

Uso de microsatélites en *Rhodnius ecuadoriensis* para determinar estructura poblacional y patrones de migración en el Ecuador

Juan Carlos, Fernández-Cadena*; Derly, Andrade-Molina
(Recibido: abril 1-2018, Aceptado: julio 2- 2018)

Universidad de Especialidades Espíritu Santo, Samborondón, Guayaquil-Ecuador
*E-mail: fernandezjuan@uees.edu.ec

Resumen

El entender el comportamiento migratorio de triatominos entre los ambientes silvestres hacia zonas habitadas es crucial para la lucha contra la Enfermedad de Chagas. Los marcadores basados en ADN muestran ventaja para desarrollar dicho fenómeno específicamente la plasticidad en microsatélites, que en un principio fueron desarrollados para estudiar a *Rhodnius pallescens* y que posteriormente mostraron ser efectivos en *Rhodnius ecuadoriensis*. En donde no solamente su análisis es congruente con el origen evolutivo de la clina *pallescens-colombiensis-ecuadoriensis*, sino que además permite observar patrones de migración en *R. ecuadoriensis* dentro de las provincias del Ecuador. La migración humana está relacionada directamente con la de los insectos, dicho movimiento se puede constatar en la homogeneidad que existe entre los triatominos encontrados en Loja con aquellos ubicados en Manabí.

Palabras Clave: *Rhodnius ecuadoriensis*, genética de poblaciones, enfermedad de Chagas, Microsatélites.

Use of microsatellites in *Rhodnius ecuadoriensis* to determine population structure and migration patterns in Ecuador

Abstract

Understanding the migratory behavior of triatominae (insects) between wild environments towards inhabited areas is crucial for avoiding the spread of Chagas disease. The DNA based markers show an advantage in developing this phenomenon, specifically microsatellite-based markers, which were initially developed to study *Rhodnius pallescens* and subsequently proved to be effective in *Rhodnius ecuadoriensis*. Its analysis is not only consistent with the evolutionary origin of the clina *pallescens-colombiensis-ecuadoriensis*, but it also allows observing patterns of migration in *R. ecuadoriensis* within the provinces of Ecuador. Human migration is directly related to that of the insects, this movement can be seen in the homogeneity that exists between the bugs found in Loja with those located in Manabí.

Keywords: *Rhodnius ecuadoriensis*, population genetics, Chagas disease, Microsatellites.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (EC) es una parasitosis ocasionada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (1) conformada por 22 géneros (2) y de los que se destacan: *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* (1,3). La enfermedad es endémica en 21 países de sur y centro América, afectando a 6 millones de personas anualmente. Recientemente reportada en Canadá, Europa, Estados Unidos y algunas ciudades del pacífico Oeste debido a la migración de personas infectadas (4). Actualmente, cerca de 70 millones de personas viven en áreas de riesgo de contraer esta enfermedad, de las cuales el 20% de éstas viven en el área andina (Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú) (3).

A lo largo de la historia esta patología de *antropozoonosis* crónicas se ha considerado como unas de las enfermedades con mayor impacto socioeconómico dado que entre el 30 y el 40% de los pacientes infectados evoluciona en formas graves de cardiopatía o mega formaciones digestivas (5). En el caso particular de Ecuador, alrededor de 33500 pacientes sufren la fase crónica sintomática de la enfermedad, traduciéndose a una inversión económica que alcanzan los 23 millones de dólares (1).

El vector más importante en la transmisión de la enfermedad en Ecuador es *Triatoma dimidiata*, introducida probablemente de manera artificial al país. Sin embargo, *Rhodnius ecuadoriensis* actúa como vector primario en los valles interandinos de Loja y El Oro, y como vector secundario en zonas de la costa (Manabí) (6). Insectos silvestres habitan en a copa de palmeras, especialmente de la especie *Phytelephas aequatorialis* (3). Es necesario recalcar la importancia de *R. ecuadoriensis* en la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas ya que se reporta su presencia en 5 provincias de las 24 en Ecuador, siendo éstas las que presentan mayor actividad antropogénica (7).

