo; y finalmente

las secuencias de los individuos recolectados en la salida de campo a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, realizada en Agosto del 2015.

El fragmento analizado fue de 388 bp, se encontró un total de 8 sitios polimórficos o variables $S_{TOTAL} = 8$, que representa el 2,06% de la longitud del fragmento, todas las mutaciones fueron sinónimas. Los sitios informativos de parsimonia fueron 5 y se determinaron 3 sitios únicos "singleton sites" en las posiciones 124, 272 y 346. La diversidad haplotípica (Hd) fue $Hd_{TOTAL} = 0,669 \pm 0,027$; mientras que la diversidad nucleotídica obtenida fue $\pi_{TOTAL} = 0,0029$ (Tabla 3). La composición nucleotídica se distribuyó de la siguiente manera: Citosina (C = 8,2%), Adenina (A = 31,0%), Timina (T = 43,0%) y Guanina (G = 17,7%).

Las distancias genéticas en función de la distribución de las frecuencias de pares de bases dentro de los genes analizados, fueron bajas entre individuos y entre provincias tanto para el mt Cyt B (Tabla 4), como para el mtlstrRNA (Tabla 5).

5.3. Test de neutralidad selectiva Tajima's D en tres provincias de la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas)

La prueba de neutralidad selectiva denominada Tajima's D, fue calculada para poder inferir si la población de las tres provincias se encuentra en crecimiento o si al contrario la población decrece. El resultado para el mt Cyt B fue $D_{zona\ occidental} = -0,349$, mientras que

para el mtlsurRNA fue $D_{\text{zona occidental}} = -0,8539$. En ambos marcadores los valores fueron negativos, lo que nos sugiere que esta población se encuentra en incremento.

Adicionalmente, se procedió a realizar esta prueba en cada una de las provincias con el marcador mt Cyt B. En la provincia de Manabí se obtuvo un valor $D_{\text{Manabí}} = -0.319$ que nos indica que la población se encuentra en incremento, al igual que en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en donde el valor fue de $D_{\text{Santo Domingo}} = -1.830$. Para la provincia de Guayas, no se pudo realizar esta prueba debido a los pocos individuos que se obtuvieron, lo que hace que el análisis no sea confiable.

5.4. Análisis filogenético de *Rhodnius ecuadoriensis* en tres provincias de la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas)

Se procedió a elaborar una lista de haplotipos con las secuencias correspondientes a las tres provincias, mediante el análisis del fragmento de mt Cyt B. Se obtuvieron 29 haplotipos (Tabla 6), se pudo observar un total de 13 haplotipos compartidos entre las diferentes localidades, siendo el más común el haplotipo 1 (HEO1) con 29 individuos, seguido por los haplotipos (HEO13) 19, (HEO5) 10, (HEO3) 8, (HEO8) 4, (HEO2) 3, (HEO7) 3, (HEO9) 3, (HEO18) 3, (HEO10) 2, (HEO14) 2, (HEO16) 2 y (HEO19) 2 individuos. En el haplotipo 1 (HEO1) se observó algunas de las secuencias pertenecientes a la provincia de Manabí, compartiendo este grupo junto con 11 secuencias de Santo Domingo de los Tsáchilas. Lo mismo se evidenció en el haplotipo 9 (HEO9), en el que el grupo se conformó por secuencias de ambas provincias (Manabí y Sto. Domingo de los Tsáchilas).

Los 16 haplotipos restantes únicamente estaban conformados por un solo individuo, y correspondieron a la provincia de Manabí y 2 haplotipos (HEO11 y HEO12) pertenecientes a Guayas.

Mediante el uso del marcador *mtlsurRNA*, se determinaron un total de 10 haplotipos (Tabla 7). Cuatro de ellos fueron compartidos (HEO1, HEO2, HEO3 y HEO5) entre las localidades. El haplotipo 1 (HEO1) se encuentra conformado por 41 individuos, los cuales pertenecen a la provincia de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas. De la misma manera el haplotipo 2 (HEO2) se conforma por 41 individuos, 40 de Manabí y uno de Santo Domingo. El resto de haplotipos compartidos y no compartidos pertenecen únicamente a Manabí.

5.4.1. Filogenia mediante Neighbour Joining

Para el marcador *mt Cyt B* el modelo T92+G (Tamura 3 parámetros) con distribución Gamma discreta (+G), fue el mejor para nuestro análisis. Se construyó la filogenia, utilizando nuestros individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, junto con secuencias obtenidas del GenBank (KC543507.1) (KC543510.1) (KC543509.1) (KC543508.1) y como grupos externos se usaron secuencias publicadas en Díaz *et al.* (2014) correspondientes a *Rhodnius pallescens* (FJ225391.1), (JQ686689.1) y *Rhodnius colombiensis* (FJ229360.1), (KC543506.1).

Basado en la mínima evolución mediante el algoritmo Neighbour Joining (NJ) con un bootstrap (BT) de 1000 repeticiones y sustitución nucleotídica, se obtuvo el árbol mostrado en la figura 9. Se evidenció la monofilia de *Rhodnius ecuadoriensis*, ya que se observa un BT= 100% en el nodo I. Los valores BT para los grupos externos fueron 99% para *Rhodnius pallescens* y 100% para *Rhodnius colombiensis*. Los nodos externos e internos dentro de las secuencias correspondientes a *Rhodnius ecuadoriensis*, no se encontraron valores de BT superiores a 80%; lo que nos permite evidenciar la ausencia de una estructura intraespecífica, salvo por el grupo del nodo II (BT= 84%), que se conforma por los haplotipos HEO11, HEO21, HEO19, HEO13 y HEO28; que corresponden a la provincia de Manabí excepto por HEO11, que pertenece a Guayas.

Para el marcador mtlSurRNA se estableció a TN93 (Tamura - Nei) como el mejor modelo para nuestros datos. Se realizó la filogenia, únicamente con los individuos colectados en este estudio, utilizando el algoritmo de Neighbour Joining (NJ) con un bootstrap (BT) de 1000 repeticiones y sustitución nucleotídica. En el árbol se pudo observar únicamente el origen monofilético de *R. ecuadoriensis*. Los valores BT para los nodos internos y externos obtenidos no sobrepasan el 65% (BT), lo que nos indica una ausencia de variación suficiente para establecer relaciones claras entre haplotipos excepto por el Nodo dos que agrupa a los haplotipos HEO3 y HEO5, con un valor BT= 83% (Figura 10).

5.4.2. Filogenia mediante método Bayesiano

Se realizó la filogenia mediante el método bayesiano utilizando el programa BEAST v1.8.2 (Drummond & Bouckaert, 2015), la extensión del mismo programa denominada TreeAnnotator v1.8.2 para eliminar los árboles que se establecen al inicio del análisis, y así poder tener únicamente los árboles de mayor veracidad. Posteriormente, se procedió a graficar la filogenia en el programa FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2014).

Para mt Cyt B se establecieron los siguientes parámetros: modelo de sustitución HKY (Hasegawa-Kishino-Yano), número de categorías gamma 4, frecuencias base estimadas, MCMC: largo de la cadena 10000000, y se realizó un burnin para eliminar los 1000 primeros árboles. De esta manera, se obtuvo un árbol cuyas probabilidades posteriores bayesianas (PPB) fueron mayores a 0,95 para los nodos externos (Figura 11). Se pudo observar un PPB= 1 para el nodo I, al igual que para sus grupos externos (*R. colombiensis* y *R. pallescens*). Dos grupos se encuentran establecidos mediante el valor de probabilidad del nodo 2 (PPB= 100%), el nodo 3 posee un valor igualmente significativo de PPB= 0,95, que nos indica que el grupo de individuos dentro de esta rama se encuentra correctamente establecido, y se divide en 2 subgrupos, uno correspondiente al nodo 4 (PPB= 0,43) que nos indica que el subgrupo carece de estructura; y el otro subgrupo correspondiente al nodo 5 (PPB= 0,93). El nodo 6 (PPB= 0,48) nos muestra una agrupación que de igual manera carece de estructura intraespecífica.

Para el mtlsurRNA se utilizaron el mismo modelo evolutivo y los mismos parámetros que para el mt Cyt B. En el árbol se puede observar que el nodo entre los individuos de *R.*

ecuadoriensis y el grupo externo (*R. palleescens*) (AF045706.2) posee un valor PPB de 1, lo que nos confirma el origen monofilético de la especie. En esta filogenia sólo se observó que el PPB del nodo II (0,97) es el que presentó un soporte aceptable, conformado por tres haplotipos (HEO3, HEO5 y HEO8), pertenecientes a la provincia de Manabí. Cabe mencionar que son haplotipos conformados por pocos individuos (HEO3 y HEO5) o por un solo individuo como es el HEO8 (Figura 12).

Además, se concatenó la información de ambos genes y se construyó una filogenia mediante análisis bayesiano con los parámetros antes mencionados para cada uno de los marcadores. En este árbol se observó un valor PPB= 1 (100%) para el nodo 1, que indica un soporte aceptable para la relación de los haplotipos de *R. ecuadoriensis* con su grupo externo (*R. palleescens*). Existen dos grupos claramente separados con un soporte alto, que corresponde al nodo 2 (PPB=1). Podemos observar que en los nodos internos el nodo 3 mostró un valor de (PPB=0,99) y agrupa a los haplotipos HEO1, HEO2, HEO3, HEO4 y HEO5. Se observó también la agrupación de los haplotipos HEO6 con el HEO8 y del HEO7 con el HEO9 con probabilidades posteriores bayesianas mayores a 0,95 (Figura 13).

5.5. Relación entre haplotipos de la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas)

Para el análisis de la relación de los haplotipos obtenidos con los datos del mt Cyt B de las tres provincias de la zona occidental (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas), se realizó una red haplotípica (Figura 14). Se determinó que del total de los 29 haplotipos,

13 son compartidos entre individuos de las diferentes provincias. En el haplotipo 1 (HEO1) se observó individuos de la provincia de Manabí representados dentro de la red por el color verde, e individuos de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas en color naranja. Otro haplotipo compartido entre dos provincias es el HEO9 conformado igualmente por individuos de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas. El resto de haplotipos compartidos se muestran únicamente en color verde, debido a que se agrupan individuos sólo de la provincia de Manabí.

Los 16 haplotipos restantes se encontraron establecidos únicamente por un individuo, y dentro de estos se pudo observar haplotipos de Manabí (HEO4, HEO6, HEO15, HEO17, HEO19, HEO20, HEO21, HEO22, HEO23, HEO24, HEO25, HEO26, HEO27, HEO28), y también encontramos haplotipos de la provincia de Guayas que son: HEO11 y HEO12. Para esta red haplotípica fueron inferidos dos ancestros hipotéticos que se muestran como puntos de color rojo, uno de ellos se encuentra entre el HEO20 y el HEO22, mientras que el segundo une a los haplotipos HEO6 y HEO11.

Para el mtlurRNA se estableció de la misma manera una red haplotípica (Figura 15), para poder determinar la relación entre los diferentes haplotipos encontrados. El haplotipo 2 (HEO2), conformado por individuos de las tres provincias fue el haplotipo central. A partir de este se derivan cinco haplotipos, de los cuales cuatro corresponden a un solo individuo (HEO6, HEO9, HEO10, HEO7), mientras que HEO1 conformado por 41 individuos de dos provincias. En esta red existió únicamente un ancestro inferido entre los haplotipos HEO3 y HEO4.

5.6. Diferenciación genética (G_{st}) y Flujo génico (N_m) en la zona occidental del Ecuador (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas)

Para el análisis de la diferenciación genética se evaluó tanto a nivel de secuencias, como de haplotipos de *R. ecuadoriensis* que pertenecen a la zona occidental. En el análisis en función de las secuencias (Hudson *et al.*, 1992) se encontró que para el mt Cyt B un $F_{ST}=0,265$ y el número de migrantes fue de $N_m=1,38$. Mientras que para el mtlurRNA el $F_{ST}=0,387$ y el número de migrantes fue de $N_m=0,79$. Ambos genes nos indican una diferenciación moderada-alta entre las secuencias de la zona analizada.

Mediante el análisis de Nei (1973) se procedió a determinar el valor de G_{ST} , para establecer la diferenciación genética entre los haplotipos. Es así, como para el mt Cyt B se obtuvo un $G_{ST}=0,114$ y el número de migrantes fue de $N_m=3,87$, mientras que para el mtlurRNA el $G_{ST}=0,293$ y el número de migrantes fue de $N_m=1,20$, lo que sugiere una diferenciación moderada-alta entre los haplotipos de la zona occidental.

En el mt Cyt B, la comparación entre provincias, se encontró que las menos diferenciadas son Manabí con Santo Domingo de los Tsáchilas ($G_{ST}=0,078$), seguida por Manabí con Guayas ($G_{ST}=0,107$); mientras que se observó una diferenciación elevada entre Guayas y Santo Domingo ($G_{ST}=0,301$). Al analizar el mtlurRNA, se observó de igual manera que la mayor diferenciación se encontraba entre Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas ($G_{ST}=0,537$), seguida por Manabí y Guayas ($G_{ST}=0,117$) y la menor diferenciación fue entre Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas ($G_{ST}=0,052$).

5.7. Análisis de los haplotipos de *Rhodnius ecuadoriensis* en 14 cantones de la provincia de Manabí

Adicionalmente al análisis que se realizó sobre la variabilidad genética y la diferenciación de los individuos de la zona occidental del país, separando a los individuos por cada provincia en la que fueron recolectados, se estableció un segundo análisis enfocado en la Provincia de Manabí; lugar donde se tienen la mayor cantidad de datos y se recolectaron individuos de *R. ecuadoriensis* en palmeras de tagua a lo largo y ancho de la provincia durante el año 2013.

Es así, como se realizó el análisis de 14 de los 22 cantones de Manabí, en los cuales se recolectaron individuos para establecer si existen diferencias entre los cantones dentro de la provincia, y observar cómo se distribuyen espacialmente los linajes genéticos en la zona. Los cantones para los que se obtuvieron secuencias fueron: Portoviejo, Pedernales, El Carmen, Olmedo, Puerto López, Jama, Pichincha, Jipijapa, Rocafuerte, Santa Ana, Junín, Chone, San Vicente y Paján (Tabla 7).

Se realizó una red haplotípica para el mt Cyt B, en la que se asignó un color diferente para cada uno de los cantones (Figura 16). Donde se observó un total de 27 haplotipos, de los cuales nueve son compartidos por dos o más cantones. Por ejemplo, podemos observar el haplotipo 1 (HEM1), que se formó por individuos de cuatro cantones (Portoviejo, Pichincha, San Vicente y Puerto López). Otro haplotipo grande fue HEM5, que se compone de individuos de Portoviejo, Pedernales, Jipijapa, Jama y Santa Ana. El haplotipo más diverso en cuanto a los cantones que lo conforman, es el HEM11, conformado por

individuos de ocho cantones; mientras que dentro de los haplotipos compartidos, los individuos de Portoviejo son los más comunes. El Carmen es el único cantón que no forma parte de los haplotipos compartidos.

En la tabla 7, se observó la distancias expresadas en valores del promedio de sustitución de bases por cada sitio dentro de las secuencias analizadas, dentro de los cantones más cercanos pudimos observar a Rocafuerte y el Carmen, Jama con Chone y Rocafuerte con Junín, con un valor $G_{ST}= 0,0051$; mientras que la mayor distancia encontrada fue entre Chone y Olmedo con un valor $G_{ST}= 0,0153$.

De la misma manera se procedió al análisis de las secuencias del mtl_{sur}RNA. En la red haplotípica que se realizó, se asignó un color específico para cada cantón (Figura 17). Donde los haplotipos HEO1 y HEO2, fueron conformados por varios cantones. En el caso del haplotipo 1 (HEO1), en su mayoría se conforma por individuos de Portoviejo, seguidos por individuos de Jama, Pichincha, Jipijapa, Puerto López, San Vicente y Paján. El haplotipo más diverso fue el HEO2, que se conforma por individuos pertenecientes a 11 de los 14 cantones que se incluyeron en el estudio. No existieron cantones aislados, es decir, que se los encuentre en haplotipos individuales.

En la matriz de distancias genéticas entre los diferentes cantones (Tabla 8), se pudo observar que las mayores distancias se dan entre Paján, con Puerto López y Jipijapa. En la diferenciación entre los haplotipos mediante el análisis de Nei (1973), se estableció un valor $G_{ST}= 0,291$ que nos sugiere una moderada-elevada diferenciación dentro de la provincia en cuanto a los haplotipos establecidos en el análisis.

Se realizó una prueba de Mantel en la que se evaluó la correlación de la matriz de distancias genéticas de los individuos de *R. ecuadoriensis*, con la matriz de distancias geográficas existentes dentro de las 35 localidades en las que se realizaron colectas de insectos. Los resultados nos indican que no existe una correlación entre las distancias genéticas de los individuos, con las distancias geográficas de las diferentes localidades (Figura 18).

5.8. Comparación entre individuos recolectados en hábitat silvestre y peridomiciliar

Por medio de una red haplotípica, establecida entre individuos de *Rhodnius ecuadoriensis* recolectados en *Phytelephas aequatorialis*, y con insectos recolectados en el hábitat peridomiciliar. Se añadieron al análisis un total de 35 secuencias correspondientes al cantón Portoviejo, y se obtuvieron cinco haplotipos adicionales a la red establecida mediante el mt Cyt B; obteniendo así una red con 34 haplotipos (Figura 19).

Existieron seis haplotipos compartidos entre hábitat silvestre y peridomicilio, estos fueron: HEO1, HEO2, HEO3, HEO5, HEO9, HEO25. Mientras que el cálculo de las distancias genéticas, nos indicó que los individuos de hábitat silvestre eran apenas 0,9 % diferentes a los individuos que se recolectaron en el peridomicilio. Dentro de los haplotipos compartidos, observamos que los individuos de peridomicilio se agrupan con individuos recolectados en diferentes cantones, además de que en los haplotipos HEO1 y HEO9, se encuentran agrupados con individuos de hábitat silvestre recolectados en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

En esta red se pudo observar el aumento de los ancestros inferidos por parte del programa y que se muestran como puntos de color blanco, los cuales fueron agregados debido a la aparición de los haplotipos peridomiciliares HEO30, HEO31 y HEO33, que representan un total de 6 individuos que no tienen relación cercana con los demás haplotipos.

En relación a los índices de diversidad genética, se observó que hubo un ligero incremento en la diversidad haplotípica que paso de $Hd_{TOTAL} = 0,877 \pm 0,021$ a $Hd_{TOTAL} = 0,898 \pm 0,015$ cuando se agregaron los individuos peridomiciliares, mientras que la diversidad nucleotídica aumentó de $\pi_{TOTAL} = 0,0085$ a $\pi_{TOTAL} = 0,0088$.

Se encontró un total de 14 mutaciones compartidas entre los individuos de los hábitats silvestres y peridomiciliares. Además de un promedio de 5,44 diferencias en nucleótidos entre estos hábitats, mientras que el valor $G_{ST} = 0,0218$ y un $F_{ST} = 0,0630$ que sugieren una diferenciación baja entre los individuos de ambos hábitats.

6. DISCUSIÓN

6.1. Variabilidad genética de *R. ecuadoriensis* en la zona occidental (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas), mediante el marcador mt Cyt B

El uso de marcadores moleculares mitocondriales para poder establecer diferencias entre individuos de una misma especie (intraespecíficamente), es indispensable debido a que estos marcadores no se encuentran sometidos a una presión evolutiva rigurosa, como la del ADN nuclear (Lanteri y Confalonieri, 2003). Otra característica importante del ADN mitocondrial es su herencia casi exclusivamente materna, lo que lo hace ideal para poder establecer relaciones de buen soporte entre los diferentes haplotipos, debido a que esta característica permite realizar una conexión clara entre los grupos que se establecen en el análisis (Avise, 2000).

