

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Rhodnius prolixus* y
Triatoma dimidiata EN ÁREAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA.**

KATHERINE PAOLA LUNA MARIN



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2009**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Rhodnius prolixus* y
Triatoma dimidiata EN ÁREAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA.**

Trabajo de Grado presentado por:

KATHERINE PAOLA LUNA MARIN

Para optar al título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Director

VICTOR MANUEL ANGULO

Médico. MSc



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2009**

A mi Padre Celestial



Esta investigación fue financiada por COLCIENCIAS y la Universidad Industrial de Santander (UIS). La mayor parte del trabajo de laboratorio se realizó en el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Atlanta, USA.

AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS por el apoyo financiero.

Al *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta, USA, por el apoyo financiero y prestar sus instalaciones para las pruebas de PCR y Secuenciación.

Al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) que por más de trece años, ha contribuido a la realización de mi sueño, como investigadora.

A la Dra. Ellen Dotson, directora del departamento de Entomología molecular del CDC, por su guía y colaboración incondicional.

A mi director, Dr. Víctor Manuel Angulo, por su incansable trabajo en la enfermedad de Chagas en Colombia, lo cual permitió contar con el valioso material de campo utilizado en esta investigación.

Al Dr. Fernando Rondón por su asesoría y darme la oportunidad de asistir a sus clases de Genética de Poblaciones y Evolución.

A Adrian Jaimes por el acompañamiento y asesoría en Bioinformática.

Al personal del laboratorio de Entomología del CINTROP por la disección e identificación de insectos.

A todos mis compañeros del CINTROP por su amistad y colaboración.

CONTENIDO

	Pág.
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1 CONSIDERACIONES GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	4
3.2 VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	6
3.3 MÉTODOS BASADOS EN ADN EN EL ESTUDIO DE LOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	11
4. CAPITULO 2: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE <i>Rhodnius prolixus</i> EN ÁREAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA.	15
4.1 INTRODUCCIÓN	15
4.2 MATERIALES Y METODOS	16
4.2.1 Área de estudio	16
4.2.2 Insectos	17
4.2.3 Extracción de ADN	20
4.2.4 Amplificación del gen mitocondrial citocromo b	20
4.2.5 Secuenciación del gen mitocondrial citocromo b	20
4.2.6 Análisis de datos	21
4.2.6.1 Alineamiento	21

4.2.6.2	Análisis filogenético	21
4.2.6.3	Análisis genético-poblacionales	21
4.3	RESULTADOS	23
4.4	DISCUSIÓN	31
5.	CAPITULO 3: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE <i>Triatoma dimidiata</i> EN ÁREAS ENDÉMICAS DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER	35
5.1	INTRODUCCIÓN	35
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.2.1	Área de estudio	37
5.2.2	Insectos	38
5.2.3	Extracción de ADN	41
5.2.4	Amplificación del gen mitocondrial citocromo b	41
5.2.5	Secuenciación del gen mitocondrial citocromo b	41
5.2.6	Análisis de datos	42
5.3	RESULTADOS	43
5.4	DISCUSIÓN	49
6.	CONCLUSIONES	53
	BIBLIOGRAFIA	54