Uno de los principales problemas en el control vectorial de triatominos es la recolonización de los insectos entre el hábitat silvestre o peridoméstico hacia el ambiente doméstico, entendiéndose el proceso de domesticación como la colonización de estos insectos dentro de domicilios humanos y una población peridoméstica como insectos que habitan los alrededores de la vivienda hasta una distancia de aproximadamente 200 metros, estos dos últimos casos implican una mayor interacción de insecto-humano; mientras que en una población silvestre esta relación es casi nula dado que los insectos se encuentran alejados de la vivienda (8).

Durante el proceso de domesticación se aprecian simplificaciones morfológicas, observándose reducciones en el promedio del tamaño corporal, esta reducción se aprecia en las especies pertenecientes a la *clina pallescens-colombiensis-ecuadoriensis*, siendo *R. pallescens* la de mayor tamaño, *R. colombiensis* la segunda, y finalmente *R. ecuadoriensis* la de menor tamaño (9). La reducción de tamaño entre *R. ecuadoriensis* es notoria entre los insectos de la parte norte y central (14 mm) frente a los del sur del Ecuador (11 mm) (10).

El analizar la estructura genética de poblaciones con respecto al flujo de genes permite determinar el movimiento de los triatominos entre los mencionados hábitats, este estudio busca determinar la historia evolutiva dentro de la tribu *Rhodniini* haciendo énfasis en la evolución de *R. ecuadoriensis* con respecto a su hábitat y cercanía con asentamientos humanos utilizando marcadores moleculares de microsatélites.

METODOLOGÍA

Área de estudio

Se escogieron dos provincias de estudio para el presente trabajo, poblaciones de *R. ecuadoriensis* ubicados en Manabí fueron comparadas con aquellos encontrados al sur del país en Loja. La recolección de los

insectos domésticos se realizó dentro de viviendas (Loja- Quilanga y Manabí- Lodana), así también en ambientes peridomésticos (Manabí -Santa Ana) cerca de animales de corral y madrigueras de roedores. En el caso del ambiente silvestre se orientó hacia nidos de animales silvestres (Manabí-Alhajuella).

Adicional a esto, se analizó una población de insectos que permanecieron en condiciones controladas (alimentación aviar semanal, humedad y temperatura constantes) de insectario durante 9 años previo a la investigación, estos originalmente fueron de Manabí -Portoviejo (Figura 1).

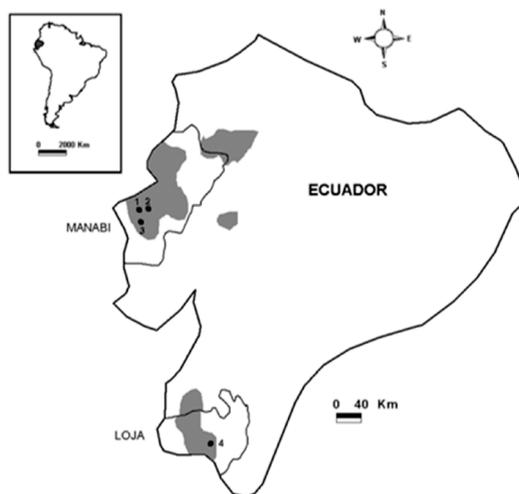


Figura 1. Distribución de *Rhodnius ecuadoriensis* en el Ecuador y sitios de muestreo de los insectos analizados: 1) Doméstico - Lodana, 2) Silvestre - Alhajuella y 3) Peridoméstico - Santa Ana en la provincia de Manabí. 4) Peridoméstico -Quilanga en la provincia de Loja

Extracción de ADN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN genómico se extrajo en diferentes fechas por lo que se utilizaron distintos protocolos de extracción a partir de las patas de cada insecto previamente conservadas en etanol 70%, para 64 insectos se utilizó el método de Salting Out (11), 15 mediante Grind Buffer (12) y en 10 muestras se había realizado previamente la extracción mediante el kit de AquaPure Genomic de BIORAD®. Cada muestra de ADN fue resuspendida en 50 µl de agua destilada desionizada (13) y almacenadas a -20°C para posteriores análisis.