Para el estudio realizado la determinación de los índices de variabilidad genética en esta zona, nos da ciertas ideas de la situación en la que *R. ecuadoriensis* se encuentra habitando en las tres provincias para las que se obtuvo datos.

Un valor elevado en la diversidad haplotípica, que se establece como la medida de las frecuencias y el número de haplotipos entre individuos (Grant y Bowen, 1998), encontrada en la zona fue $Hd_{TOTAL} = 0,877 \pm 0,021$. Por otro lado, la baja diversidad nucleotídica considerada como el promedio ponderado de divergencia de la secuencia entre haplotipos

(Grant y Bowen, 1998); que para este caso resultó $\pi_{TOTAL} = 0,0085$, se pueden correlacionar e interpretar mediante ciertos parámetros aplicados para otras especies.

Dentro de estos parámetros encontramos que una elevada diversidad haplotípica (H_d) junto con una baja diversidad nucleotídica en la especie (π), nos sugiere un escenario en el que existió un cuello de botella reciente, el cual ocasionó una pérdida de la variabilidad genética de *R. ecuadoriensis*; seguido de un crecimiento rápido de la población y una acumulación de mutaciones (Avice, 1984; Grant y Bowen, 1998). Similares índices fueron observados por Díaz *et al.*, (2014) en un estudio que involucró a las especies que conforman el denominado complejo *Rhodnius* del Pacífico o *pallescens*, dentro del cual tenemos a *R. ecuadoriensis* en el Ecuador, *R. colombiensis* en el país vecino de Colombia y *R. pallescens* en Colombia y Panamá; allí se pudieron observar valores de diversidad haplotípica y nucleotídica para *R. ecuadoriensis* mediante el mt Cyt B, similares a los de este estudio, a pesar de que se usaron menos individuos.

Se establece que *R. ecuadoriensis* es una especie reciente que surge luego del segundo levantamiento de la cordillera de los Andes, en el Mioceno tardío, aproximadamente de entre 7 a 11 millones de años atrás (Díaz *et al.*, 2014). Antes de este suceso, las cadenas montañosas, no superaban en muchos lugares el 40% de su elevación actual (Gregory-Wodzicki, 2000), lo que permitía que el complejo *Rhodnius* del pacífico ancestralmente fuera una sola especie establecida en las zonas de Ecuador y Colombia. Después de este suceso geográfico el complejo se separó y algunos individuos quedaron aislados del lado occidental de la cordillera de los Andes (*Rhodnius ecuadoriensis*), mientras que los demás individuos se establecieron hacia la parte oriental (*Rhodnius colombiensis*).

Posteriormente, estos individuos se distribuyeron hacia el norte, en donde no encontraron barreras geográficas (*Rhodnius pallescens*) (Díaz *et al.*, 2014).

También se sugiere que después de este efecto de cuello de botella, la especie experimentó un crecimiento acelerado que es caracterizado por una acumulación de mutaciones (Grant y Bowen, 1998), lo que se evidenció en nuestros datos mediante la diversidad haplotípica alta; que indicaría una acumulación de variantes puntuales de bases dentro de los individuos estudiados. Además de los resultados obtenidos mediante el test de neutralidad Tajima's D, que nos mostró un valor global $D_{\text{zona occidental}} = -0.349$, lo cual propone que la población se encuentra incrementándose.

Así se puede evidenciar la importancia de los estudios filogeográficos tanto a nivel interespecífico como intraespecífico, estudios anteriores nos dan una pauta de cómo pudo haber sido el escenario en el cual se originó *Rhodnius ecuadoriensis* por medio del establecimiento de diferencias entre esta especie con sus especies más cercanas (*R. pallescens* y *R. colombiensis*). Estudios a nivel de especie como este, pueden dilucidar de mejor manera las evidencias y las hipótesis que se plantean a gran escala; enfocarnos en una sola especie nos ayuda a obtener un mayor número de detalles acerca de los resultados que se obtuvieron con anterioridad.

De igual forma, con estos análisis se puede seguir obteniendo conclusiones y esclarecer una de las preguntas que investigadores se han planteado hace mucho tiempo, y de la cual no se tenían datos concisos, como ¿Cuál es el origen de *Rhodnius ecuadoriensis*?, esta pregunta es de gran importancia a nivel epidemiológico para conocer: cómo apoyar en el

control de esta especie, ya que, desde el punto de vista entomológico es considerado como uno de los principales vectores del parásito, *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la ECh. Se creía que esta especie vino desde el Perú, debido a que, en ciertas partes limítrofes de este país con el Ecuador se ha registrado la presencia de este vector (Cuba-Cuba *et al.*, 2007). Sin embargo, este tipo de análisis a nivel molecular, junto con características y acontecimientos geográficos históricos, nos llevan por una senda diferente en cuanto al origen esta especie, y nos impulsan a pensar que originalmente *R. ecuadoriensis* tienen sus orígenes en la región occidental del Ecuador comprendida por las provincias de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas.

Al analizar los índices de variabilidad genética para cada una de las tres provincias, evidenciamos que de la misma manera que a nivel global, en cada una de ellas, las poblaciones de *R. ecuadoriensis* se encuentran en incremento. Es decir, que se esperaría que con el tiempo estas provincias presenten poblaciones de tamaño considerable, que a su vez representen un mayor riesgo para las personas que habitan en zonas vulnerables. En la provincia de Guayas, no se pudo determinar si la población de *R. ecuadoriensis* crece o decrece, esto debido a los pocos datos obtenidos; impidiéndonos realizar pruebas que den soporte a nuestros resultados.

6.2. Variabilidad genética de *R. ecuadoriensis* en la zona occidental (Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y Guayas), mediante el marcador mtl_{sur}RNA

Se sugiere que la población de la zona occidental del país, se encuentra en incremento, ya que de la misma manera que en el caso del mt Cyt B, este marcador demostró una

diversidad haplotípica relativamente elevada $Hd_{TOTAL} = 0,669 \pm 0,027$, una diversidad nucleotídica baja $\pi_{TOTAL} = 0,0029$ y el test de neutralidad selectiva de Tajima's $D_{occidental} = -0,8539$.

Sin embargo, cuando nos enfocamos en la variación intraespecífica de nuestros individuos observamos que el mtlurRNA, es un marcador que presenta menor variación con respecto al mt Cyt B. Esto concuerda con estudios en varias especies del género *Rhodnius* realizados por Monteiro *et al.* (2000), utilizando los mismos marcadores moleculares, en donde al igual que en este estudio la variación del mt Cyt B es mayor a la que presenta el mtlurRNA, con una diferencia de 38,1% de polimorfismos para el mt Cyt B, y un 32,1% para el mtlurRNA.

No obstante, en este estudio realizado en una sola especie, la variación intraespecífica del mt Cyt B fue de 4,82% y en el mtlurRNA 2,07% evidenciando un patrón similar de mayor variabilidad para el mt Cyt B, siendo más del doble de variable que el mtlurRNA.

6.3. Relación entre los haplotipos encontrados en la zona occidental del Ecuador

Las redes haplotípicas se han convertido en una de las maneras más eficientes para la evaluación de la estructura de uno o varios linajes genéticos, y su distribución espacial en una zona determinada (Clement *et al.*, 2000).

6.3.1. Haplotipos mediante el mt Cyt B

De los 29 haplotipos que se obtuvieron dentro de la zona occidental, se pudo evidenciar que únicamente dos de ellos fueron compartidos entre Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas, estos fueron el haplotipo 1 (HEO1) y el haplotipo 9 (HEO9). Los haplotipos HEO11 y HEO12 fueron únicos para la provincia de Guayas. Sin embargo, como se pudo observar en la red haplotípica que se realizó, se establecieron únicamente dos ancestros inferidos por el programa, para poder establecer correctamente la relación entre haplotipos. Según Abad-Franch & Monteiro (2005) al analizar cinco poblaciones de *R. ecuadoriensis*, observaron resultados similares, en cuanto a la cercanía de los haplotipos dentro de las diferentes poblaciones, formando únicamente un filogrupo. Lanteri y Confalonieri (2003) definieron a filogrupo, como un conjunto de haplotipos cercanamente relacionados, que se encuentran a pocos pasos mutacionales el uno del otro.

Los resultados obtenidos muestran que los haplotipos que se establecieron en el análisis, forman un único filogrupo, ya que en todos los casos se encuentran separados por máximo tres pasos mutacionales. Esto nos señala la cercanía que poseen los haplotipos, demostrando que no existen individuos o grupos que se encuentren considerablemente separados. Avise *et al.* (1987) establecen que: **(i)** si en la población existen numerosos haplotipos, ésta es ancestral o antigua y **(ii)** si existen pocos haplotipos la población será reciente. Esto nos permitió evidenciar que la población de la zona occidental es hipotéticamente más antigua que la población de *R. ecuadoriensis* que se encuentra distribuida en la provincia de Loja (Villacís, 2011).

6.3.2. Haplotipos mediante el mtlurRNA

La poca variación que se observó en este marcador, explica que se hayan encontrado únicamente 10 haplotipos a diferencia de los 29 haplotipos que se encontraron mediante el mt Cyt B. Aparentemente, la diferencia que se pudo evidenciar entre ambos marcadores en cuanto a su variabilidad, se encuentra relacionado al tiempo de evolución de los mismos, siendo el mt Cyt B, el que evolucionó de una manera más rápida, con respecto al mtlurRNA (Lyman *et al.*, 1999).

Dentro de los diez haplotipos encontrados, podemos observar a dos haplotipos de mayor frecuencia. El primero es el HEO1, conformado por 41 individuos pertenecientes a Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas. El segundo corresponde al HEO2 que de la misma manera se constituye de 41 secuencias, pertenecientes a las tres provincias, siendo estos dos haplotipos los de mayor frecuencia y aparentemente los más comunes, de los cuales surgen los demás haplotipos que se pueden observar en la periferia de la red haplotípica (Lanteri & Confalonieri, 2003).

6.4. Relación filogenética de *Rhodnius ecuadoriensis* en la zona occidental

En el árbol filogenético realizado entre los haplotipos de la zona occidental mediante el mt Cyt B, se utilizan las probabilidades posteriores bayesianas (PPB), para poder inferir conclusiones a cerca de la estructura intraespecífica de *R. ecuadoriensis*. Valores inferiores a 0,95 (95%), representan un soporte bajo en la relación de los individuos. Se evidenció

claramente el origen monofilético de los individuos sustentado por el valor obtenido en el nodo 1 (PPB= 100%). También se observó una clara separación entre dos grupos, sustentado por el nodo 2 (PPB= 100%). El valor del nodo 3 (PPB= 95%) nos muestra dos clados, el primero conformado por diez haplotipos correspondientes a la provincia de Manabí y Santo Domingo. El segundo clado se compone por individuos de Manabí, un individuo de Guayas y dos secuencias obtenidas en el Gen Bank denominadas R.ecu1 y R.ecu4, pertenecientes a la Provincia de Manabí.

En el árbol filogenético que se realizó para el mtlstrRNA mediante el método bayesiano, se pudo observar y confirmar el origen monofilético del grupo sustentado por el nodo 1 (PPB= 100%), mientras que los valores de los nodos internos que relacionan a los individuos de *R. ecuadoriensis* presentan bajo soporte, excepto por el nodo 3 (PPB= 97%) que establece la relación entre los haplotipos HEO8, HEO3 y HEO5 que corresponden únicamente a individuos de Manabí. Este resultado se debe a la poca variación que presentó este marcador dentro de los individuos analizados. Esta considerable ausencia de variación, hace que existan menos haplotipos, pero de mayor frecuencia; y que las diferencias entre los mismos sean mínimas, causando así una dificultad para establecer conexiones concretas y bien soportadas entre los mismos, esto debido a la falta de diferencias suficientes para realizar esta relación (Quintero & Navarro, 2012).

6.5. Diferenciación entre Cantones dentro de la Provincia de Manabí

En el análisis de los 14 cantones de la Provincia de Manabí mediante el mt Cyt B, no se encontraron diferencias grandes en cuanto a la variabilidad genética. Muchos de los

individuos de diferentes cantones formaban un haplotipo único. No se evidenció que los triatomíneos se encuentren agrupados por cantones, sin embargo existe el patrón de que mientras más alejados se encuentren estos, se observó un mínimo incremento de la diferenciación genética que no sobrepasa el 1,5%. En estudios similares con otras especies de *Rhodnius* (*R. robustus* y *R. prolixus*), se encontró índices de variabilidad genética bajos, que sugieren al igual que en este estudio, una pérdida de variabilidad genética causada por un cuello de botella. Mientras que la influencia antropogénica interviene en la dispersión de estas especies a lo largo de un territorio determinado (Monteiro *et al.*, 2003).

Por medio del mt12S rRNA se pudo observar, que el haplotipo más diverso es el HEO2 conformado por 41 secuencias pertenecientes a 11 de los 14 cantones; lo que se evidenció en la red haplotípica por los diferentes colores observados, cada uno correspondiente a un cantón diferente de Manabí. Seguido por el HEO1 conformado por secuencias de siete cantones diferentes. En general, podemos observar que mediante este marcador de igual manera que en el mt Cyt B, los cantones no se encuentran diferenciados significativamente unos de otros y que la variación entre los individuos es mínima. Algo evidente mediante la conexión que se realiza en la red haplotípica, es que todos los haplotipos se encuentran separados solamente por un paso mutacional, a diferencia de la red establecida por el mt Cyt B que llegaba a establecer diferencias de hasta tres pasos mutacionales entre ciertos haplotipos.

La prueba de Mantel que se realizó, nos indica que no existe correlación entre las distancias genéticas de los individuos recolectados en diferentes localidades de la región occidental del Ecuador, con las distancias geográficas de cada uno de los puntos de colecta. El transporte activo de las palmeras de tagua dentro de la zona puede influenciar de igual manera en el transporte de los triatomíneos que accidentalmente pueden ser trasladados de

un lugar a otro con dichas palmeras, generando así que no exista una diferenciación considerable entre los insectos de una localidad con otra.

6.6. Similitud entre los marcadores moleculares utilizados (mt Cyt B y mtlsurRNA)

Se observó que existen diferencias en cuanto al nivel de variabilidad que presentaron los dos marcadores moleculares. El mt Cyt B presentó un mayor porcentaje de variación entre las secuencias analizadas que el mtlsurRNA. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron con cada uno de estos marcadores, no significan la existencia de grandes diferencias, que dificulten la interpretación de los resultados; ya que en ambos casos podemos observar el mismo patrón de baja variabilidad genética dentro del conjunto de individuos que se utilizaron en este estudio.

Ciertamente el resultado de mayor importancia para este estudio, es sin duda el bajo nivel de variación genética que se pudo evidenciar en la zona, con un número de individuos considerablemente aceptable, y que procedía de diferentes lugares dentro de una amplia zona geográfica. No se encontraron diferencias que nos permitan establecer poblaciones definidas dentro de la zona, a pesar de haber utilizado marcadores mitocondriales, principalmente por su alto polimorfismo y su herencia materna (Krzywinski & Besansky, 2003) que facilitan un análisis intrapoblacional para obtener parámetros (Avice, 1994), y de la misma manera relacionar dentro de la población a los individuos por medio de genealogías maternas (Simon *et al.*, 1994).

Resultados obtenidos por Villacís *et al.*, (2010), evidenciaron diferencias fenotípicas entre poblaciones de *R. ecuadoriensis* recolectadas en Loja y Manabí. En el caso de los insectos recolectados en la localidad de Alluriquín, perteneciente a la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, los individuos presentaron una coloración mucho más oscura que la que se observó en los individuos de Manabí y Guayas. Podemos establecer que existen variaciones a nivel fenotípico dentro de los individuos, a pesar de la similaridad genética encontrada en las tres provincias de la zona occidental.

Estas diferencias en cuanto a las características visibles de los individuos, pero que no son propiamente relacionadas con las características genéticas de los mismos; nos llevan a pensar en un concepto denominado plasticidad fenotípica. La cual se define, como la variación de las características visibles y/o también llamadas fenotípicas de un individuo en adaptación a las condiciones ambientales del medio en el que se desarrolla, sin necesidad de que exista un cambio en su genotipo (Pigliucci, 2005).

Es así, como podemos basarnos en este concepto y aplicarlo en los triatominos en donde también se sabe que existe plasticidad fenotípica, como en el caso del estudio de los cambios en las sensillas antenales en condiciones controladas de laboratorio con respecto a individuos silvestres (Catalá *et al.*, 2004) o en estudios más cercanos realizados con el mismo *R. ecuadoriensis* en la provincia de Manabí para determinar variaciones en el fenotipo alar y antenal (Villacís *et al.*, 2010). La gran cantidad de materia orgánica y húmeda presente en las palmeras de tagua, junto con las características biogeográficas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, nos permitirían explicar las diferencias

morfológicas que se evidenciaron en cuanto al color (marrón-negro) y al tamaño (mayor en Santo Domingo) de estos individuos.

Puede ser que por esta razón, los individuos de esta zona tengan una coloración mucho más oscura, para poder camuflarse de mejor manera dentro de la materia orgánica húmeda, y así evitar ser presas fáciles de predadores. Mientras que en Manabí y Guayas, las condiciones de humedad son relativamente más bajas, lo que conlleva a que la materia orgánica de las palmeras no presenten un gran nivel de humedad y no permanezcan la mayoría de tiempo con una coloración oscura; sino mas bien tenga una coloración marrón clara, al igual que los individuos de *R. ecuadoriensis* que habitan en ellas. Estas características de igual forma, pueden relacionarse con ciertos indicios de preferencia de hábitats en cuanto a palmeras por algunas especies del género *Rhodnius*, y al ser *R. ecuadoriensis* un insecto que se encuentra asociado a palmeras de tagua (Abad-Franch *et al.*, 2005), puede que su fenotipo se vea alterado con el único fin de mantener su hábitat de preferencia.

6.7. Influencia Antropogénica en la distribución y variación genética de *Rhodnius ecuadoriensis*

Pudimos llegar a establecer por medio de este estudio y por anteriores (Díaz *et al.*, 2014), que la poca diferenciación genética de la población de *R. ecuadoriensis* en la zona occidental, está ligado a eventos de separación de un grupo más grande; causado por un fenómeno geográfico muy importante para la región sudamericana. Adicionalmente, es fundamental analizar el contexto ecológico de esta especie dentro de la zona, al ser un

insecto que naturalmente prefiere hábitats arbóreos (Abad-Franch *et al.*, 2005) y siendo *Phytelephas aequatorialis* el más importante; podemos relacionar de cierta manera la posibilidad de que la importancia económica de esta palmera en el sector, sea una de las causas de que estos triatomíneos se encuentren distribuidos en casi toda la zona, y de que no se encuentren poblaciones ciertamente definidas como tal.

En el año 2011 se pudo constatar que el ingreso global en el país por parte de actividades relacionadas con *Phytelephas aequatorialis*, tanto para materia prima como elaboración de artesanías y construcción, equivalieron a un aproximado de 14 millones de dólares (Brokamp *et al.*, 2014). Lo que hace evidente que la actividad con esta palmera en la zona sea intensa. Los frutos y las hojas denominadas cade, se transportan de manera frecuente por toda la zona, especialmente dentro de la provincia de Manabí, lugar en donde se encuentran grandes centros de acopio, a los cuales diariamente llegan cargamentos de todos los sectores.

La amplia red vial dentro del área occidental, es de suma importancia para poder comprender la influencia que el mecanismo de transporte activo tiene en la dispersión y distribución de *Rhodnius ecuadoriensis* en la región. Las numerosas vías alternas que se presentan para poder llegar hacia cada uno de los cantones y comunidades rurales de esta zona, facilitan las actividades comerciales de muchas personas, en cuanto al transporte de varios tipos de productos. De esta manera, y gracias a la importancia económica de las palmeras de *P. aequatorialis*, se incrementa el riesgo de movilización de estos insectos y a su vez el riesgo de transmisión del *T. cruzi* para un elevado número de seres humanos que día a día se encuentran relacionados con actividades que involucran la manipulación o cercanía con las palmeras de tagua (Abad-Franch *et al.*, 2005).