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Sitios de colecta de los individuos de <i>R. prolixus</i> del estudio.	18
Tabla 2. Diversidad genética de las poblaciones de <i>R. prolixus</i> de Colombia y una zona fronteriza Venezolana.	24
Tabla 3. Posiciones variables en los 18 haplotipos encontrados de <i>R. prolixus</i> .	25
Tabla 4. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de <i>R. prolixus</i> basado en valores <i>Fst</i> y <i>Nm</i> respectivamente.	27
Tabla 5. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de <i>R. prolixus</i> basado en valores <i>Gst</i> y <i>Nm</i> respectivamente.	27
Tabla 6. Análisis jerárquico de la variación genética en poblaciones de <i>R. prolixus</i> .	29
Tabla 7. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de <i>R. prolixus</i> de los diferentes hábitats en los Llanos orientales.	30
Tabla 8. AMOVA en poblaciones de <i>R. prolixus</i> de los diferentes hábitats en los Llanos Orientales de Colombia.	30
Tabla 9. Sitios de colecta de los individuos de <i>T. dimidiata</i> del estudio.	39
Tabla 10. Diversidad genética en poblaciones de <i>T. dimidiata</i> de Santander, Colombia.	43
Tabla 11. Posiciones variables en los 12 haplotipos encontrados de <i>T. dimidiata</i> en Santander, Colombia.	45
Tabla 12. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de <i>T. dimidiata</i> de Santander.	47
Tabla 13. AMOVA de las poblaciones de <i>T. dimidiata</i> de seis municipios en Santander.	47
Tabla 14. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de <i>T. dimidiata</i> de los diferentes hábitats del municipio de Macaravita.	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa con el sitio de origen de los individuos <i>R. prolixus</i> del estudio.	17
Figura 2. Sitios de colecta de algunos individuos de <i>R. prolixus</i> del estudio. A: Casa del departamento de Santander y B: Hábitat selvático del departamento de Casanare.	19
Figura 3. Trampa con cebo animal (gallina), para colecta de insectos selváticos (Angulo VM).	19
Figura 4. Electroforesis de agarosa del fragmento <i>cyt b</i> amplificado.	24
Figura 5. Árbol Neighbor-Joining basado en el modelo Kimura 2P.	26
Figura 6. Árbol Neighbor-joining a partir de distancias <i>Fst</i> entre pares de poblaciones de <i>R. prolixus</i> .	28
Figura 7. Red de haplotipos obtenida mediante parsimonia estadística a partir del programa TCS.	31
Figura 8. Mapa con el sitio de origen de los individuos <i>T. dimidiata</i> del estudio.	38
Figura 9. Diferentes hábitats de la zona de estudio. A: Doméstico, B: Peridoméstico, C: Selvático.	40
Figura 11. Electroforesis de agarosa del fragmento <i>cyt b</i> amplificado.	43
Figura 12. Árbol Neighbor-Joining basado en el modelo K2P de haplotipos de <i>T. dimidiata</i> encontrados en Santander, Colombia.	46
Figura 13. Árbol Neighbor-joining a partir de distancias <i>Gst</i> entre pares de poblaciones de <i>T. dimidiata</i> .	48

RESUMEN

TITULO: Caracterización genética de poblaciones de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en áreas endémicas de Colombia*.

AUTOR: Katherine Paola Luna Marín**.

PALABRAS CLAVES: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Trypanosoma cruzi*, citocromo b, Enfermedad de Chagas, Colombia.

DESCRIPCIÓN

Introducción. La enfermedad de Chagas es considerada como uno de los más importantes problemas de salud pública en Latinoamérica. En Colombia se destaca *Rhodnius prolixus* como vector principal, seguido de *Triatoma dimidiata*. La correcta determinación de estas especies vectoras en sus diferentes hábitats es fundamental en el desarrollo de nuevas y eficientes estrategias de control de la enfermedad de Chagas en Colombia.

Objetivo. Caracterizar genéticamente las poblaciones de *R. prolixus* y *T. dimidiata* de áreas endémicas de Colombia, en términos de diversidad y estructura.

Materiales y métodos. Se secuenció y se analizó un fragmento del gen mitocondrial citocromo b en un total de 109 individuos de *R. prolixus* y 56 de *T. dimidiata* procedentes de hábitats doméstico y selvático. Se determinó el grado de variación genética de las poblaciones estudiadas.

Resultados. La secuenciación directa, confirmó la presencia de *R. prolixus* selvático en Colombia, estos insectos selváticos tienen la capacidad de colonizar las viviendas humanas. Las poblaciones de *R. prolixus* del país y una zona fronteriza de Venezuela presentan una baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00204 \pm 0.00027$), diversidad haplotípica de media a alta ($Hd = 0.5902 \pm 0.055$) y un grado de diferenciación genética moderado ($Fst = 0.12345$, $Gst = 0.11085$, $p = 0.0001$). Las poblaciones de *T. dimidiata* del departamento de Santander presentan altos niveles de diversidad nucleotídica ($\pi = 0.02239 \pm 0.00117$) y diversidad haplotípica ($Hd = 0.808 \pm 0.039$), el grado de diferenciación genética es muy elevado ($Fst = 0.90349$, $Gst = 0.48469$, $p = 0.0000$). En algunas regiones, ambas especies vectoras, las poblaciones domésticas y selváticas se comportan como una unidad panmíctica ($Fst < 0.05$ y $Nm > 1$).

Conclusión. Estos hallazgos muestran un importante riesgo de transmisión con *Trypanosoma cruzi* para las poblaciones humanas en esta zona endémica de enfermedad de Chagas, el diseño de nuevas y efectivas estrategias que eviten la incursión de las poblaciones selváticas al domicilio es imperativo.