Amplificación de microsatélites

Diez loci microsatélites fueron seleccionados a partir de las bases de datos publicadas para *R. pallescens* (14) (Tabla 1), el volumen final para cada reacción es de 12.5 µl conteniendo 20 ng de ADN aproximadamente, 0.2 mM de

dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 12.5 pmol de cada primer (el iniciador directo marcado con fluoresceína), 0.625 U/µl de Taq Polimerasa. La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y una extensión final de 72°C por 10 minutos. El producto obtenido fue leído por medio de secuenciación por electroforesis capilar en MACROGEN® y los alelos fueron medidos utilizando el programa Genescan.

Tabla 1. Loci de microsatélites utilizados en *R. pallescens*

Locus	<i>R. pallescens</i> (Harry et al. 1998)			<i>R. pallescens</i> (Harry et al. 1998)		
	Tamaño del producto de PCR (PB)	Alelos	Frecuencia del alelo más común	Tamaño del producto de PCR (PB)	Alelos	Frecuencia del alelo más común
L3	88 - 113	11	0.318 (91)	68 - 88	11	0,35 (83)
L9	277 - 297	8	0.408 (279)	236 - 271	13	0,28 (266)
L13	166-175	6	0.397 (168) 0.382 (174)	160 - 170	9	0,47 (164)
L17	98-170	20	0.347 (123)	117 -170	12	0,61 (154)
L25	161-166	5	0.342 (162)	147 - 164	4	0,85 (163)
L33*	177-195	9	0,386 (183) 0,329 (177)	N/A	N/A	N/A
L43	114-135	8	0.309 (207)	124 - 183	24	0,16 (178)
L47	120-124	2	0.803 (120)	108 - 122	15	0,36 (119)
L50	205-269	16	0.162 (130)	64-98	10	0,67 (90)
L58	86-99	5	0.528 (91)	72 - 187	11	0,70 (82)

Análisis de datos

Estudio de poblaciones individuales

La frecuencia alélica (15) corresponde a la frecuencia relativa de un alelo en una población determinada y fue calculada con GENODIVE (16). Un alelo privado es aquel localizado de manera exclusiva en una sola población, estos fueron) determinados por CONVERT (17). El equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se calculó en todas las poblaciones utilizando el método de aleatorización de cadenas ocultas de Markov modificado por (18) utilizando el programa Fstat (19). La tasa de reproducción in situ existente en cada población fue determinado mediante el cálculo de los valores de heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) mediante el programa Arlequin V3.1 (20). De igual manera se determinó el índice de endogamia (Fis) utilizando el programa Genetix (21) para disminuir la tasa de error por amplificación de microsatélites y la generación de alelos nulos junto a posteriores falsos homocigotos, que son problemáticos para cualquier análisis de estructura poblacional). Se realizó una corrección de alelos nulos utilizando el programa freeNA (22).

Estudio de estructura poblacional

El grado de diferencia entre las frecuencias de cada subpoblación (F_{st}) y número de migrantes (N_m) fueron determinados por medio de Genetix (21), estos valores son estimaciones indirectas del flujo genético y la migración entre poblaciones. El análisis molecular de varianza (AMOVA) se analizó mediante una matriz de distancias euclidiana, por medio de GENODIVE (16).

Con el fin de determinar la estructura poblacional se utilizó el programa STRUCTURE V2.2 (23) el cual por medio de un modelo de agrupación en clusters, se asigna a los individuos en las poblaciones. El modelo asume un número desconocido de poblaciones (K), caracterizada por un grupo de frecuencias alélicas para cada locus. Los individuos son asignados de manera probabilística a cada población, o de manera parcial entre dos o más.