6.8. Relación entre individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados en hábitat peridomiciliar y silvestre

Dentro de la red haplotípica que se estableció para este análisis, la mayoría de los individuos pertenecientes al hábitat peridomiciliar, se encontraban formando parte de los grupos junto a individuos recolectados en el hábitat silvestre. Esto puede deberse a la alta densidad poblacional que presenta *R. ecuadoriensis* en el hábitat silvestre, principalmente asociado a *P. aequatorialis* en la zona costera del Ecuador (Abad-Franch *et al.*, 2001; Sánchez, 2015) y en las estribaciones de la cordillera occidental de los Andes (Suarez-Dávalos *et al.*, 2010); lo que contribuye a que esta especie pueda moverse a zonas más cercanas a los domicilios, lugar en el cual también puede encontrar fuentes de alimento como gallinas, y acumulaciones de escombros o vegetación que le sirvan de refugio (Guhl *et al.*, 2009).

En un principio se esperaría que los individuos que lleguen desde el hábitat silvestre hacia el peridomicilio, sean una fracción de todos los individuos silvestres, y que por esta razón exista una pérdida de la variabilidad genética y el inicio de una separación de esta población peridomiciliar (Dujardin, 1998). Sin embargo, ciertos factores como la movilización de los animales salvajes de los cuales se alimentan estos triatominos, pueden ser la causa para el cambio de hábitat de estos insectos (Schofield *et al.*, 1999).

Adicionalmente, la importancia económica de la palmera que sirve de refugio para estos triatomíneos juega un papel importante en el transporte activo de esta especie, muchos de los individuos que pueden llegar al peridomicilio, provienen de las hojas de palmeras o de los frutos de las mismas, que las personas llevan para realizar artesanías o utilizarlas en la construcción (Brokamp *et al.*, 2014).

Por todo lo antes mencionado, es que no se puede evidenciar claramente una variación significativa entre los diferentes hábitats, ya que el transporte activo es muy intenso dentro de la zona, y favorece a que no exista un aislamiento suficiente para que se formen poblaciones genéticamente diferenciadas.

6.9. Estrategias de control fundamentadas en la variación genética

Desde el punto de vista epidemiológico, la relación existente entre el vector de una enfermedad con su hábitat es muy importante, por ejemplo *R. ecuadoriensis* (vector), con *P. aequatorialis*, como el principal microhábitat de esta especie. Adicionalmente, se debe tomar en cuenta que esta palmera es de gran importancia económica, para los moradores de los sectores en donde se encuentra distribuida, generando un potencial riesgo, ya que las actividades que involucran el manejo de ciertas partes de la palmera, conllevan a la dispersión de estos triatomíneos y aumentan el riesgo de contraer la ECh.

Se pudo establecer que los mecanismos de control en base a la aplicación de deltametrina, en la provincia de Manabí, no son una manera efectiva de reducir el riesgo de transmisión de la enfermedad por medio de vectores. Esto puede deberse a la capacidad de reinfestación desde el peridomicilio y/o del hábitat silvestre de manera constante hacia las viviendas y/o por parte de poblaciones residuales que sobrevivieron a la aplicación del insecticida (Grijalva *et al.*, 2011).

Se han encontrado indicios en otros insectos como las moscas comunes, de que ciertas cadenas de proteínas pertenecientes al citocromo p450, son parte fundamental de la resistencia a los piretroides que se presenta en ciertos individuos; gracias a una alta actividad monooxigenasa (Geoffrey *et al.*, 1992). En cuanto a la deltametrina, ha sido probado que la resistencia por parte de ciertas especies de triatomíneos como *Triatoma infestans*, se debe principalmente al antes mencionado complejo del citocromo p450 (Oppenoorth, 1985; French-Constant & Roush, 1990).

Dado que este complejo de proteínas es un mecanismo metabólico tanto en etapas tempranas del desarrollo (ninfales) (Roca *et al.*, 2015), como en etapas finales (adultos) (Coutinho *et al.*, 2010), puede darse la posibilidad de que la variabilidad genética en diferencia al citocromo B, que de la misma manera es un complejo de proteínas con funciones metabólicas, sea similar o incluso sea menor. Esto debido al origen mitocondrial del gen que codifica para el citocromo B, para el cuál conocemos que la presión evolutiva es mucho menor a la que se presenta en el genoma nuclear, del cual proviene la familia de genes CYP450 (Coutinho *et al.*, 2010) que codifican para las proteínas del citocromo p450.

De la misma manera se analiza que la resistencia de un grupo, en este caso los triatominos, a un insecticida es dada por características hereditarias que desarrollaron ciertos individuos, no directamente causados por acción del insecticida sobre su material genético; sino más bien, porque dicha característica es parte de la variabilidad genética de algunos especímenes, a pesar de que se encuentren expuestos o no al contacto con el químico (Oppenorth, 1985; Mougabure-Cueto & Picollo, 2015).

Por esta razón podemos observar que la variabilidad genética de una población, se expresa fenotípicamente como la capacidad de resistir la aplicación de insecticidas. A su vez esta característica al ser hereditaria confiere la misma capacidad a las futuras generaciones, permitiendo que aquellas que hereden estas características sean las más aptas para sobrevivir. De esta manera, se establece la resistencia de insecticidas por parte de los triatominos, como un proceso microevolutivo cuyo principal factor determinante es la selección natural (Mougabure & Picollo, 2015; Roush & Mckenzie, 1987; Mougabure-Cueto, 2004).

En conclusión, las hipótesis que han sido un aporte de este estudio, conjuntamente con estudios recientes en otros lugares (Díaz *et al.*, 2014); deben ser sustentadas con futuras investigaciones dentro de la zona, para así lograr la mayor efectividad posible en el control de la ECh dentro del área occidental. En las provincias de Manabí, Guayas y Santo Domingo de los Tsáchilas muchas personas viven de lo que obtienen de las palmeras de *P. aequatorialis*, ya sea para su comercialización y/o el uso en la construcción de sus viviendas, exponiéndose de esta manera muy frecuentemente al contacto con los vectores de esta enfermedad y generando un riesgo constante de infección. Finalmente, las

secuencias obtenidas con estos dos marcadores moleculares utilizados en este estudio, complementará la falta de información de esta especie en bases de datos, como el GenBank; lo cual permitirá futuros estudios tanto a nivel nacional como internacional en la prevención, control y vigilancia de esta enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Franch, F., Aguilar, V.H.M. 2000. Control de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador. Datos y reflexiones para una política de estado. *Revista del Instituto Juan César García* 10 (1-2): 12-32.
- Abad-franch, F., C, A.P., C, C.C., V, H.M.A., Miles, M.A., 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera : Reduviidae) in Ecuador : Implications for the Design of Control Strategies. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 96: 611–620.
- Abad-Franch, F., Palomeque, F.S., Aguilar, H.M., Miles, M. a, 2005. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Tropical Medicine and International Health* 10: 1258–66.
- Abad-franch, F., Monteiro, F.A., 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Annals of the Brazilian Academy of Science* 77: 437–454.
- Abad-franch, F, 2009. Control de las poblaciones sinantrópicas de vectores de la enfermedad de Chagas en el Ecuador, con énfasis en las estrategias de manejo ambiental integrado. *Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles en el Ecuador* 1-28.
- Abad-Franch, F., Lima, M.M., Sarquis, O., Gurgel-Gonçalves, R., Sánchez-Martín, M., Calzada, J., Saldaña, A., Monteiro, F. a., Palomeque, F.S., Santos, W.S., Angulo, V.M., Esteban, L., Dias, F.B.S., Diotaiuti, L., Bar, M.E., Gottdenker, N.L., 2015. On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. *Acta Tropica*. 151: 126–141.
- Aguilar, H.M., Abad-franch, F., Racines, J.V., Paucar, A. 1999. Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. A Brief Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 387–393.

- Avise, C.J. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts.
- Avise, J.C., Neigel, J.E., Arnold, J. 1984. Demographic influences of mitochondrial DNA lineages survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution* 20: 99-105.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Beringham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. 1987. Intraespecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology, and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, C.J. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, Nueva York.
- Barford, A.S., Bergman, B., Borgot Pedersen, H. 1990. The vegetable ivory industry: surviving and doing well in Ecuador. *Economic Botany* 44: 293-300.
- Barford, A. 1991. A monographic study of the subfamily Phytelephantoideae (Arecaceae). *Opera Botánica* 105: 1-73.
- Barret, T. 1991. Advances in triatomine bug ecology in relation to Chagas disease. *Triatomine ecology. Advantages in Diseases Vectores Response* 8: 144-175.
- Black, C.L., Ocaña-Mayorga, S., Riner, D.K., Costales, J.A., Lascano, M.S., Arcos-Terán, L., Preisser, J.S. 2009. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in rural Ecuador and clustering of seropositivity within households. *The American journal of tropical Medicine and hygiene*. 81: 1035–40.
- Borchsenius, F., Moraes, M., 2006. Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae). *Botánica Económica los Andes Cent.* 412–433.

- Brener, Z. 1992. *Trypanozoma cruzi*: Taxonomy, morfology and life cycle. In: Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine pp. 13-30.(S. Wendel, Z. Brener, M.E. Ca, argp, A. Rassi, edt.) ISTB, Sao Paulo. Brazil.
- Briceño-León, R. 2009. La enfermedad de Chagas en las Américas : una perspectiva de ecosalud Chagas disease in the Americas. Cad. Saúde Pública 25: 71-82. Río de Janeiro, Brasil.
- Brokamp, G., Borgtoft Pedersen, H., Montúfar, R., Jácome, J., Weigend, M., Balslev, H. 2014. Productivity and management of *Phytelephas aequatorialis* (Arecaceae) in Ecuador. Annals of Applied Biology 164: 257–269.
- Catalá, S.S., Maida, D.M., Jaramillo, N., Moreno, J. 2004. Changes Associated with Laboratory Rearing in Antennal Sensilla Patterns of *Triatoma infestans* , *Rhodnius prolixus* , and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera , Reduviidae , Triatominae). Memorias del Instituto Oswaldo Cruz 99: 25–30.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9: 1657-1659.
- Costales, J.A., Davila, S., Grijalva, M.J., Champion, P., Lent, R., 2005. High Household Infestation Rates by Synanthropic Vectors of Chagas Disease in Southern Ecuador. Journal of Medical Entomology 42 (1): 68–74.
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease : what is known and what is needed – A background article. Memorias del Insituto Oswaldo Cruz 102: 113–122.
- Coura, J.R., Carlos, J., Dias, P., 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz 104: 31–40.

- Coutinho, E.M., Purata, A., Cruz, P. 2010. Citocromo P450 Biomarcador de Exposición Terapéutico - Toxicológico - Carcinogénico. *Revista de Educación Química* 29: 39–52.
- Cuba, C., Vallejo, G.A., Gurgel - Goncalves, R. 2007. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) prevalent in the northwest of Peru: species with epidemiological vectorial capacity. *Parasitología Latinoamericana* 154–164.
- Cuba, C.A. 1975. Estudio de una cepa peruana de *Trypanosoma rangeli*. Observaciones sobre la evolución y morfogénesis de *T. rangeli* en hemocele y glándulas salivales de *Rhodnius ecuadoriensis*. *Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 17: 284-297.
- Cummings, M.P., Otto, S.P., Wakeley, J. 1995. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 12: 814-822.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 722.
- Dias, J.C.P., 1994. Ecological Aspects of The Vectorial Control of Chagas' Disease in Brazil. Aspectos Ecológicos do Controle de Vetores para Doença de Chagas no Brasil. *Cad. Súde Pública* 10: 352–358.
- Dias, J.C.P., Schofield, C.J., 1999. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 94: 103–121.
- Díaz, S., Panzera, F., Jaramillo-O, N., Pérez, R., Fernández, R., Vallejo, G., Saldaña, A., Calzada, J.E., Triana, O., Gómez-Palacio, A., 2014. Genetic, cytogenetic and morphological trends in the evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) trans-Andean group. *PLoS One* 9: 1–12.
- Dopico, E., Grezner, E., Ubillos, I., Sulleiro, E., Riera, T., Vinuesa, T. 2011. Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en un área no endémica. *Biomedicina* 3: 209-421.

- Dransfield, J., N.W. Uhl., C.B. Asmussen., W.J. Baker., M.M. Harley & C.E. Lewis. 2005. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. *Knew Bulletin* 60: 559-569.
- Drummond. J., Bouckaert. R. 2015. *Bayesian Evolutionary Analysis with BEAST*. University of Auckland.
- Dujardin, J.P. 1998. Population genetics and the natural history of domestication in triatominae. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 93: 34-36.
- Ferreira, E., Granville, J., De, Mejía, K. 2008. Las palmeras de América del Sur : diversidad, distribución e historia evolutiva *The palms of South America : diversity, distribution and evolutionary history* 15: 7–29.
- French - Constant, R.H., Roush, R.T. 1990. Resistant detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assay. In: Roush, R.T., Tabashnik, B.E. (Eds.), *Pesticide Resistance in Arthropods*. Chapman & Hall, New York and London 4-38.
- Fitzpatrick, S., Feliciangeli, M. D., Sanchez-Martin, M. J., Monteiro, F. a, & Miles, M. a. (2008). Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(4).
- Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2000. An Insect Molecular Clock Dates the Origin of the Insects and Accords with Palaeontological and Biogeographic Landmarks. *Society for Molecular Biology and Evolution* 19 (5): 748–761.
- Geoffrey, D., Wheelock, K., Jeffrey, G., Scott. 1992. The role of cytochrome P450 in deltamethrin metabolism by pyrethroid - resistant and susceptible strains of house flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 43: 67- 77.
- Gillespe, J.H. 1986. Variability of evolutionary rates of DNA. *Genetics* 113: 1077- 1091.

- Grant, W.S., Bowen, B.W., 1998. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lesson for Conservation. *The American Genetic Association* 89: 415–426.
- Gregory-Wodzicki, K.M. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *GSA Bulletin*. 112: 1091–1105.
- Grijalva, M.J., Villacis, a G., 2009. Presence of *Rhodnius ecuadoriensis* in sylvatic habitats in the southern highlands (Loja Province) of Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 46: 708–11.
- Grijalva, M.J., Villacís, A.G., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C. a, Baus, E.G., 2011. Limitations of selective deltamethrin application for triatomine control in central coastal Ecuador. *Parasites and Vectors* 4: 1- 20.
- Grijalva, M.J., Suarez-Davalos, V., Villacis, A.G., Ocaña-Mayorga, S., Dangles, O., 2012. Ecological factors related to the widespread distribution of sylvatic *Rhodnius ecuadoriensis* populations in southern Ecuador. *Parasites and Vectors* 5-17.
- Guarneri, A.A., Pinto, C.J.C., Schofield, C.J., Steindel, M., 1998. Population Biology of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae) under Laboratory Conditions. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 93: 273–276.
- Guevara, A.G. 1997. Tripanosomiasis. En: *Terapéutica antiparasitaria* (Manuel Calvopiña ed) pp. 47-56, 2da edición. Ministerio de Salud Pública del Ecuador - Universidad Católica Santiago de Guayaquil - Hospital Vozandes, Quito, Ecuador.
- Guhl, F., 2007. Chagas disease in Andean countries. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 102: 29–37.
- Guhl, F. 2009. Enfermedad de Chagas : Realidad y perspectivas. *Red Biomed* 20:228-234.

- Gürtler, R., 1999. Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. *Acta Trópica* 72: 213–234.
- Gürtler, R.E., Cohen, J.E., Cecere, M.C., Chuit, R., 2009. Shifting host choices of the vector of Chagas disease, *Triatoma infestans*, in relation to the availability of hosts in houses in north-west Argentina. *Journal of Applied Ecology* 34: 699–715.
- Harrison, R.G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 6-11.
- Henderson, A., Galeano, G., Bernal, R. 1995. *Field Guide to the palms of the Américas*. Princeton University Press, Princeton pp 363.
- Holguín Arias, R. 2003. *Estudios Sociales 6*. Quito, Ecuador. Ediciones Holguín.
- Hudson, R., Slatkin, M., Madisson, P. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583-589.
- Krzywinski, J.M & Besansky, N.J. 2003. Molecular systematic of *Anopheles*: from subgenerato subpopulations. *Annual Review of Entomology* 48: 111-139.
- Lanteri, A., Confalonieri, V. 2003. *Filogeografía: Objetivos, Métodos y Ejemplos. Una perspectiva Latinoamericana a la Biogeografía* pp 185–193.
- León, L.A. 1949. Información sobre el problema de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. *Boletín de la oficina sanitaria Panamericana* 28: 569-585.
- Lyman, D.F., Monteiro, F.A., Escalante, A.A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D.M., Dujardin, J.P., Beard, C.B. 1999. Mitochondrial DNA secuencia variation among triatomine vectors of Chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60: 337-386.

- Marquardt, WC, Demaree, R.S., Grieve. R.B. 2000. Parasitology and vector Biology. Segunda Edición. Harcourt Academic Press, Burlington, Estados Unidos.
- Mazzoti, L. 1943. *Triatoma phyllosoma usingeri*, a new subspecies of *Triatoma* from México. Pan-Pacific Entomologist, 19: 81 - 85.
- Miles, M.A., Arias, J.R., De Souza, A.A. 1983. Chagas Disease in the Amazon Basin: V. Periurban palms as hábitat of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes* - Triatomine vectors of Chagas disease. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz 78 (4): 391-398.
- Moncayo, Á., Silveira, A.C., 2009. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz 104: 17–30.
- Monteiro, F.A., Wesson, D.M., Dotson, E.M., Schofield, C.J., Beard, C.B., 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodiini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene 62: 460–465.
- Monteiro, F.A., Barret, T., Fitzpatrick, S., Cordon-Rozales, C., Feliciangeli, D., Beard, C. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. Molecular Ecology. 12(4): 997–1006.
- Monteiro, F., Donnelly, M.J., Beard, C.B., Costa, J., 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. Molecular Phylogenetics and Evolution. 32: 46–56.
- Mougabure-Cueto, G. 2004. Caracterización de la resistencia a insecticidas piretroides en *Pediculus humanus capitis* De Geer 1778 (Phthiraptera: Pediculidae): estudio comparativo entre estados embrionarios y post - embrionarios. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires.
- Mougabure-Cueto, G., Picollo, M.I. 2015. Insecticide resistance in vector Chagas Disease: evolution, mechanisms and management. Acta Trópica. 149: 70–85.

- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 70: 3321-3323.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Oppenoorth, F.J. 1985. Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: Kerkut, G.A., Gilbert, C.I (Eds), Comprehensive insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol 12. Pergamon Press, pp. 731-733.
- Oscherov, E. B., Bar, M. E., Damborsky, M. P., Mf, A., & Borda, A. (2003). Epidemiología de la enfermedad de Chagas, Departamento General Paz, Argentina Chagas' disease epidemiology in the province of General Paz, Argentina 37(1): 59–64.
- Panzer, F., Dujardin, J.P., Nicolini, P., Caraccio, M. N., Rose, V., Tellez, T., Bermúdez, H. (2004). Genomic Changes of Chagas Disease Vector, South America. Emergin Infectious Diseases. 10:3.
- Pigliucci, M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity : where are we going now? Trends in Ecology and Evolution 20: 482-486.
- Pita, S. 2013. Evolución cariotípica en insectos vectores de la enfermedad de chagas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): análisis del Cluster Ribosomal 45S. Tesis de Maestría. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Quintero, L., Navarro, J.C. 2012. Filogenia intraespecífica y variabilidad genética de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) con los genes mitocondriales ND5 y COI. Boletín de Malariología y Salud Ambiental 52: 45–65.
- Rassi, A., Rassi Jr, A., Marin-Neto, J.A. 2007. Chagas disease. The lancet. 375: 1388-1402.