* Proyecto de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas.

Director: Dr. Víctor Manuel Angulo Silva

ABSTRACT

TITLE: Genetic characterization of populations of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in endemic areas from Colombia*.

AUTOR: Katherine Paola Luna Marín**.

KEY WORDS: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Trypanosoma cruzi*, cytochrome b, Chagas disease, Colombia.

DESCRIPTION

Introduction. Chagas disease is considered one of the most important problems of public health in Latin America. In Colombia, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* are principal vectors. The correct determination of these vector species in their different habitats is fundamental in the development of new and efficient strategies of control in the Chagas disease.

Objective. To characterize genetically the populations of *R. prolixus* and *T. dimidiata* in endemic areas from Colombia, in terms of diversity and structure.

Materials and methods. A fragment of the cytochrome b gene for 109 *Rhodnius prolixus* specimens and 56 *T. dimidiata* specimens from domestic and sylvatic habitats was analyzed to determine the degree of genetic variation present in the populations.

Results. Direct sequencing confirmed the presence of *R. prolixus* in palms and that sylvatic insects can colonise houses. The populations of *R. prolixus* from Colombia and Venezuela showed a low nucleotide diversity ($\pi = 0.00204 \pm 0.00027$) and high haplotype diversity ($Hd = 0.5902 \pm 0.055$). A degree of genetic moderated differentiation ($Fst = 0.12345$, $Gst = 0.11085$, $p = 0.0001$). The populations of *T. dimidiata* from Santander present high levels of nucleotide diversity ($\pi = 0.02239 \pm 0.00117$) and haplotype diversity ($Hd = 0.808 \pm 0.039$), the degree of genetic differentiation is very high ($Fst = 0.90349$, $Gst = 0.48469$, $p = 0.0000$). In some regions, both species, the domestic and sylvatic populations behave as a panmictic unit ($Fst < 0.05$ and $Nm > 1$).

Conclusion. These findings show an important risk of transmission with *Trypanosoma cruzi* for the human populations in this endemic zone of Chagas disease, the design of new and effective strategies that avoid the incursion of the sylvatic insects to the domicile is imperative.

* Grade project

** Faculty of Health. School of Medicine. Master in Basic Biomedical Sciences. Víctor Manuel Angulo Silva Director.

1. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es considerada como uno de los más importantes problemas de salud pública en Latinoamérica. Los estimativos de la organización mundial de la Salud (OMS) indican que 16 a 18 millones de personas han estado infectadas por su agente causal, *Trypanosoma cruzi*. En Colombia, los departamentos con más altas tasas de infección son: Arauca (21.1%), Casanare (10%), Santander (6.3%), Norte de Santander (5.2%), Boyacá (3.7%), Cundinamarca (1.9%) y Meta (1.7%) (Moncayo 2003). Se destaca *Rhodnius prolixus* como vector principal, seguido de *Triatoma dimidiata* (Moncayo 2003, Molina et al., 2000).

Actualmente, no existe una vacuna contra *T. cruzi* y no se dispone de un tratamiento efectivo para ser aplicado a gran escala, por consiguiente la medida de control más efectiva contra la enfermedad ha sido la eliminación de las poblaciones domiciliadas de insectos vectores por medio de fumigación de las casas infestadas con insecticidas con acción residual. En algunos países (Venezuela y Colombia) los alcances de esta medida no han sido significativos debido en parte, al poco conocimiento de las características genéticas y biológicas de sus principales especies vectoras.

En el estudio de los Triatominae, una herramienta como la secuenciación del ADN ha demostrado ser muy útil. El gen mitocondrial citocromo b, se destaca como uno de los marcadores de más alto poder de resolución, el cual ha permitido diferenciar especies morfológicamente similares como *R. prolixus* y *Rhodnius robustus* (Lyman et al., 1999, Monteiro et al., 2003), la determinación de la diversidad genética las poblaciones de *Triatoma infestans* en Bolivia (Giordano et al., 2005), la determinación de la estructura genética de *Triatoma brasiliensis* (Almeida et al., 2008), el estudio de las poblaciones venezolanas de *R. prolixus* (Fitzpatrick et al., 2008) y las poblaciones de *T. dimidiata* de

Centro-América (Dorn et al., 2009).