Resultados

Poblaciones individuales

Un total de 89 insectos fueron recolectados en el Ecuador, tanto la ubicación geográfica y el número de insectos por sitio se encuentran descritos en la tabla 2. De los

diez marcadores basados en secuencias de microsatélites descritas para *R. pallescens* (14), nueve pudieron ser amplificados en *R. ecuadoriensis*. El número de alelos encontrados para cada población, la frecuencia de alelo más común y el tamaño de producto de PCR esperado, muestran resultados similares entre *R. pallescens* y *R. ecuadoriensis*. Exceptuando L58, el resto de los microsatélites presentan un tamaño de amplificación de PCR dentro del mismo rango,

en lo que respecta la frecuencia del alelo más común, estos presentan variabilidad entre *R. pallescens* y *R. ecuadoriensis*. La mayoría de los loci descritos son polimórficos, llegando a ser incluso en su totalidad en las poblaciones procedentes del ambiente peridoméstico, mientras que un porcentaje menor (66,6%) en poblaciones silvestres y domésticas (Tabla 2), misma relación se ve considerando a los alelos privados.

Tabla 2. Generalidades Geográficas y análisis de poblaciones inviduales de *R. ecuadoriensis*.

Procedencia	Número de insectos	Provincia	Localidad	NI	Lp	Lm	AP	H _o	H _e	F _{is}
Peridoméstico	22	Manabí	Santa Ana	9	9	0	22	0,31	0,7	0,57
Silvestres	12		Alhajuela	9	6	3	2	0,33	0,54	0,4
Insectario	24		Portoviejo	9	8	1	9	0,32	0,54	0,41
Doméstico	10		Lodana	9	7	2	10	0,34	0,56	0,4
Peridoméstico	21	Loja	Quilanga	9	9	0	18	0,32	0,42	0,24

NI = Loci analizados, Lp = Loci polimórficos, Lm = Loci monomórficos, AP = Alelos Privados, H_o = Media Heterocigicidad observada, H_e = Media Heterocigicidad esperada, F_{is} = Índice de Endogamia

Los índices de heterocigicidad observada (H_o) son superiores a los de heterocigicidad esperada (H_e), mientras que el índice de endogamia es elevado en el ambiente peridoméstico de Manabí (0,57) y el menor valor se registra en la zona sur en Loja (0,24) (Tabla 2). Los índices de heterocigicidad observada (H_o) son superiores a los de heterocigicidad esperada (H_e), mientras que el índice de endogamia es elevado en el

ambiente peridoméstico de Manabí (0,57) y el menor valor se registra en la zona sur en Loja (0,24). El desequilibrio de Hardy-Weinberg fue determinado para todos los loci en las poblaciones de *R. ecuadoriensis*, posterior a la corrección de alelos nulos. El mayor número de loci en desequilibrio se observó en la población procedente de insectario y en el ambiente silvestre en Manabí (Tabla 3).

Tabla 3. EHW para las poblaciones de *R. ecuadoriensis* en Ecuador

Locus	Equilibrio de Hardy-Weinberg				
	Manabí			Loja	
	Peridoméstico	Insectario	Silvestre	Doméstico	Peridoméstico
L3	NS	P < 0.05*	P < 0.05*	NS	NS
L9	NS	NS	NS	NS	NS
L13	NS	NS	NS	NS	NS
L17	NS	P < 0.05*	P < 0.05*	NS	NS
L25	NS	NS	Mo	NS	NS
L43	NS	P < 0.05*	NS	NS	NS
L47	NS	P < 0.05*	NS	NS	NS
L50	NS	NS	NS	NS	NS
L58	NS	NS	NS	NS	NS

Estructura poblacional

Para medir el grado de diferenciación genética entre poblaciones, se determinó el índice de fijación estadístico F (Fst) y la tasa efectiva de migración (Nm) entre todas las poblaciones en conjunto y por pares (Tabla 4). La prueba global pareada (Fst =0,20; p<0,05) y AMOVA (Fst =0,23; p<0,05) indican que la población de *R. ecuadoriensis* de Manabí es diferente a la de Loja. A nivel de subpoblaciones (Tabla 4), la mayor diferenciación genética ocurre

entre el ambiente silvestre y doméstico de Manabí (Fst =0,43; p<0,05), seguido entre el hábitat peridoméstico y doméstico de Manabí (Fst=0,3; p<0,05). Los valores entre las poblaciones de insectos tomando como referencia. Al considerar los valores entre todas las poblaciones tomando como referencia la proveniente del insectario son elevados (Fst = 0,24, 0,23 & 0,48; p<0,05), estos resultados son esperados dado las condiciones de aislamiento en el laboratorio.