- Roca - Acevedo, G., Picollo, M.I., Capriotti, N., Sierra, L., Santo-Orihuela, P.L. 2015. Examining Mechanisms of Pyrethroid Resistance in Eggs of Two Populations of the Chagas' Disease Vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 52 (5): 987-992.
- Rozas, J., Librado, P. 2009. Dna SP v5.0: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Roush, R.T., McKenzie, J.A. 1987. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Annual Review of Entomology* 32: 361-380.
- Sánchez, D. 2015. Presencia de triatominos en palmas de *Phytelephas aequatorialis* en 74 comunidades rurales de la provincia de Manabí. Tesis de licenciatura, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Sanchez-Martin, M.J., Feliciangeli, M.D., Campbell-Lendrum, D., Davies, C.R., 2006. Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised by reinvasion of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations? *Tropical Medicine and International Health* 11: 1585-93.
- Schofield, C.J., Diotaiuti, L., Dujardin, J.P. 1999. The Process of Domestication in Triatominae. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 94: 375-378.
- Schofield, C.J., 2003. Enfermedad de Chagas Iniciativas para su control en Latinoamérica. *Biomedicina*. 1 (2).
- Schofield, C.J., Jannin, J., Salvatella, R., 2006. The future of Chagas disease control. *Trends in pathology* 12: 583-588
- Schofield, C.J., Galvão, C., 2009. Acta Tropica Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 110: 88-100.
- Sherlock, I.A., 1999. Epidemiology and Dynamics of the Vectorial Transmission of Chagas Disease. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 94: 385-386.

- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. 1994. Evolution, Weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of Entomological Society of America* 87: 651-701.
- Suarez-Davalos, A.V., Dangles, O., Villacis, A.G., Grijalva, J., Suarez-davalos, V., 2010. Microdistribution of Sylvatic Triatomine Populations in Central- Coastal Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 47: 80–88.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725 -2729.
- Teixeira, A, R., Monteiro, P.S., Rebelo, J.M., Argañaraz, E.R., Vierira, D., Lauria-Pries.,L. 2001. Emerging Chagas disease: Triphasic Network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the amazon. *Emergence infection Diseases* 7: 100-112.
- Teixeira, A. R. L., Nascimento, R. J., & Sturm, N. R. (2006). Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 101: 463–491.
- Toso, A., Felipe, V., Galanti, N., 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista de Medicina de Chile* 139: 258–266.
- Vargas Alzamora, A., Díaz Benalcazar, R. 2010. La Etnia Tsáchila. Quito, Ecuador. ED: Sector Público Gubernamental.
- Velásquez Runk, J. 1998. Productivity and Sustainability of a vegetable ivory palm (*Phytelephas aequatorialis*, arecaceae) under three management regimes in northwestern Ecuador. *Economic Botany* 52 (2): 168-182.

- Villacís, A. 2006. Ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación de *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent y León), 1958 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- 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.
- Villacís, A.G., Grijalva, M.J., Catalá, S.S. 2010. Phenotypic Variability of *Rhodnius ecuadoriensis* Populations at the Ecuadorian Central and Southern Andean Region. Journal of Medical Entomology 47(6): 1034–1043.
- Villacís, A.G. 2011. Análisis de variabilidad fenotípica y diversidad genética de poblaciones sin antrópicas y silvestres de *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León) en dos provincias endémicas para la enfermedad de Chagas en Ecuador. Tesis de Doctorado. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Whitaker, M.D., Colyer, D., Alzamora, J., Figueroa, R., Chávez Vargas, A., Pacora Coupen, L., Hurtado Miller, J.C. 1990. El rol de la agricultura en el desarrollo económico del Ecuador: un diagnóstico del sector agrícola del Ecuador (No. E10 225). Instituto de Estrategias Agropecuarias. Quito, Ecuador.
- World Health Organization. 1991. Control of Chagas Disease. WHO Technical Report Series 811. WHO, Ginebra, Suiza.
- World Health Organization. 2002. Control of Chagas Disease. Technical Report Series. No. 905, Geneva.
- World Health Organization. 2015. La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N° 340. Consultado en línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/14/08/2015>.

8. FIGURAS



Figura 1. Mapa de distribución de la enfermedad de Chagas

- Países endémicos, con transmisión mediante vectores.
- Países endémicos, con transmisión vectorial ocasional.
- Países no endémicos, con transmisión transplacentaria, donación de sangre y de órganos.

Figura: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>

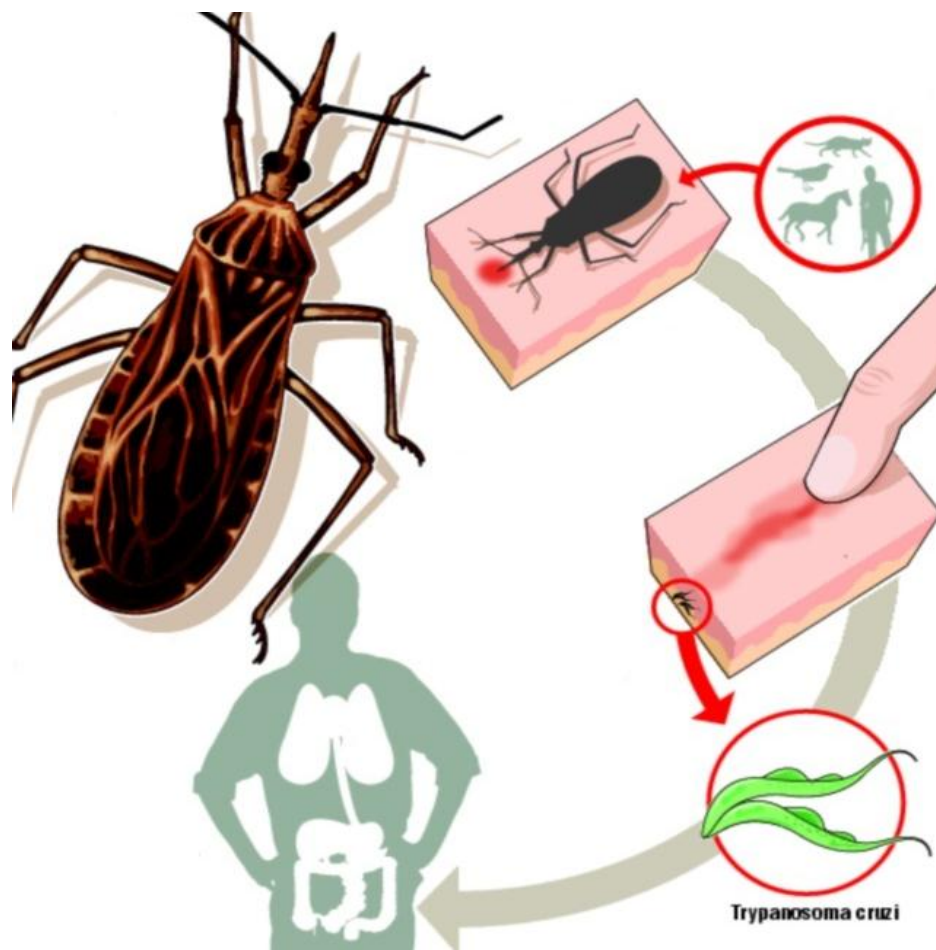


Figura 2. Transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi*

Esta transmisión se da por medio de las heces de triatominos que pueden llegar a entrar al organismo al momento de rascarse (CDC, 2013).



Figura 3. Hábitats de *Rhodnius ecuadoriensis* en la región occidental del Ecuador

a. Domicilio; b. Peridomicilio; c. Silvestre

Fotografías: Anabel Padilla, 2013; Juan José Bustillos, 2015



Figura 4. Estadios de desarrollo de *Rhodnius ecuadoriensis*

Derecha a izquierda a.- Ninfa 1 (NI), b.- Ninfa 2 (NII), c.- Ninfa 3(NIII), d.- Ninfa 4 (NIV); e.- Ninfa 5 (NV); f.- Adulto macho y g.- Adulto hembra.



Figura 5. Palmeras de *Phytelephas aequatorialis*, pertenecientes a la región occidental del Ecuador en la parroquia de Alluriquín, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas

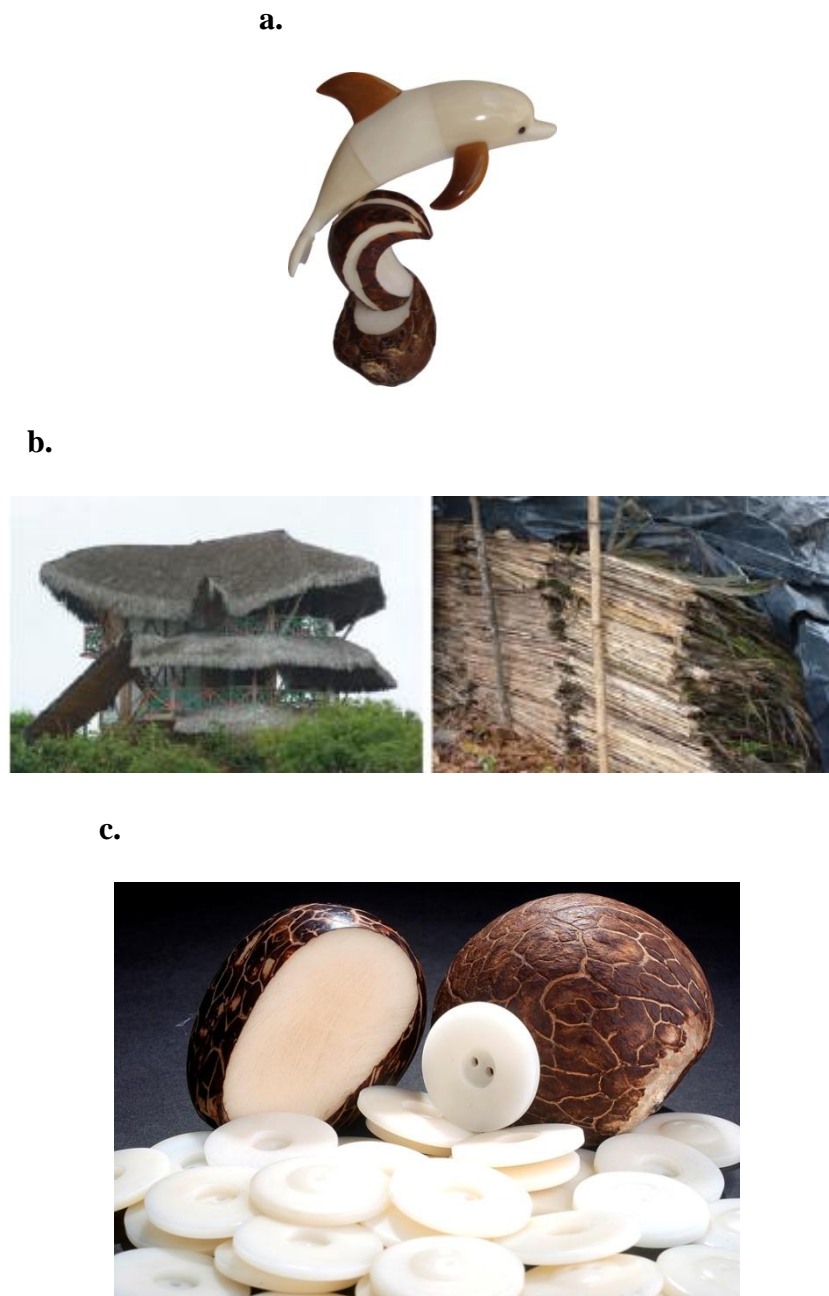


Figura 6. Importancia económica de *Phytelephas aequatorialis*

En la zona occidental del Ecuador, muchas personas utilizan las hojas y los frutos de estas palmeras para: a.- artesanías, b.- el uso en la construcción y c.- exportación como materia prima.



Figura 7. Búsqueda de triatominos en *Phytelephas aequatorialis*

Fotografías: Juan José Bustillos, 2015

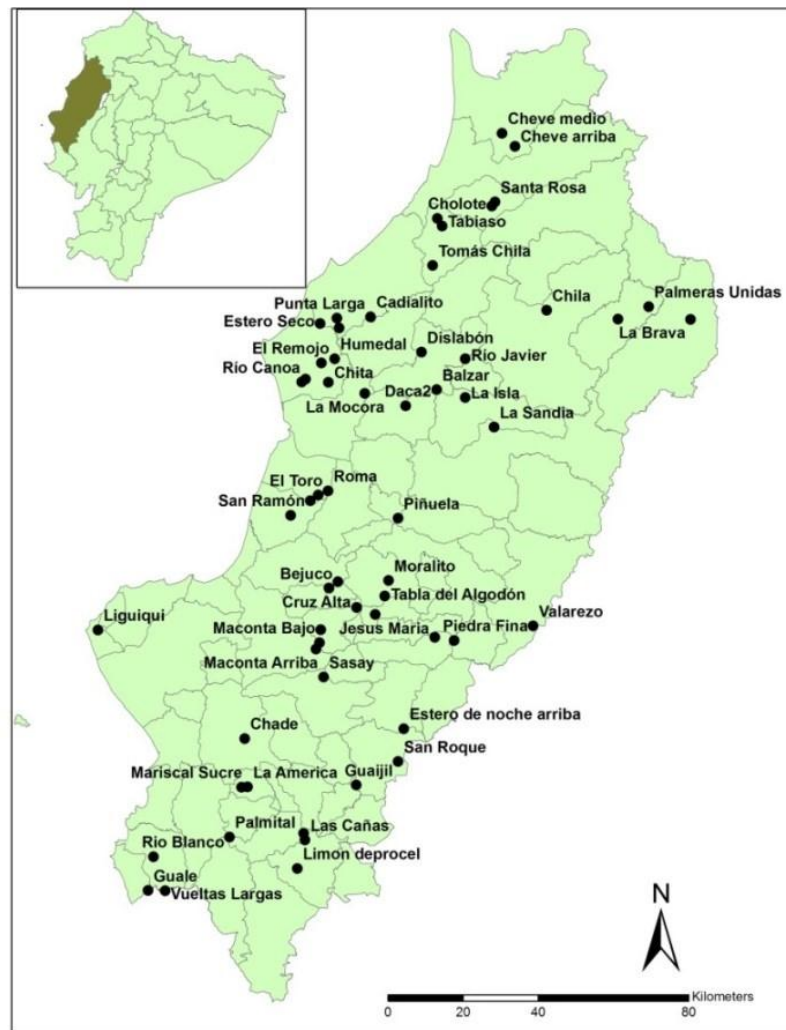


Figura 8. Mapa de la provincia de Manabí con las diferentes comunidades en las que se realizó la búsqueda de individuos de *R. ecuadoriensis* en palmeras de tagua

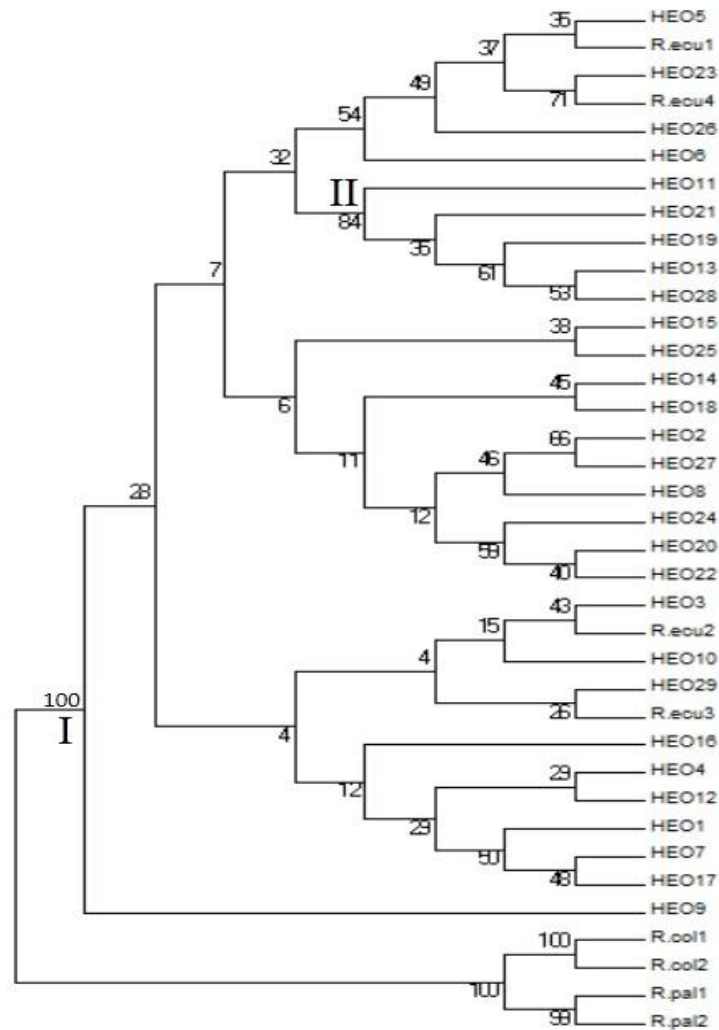


Figura 9. Árbol establecido para la región occidental mediante el mt Cyt B utilizando el algoritmo de Neighbour Joinig (NJ)

El valor BT= 100% en el nodo I muestra el origen monofilético de los individuos de *R. ecuadoriensis*, mientras que no se observan valores que den soporte para los nodos internos excepto por el nodo II cuyo valor BT= 84% muestra un grupo conformado por cinco haplotipos pertenecientes a Manabí y Guayas.

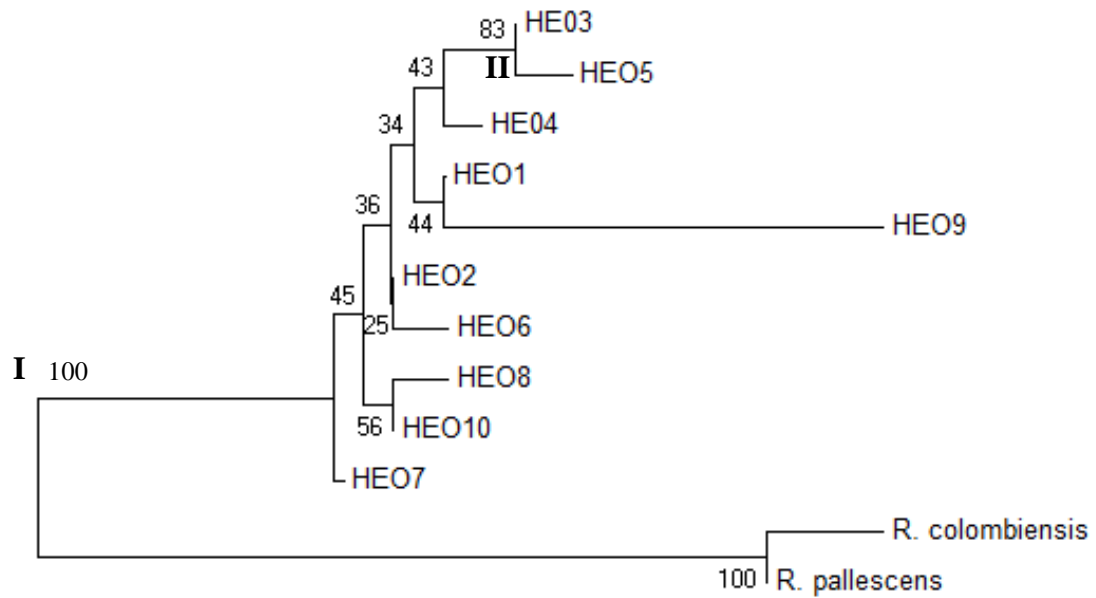


Figura 10. Árbol establecido para la región occidental mediante el mtlurRNA utilizando el algoritmo de Neighbour Joining (NJ)

El valor del Nodo I (BT= 100%) nos sugiere el origen monofilético de *R. ecuadoriensis*, mientras que los nodos internos no se encuentran con un buen soporte a excepción del nodo II (BT= 83%) que establece la relación entre los haplotipos HEO5 y HEO5.