Hasta el momento, no se había realizado el primer estudio genético poblacional que utilice este excelente marcador en las poblaciones de *R. prolixus* y *T. dimidiata* de Colombia. La correcta determinación y caracterización genética de estas especies vectoras es fundamental para la comprensión de su papel en la transmisión de la enfermedad de Chagas, conocimiento necesario para el desarrollo de nuevas y eficientes estrategias de control vectorial.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genéticamente las poblaciones de *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en áreas endémicas de Colombia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la estructura genética de las poblaciones de *Rhodnius prolixus* basada en el gen mitocondrial citocromo b.
- Establecer la diversidad genética de las poblaciones de *Rhodnius prolixus* en áreas endémicas de Colombia.
- Determinar la estructura genética de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* basada en el gen mitocondrial citocromo b.
- Establecer la diversidad genética de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* en áreas endémicas de Santander.

3. MARCO TEORICO

3.1 CONSIDERACIONES GENERALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es producida por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), se considera una de las enfermedades parasitarias de Latinoamérica de más impacto social y económico (Días & Schofield 1999). Fue descubierta en 1909 por el Médico investigador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, el cual además de proveer información fundamental sobre la patología, sintomatología y epidemiología de la enfermedad, fue el primero en reconocer el papel de insectos hemípteros hematófagos como vectores del parásito (Lewinsohn, 1979).

T. cruzi circula naturalmente entre los insectos vectores y varios vertebrados silvestres y domésticos incluyendo el hombre. Se observan tres importantes estadios morfológicos: tripomastigote (estadio no proliferativo), epimastigote y amastigote (estadios proliferativos) (Brener, 1973, Tyler & Engman, 2001).

Las poblaciones de *T. cruzi* presentan una alta variabilidad genética (Buscaglia & Di Noia, 2003, Devera et al., 2003, Macedo et al., 2004) atribuida a su modo de propagación básicamente clonal (Tibayrenc et al., 1986). Actualmente *T. cruzi* se encuentra dividido en dos grupos principales bien definidos denominados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II; cinco sublinajes son reconocidos dentro de *T. cruzi* II (IIa-IIe) (Brisse et al., 2000).

El mecanismo más importante de transmisión de *T. cruzi* para los humanos y otros mamíferos es a través del contacto con las heces del vector infectado que contiene la forma infectiva del parásito los tripomastigotes metacíclicos, alrededor del 80% de la transmisión ocurre de esta forma. La transmisión transfusional ocurre en un 15% y es considerada como el segundo mecanismo, seguida por la transmisión congénita la cual se presenta en un 0.5-

4% (Dias & Schofield, 1999). Los otros mecanismos son excepcionales (trasplante de órganos, infección vía oral por ingestión de alimentos contaminados, vía lactogénica y accidentes de laboratorio) y no representan una importancia significativa en términos de salud pública.

La enfermedad de Chagas es una patología muy compleja, muestra un amplio rango de presentaciones clínicas, las cuales varían en diferentes regiones geográficas, probablemente como reflejo de factores genéticos del parásito y el huésped (Miles et al., 1981a, Apt et al., 1987, Brenière et al., 1989, Macedo et al., 2004). En Chile y el centro de Brasil es frecuente la forma digestiva de la enfermedad, mientras que en los países de Centro-América, Colombia y Venezuela son prácticamente inexistentes, predominando la cardiopatía chagásica (Luquetti et al., 1986, Días, 1992). Las poblaciones de *T. cruzi* II predominan en los ciclos de transmisión doméstica en los países del cono sur de América del Sur, mientras en los países del norte de Sur América predomina *T. cruzi* I (Gaunt & Miles, 2000).

En términos generales, la infección por *T. cruzi* en los humanos se inicia con un conjunto de manifestaciones variables en frecuencia e intensidad, caracterizada por la señal de puerta de entrada del parásito. Esta lesión recibe el nombre de “chagoma” y consiste en una zona endurecida eritematosa con inflamación e hipertrofia de los ganglios regionales. Cuando la vía de entrada del parásito es la mucosa conjuntival, aparece un edema indoloro unilateral en las párpadas o en los tejidos adyacentes denominado “signo de Romana”. Las manifestaciones clínicas más frecuentes comprenden fiebre, edema, hepatomegalia, esplenomegalia e insuficiencia cardíaca. La fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, con apenas 1 a 2% de los pacientes con síntomas una o dos semanas después de la infección. Esta fase es más frecuente en niños en las edades de 1 a 5 años. Entre el 5 y el 10% de los pacientes sintomáticos mueren durante esta fase, debido a encefalomiелitis o a falla cardíaca (Prata, 2001, WHO 2002). Después de la fase aguda, los síntomas iniciales desaparecen y comienza la forma indeterminada de la fase crónica, entre el 50-70% de los individuos infectados permanecen en esta condición durante toda su vida

(WHO, 2002). Se estima que aproximadamente el 25% de los individuos en fase crónica desarrollará síntomas cardiacos, 6% daños digestivos, y el 3% compromiso del sistema nervioso periférico (Moncayo, 2003).