Tabla 4. Valores Fst y Nm entre las poblaciones de *R. ecuadoriensis*

	Man Sil	Man Per	Man Dom	Man Ins	Loj Per
Man Sil	****	5,81	0,33	0,79	1,1
Man Per	0,04	****	0,56	1,58	1,49
Man Dom	0,43	0,3	****	0,26	5,34
Man Ins	0,24	0,13	0,48	****	0,63
Loj Per	0,18	0,14	0,04	0,28	****

Man Sil = Manabí silvestre, Man Per = Manabí peridomicilio, Man Dom = Manabí domicilio, Man Ins = Manabí Insectario, Loj Per = Loja peridomicilio

El Nm presentó el valor más alto entre los ambientes de Manabí silvestre y peridoméstico (Nm=5,81), esto representa un total de 6 migrantes por generación. Considerando la población de insectos encontrada en Loja, muestra valores incrementados en comparación a las poblaciones naturales en Manabí. De manera particular, el segundo valor elevado se da entre la población de Loja y el ambiente doméstico de Manabí (Nm =5,34) lo que implica 6 migrantes por generación.

La representación gráfica se dio por la iteración entre individuos mediante agrupamiento ancestral utilizando STRUCTURE 2.2. La

probabilidad de análisis inicial fue la opción de la presencia de 5 poblaciones diferentes, de acuerdo al análisis, se estima la presencia de solamente 3 (representadas en los colores azul, verde y rojo). Los triatomos en condiciones de insectario conforman una sola población diferente al resto de los sitios analizados mientras que en Manabí hay dos poblaciones diferentes. La primera conformada entre insectos de los ambientes del peridomicilio y silvestre siendo la otra estrictamente domiciliar. En lo que respecta a nivel geográfico, la población de insectos de Loja no es exclusiva de dicha región, sino que se asemeja a las del domicilio en Manabí en un alto porcentaje.

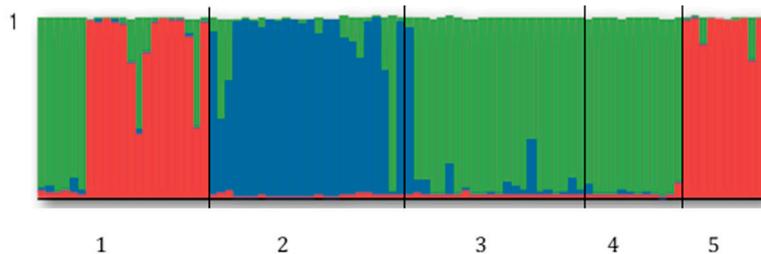


Figura 2. Estructura poblacional determinada por STRUCTURE
1 = sur peridomicilio, 2 = centro colonia, 3 = centro peridoméstico,
4 = centro doméstico, 5 = centro doméstico

Discusión

El presente estudio registra la presencia de los *R. ecuadoriensis* en nidos de árboles maderables (i.e. *Guazuma ulmifolia*, *Laurus nobilis*) en la provincia de Manabí. Al sur del país en la provincia de Loja, las palmas no forman parte de la flora nativa y las condiciones ambientales son diferentes en donde la escasa vegetación y las altas temperaturas prevalecen (24). Esto influye a que el insecto se encuentre de manera preferente en los ambientes doméstico y peridoméstico (25,26).