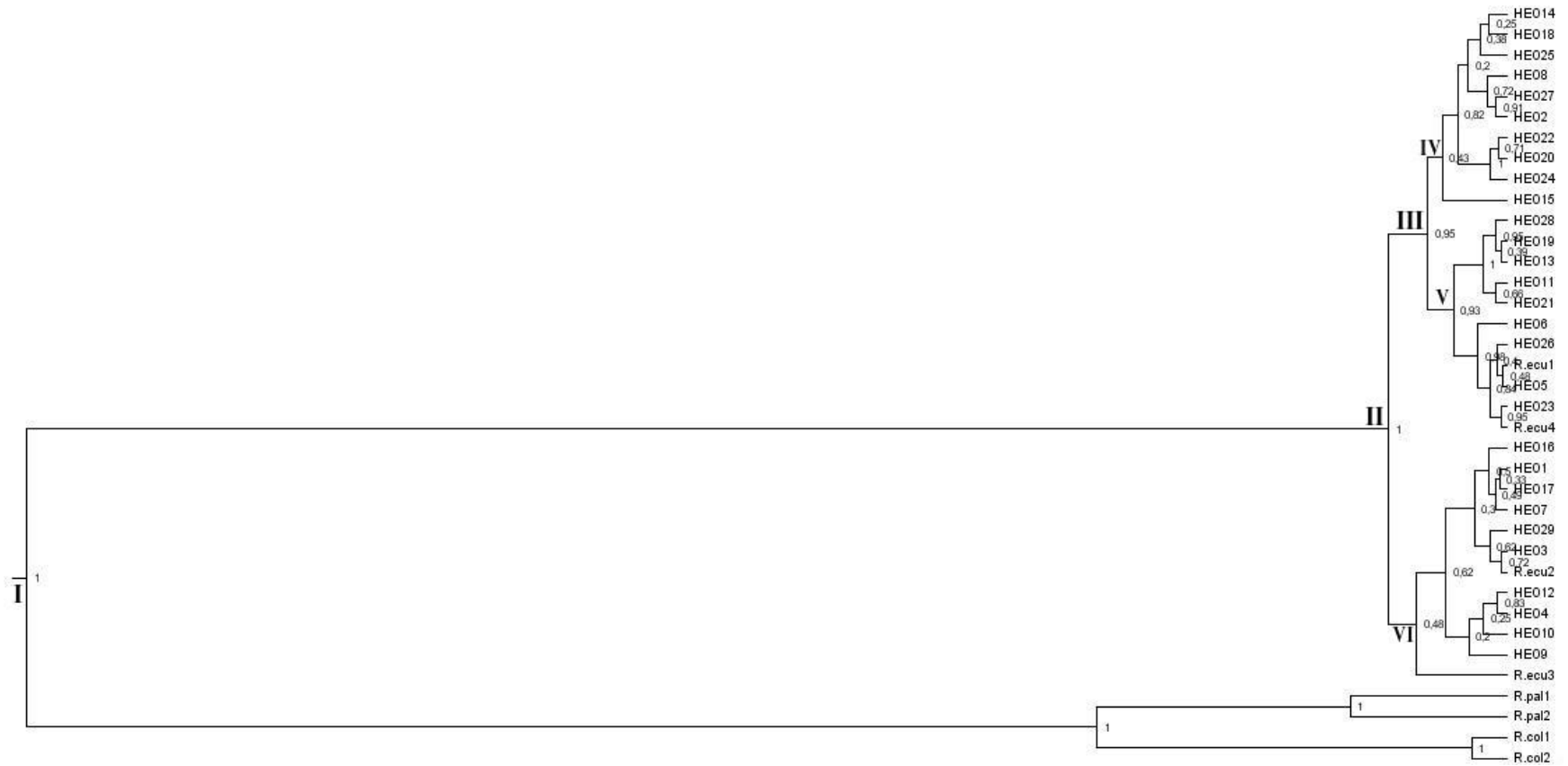


Figura 11. Filogenia establecida para la región occidental mediante el mt Cyt B utilizando análisis bayesiano

En el árbol se puede observar valores de probabilidad que proporcionan un correcto soporte en los nodos (I), (II) y (III). Los nodos internos no poseen soporte suficiente para poder establecer las relaciones entre los haplotipos.

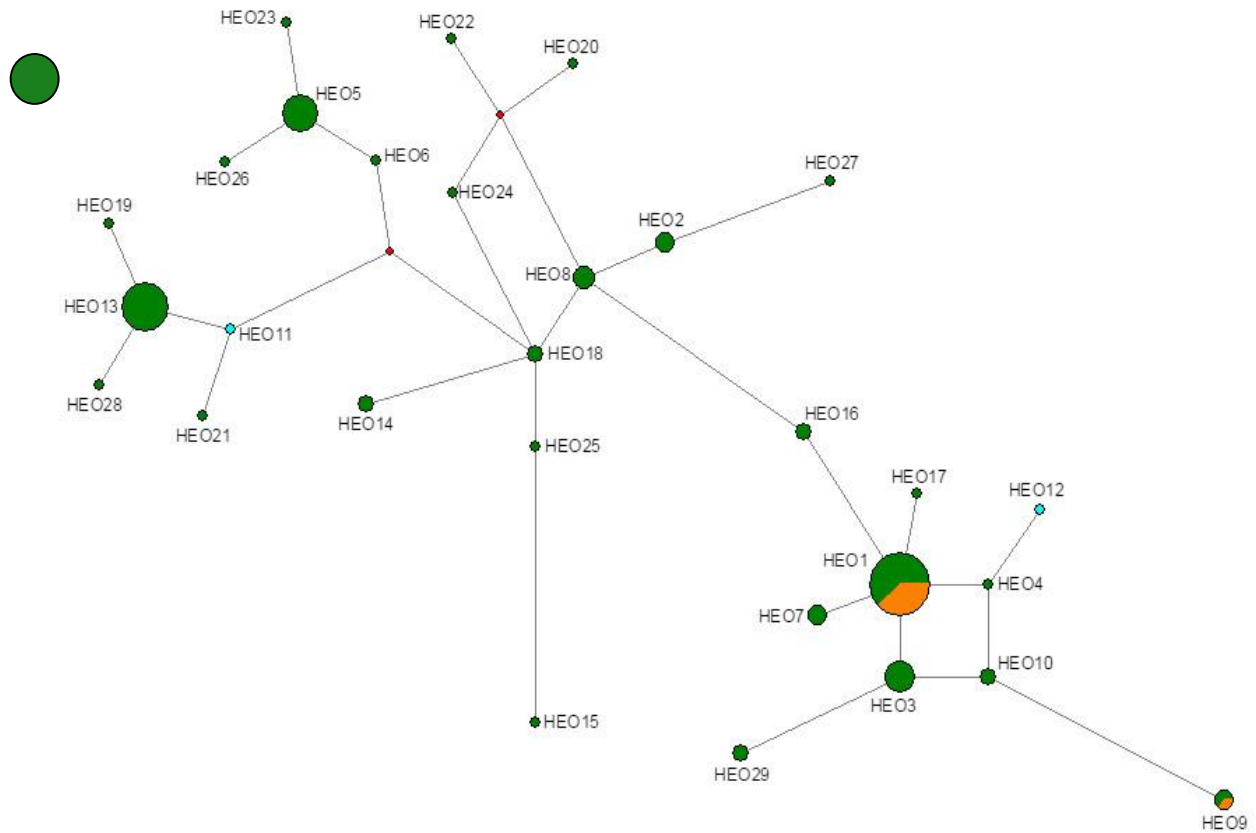
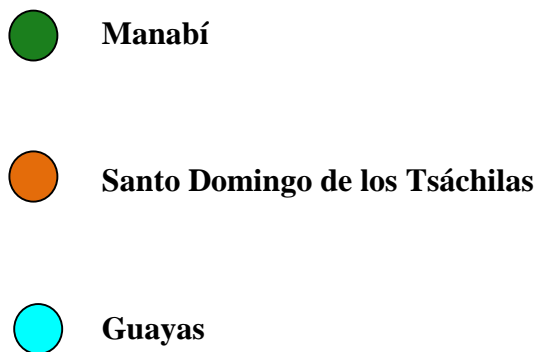


Figura 14. Red haplotípica para la región occidental mediante el marcador mt Cyt B



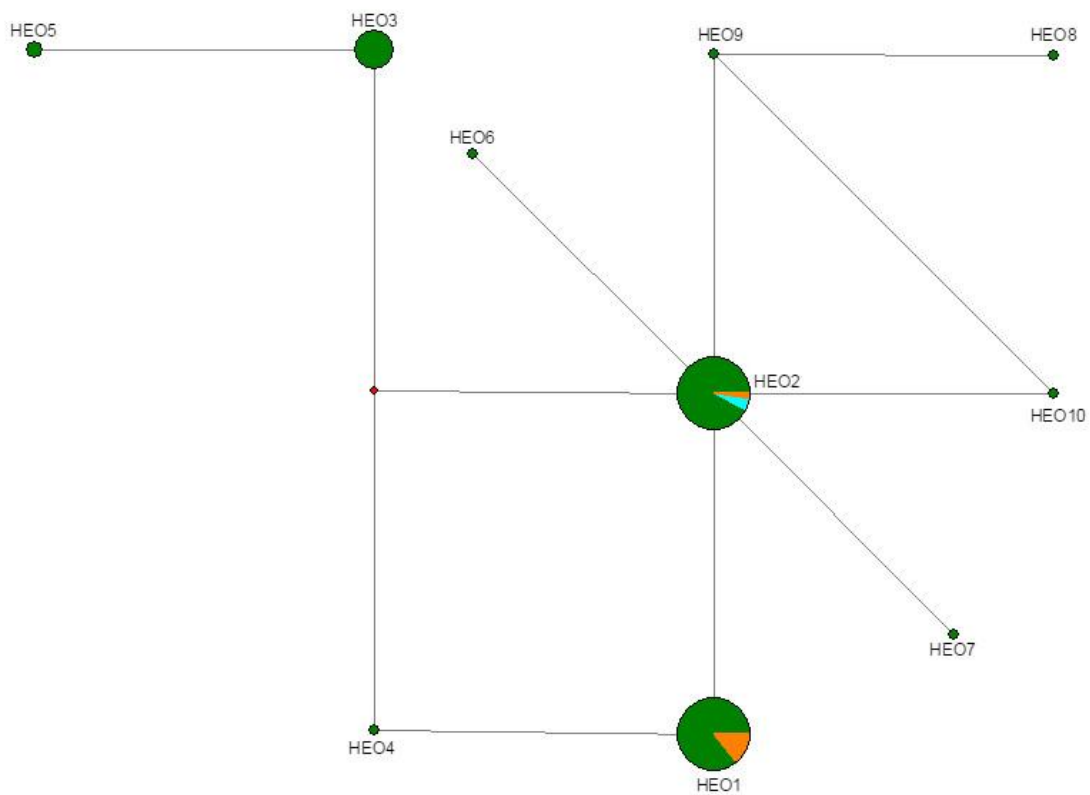


Figura 15. Red haplotípica para la región occidental mediante el marcador mtlSurRNA

 **Manabí**

 **Santo Domingo de los Tsáchilas**

 **Guayas**

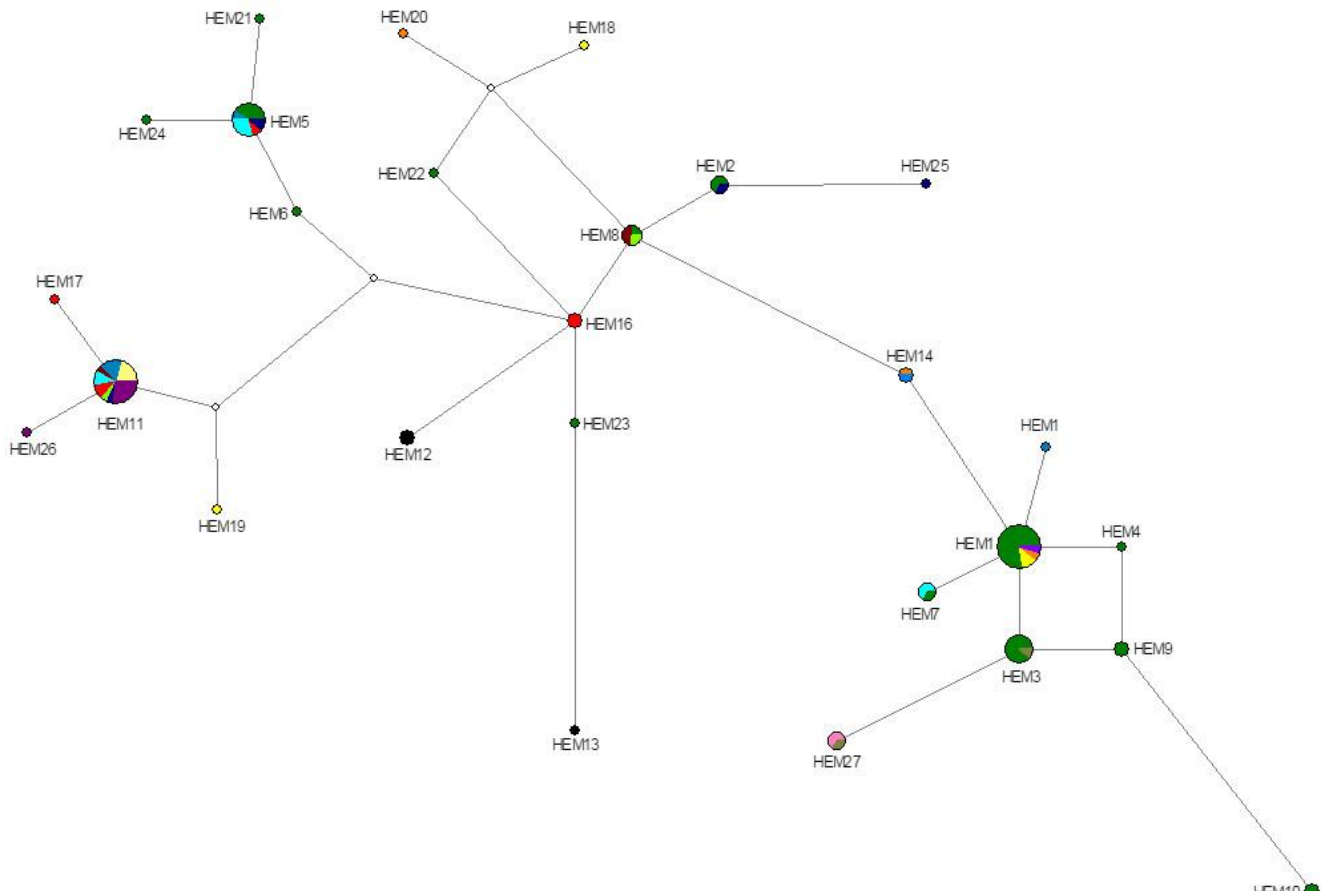


Figura 16. Red haplotípica para los 14 cantones de la provincia de Manabí, mediante el marcador mt Cyt B

Santa Ana		Pedernales	
San Vicente		Chone	
Junín		Pichincha	
Puerto López		Rocafuerte	
El Carmen		Portoviejo	
Paján		Jipijapa	
Olmedo		Jama	

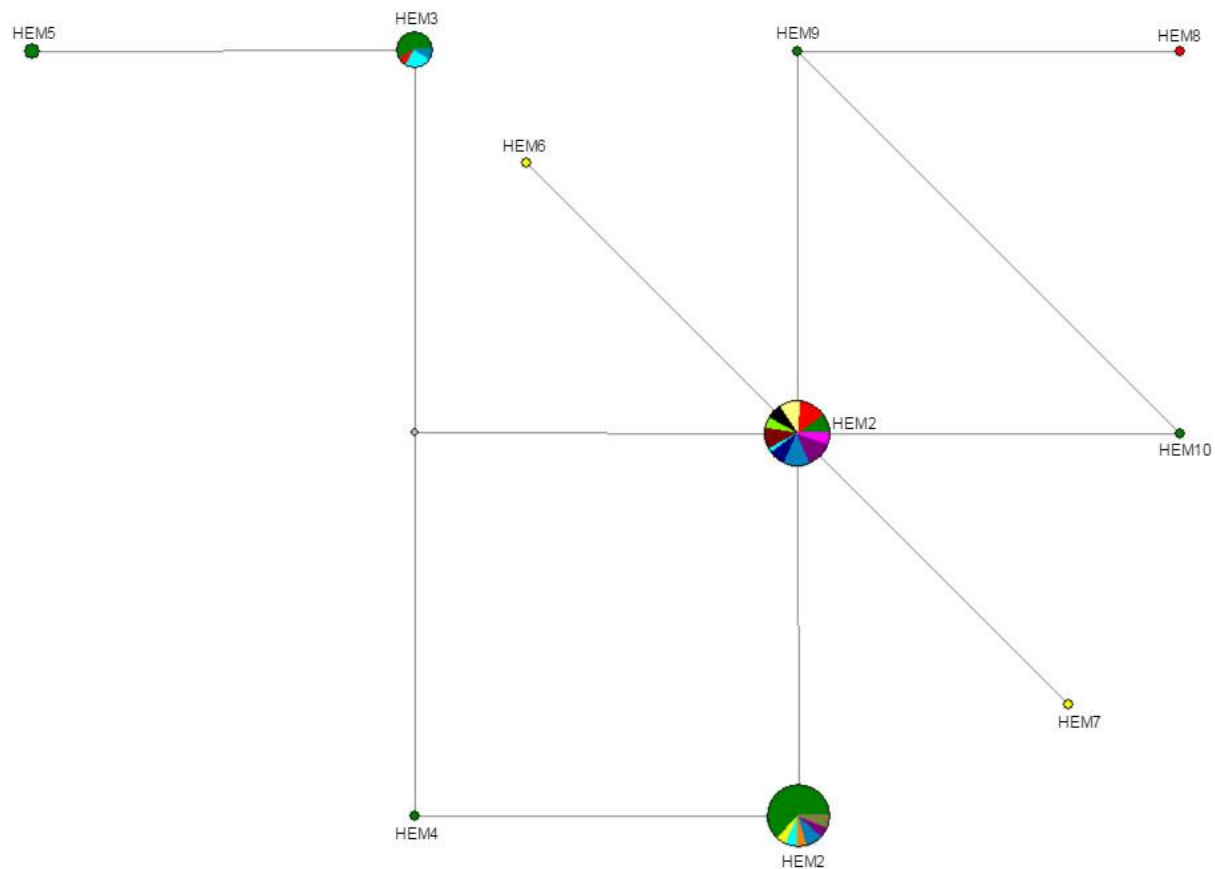


Figura 17. Red haplotípica para los 14 cantones de la provincia de Manabí, mediante el marcador mtlSurRNA

Santa Ana		Pedernales	
San Vicente		Chone	
Junín		Pichincha	
Puerto López		Rocafuerte	
El Carmen		Portoviejo	
Paján		Jipijapa	
Olmedo		Jama	