Actualmente, no hay una vacuna contra *T. cruzi*, y no se dispone de un tratamiento efectivo para ser aplicado a gran escala, por consiguiente, el control de la enfermedad está basado principalmente en prevenir la transmisión del parásito (Dias & Schofield 1999). En 1991 se lanzó por el gobierno de los países del cono sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) una iniciativa regional para eliminar la enfermedad de Chagas, la cual implicaba la eliminación de las poblaciones domésticas y peridomésticas de *Triatoma infestans* y un tamizaje obligatorio en los donantes de sangre para reducir el riesgo de transmisión transfusional (Schofield & Dujardin 1997, Schofield & Dias 1998), debido al aparente éxito de esta iniciativa del Cono Sur, dos iniciativas regionales adicionales fueron lanzadas en 1997, la Iniciativa Centro Americana la cual incluyó los países de Centro América (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá) y la iniciativa del Pacto Andino (Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú) con el objetivo de erradicar principalmente poblaciones de *R. prolixus* y *T. dimidiata* (WHO, 1997). A pesar de que estas iniciativas tienen objetivos comunes, se ha observado resultados diferenciales, así por ejemplo, Chile y Uruguay fueron declarados libres de transmisión de la enfermedad de Chagas en 1997 y 1999 respectivamente y una parte de Brasil en el 2000, mientras que en otros países esto sería difícilmente logrado en un futuro cercano (Añez et al., 2004). En parte, los motivos se deben al poco conocimiento sobre las características genéticas y biológicas de las principales especies vectoras, que con lleva a la incertidumbre sobre cuáles deben ser las medidas y estrategias de control más apropiadas para ser aplicadas en cada región (Guhl & Schofield, 2005).

3.2 VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Los vectores de *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas son insectos pertenecientes al orden Hemíptera, suborden Heteróptera, familia Reduviidae y subfamilia

Triatominae; la cual está organizada en seis tribus (Triatomini, Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini, Linshcosteini y Alberprosenini) y 19 géneros con alrededor de 140 especies (Galvao et al., 2003).

Los Hemíptera en general representan un orden antiguo, que sobre la base de especímenes fósiles, habrían aparecido entre el bajo Pérmico y el bajo Triásico (220 -260 millones de años) (Bargues et al., 2000, Schofield, 1994, Dujardin et al., 2002). Las especies de este orden se encuentran ampliamente distribuidas por todas las regiones tropicales y templadas. Estos organismos se caracterizan por su aparato bucal picador y chupador, tradicionalmente se han clasificado en dos subórdenes: Heteroptera y Homóptera. Los Homóptera y la mayor parte de los Heteróptera son fitófagos, adaptados para alimentarse de jugos vegetales, pero varias de las familias de Heteróptera son predadores de insectos y otros invertebrados. Se ha sugerido la existencia de líneas de evolución independiente hacia las formas hematófagas facultativas y obligadas, partiendo de formas predatorias principalmente, pero en el caso de los Cleradini (Subfamilia Heteróptera) de formas fitófagas granívoras. Se encuentran hematófagos obligados en cuatro familias de Hemíptera (Schofield, 1994, Dujardin et al., 2002).

Los Reduviidae constituyen una de estas cuatro familias, el éxito de estos insectos se ve representado en su gran diversidad y extensa distribución mundial. Se han encontrado especímenes fósiles de predadores Reduviidae de los periodos Oligoceno y Eoceno (25-65 millones de años) (Tartarotti et al., 2006). Los Triatominae probablemente evolucionaron de este grupo, algunos autores sugieren un origen polifilético, de una variedad de ascendientes predadores adaptándose primero para alimentarse de grupo de invertebrados viviendo en varios nidos de aves o de mamíferos y evolucionando progresivamente para explotar directamente el huésped vertebrado. Esta adaptación se ve reflejada principalmente en modificaciones del aparato bucal en relación a los cambios de hospederos. Los Reduviidae predadores tienen una proboscis curva y gruesa, apropiada para perforar el exoesqueleto duro de los insectos, mientras que los Triatominae tienen una proboscis

rectilínea, fina y delgada, adaptada para perforar tejidos más suaves (Schofield, 1994, Dujardin et al., 2002).