Estructura poblacional

A nivel geográfico la población de insectos dentro de la provincia de Manabí es homogénea, dicho patrón entre ambientes silvestres y peridomésticos ha sido observado en *R. prolixus* (27). Al existir un número considerable de individuos migrantes entre los ambientes silvestre, peridoméstico y doméstico en Manabí, se observa un freno para la diferenciación genética entre las poblaciones. Dicho fenómeno curiosamente es observado entre las poblaciones domésticas de Manabí y peridoméstica de Loja. Esto se refleja a que, por el flujo constante de insectos, la conformación de tres poblaciones diferentes: la primera conformada por los insectos de colonia (color azul), la segunda por los insectos de los ambientes silvestre y peridoméstico en Manabí (color verde) y la tercera entre la población doméstica en Manabí y peridoméstica en Loja (color rojo) (Figura 2).

El incremento en número de migrantes en las condiciones insectario, así también los valores elevados de H_o frente a la H_e y sumado a que no se índices endogámicos significativos. Indica que nuevos insectos están llegando en menor número de manera artificial a la colonia, esta migración ocurriría al momento de realizar los procesos de alimentación y limpieza de la colonia.

Comportamiento poblacional

Las relaciones genéticas entre poblaciones indican que a nivel de provincia son dos poblaciones distintas. Dentro de Manabí existe una gran diferenciación genética al comparar el ambiente doméstico, peridoméstico y silvestre. Una relación parecida se observó entre la población de Loja frente a los ambientes silvestre y peridoméstico en Manabí. Esta asociación no es común en poblaciones de *Rhodnius* (27), por ejemplo, en las poblaciones *R. prolixus* se ha observado que los ambientes silvestres y peridomésticos son muy similares entre sí. Lo que llama la atención es que la población de insectos de Loja y aquellos encontrados en las viviendas de Manabí son genéticamente parecidas entre sí, aunque estas se encuentren a no menos de 600 kilómetros de distancia. Dichas asociaciones ilustradas no solo indica un flujo constante de insectos sino la existencia de 3 poblaciones distintas: la primera conformada por los insectos de colonia (coloración azul), la segunda por los insectos de los ambientes silvestre y peridoméstico en Manabí (coloración verde) y la tercera entre población doméstica en Manabí y peridoméstica en Loja (coloración roja).

Al existir un número considerable de individuos migrantes entre los ambientes silvestre, peridoméstico y doméstico, se observa un freno para la diferenciación genética entre las poblaciones. Al considerarse que la migración en insectos de colonia es nula, es la única que presenta estructura poblacional diferente.

En el área silvestre las fuentes de alimentación y protección son muy limitadas en comparación a los ambientes peridoméstico y doméstico, además se observa en *R. ecuadoriensis* un número reducido de insectos silvestres por palma, promediando 7 (6), mientras que para otras especies del mismo género este número es mucho mayor (28), permitiendo que las poblaciones al llegar al ambiente peridoméstico se produzca un evento parecido a un efecto fundador

(29).

Las piñuelas y palmas en el ambiente peridoméstico proveen resguardo a muchos vertebrados los cuales son fuente de alimento que explotan los triatomínicos, un ejemplo de esta asociación es la propuesta en *Rhodnius-Didelphis-Palmas* (30). En el ambiente doméstico las posibilidades de domiciliación dependen de distintos factores como puede ser la disponibilidad de alimento, tolerancia a insecticidas y uso de toldillos aplicados como medida de control en esta provincia (7) entre otros. Debido a esto el número final de insectos que colonicen el domicilio puede ser bajo, esta colonización podría estar también limitado por el uso de insecticidas.

Migración de *R. ecuadoriensis*

El movimiento de *R. ecuadoriensis* hasta llegar al Perú puede ser resultado de un proceso mediado por transporte pasivo asociado a migraciones rurales y urbanas, o por intercambio comercial entre provincias (31) esta conducta migratoria es similar al observado en *R. pallescens* hacia el norte, donde existen poblaciones en todos los ambientes al norte de Colombia llegando hasta la frontera entre Panamá y Costa Rica (33). Se ha demostrado que poblaciones de *R. prolixus* en Venezuela a nivel de los estados Portuguesa, Barinas, Cojedes, Trujillo y Lara, presentan poca variabilidad genética ($F_{st} = 0,07$) (27), esta estructura se asemeja al de *R. ecuadoriensis* entre Manabí y Loja, para poder comprender mejor esta asociación se deberían de buscar poblaciones de *R. ecuadoriensis* en las provincias intermedias, Guayas y El Oro, donde poblaciones silvestres y domésticas son altamente probables y en Los Ríos donde se presenta como vector secundario (32).