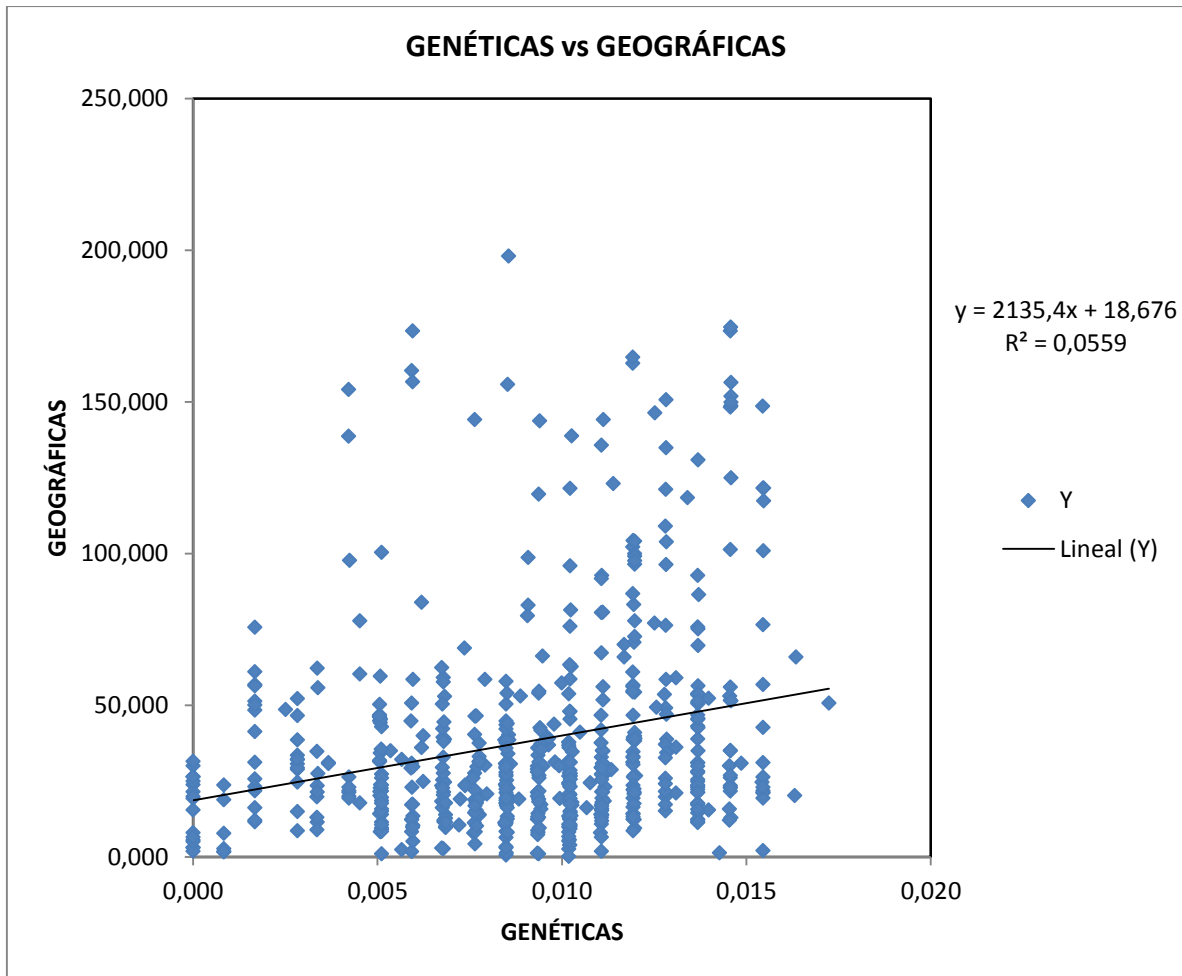


Figura 18. Test de Mantel para evaluar la correlación entre distancias genéticas y geográficas

No se establecieron relaciones entre la matriz de distancias genéticas, con la matriz de distancias geográficas de los individuos recolectados.

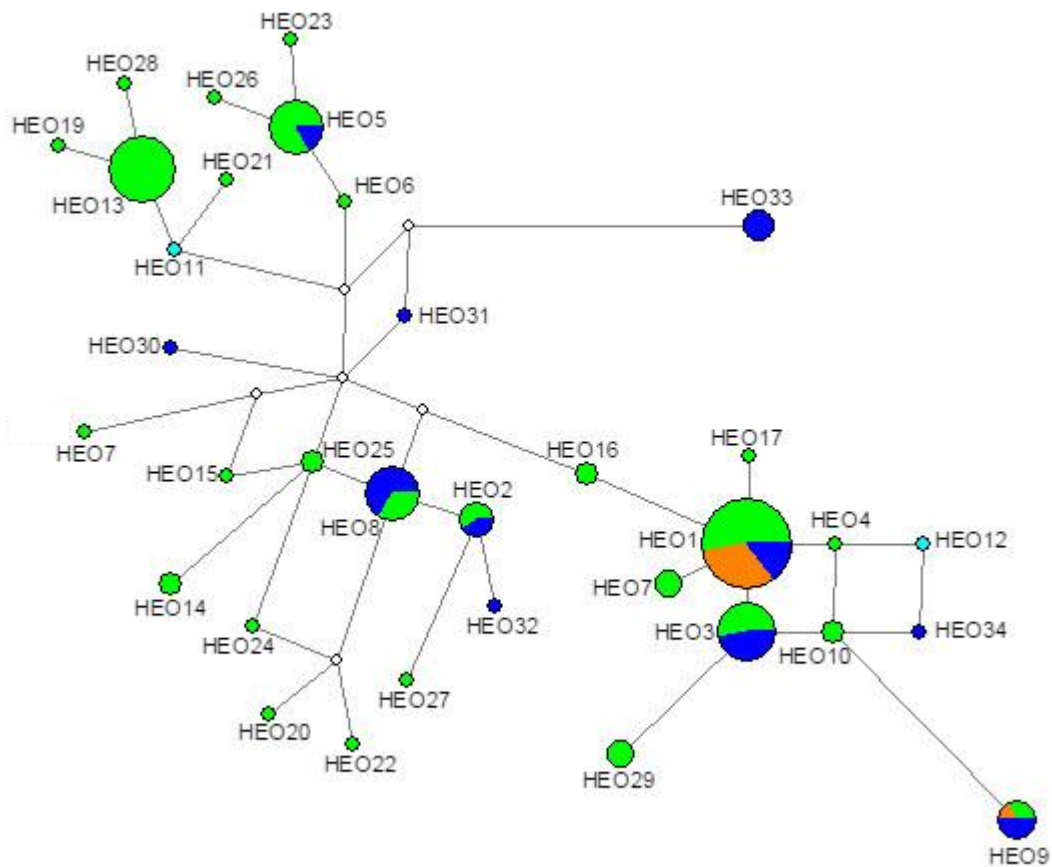


Figura 19. Red haplotípica mediante el mt Cyt B para evidenciar la relación entre los hábitats peridomiciliar y silvestre

- Manabí Silvestre
- Santo Domingo Silvestre
- Manabí Peridomicilio



Figura 20. Comparación entre *R. ecuadoriensis* recolectados en la provincia de Manabí y Santo Domingo de los Tsáchilas

A. Santo Domingo de los Tsáchilas

B. Manabí

9. TABLAS

Tabla 1. Número de secuencias utilizadas para los análisis con cada uno de los marcadores moleculares

Provincia	mt Cyt B	mtlsurRNA
Manabí	91	93
Santo Domingo	12	7
Guayas	2	2
TOTAL	105	102

Tabla 2. Índices de variabilidad genética, establecidos mediante el programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2009), en el análisis del fragmento mt Cyt B

Sitios variables =	29				
Sitios parsimoniosamente informativos	22				
Singleton sites	7				
ÍNDICES DE DIVERSIDAD					
<i>Poblaciones</i>	<i>n</i>	<i>s</i>	<i>k</i>	<i>h</i>	<i>π</i>
Zona Occidental	105	29	29	0,877 ± 0,021	0,0085
TOTAL	105	29	29	0,877 ± 0,021	0,0085

n= número de individuos

s= sitios variables

k= número de haplotipos

h= diversidad haplotípica

π= nucleotídica

Tabla 3. Índices de variabilidad genética, establecidos mediante el programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2009), en el análisis del fragmento mtlurRNA

Sitios variables =	8				
Sitios parsimoniosamente informativos	5				
Singleton sites	3				
ÍNDICES DE DIVERSIDAD					
<i>Poblaciones</i>	<i>n</i>	<i>s</i>	<i>k</i>	<i>h</i>	<i>π</i>
Zona Occidental	102	8	10	0,669 ± 0,027	0,00293
TOTAL	102	8	10	0,669 ± 0,027	0,00293

n= número de individuos

s= sitios variables

k= número de haplotipos

h= diversidad haplotípica

π= nucleotídica

Tabla 4. Distancias genéticas establecidas mediante el programa MEGA v6.0, para el análisis del fragmento mt Cyt B

a.

Distancia Genética Global	0,009	0,90%
Dentro de Grupos:		
Manabí	0,0089	0,89%
Santo Domingo	0,0014	0,14%
Guayas	0,0067	0,67%

b.

Entre Grupos			
Provincia1	Provincia 2	Dist	%
Manabí	Santo Domingo	0,008	0,80%
Manabí	Guayas	0,008	0,80%
Santo Domingo	Guayas	0,007	0,20%

Tabla 5. Distancias genéticas establecidas mediante el programa MEGA v6.0, para el análisis del fragmento mtlurRNA

a.

Distancia Genética Global	0,003	0,30%
Dentro de Grupos:		
Manabí	0,0030	0,30%
Santo Domingo	0,0007	0,07%
Guayas	0,0000	0%

b.

Entre Grupos			
Provincia1	Provincia 2	Dist	%
Manabí	Santo Domingo	0,0020	0,20%
Manabí	Guayas	0,0026	0,26%
Santo Domingo	Guayas	0,0022	0,22%

Tabla 6. Lista de haplotipos encontrados mediante el marcador mt Cyt B, con su número de secuencias y lugares a donde corresponden

Haplotipo	N° Secuencias	Cantones/Provincia
HEO1	29	Pto López Pichincha Portoviejo San Vicente Santo Domingo
HEO2	2	Santa Ana Portoviejo
HEO3	8	Paján Portoviejo
HEO4	1	Portoviejo
HEO5	10	Jama Pedernales Jipijapa Portoviejo Santa Ana
HEO6	1	Portoviejo
HEO7	3	Jipijapa Portoviejo
HEO8	4	Junín Rocafuerte Portoviejo
HEO9	3	Santo Domingo Portoviejo
HEO10	2	Portoviejo

Tabla 6. Lista de haplotipos encontrados mediante el marcador mt Cyt B, con su número de secuencias y lugares a donde corresponden (continuación...)

Haplotipo	N° Secuencias	Cantones/Provincia
HEO11	1	Guayas
HEO12	1	Guayas
HEO13	19	Chone Jama Junín Pedernales Rocafuerte San Vicente Jipijapa
HEO14	2	El Carmen
HEO15	1	El Carmen
HEO16	2	Jama San Vicente
HEO17	1	Jama
HEO18	3	Paján Olmedo
HEO19	2	Pedernales
HEO20	1	Pedernales

Tabla 6. Lista de haplotipos encontrados mediante el marcador mt Cyt B, con su número de secuencias y lugares a donde corresponden (continuación...)

Haplotipo	N° Secuencias	Cantones/Provincia
HEO21	1	Pichincha
HEO22	1	Pichincha
HEO23	1	Pto López
HEO24	1	Portoviejo
HEO25	1	Portoviejo
HEO26	1	Portoviejo
HEO27	1	Portoviejo
HEO28	1	Santa Ana
HEO29	1	San Vicente

Tabla 7. Lista de haplotipos encontrados mediante el marcador mtlurRNA

Haplotipo	N° Individuos	Cantón/Provincia
HEO1	41	Portoviejo Pichincha Jipijapa Pto López Jama San Vicente Paján Santo Domingo
HEO2	41	Portoviejo Pedernales Chone El Carmen Rocafuerte Junín Santa Ana Jama San Vicente Olmedo Jipijapa
HEO3	12	Portoviejo Pedernales Santa Ana Jipijapa
HEO4	1	Portoviejo
HEO5	2	Portoviejo
HEO6	1	Pichincha
HEO7	1	Pichincha
HEO8	1	Pedernales
HEO9	1	Potoviejo
HEO10	1	Portoviejo

Tabla 8. Distancias genéticas calculadas entre cantones de la provincia de Manabí, mediante el número promedio de sustitución de bases por cada sitio (Tamura, 1992; Tamura et al, 2013) dentro del fragmento mt Cyt B

CANTÓN													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Portoviejo													
Chone	0,017												
El Cármen	0,017	0,011											
Jama	0,009	0,005	0,011										
Jipijapa	0,009	0,007	0,012	0,008									
Junín	0,009	0,006	0,008	0,007	0,008								
Paján	0,005	0,014	0,012	0,011	0,010	0,009							
Pedernales	0,010	0,004	0,009	0,007	0,008	0,006	0,012						
Pichincha	0,008	0,010	0,012	0,009	0,010	0,008	0,008	0,010					
Pto López	0,007	0,013	0,012	0,011	0,011	0,009	0,006	0,012	0,008				
Rocafuerte	0,009	0,005	0,009	0,007	0,008	0,005	0,010	0,005	0,009	0,010			
Santa Ana	0,010	0,008	0,010	0,009	0,010	0,007	0,012	0,008	0,011	0,011	0,007		
San Vicente	0,010	0,002	0,012	0,006	0,008	0,007	0,012	0,006	0,009	0,011	0,006	0,009	
Olmedo	0,007	0,015	0,013	0,012	0,012	0,010	0,001	0,013	0,009	0,008	0,011	0,013	0,013

Tabla 9. Distancias genéticas calculadas entre cantones de la provincia de Manabí, mediante el número promedio de sustitución de bases por cada sitio (Tamura 1992; Tamura et al., 2013) dentro del fragmento mtlurRNA

CANTÓN													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Portoviejo													
Pedernales	0,004												
Chone	0,003	0,001											
El Cármen	0,003	0,001	0,000										
Pichincha	0,004	0,004	0,002	0,002									
Rocafuerte	0,003	0,001	0,000	0,000	0,002								
Junín	0,003	0,001	0,000	0,000	0,002	0,000							
Jipijapa	0,004	0,004	0,003	0,003	0,005	0,003	0,003						
Santa Ana	0,003	0,002	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,003					
Pto López	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,003				
Jama	0,003	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,003	0,002	0,001			
San Vicente	0,003	0,002	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,003	0,003	0,001	0,001		
Paján	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,004	0,003	0,000	0,001	0,001	
Olmedo	0,003	0,001	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,003	0,001	0,002	0,001	0,000	0,0026

10. ANEXOS

Anexo 1. Preferencia de hábitat por parte de algunos géneros de triatominos (Abad Franch *et al.*, 2005)

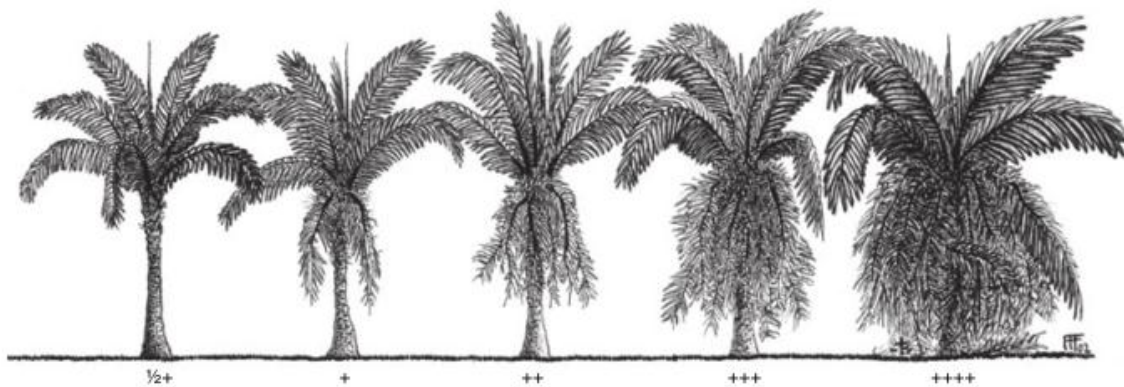
Triatomine	Silvatic Ecotope	Associated Trypanosomes	Associated Hosts
<i>Rhodnius</i> species	Arboreal: palms	<i>Trypanosoma cruzi</i> 1 [Z1] <i>T. rangeli</i>	Marsupial (<i>Didelphis</i>) Marsupial (<i>Didelphis</i>)
<i>Panstrongylus</i>	Arboreal: not palms	<i>T. cruzi</i> 1 [Z1]	<i>Didelphis</i>
<i>Panstrongylus</i>	Terrestrial: burrows	<i>T. cruzi</i> [Z3]	Edentate <i>Dasybus</i> Marsupial <i>Monodelphi</i>
<i>Triatoma</i>	Terrestrial: rocks	<i>T. cruzi</i> 2 [Z2]	[Edentates?] ^a Rodents (<i>Cavia</i>) Primates (<i>Leontocebus</i>)

Anexo 2. Medidas de acumulación de materia orgánica en palmeras

a.



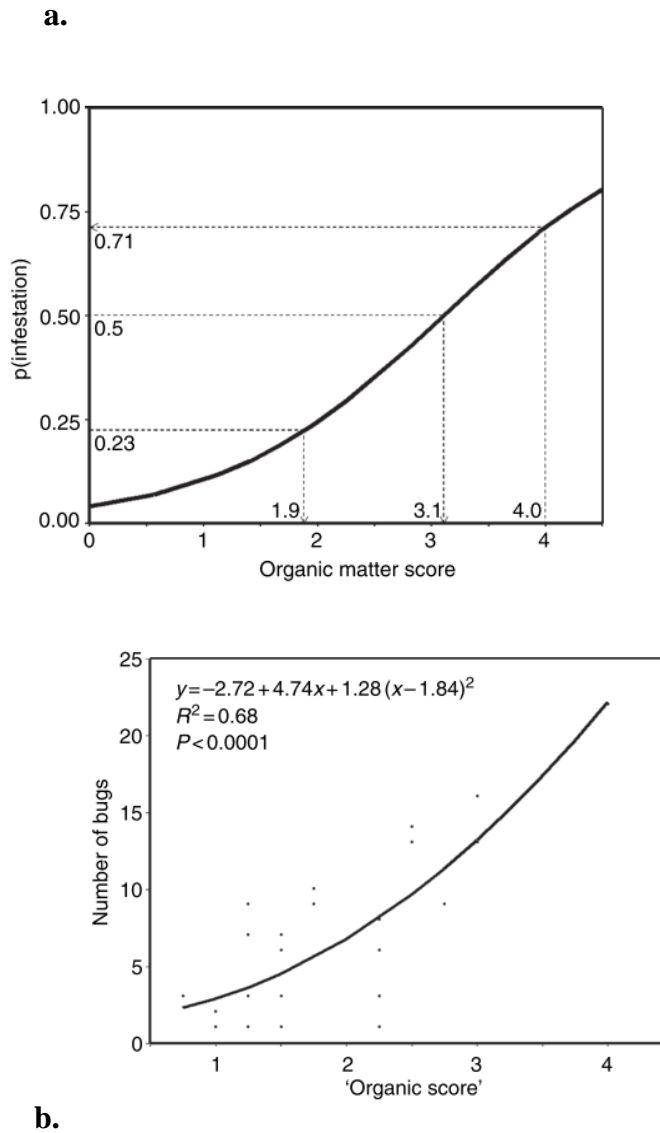
b.



a.- Plantas epífitas vivas que crecen sobre las palmeras

b.- Materia orgánica en descomposición

Anexo 3. Correlaciones entre materia orgánica presente en las palmeras y la presencia de triatomíneos



a.- La probabilidad de infestación de una palmera en relación a la cantidad de materia orgánica presente; b.- La cantidad de insectos que hipotéticamente se podrían encontrar en relación a la medida de la cantidad de materia orgánica.