La adaptación a la hematofagia ha sido considerada un evento fundamental en la aparición de los Triatominae (Schofield 1994, Dujardin et al., 2002). Hay evidencia que sugiere que este proceso adaptativo ha sido relativamente reciente en esta subfamilia, por ejemplo, la forma de su cuerpo ha sufrido pocos cambios de sus putativos ancestros Reduviidae (Schofield, 2000), la gran mayoría de especies de Triatominae se encuentran exclusivamente en el nuevo mundo (Gorla et al., 1997), algunas especies de esta subfamilia se alimentan facultativamente de invertebrados como *Belminus herreri* perteneciente a la tribu Bolboderini y *Eratyrus mucronatus* perteneciente a la tribu Triatomini (Miles 1981b, Sandoval et al., 2000), la picadura de muchos Triatominae permanece dolorosa a los hospederos vertebrados, lo cual recuerda la picadura dolorosa de los Reduviidae predadores, y por último, la mayoría de los hematófagos obligados almacenan sus simbiontes intracelularmente o en un órgano especial llamado micetoma, pero en los Triatominae los simbiontes están libres en el lumen intestinal (Schofield, 2000).

La gran mayoría de especies de Triatominae se encuentran exclusivamente en el Nuevo mundo entre el gran lago de norte América y el sur de argentina y Chile, aproximadamente entre las latitudes 40°N y 46°S (Schofield, 1985), siete especies del genero *Triatoma* en el este de Asia y cinco especies del genero *Linshcosteus* en India y una sola especie *Triatoma rubrofasciata* se encuentra en el Nuevo y Viejo mundo (Gorla et al., 1997).

En el Nuevo mundo, las especies de Triatominae pueden ser encontradas en una amplia variedad de hábitats, los cuales ofrecen protección climática y un fácil acceso a la fuente de sangre de los vertebrados. Principalmente son hábitat selváticos tales como nido de aves, madrigueras de pequeños mamíferos, montones de rocas, árboles huecos, nidos de pequeños roedores y cuevas con murciélagos, algunas especies también invaden y colonizan hábitats peridomésticos tales como gallineros y corrales de cabras y hábitats

domésticos ocupados por el hombre y sus animales (Schofield, 1994, Gorla et al., 1997, Dujardin et al., 2002).

El ciclo biológico de un Triatominae es exopterigota hemimetábolo, el cual comprende el huevo, cinco estadios ninfales y el estado adulto. Estos insectos tienen un ciclo mucho más largo y una tasa de reproducción inferior a los demás insectos de importancia médica. Las especies como *R. prolixus* pueden realizar el desarrollo huevo-adulto en 3 a 4 meses en condiciones óptimas mientras especies como *T. dimidiata* y *Panstrongylus megistus* pueden tardar de 1 a 2 años en terminarlo. En *Triatoma infestans*, una de las especies más estudiadas se ha demostrado que parámetros como la densidad poblacional y la temperatura externa pueden modificar la velocidad del ciclo, por ejemplo puede realizar hasta dos generaciones por año, cuando se ha encontrado en casas en el centro de Brasil, pero solo una generación por año en el clima más frío del centro de Argentina. La duración de la vida de un adulto puede sobrepasar los dos años (Schofield 1994, Dujardin et al., 2002).

El ciclo de vida y la dinámica de las poblaciones de Triatominae dependen de manera crítica de la interacción con sus huéspedes vertebrados. Los Triatominae se describen como estrategias K, adaptados para la explotación eficaz de un ambiente estable como lo es el nido de un ave o la vivienda humana. En general, son insectos grandes que necesitan comidas de sangre considerables, *T. infestans* por ejemplo ingiere en total 1.2 gramos de sangre durante su desarrollo de huevo a adulto, y cada hembra puede ingerir otros 10 gramos o más durante su vida reproductiva. Las especies como *P. megistus*, pueden tomar dos veces esta cantidad. En una infestación doméstica típica, cada insecto se alimenta cada 4 a 9 días con lo que cada persona puede ser picada 20 a 30 veces por noche, según la especie infestante lo que representa una pérdida media de sangre por persona de unos 2,5 gramos por noche, contribuyendo de manera importante al desarrollo de anemia crónica por deficiencia de hierro (Schofield 1981, Schofield 1994).