La reducción del tamaño en *R. ecuadoriensis* como resultado de adaptación por medio de plasticidad fenotípica se aprecia de manera considerable mientras más alejados hacia el sur se encuentren los insectos de Ecuador, este fenómeno de plasticidad ha

sido evidenciado mediante la técnica de morfometría geométrica al compararse poblaciones de *R. pallescens* provenientes de Panamá y Colombia con el fin de cuantificar las diferencias, en donde la relación es inversa entre la temperatura y tamaño corporal, sugiriendo bases adaptativas de la especie (34). Al realizar análisis de citometría de flujo aplicados en triatomínicos ha demostrado que *R. ecuadoriensis* posee el menor valor haploide de ADN (35), el poseer un tamaño genómico reducido va a permitir la fijación de nuevos alelos resultando en índices endogámicos elevados.

Origen de *Rhodniini*

Por medio de marcadores genéticos, se ha podido visualizar el movimiento de triatomínicos entre hábitats dentro del Ecuador con mayor resolución y se ha podido describir posibles asociaciones entre ambientes (36). La contribución del presente documento es que con la amplificación e interpretación adecuada de los 9 microsatélites descritos previamente para *R. pallescens* y teniendo énfasis el comportamiento migratorio entre provincias y entre países, para poder aplicar medidas de control vectorial específicas para su erradicación (37).

CONCLUSIÓN

El hecho de que la distribución del insecto en el país y hacia el Perú esté asociada a las migraciones humanas desde la región endémica (Manabí), incluso a otras provincias como Guayas, Los Ríos y El Oro, indica que existen otros aspectos socio-económicos a tener en cuenta para el establecimiento de las metas para la eliminación del vector. El conocimiento de la estructura genética de *R. ecuadoriensis* permitirá la implementación de técnicas de control vectorial para la aplicación de insecticidas. Dada esta diferenciación en estructura poblacional, el control de la transmisión y erradicación del vector en el ambiente doméstico y

peridoméstico sería parcialmente posible por medio de rociamiento químico, por la poca variabilidad genética presentada.