Anexo 4. Permiso de colección para las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos



AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

N° 004-15 IC-FAU-FLO-DNB/MA

FLORA X

FAUNA X

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere La Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

Investigador	C.I. / Pasaporte	Nacionalidad
Villacis Salazar Anita Gabriela	1706504535	Ecuatoriana
Yumiseva Marín Cesar Alberto	1709331571	Ecuatoriana
Bustillos Herrera Juan José	1715618235	Ecuatoriana
Sánchez Mackenzie Dino David	2100602461	Ecuatoriana

Para que lleven a cabo la investigación: "**Presencia de *Rhodnius ecuadoriensis*, vector de la enfermedad de Chagas, en la palma *Phytelephas aequatorialis* en la región occidental del Ecuador**".

De acuerdo a las siguientes especificaciones

- Solicitud de: Dra. Anita Gabriela Villacis Salazar Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Crónicas.
- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Coordinadores de Patrimonio Natural, Responsables de Vida Silvestre de las Direcciones Provinciales y Dirección Nacional de Biodiversidad.
- Inicio de la investigación: 28 de mayo de 2015 hasta 28 de mayo del 2016.
- Valoración técnica del proyecto: Paul Aulestia Dirección Nacional de Biodiversidad.
- Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN O MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin el permiso que deberá obtenerse en la correspondiente Dirección Provincial del Ministerio del Ambiente.
- Estas muestras no podrán ser **UTILIZADAS EN CUALQUIER ACTIVIDAD DE BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO A RECURSO GENÉTICO**, sin la correspondiente autorización del Ministerio del Ambiente.
- Complementos Autorizados de la Investigación**
 - Colección de Triatomíneos para identificación taxonómica morfológica.

Obligaciones del investigador

- Entregar al Ministerio del Ambiente-DNB, (02) dos copia del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar formato Informe Final en la DNB).
- Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión.
- Lista taxonómica de las especies debidamente identificadas, objeto de la autorización con sus respectivas coordenadas.
- Entregar una copia de los resultados de su trabajo, a cada una de las áreas protegidas o Direcciones Provinciales donde se realizó la investigación.
- Depositar los especímenes producto de esta investigación en una unidad de manejo autorizada por el Ministerio del Ambiente (Museo de invertebrados PUCE), las muestras deberán ser preservadas, curadas y depositadas de lo contrario, se deberán sufragar los gastos que demanden la preparación del material para su ingreso a la colección correspondiente.
- Entregar a la dirección Nacional de Biodiversidad el certificado del depósito de las muestras emitida por una institución científica ecuatoriana depositaria de material biológico.

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales: 8,9,10,11,12,13 se responsabiliza a la Dra. Anita Gabriela Villacis Salazar, Investigadora del Centro de investigación de Enfermedades Infecciosas y Crónicas.

Anexo 4. Permiso de colección para las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Los Ríos (continuación...)

OBLIGACIONES Y CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE ESTA AUTORIZACIÓN:

14. SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN LAS PROVINCIAS:

Provincia	Cantón	Parroquia
Los Ríos	Palenque	
Santo Domingo de los Tsáchilas	Santo Domingo	San José de Alluriquín

15. NO SE AUTORIZA LA INVESTIGACIÓN EN ÁREAS PROTEGIDAS

16. SE AUTORIZA EL ESTUDIO DE MUESTRAS ZOOLOGICAS Y VEGETALES CON EL PROPÓSITO DE:

- Determinar la presencia de *Rhodnius ecuadoriensis* en las palmeras *Phytelephas aequatorialis* en la parte occidental del Ecuador.
- Conocer las especies de los insectos vectores presentes en el área de estudio.
- Calcular los indicadores entomológicos (infestación, nacimiento, densidad y colonización) presentes en las palmeras.

17. LAS MUESTRAS PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN DEBERAN SER CATALOGADAS POR INDIVIDUO, PARA FAUNA DESDE EL NÚMERO 001—004-15 IC- FAU-FLO-DNB/MA HASTA 000-004-15 IC- FAU-FLO-DNB/MA.

18. SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES MATERIALES Y/O EQUIPOS PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA INVESTIGACION.

EQUIPO	MATERIALES
GPS	Escalera
Esteroscopio	Machete
Cámara de fotos	Plástico
Microscopio	Recipientes plásticos
	Marcador Indeleble, amés, cuerdas, mascarillas
	Alcohol industrial.

19. EN CASO DE ENCONTRARSE NUEVAS ESPECIES, DEBERÁ NOTIFICARSE A LA DIRECCION NACIONAL DE BIODIVERSIDAD LA DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE ADJUNTANDO LA RESPECTIVA PUBLICACIÓN.
20. ES OBLIGATORIO DEPOSITAR HOLOTIPOS Y EJEMPLARES ÚNICOS A UNA INSTITUCIÓN DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO, DE SER EL CASO SÓLO PUEDEN LLEVARSE FUERA DEL PAÍS EN CALIDAD DE PRÉSTAMO POR UN PERIODO DE HASTA 6 MESES, PREVIA AUTORIZACIÓN.
21. LOS INVESTIGADORES DEBERÁN REALIZAR SUS INTERVENCIONES EN CAMPO BAJO UN MANEJO RESPONSABLE Y ÉTICO CON LOS ESPECIMENES ASÍ COMO CON LOS EQUIPOS Y MATERIALES UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN.
22. PARA EL INGRESO A AREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.
23. PARA EL INGRESO A AREAS NATURALES PROTEGIDAS LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO RESPONSABLE DE ÁREA.
24. NO SE AUTORIZA LA UTILIZACIÓN DE ARMAS DE FUEGO, EXPLOSIVOS O SUBSTANCIAS VENENOSAS COMO METODOLOGIA DE ESTA INVESTIGACION.
25. SE PROHIBE EL INGRESO A LAS AREAS NATURALES DEL ESTADO PORTANDO ARMAS, IMPLEMENTOS DE COLECCIÓN, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, ESPECIES VEGETALES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.
26. NINGÚN ESPÉCIMEN PRODUCTO DE ESTA INVESTIGACIÓN PODRA SER UTILIZADO PARA USO COMERCIAL SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
27. ESTAS MUESTRAS NO PODRÁN SER UTILIZADOS EN CUALQUIER ACTIVIDAD DE BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO A RECURSO GENÉTICO SIN LA CORRESPONDIENTE AUTORIZACIÓN DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE.
28. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAIDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
29. SE SOLICITARA PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
30. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE AREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA. Y DEMAS NORMATIVA PERTINENTE.
31. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES DEPOSITADOS CON REFERENCIA No. 3173069 DEL 14 DE ABRIL DEL 2015 EN EL BANCO NACIONAL DE FOMENTO CUENTA 0010000785.


Francisco Prieto

Director Nacional de Biodiversidad

PA 29/05/15

CC: Coordinadores de Patrimonio Natural
Responsables de Vida Silvestre

**Anexo 4. Permiso de colección para las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas
y Los Ríos (continuación...)**

 Ministerio del Ambiente		RUC.:1760010460001				
		FACTURA No.001-002-4330 NÚMERO DE AUTORIZACIÓN NO AUTORIZADO FECHA Y HORA DE AUTORIZACIÓN 0000-00-00 00:00:00 AMBIENTE:PRODUCCION EMISIÓN:NORMAL CLAVE DE ACCESO				
Ministerio del Ambiente Ministerio del Ambiente - Planta Central Dirección Matriz:El Giron Madrid E12-102 y Andalucía - Quito * Ecuador Dirección Sucursal:El Giron Madrid E12-102 y Andalucía Contribuyente Especial Nro:1308 OBLIGADO A LLEVAR CONTABILIDAD:SI		 <small>040620159117060184600E120050628000043301177021712</small>				
Razón Social / Nombres y Apellidos:PUCE Fecha Emisión:2015-06-04 10:44:06		RUC / CI:1790105601001 Guía Remisión:				
Cod. Principal	Cod. Auxiliar	Cant	Descripción	Precio Unitario	Descuento	Precio Total
POT15		2	PAGO DE TASA PARA AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTIFICA COLECCIÓN (FLORA Y FAUNA)	21.70	0.00	43.40
NOTA:: Depositos: 631059187, 631059690,				Subtotal 12%		0
				Subtotal 0%		43.4000
				Subtotal No sujero IVA		0.00
				Descuento		0.0000
				ICE		0.0000
				IVA 12%		0.0000
				Propina		0.00
Valor Total		43.40				

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
				Laboratorio		
TB8002	Tabiaso	Pedernales	Manabí	J1	X	X
TB8084	Tabiaso	Pedernales	Manabí	J2	X	X
TB8086	Tabiaso	Pedernales	Manabí	J3	X	X
DC7993	Daca 2	Chone	Manabí	J4	X	X
JC8015	Cajón de Achiote	El Cármen	Manabí	J5	X	X
JC8016	Cajón de Achiote	El Cármen	Manabí	J6	X	X
JC8017	Cajón de Achiote	El Cármen	Manabí	J7	X	X
DB8169	Dislabón	Chone	Manabí	J8	X	X
DB8170	Dislabón	Chone	Manabí	J9	X	X
DB8171	Dislabón	Chone	Manabí	J10	X	X
PF7939	Piedra Fina	Pichincha	Manabí	J11	X	X
PF7940	Piedra Fina	Pichincha	Manabí	J12	X	X

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio (continuación...)

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
				Laboratorio		
DZ8005	Danzarín	Rocafuerte	Manabí	J13	X	X
CA8034	Cruz Alta	Portoviejo	Manabí	J14		X
CV8228	Cheve Arriba	Pedernales	Manabí	J15		X
CV8227	Cheve Arriba	Pedernales	Manabí	J16	X	X
CA8060	Cruz Alta	Portoviejo	Manabí	J17	X	X
MB8237	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J18	X	X
MB8238	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J19	X	X
QM8076	Quebra de Macona	Portoviejo	Manabí	J20	X	X
VZ7953	Valarezo	Pichincha	Manabí	J21	X	X
VZ7954	Valarezo	Pichincha	Manabí	J22	X	X
DZ8045	Danzarín	Rocafuerte	Manabí	J23	X	X
MI8229	Moralito	Junín	Manabí	J24	X	X
MI8230	Moralito	Junín	Manabí	J25		X
CD8223	Chade	Jipijapa	Manabí	J26	X	X

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio (continuación...)

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
Laboratorio						
CD8224	Chade	Jipijapa	Manabí	J27	X	X
AM8207	La América	Jipijapa	Manabí	J28	X	X
AM8208	La América	Jipijapa	Manabí	J29	X	X
ET8138	Estero de Noche Arriba	Santa Ana	Manabí	J30	X	X
ET8139	Estero de Noche Arriba	Santa Ana	Manabí	J31	X	X
TO7934	Tablada de Algodón	Junín	Manabí	J32	X	X
TO7935	Tablada de Algodón	Junín	Manabí	J33	X	X
MR8092	Mariscal Sucre	Jipijapa	Manabí	J34	X	X
TL8195	Tablada del Moral	Santa Ana	Manabí	J35	X	X
TL8196	Tablada del Moral	Santa Ana	Manabí	J36	X	X
VG8203	Vueltas Largas	Puerto López	Manabí	J37	X	X
VG8204	Vueltas Largas	Puerto López	Manabí	J38	X	X
TT8090	Santo Tomás	Jama	Manabí	J39	X	X
PY8112	Punta Larga	Jama	Manabí	J40	X	X

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio (continuación...)

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
Laboratorio						
ET8187	Estero seco	Jama	Manabí	J41	X	X
ET8188	Estero seco	Jama	Manabí	J42	X	X
DT8247	Cadialito	Jama	Manabí	J43	X	X
DT8248	Cadilaito	Jama	Manabí	J44	X	X
RC8242	Río canoa	San Vicente	Manabí	J45	X	X
RC8243	Río canoa	San Vicente	Manabí	J46	X	X
HD8214	Humedal	San Vicente	Manabí	J47	X	X
HD8215	Humedal	San Vicente	Manabí	J48	X	X
RR8103	El remojo	San Vicente	Manabí	J49	X	X
CI8158	Chita	San Vicente	Manabí	J50	X	X
LP8155	Limón de Procel	Pajan	Manabí	J51	X	X
LP8156	Limón de Procel	Pajan	Manabí	J52	X	X
SY8700	Santa Rosa	Pedernales	Manabí	J53	X	X
SY8701	Santa Rosa	Pedernales	Manabí	J54	X	X

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio (continuación...)

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
Laboratorio						
JM8704	Jesus María	Portoviejo	Manabí	J55	X	X
JM8705	Jesus María	Portoviejo	Manabí	J56	X	X
QM8706	Quebrada de Macona	Portoviejo	Manabí	J57	X	X
QM8707	Quebrada de Macona	Portoviejo	Manabí	J58	X	X
PY8708	Punta Larga	Jama	Manabí	J59		X
PY8709	Punta Larga	Jama	Manabí	J60		X
BJ8710	El bejuco	Potoviejo	Manabí	J61	X	
BJ8711	El bejuco	Potoviejo	Manabí	J62	X	X
AC8712	Ambache chico	San Vicente	Manabí	J63	X	
AC8713	Ambache chico	San Vicente	Manabí	J64	X	X
GJ8714	Guaijil	Olmedo	Manabí	J65	X	
GJ8715	Guaijil	Olmedo	Manabí	J66	X	X
MR8716	Mariscal Sucre	Jipijapa	Manabí	J67	X	X
MR8717	Mariscal Sucre	Jipijapa	Manabí	J68	X	X

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio (continuación...)

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
Laboratorio						
MB5025	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J69	X	X
MB5012	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J70	X	X
MB5028	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J71	X	X
MB5030	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J72	X	X
MB5141	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J73	X	X
BJ3092	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J74	X	X
BJ3093	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J75	X	X
BJ3094	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J76	X	X
BJ3095	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J77	X	X
BJ3096	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J78	X	X
BJ3097	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J79	X	X
MB3445	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J80	X	X
MBN3483	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J81	X	X
MBN3487	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J82	X	X

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio (continuación...)

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
				Laboratorio		
MBN3488	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J83	X	X
MBN3489	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J84	X	X
MBN3490	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J85	X	X
MBN3492	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J86	X	X
MBN3493	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J87	X	X
MBN3506	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J88	X	X
MBN3507	Maconta Bajo	Portoviejo	Manabí	J89	X	X
BJ5953	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J90	X	X
BJN3110	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J91	X	X
BJ3761	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J92	X	X
BJ3764	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J93	X	X
BJ3765	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J94	X	X
JB3767	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J95	X	X
BJ3768	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J96	X	X

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio (continuación...)

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
Laboratorio						
BJ3771	El bejuco	Portoviejo	Manabí	J97	X	
SA6490	San Antonio	San Antonio	Guayas	J98	X	X
S/C	-----	-----	Guayas	J99	X	X
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J100	X	X
TOQP4356	Las Orquídeas	Sto Domingo	Sto Domingo	J101		X
TOQP4357	Las Orquídeas	Sto Domingo	Sto Domingo	J102		X
TUTP4358	Unión del Toachi	Sto Domingo	Sto Domingo	J103		X
TUTP4359	Unión del Toachi	Sto Domingo	Sto Domingo	J104		X
TUTP4360	Unión del Toachi	Sto Domingo	Sto Domingo	J105		X
TUTP4361	Unión del Toachi	Sto Domingo	Sto Domingo	J106		X
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J107	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J108	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J109	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J110	X	

Anexo 5. Tabla de individuos de *Rhodnius ecuadoriensis*, recolectados palmeras de tagua (*Phytelephas aequatorialis*) y utilizados en este estudio (continuación...)

Código	Localidad	Cantón	Provincia	id	Cyt B	LNR
				Laboratorio		
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J111	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J112	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J113	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J114	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J115	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J116	X	
S/C	Alluriquín	Sto Domingo	Sto Domingo	J117	X	

Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN para patas de triatomíneos mediante el Kit DNeasy (Qiagen, 2006)



1. Se procedió a extraer el ADN de las patas de aproximadamente 70 individuos adultos de *Rhodnius ecuadoriensis*.
2. Se procedió a extraer las patas de los insectos, procurando que no se pierda ninguna y que se encuentren completas, las patas fueron lavadas con alcohol al 70% y secadas con papel absorbente.
3. Posteriormente se empezó a cortar las patas de cada individuo con ayuda de una hoja de bisturí en cajas petri de vidrio individuales, hasta obtener pequeños pedazos.
4. Los pedazos fueron trasladados a tubos eppendorf de 1,5 ml debidamente etiquetados con el código de cada insecto, se agregaron 200 ul de tampón ATL y se procedió a vortexear durante 10 segundos la muestra.
5. Se añadió 20 ul de proteinasa K en cada muestra, se vortexeó durante 10 segundos; y se procedió a la maceración mediante el uso de un pistilo estéril.
6. Luego de aproximadamente 2 minutos de maceración con el pistilo en cada muestra y de obtener turbidez en el tubo, se llevó las muestras a una incubadora para dejarlas a 55° C durante toda la noche, vortexeando las muestras ocasionalmente para lograr una lisis completa de todos los compuestos proteicos que componen las patas de los insectos.
7. Una vez transcurrido este tiempo se retiró las muestras de la incubadora y fueron vortexeadas por 15 segundos, después se agregó 200 ul de búfer AL a cada muestra e inmediatamente fueron sometidas a vortex por 10 segundos.
8. Se incubó las muestras a 70° C durante 10 minutos para inactivar la proteinasa K.