Los Triatominae tienen dos mecanismos de dispersión, uno activo por la marcha y el vuelo, el otro pasivo mediante el desplazamiento del huésped vertebrado. En la literatura se ha

descrito que la dispersión en forma pasiva se ha dado básicamente por el transporte de huevos y ninfas en equipaje, vehículos, utensilios de los humanos cuando estos se desplazan a diferentes pueblos y ciudades, igualmente ese transporte puede ser realizado en las plumas de algunas aves y en procesos como la recolección de la leña debido a que varias especies de Triatominae son presentes en troncos y arboles huecos. Estudios epidemiológicos han señalado la importancia de la dispersión de estos insectos en el control de la enfermedad de Chagas, porque por la dispersión se puede conducir a la recolonización de las casas tratadas o a la invasión de nuevas áreas (Schofield 1994, Dujardin et al., 2002).

Las tribus Rhodniini y Triatomini son las más importantes epidemiológicamente, destacándose los géneros *Rhodnius* y *Triatoma*. La hipótesis evolutiva formulada por Schofield y Dujardin (1999) sugiere que las especies de *Rhodnius* se derivaron de una forma ancestral que habitaba los bosques húmedos en la región del Amazonas, la cual se encuentra hoy día representada con la especie *Rhodnius pictipes*, dentro del género esta especie tiene la más amplia distribución geográfica, ocupa un amplio rango de hábitats y comparte característica de genitalia masculina con otros Triatominae, las cuales no son compartidas con las otras especies de Rhodniini excepto por *R. stali* (Jurberg 1996). Esta especie ancestral dio origen a una radiación de tres líneas adaptativas: las formas de la “floresta amazónica” (representados por las especies *pictipes*, *stali*, *brethesi*, *paraensis*, *dallesandro*), el grupo “prolixus” principalmente en regiones semejantes sabanas y áreas boscosas al oriente de la cordillera de los Andes (representados por las especies *prolixus*, *robustus*, *neglectus*, *nasutus*, *domesticus*) y el grupo “pallenscens” el cual forma un cline evolutivo de norte a sur en el occidente de la cordillera de los Andes (representado por *pallenscens*, *colombiensis*, *ecuadoriensis*) (Schofield & Dujardin, 1999, Vallejo et al., 2008).

El género *Triatoma* es el más diverso, la gran mayoría de las especies (alrededor de 72) son incluidas en este género (Dujardin et al., 2002). Hay evidencia que sugiere que las formas ancestrales de *Triatoma* fueron separadas por lo menos 19 millones de años (Bargues 2000,

Marcilla 2001). Filogenias de secuencias de DNA ribosomal (rDNA), revelan dos clados principales correspondiendo a especies de Norte y Centro América y especies de Sur América separadas antes de cerrarse el istmo de Panamá, alrededor de 3 millones de años. (Bargues et al., 2000, Bargues et al., 2002, Marcilla et al., 2001). Las especies de *Triatoma* son distribuidas en tres principales grupos: El grupo *Rubrofasciata* (principalmente especies Norte Americanas y del viejo mundo), el grupo *Phyllosoma* (principalmente Mesoamericanas y Caribeñas) y el grupo *Infestans* (principalmente Sur Americanas) cada uno incluyendo complejos diferentes y subcomplejos en una clasificación la cual es progresivamente actualizada de acuerdo a nuevos datos genéticos y morfométricos (Bargues et al., 2008). En este género las principales especies vectoras son: *T. infestans* y *T. brasiliensis* de Sur América y *T. dimidiata* en Centro América desde México a Colombia, Venezuela, Ecuador y Norte de Perú (Dujardin et al., 2002).

Generalmente las especies del género *Rhodnius* son arborícolas, la mayoría de las especies de este género están asociadas con palmas a diferencia del género *Triatoma* que se encuentra asociado a ambientes rocosos y madrigueras de roedores (Gaunt & Miles 2000, Dujardin et al., 2002). Las principales especies transmisoras de *T. cruzi* pertenecen a estos dos géneros y son: *T. infestans*, *R. prolixus*, *T. brasiliensis* y *T. dimidiata*. En Colombia *R. prolixus* es considerado el vector más importante debido a sus hábitos antropofílicos domiciliarios, su alta frecuencia de dispersión, ciclo de vida corto y corto tiempo de defecación (Molina et al., 2000), *T. dimidiata* le sigue en importancia por su gran capacidad de dispersión y plasticidad para ocupar diferentes hábitats (Angulo et al., 2005a).