REFERENCIAS

1. WHO. (2007) Reporte sobre la enfermedad de Chagas. TDR/SWG/09
2. Galvão C, Carcavallo R, Da Silva D, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (*Hemiptera, Reduviidae*) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. 2003; 202: 1-36.
3. Guhl F. Chagas disease in Andean Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2007; 102 (4)
4. Soriano-Arandes A, Angheben A, Serre-Delcor N, Treviño-Maruri B, Gomez J, Jackson Y. Control and management of congenital chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. *Trop Med Int Health Journal*. 2016;21(5) pag: 590-596. Rassi A Jr1, Rassi A, Marin-Neto JA.
5. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto J. Chagas disease. *The Lancet*. 2010; 75(9723): 1388-1402.
6. Abad-Franch F. Control de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador. OPS/OMS-2002. Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
7. Aguilar M, Abad-Franch F, Racines J, Paucar. Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. A Brief Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94: Suppl. (I: 387-393)
8. Abad-Franch F, Pacar A, Carpio C, Cuba C, Aguilar M, Miles M. Biogeography of Triatominae (*Hemiptera: Reduviidae*) in Ecuador: Implications for the Design Control Strategies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96(5): 611-620
9. Guhl Felipe. Chagas disease in Andean countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007; 102(Suppl 1)
10. Aguilar M, Abad-Franch F, Racines J, A. Paucar Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. A Brief Review *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 1999; 94(I): 387-393.
11. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16(3) :1215
12. De Merida A, Palmieri M, Yurrita M, Molina A, Molina E, Black W. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 61(2): 230 -239.
13. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. (1982) Nueva York, E.UA.
14. Harry M, Poyet G, Romaña C, Solignac M. Isolation and characterization of microsatellite in the bloodsucking bug *Rhodnius pallescens (Heteroptera, Reduviidae)*. *Molecular Ecology*. 1998; 7:1784-1786.
15. Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics: Genetic Polymorphism and Evolution*. United States: OXFORD. 2000; 231-333
16. Meirmans P, Van Tienderen P. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms, *Molecular Ecology Notes* 2004; 4(1):792-794.
17. Glaubitz J. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*. 2004; 4:309-310.
18. Wei Guo S, Thompson E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 1992; 48(2): 361-372.
19. Goudet, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity*. 1995; 86(6), 485-486.
20. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005; 1:47-50.
21. Belkhir L, Raufaste N, Bonhomme F. GENETIX, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, (2004). Université de Montpellier II, Montpellier (France).
22. Chapuis M, Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24(3): 621–631.
23. Pritchard J, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000; 155:945-959.
24. Carbajal de la Fuente A, Catalá S. Relationship between Antennal Sensilla Pattern and Habitat in Six Species of Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2002; 97(8): 1121-1125.
25. Cuba C, Vargas F, Roldan J, Ampuero C. Domestic *Rhodnius ecuadoriensis (Hemiptera, Reduviidae)* infestation in Northern Perú: A comparative trial

- of detection methods Turing a six-month follow up Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2003; 45(2):85-90.
26. Chávez J. Contribución al estudio de triatominos del Perú: Distribución geográfica, nomenclatura y notas taxonómicas. 2006; 55: 65-76.
 27. Fitzpatrick S, Feliciangeli M, Sanchez-Martin M, Monteiro F, Miles M. Molecular Genetics Reveal That Sylvatic *Rhodnius prolixus* Do Colonise Rural Houses. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2008; 2(4): 210.
 28. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (*Reduviidae: Triatominae*) en Colombia. Biomédica. 2007; 27 (supl. 1): 143-62
 29. Hartl D, Clark A. Principles of Population Genetics. 4 ed. Sinauer Associates, Inc, (2007). Sunderland, MA.
 30. Gaunt M, Miles A. The ecotopos and evolution of triatominae bugs (Triatominae) and their associated Trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95:557-565
 31. Abad-Franch F, Aguilar H, Paucar C, Lorosa E, Noireau F. Observations on the Domestic Ecology of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2001; 97(2): 199-202.
 32. Abad-Franch F. Control de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador. (2002) OPS/OMS- Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
 33. Organización Panamericana de la Salud. Taller Técnico de Estudio sobre *Rhodnius pallescens*, su Vigilancia y Control. (2003). OPS/DPC/CD/273/03
 34. Jaramillo N, Schofield C, Gorla D, Caro-Riaño H, Moreno J, Mejía E, Dujardin J. The role of *Rhodnius pallescens* as a vector of Chagas disease in Colombia and Panama. Research and Reviews in Parasitology. 2000; 60 (3-4): 75-82.
 35. Panzera F, Ferrandis I, Ramsey J, Salazar-Schettino P, Cabrera M, Monroy C, Jaramillo, N. Genome size determination in Chagas disease transmitting bugs (*Hemiptera-Triatominae*) by flow cytometry. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2007; 76(3), 516-521.
 36. Villacís A, Marcet P, Yumiseva C, Dotson E, Tibayrenc M, Brenière S, Grijalva M. Pioneer study of population genetics of *Rhodnius ecuadoriensis* (*Hemiptera: Reduviidae*) from the central coast and southern Andean regions of Ecuador. Infection, Genetics and Evolution. 2017; 53:116-127.
 37. Abad-Franch F, Palomeque F, Aguilar M, Miles A. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (*Heteroptera, Triatominae*): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. Tropical Medicine and International Health. 2005; 10(12): 1258–1266.