9. Se retiraron las muestras de la incubadora y se les agregó 200 ul de etanol al 100% y se mezcló todo por vortex, se procedió a pasar toda la cantidad posible de muestra líquida evitando tomar los pedazos de las patas a una columna debidamente etiquetada, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm durante un minuto.
10. Se descartó el tubo que contenía el líquido que bajo de la columna y se colocó la misma en un tubo de recolección nuevo.
11. Se añadió 500 ul de búfer AW1 en la columna para luego centrifugar a 8000 rpm durante un minuto.
12. La columna fue nuevamente trasladada a un nuevo tubo, luego se añadió 500 ul de búfer AW2 y se centrifugó durante tres minutos a máxima velocidad.
13. Se agregó 50 ul de búfer AE, se dejó incubar a condiciones ambientales durante 1 minuto con la tapa abierta y se centrifugó las muestras a 8000 rpm durante 1 minuto, se repitió el mismo paso una segunda vez para al final desechar la columna y conservar el tubo en el cual se obtuvieron 100 ul de ADN suspendido en búfer AE.
14. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

Anexo 7. Protocolo de PCR y condiciones de temperatura para el marcador mt Cyt B

Reactivo	C. inicial	1x
Master Mix	-	12.5 ul
Forward	10 uM	1,5 ul
Reverse	10 uM	1,5 ul
H2O	-	10.5 ul
ADN	5ng/ul	4 ul

Condiciones		
PCR		
95°C	5 min	
95°C	30 seg	35
45°C	30 seg	Ciclos
72°C	60 seg	
72°C	10 min	

Anexo 8. Protocolo de PCR y condiciones de temperatura para el marcador mtl_{sur}RNA

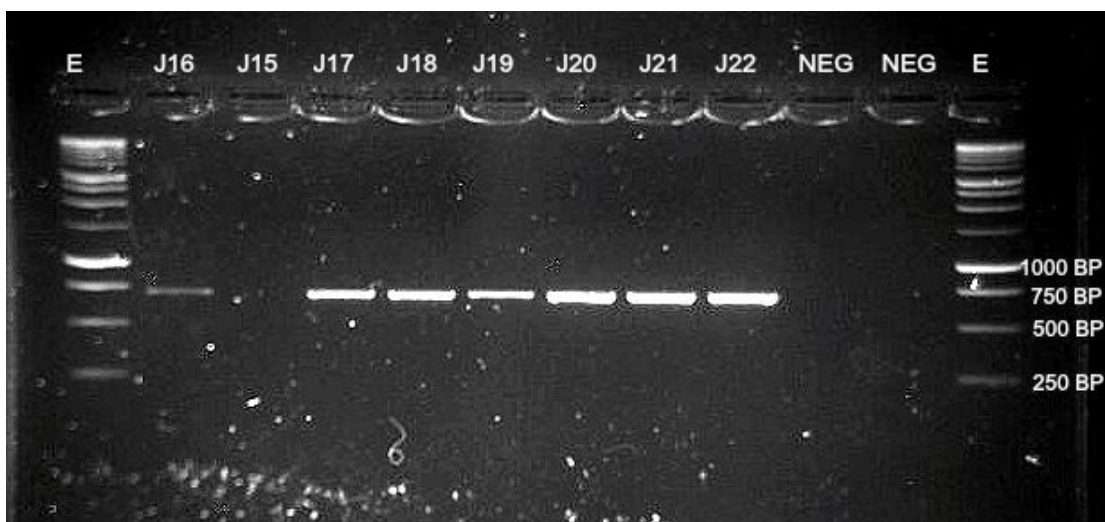
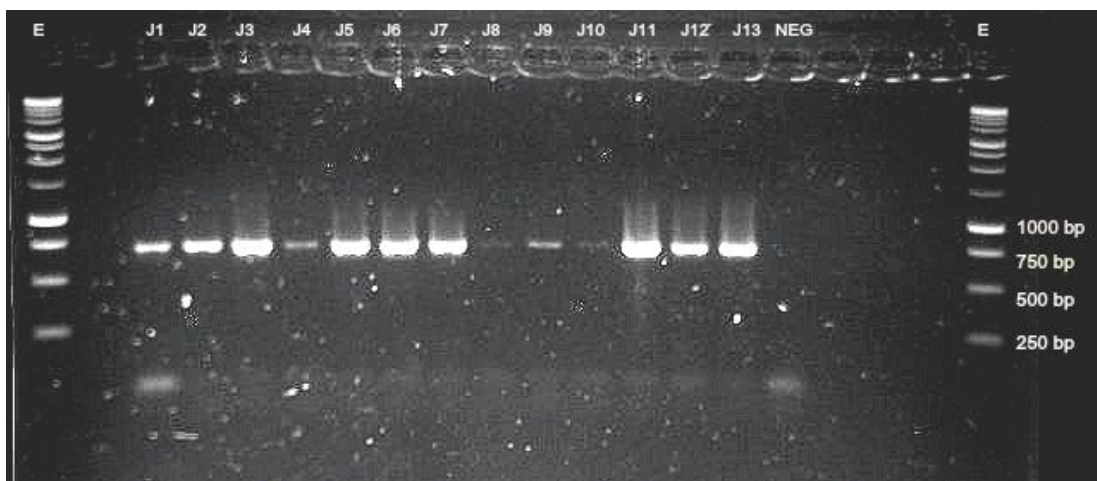
Reactivo	C. inicial	1x
Buffer	5x	5 ul
MgCl	25 m M	2 ul
Dntps	40 m M	0,5 ul
Forward	10 uM	1,5 ul
Reverse	10 uM	1,5 ul
Taq	5 U /ul	0,2 ul
H2O	-	12,3 ul
ADN	5ng/ul	7 ul

Condiciones

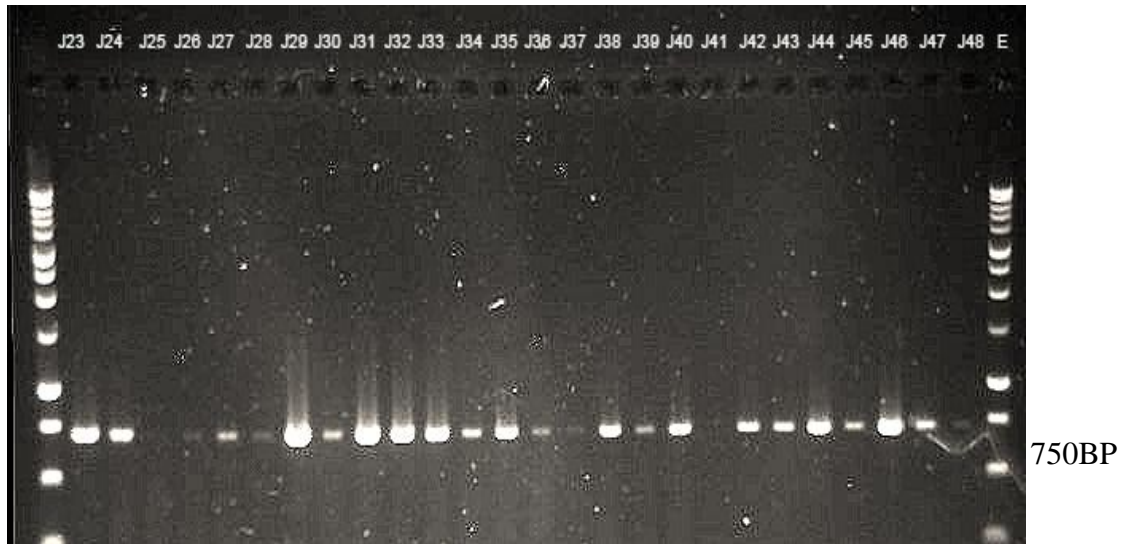
PCR

94°C	5 min	
94°C	30 seg	35
47°C	30 seg	Ciclos
72°C	60 seg	
72°C	7 min	

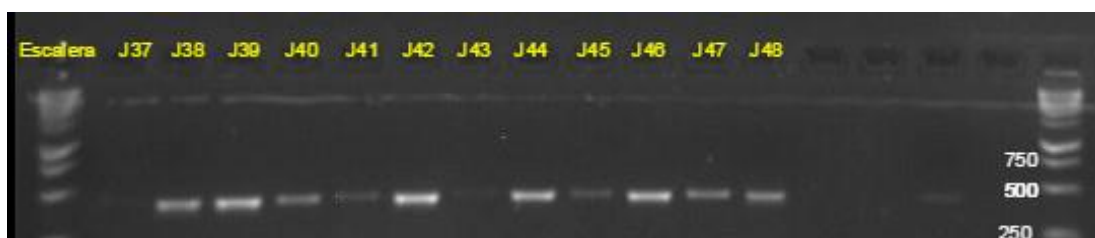
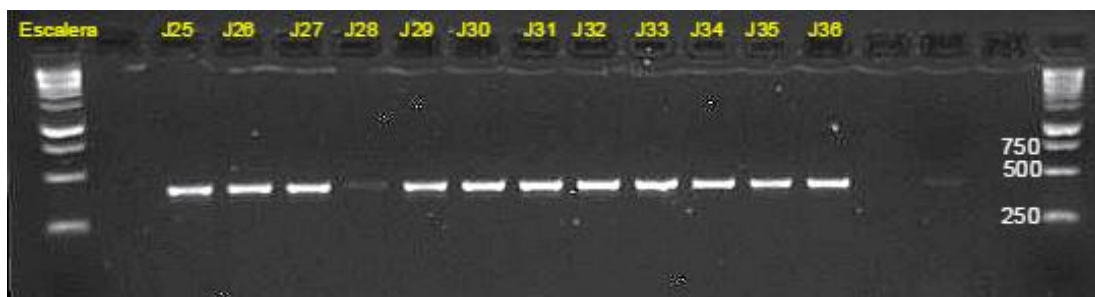
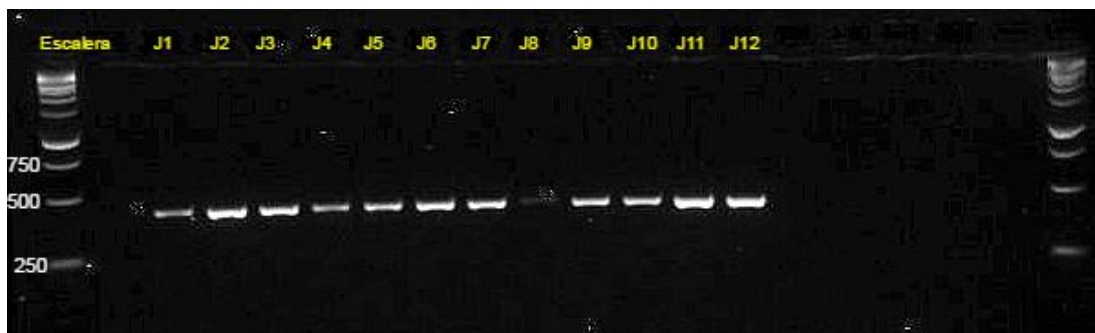
Anexo 9. Confirmación de los resultados de PCR para los marcadores utilizados, mediante geles de agarosa al 1%.



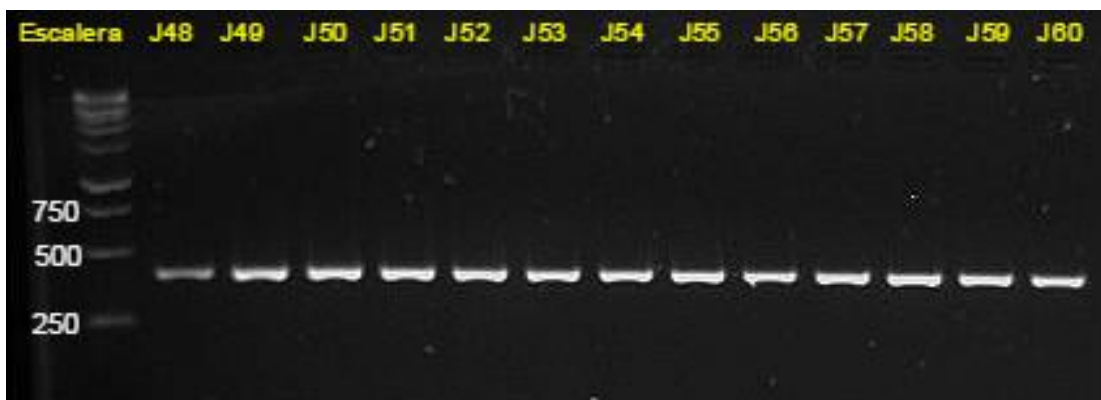
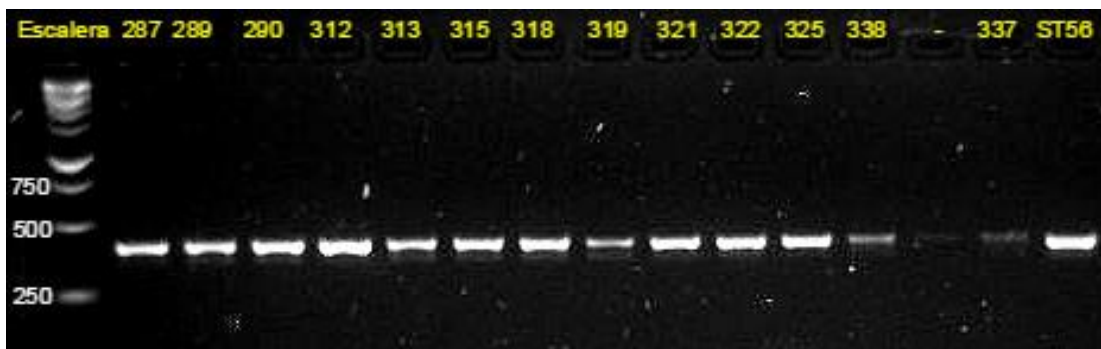
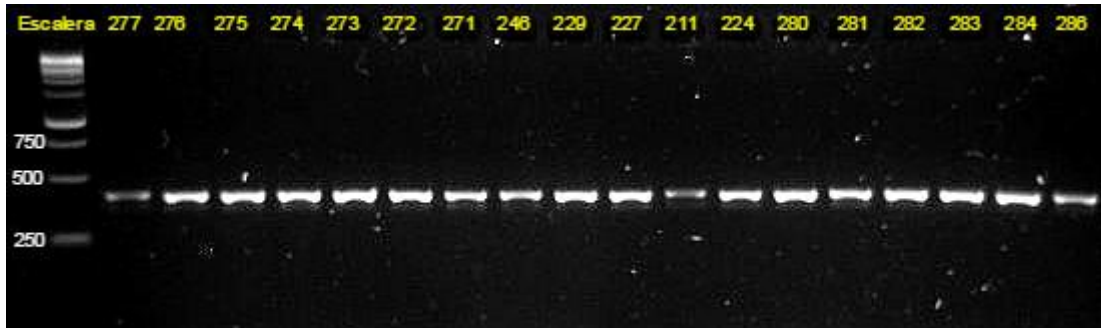
Anexo 9. Confirmación de los resultados de PCR para el mt Cyt B, mediante geles de agarosa al 1% (continuación...)



Anexo 9. Confirmación de los resultados de PCR para el mtl_{sur}RNA, mediante geles de agarosa al 2% (Continuación...)



Anexo 9. Confirmación de los resultados de PCR para el mtlstrRNA, mediante geles de agarosa al 2% (continuación...)



Anexo 12. El programa DnaSP v5.0 (Rozas *et al.*, 2009), nos permite determinar los índices de variabilidad genética, realizar el Test de neutralidad Tajimas' D, y la lista de haplotipos de nuestras secuencias

```

Haplotype/DNA Sequences Data File

Input Data File: C:\...ALIGN TODO LNR.fas
Number of sequences: 102  Number of sequences used: 102
Selected region: 1-388  Number of sites: 388
Total number of sites (excluding sites with gaps / missing data): 388

Sites with alignment gaps: not considered
Number of variable sites: 8

===== Haplotype Distribution =====
Number of haplotypes, h: 10
Haplotype diversity, Hd: 0.6686

  Hap_1: 41 [1-3 5-8 12-13 16-18 20 23-26 45 50-53 59-60 68-69 74-77 82-83 86 90 92 97-102]
  Hap_2: 41 [4 9 14-15 29-41 44 46 54-56 62-64 66-67 70-73 78-81 85 91 93-96]
  Hap_3: 12 [10-11 19 22 48-49 57-58 61 65 84 89]
  Hap_4: 1 [21]
  Hap_5: 2 [27-28]
  Hap_6: 1 [42]
  Hap_7: 1 [43]
  Hap_8: 1 [47]
  Hap_9: 1 [87]
  Hap_10: 1 [88]

  Hap_1: 41 [POa1 POa2 POA3 POA5 POA6 POA7 POA8 POA12 POA13 POA16 POA17 POA18 POA20 POA23 POA24 POA25 POA26 PORT1 PORT4 PORT5 PICH3 PICH4 JIPI3 JIPI4 PLO1 PLO2 JAM5 JAM6 SVIC1 SVIC2 PAJ1 PAJ2 PORT6 JAM7 PORT10 ST1 ST2 ST3 ST4 ST5 ST6]
  Hap_2: 41 [POA4 POA9 POA14 POA15 POA29 POA30 POA31 PED1 PED2 PED3 CHO1 ECA1 ECA2 ECA3 CHO2 CHO3 CHO4 ROCA1 PED4 ROCA2 JUN1 JUN2 SANA2 JUN3 JUN4 SANA3 SANA4 JAM1 JAM2 JAM3 JAM4 JAM5 SVIC3 SVIC4 SVIC5 SVIC6 PED7 JAM8 SVIC7 OLM1 OLM2 JIPI6]
  Hap_3: 12 [POA10 POA11 POA19 POA22 PORT2 PORT3 JIPI1 JIPI2 SANA1 JIPI5 PED6 PORT9]
  Hap_4: 1 [POA21]
  Hap_5: 2 [POA27 POA28]
  Hap_6: 1 [PICH1]
  Hap_7: 1 [PICH2]
  Hap_8: 1 [PED5]
  Hap_9: 1 [PORT7]
  Hap_10: 1 [PORT8]

===== Genetic Differentiation Estimates =====
Chi-square (table), Chi2: 137,166  P-value of Chi2: 0,0000 ***; (df = 56)
ns, not significant; *, 0.01<P<0.05; **, 0.001<P<0.01; ***, P<0.001

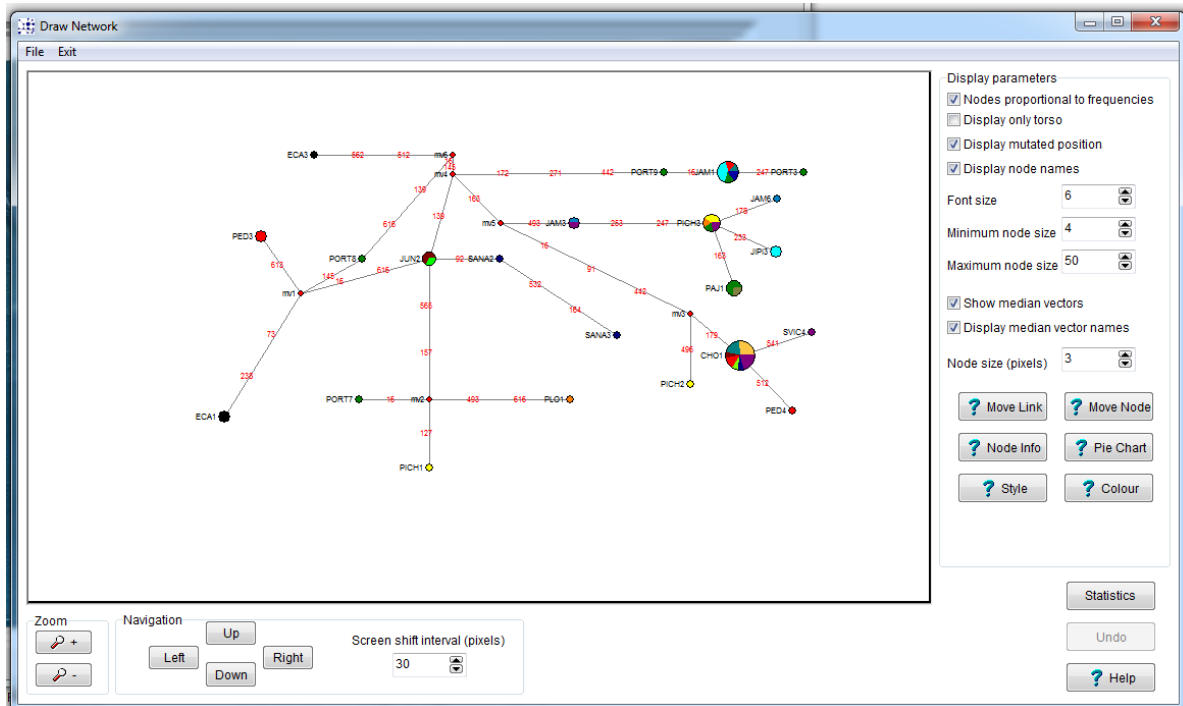
HBK 1992, Hs: 0,82701  Hst: 0,05941
HBK 1992, Ks: 4,75057  Kst: 0,06593
HBK 1992, Ks*: 1,52062  Kst*: 0,05031
HBK 1992, Z: 2644,97164  Z*: 7,56364
Hudson 2000, Snn: 0,81229

===== Gene Flow Estimates =====
Genome: Haploid

Haplotype Data Information
Nei 1973
  Gst: 0,11441  Nm: 3,87
Sequence Data Information
Nei 1982
  DeltaSt: 0,00064  GammaSt: 0,07597  Nm: 6,08
Lynch and Crease 1990 (with Jukes and Cantor correction)
  Nst: 0,26588  Nm: 1,38
Hudson, Slatkin and Maddison 1992
  Fst: 0,26542  Nm: 1,38

```

Anexo 13. El programa Network (Fluxus Techonlogy Ltd.) nos permite elaborar las diferentes redes haplotípicas, para poder establecer las conexiones entre los grupos establecidos



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Juan José Bustillos Herrera, C.I. 171561823-5 autor del trabajo de graduación intitulado “Análisis filogeográfico de *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae) recolectados en *Phytelephas aequatorialis* en diferentes áreas del Occidente del Ecuador.”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO 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 Universidad.

Quito, 2016

Sr. Juan José Bustillos Herrera

C. I. 1715618235