3.3 MÉTODOS BASADOS EN ADN EN EL ESTUDIO DE LOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Numerosas técnicas basadas en ADN han sido empleadas en el estudio de los vectores de la enfermedad de Chagas, se destaca la citogenética, la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), los microsatélites y la secuenciación de genes nucleares y

mitocondriales (Abad-Franch & Monteiro, 2005). Describiéndose a continuación algunos de sus aportes principales.

La citogenética ha aportado elementos en la comprensión de la taxonomía y la sistemática de estos insectos vectores. Los Triatominae poseen cromosomas holocéntricos (cromosomas con centrómeros no localizado o difuso). Estos insectos han sido tradicionalmente considerados como un grupo cromosómicamente muy homogéneo ya que el número diploide ($2n$) de cromosomas en machos varía dentro de un pequeño rango (21 a 25 cromosomas). Así, la mayoría de las especies estudiadas de esta subfamilia presentan 20 autosomas (Pérez et al., 1992). En relación a los cromosomas sexuales, los integrantes de las tribus Rhodniini presentan un par de cromosomas XY, mientras en la tribu Triatomini y en particular en el género *Triatoma* se observa una variación significativa en el número de estos cromosomas sexuales (Dujardin et al., 2002). Por variación cromosomal y tamaño genómico se sugiere que *T. dimidiata* puede representar un complejo de especies crípticas (Panzera et al., 2006).

RAPD es una de las primeras técnicas moleculares probada en Triatominae, esta técnica tiene ventajas como su bajo costo y gran sensibilidad; sin embargo, presenta problemas como baja reproducibilidad y el no poder distinguir individuos heterocigotos de homocigotos (Loxdale & Lushai 1998). Es importante resaltar que por medio de esta herramienta se pudo proponer la hipótesis de una introducción reciente de *R. prolixus* a Centro América (Dujardin et al., 1998) y se reveló la divergencia entre *R. prolixus* y *R. robustus* los cuales hasta ese momento eran indiferenciados por medio de electroforesis de isoenzimas (García et al., 1998). Adicionalmente, el estudio de poblaciones de *T. dimidiata* de diferentes hábitats en un área endémica de Boyacá, Colombia, mostró un gran riesgo epidemiológico debido a que se presentó un bajo grado de diferenciación y un gran flujo génico entre las poblaciones domiciliadas y no domiciliadas (Ramírez et al., 2005).

Los microsatélites son secuencias muy cortas repetidas en tándem los cuales la unidad de repetición está entre 1 y 6 pares de bases. Se consideran buenos marcadores polimórficos,

su alta tasa de mutación y neutralidad los convierte en una poderosa herramienta en los estudios genético poblacionales (Barker, 2002). Los primeros trabajos sobre microsatélites en Triatominae fueron realizados por Harry et al (1998) y Anderson et al (2002), el primero describe diez microsatélites en poblaciones de *R. pallescens* provenientes de palmas en Colombia y el segundo ocho microsatélites en poblaciones de *T. dimidiata* de Guatemala, Honduras y México. Recientemente, Fitzpatrick et al., (2008) aportaron evidencia de flujo génico en poblaciones domiciliadas y selváticas de *R. prolixus* en Venezuela con el uso de esta herramienta.

La secuenciación de ADN ha contribuido sustancialmente al conocimiento de la historia evolutiva de los Hemíptera. Diferentes genes nucleares se han utilizado, se resalta el gen 18S del ADN ribosomal como un marcador eficiente para establecer relaciones filogenéticas en Triatominae a nivel supraespecífico; sin embargo, tiene la limitante de no resolver especies muy relacionadas. Esto puede deberse a que es un gen muy conservado en el que la tasa de sustitución nucleotídica es relativamente baja, lo cual ha permitido utilizarlo en la evaluación de relaciones antiguas (Bargues et al., 2000). En el estudio de especies estrechamente relacionadas los espaciadores internos (ITS) han mostrado ser muy útiles (Bargues et al., 2002), Un estudio realizado por Marcilla et al (2001) con el uso del segundo espaciador interno (ITS-2) muestra una clara divergencia entre Triatomini y Rhodnini confirmando la separación de estas dos tribus. A nivel de géneros establece la inclusión de *Psammolestes* dentro del género *Rhodnius* y sugiere que el género *Dipetalogaster* se incluya en el género *Triatoma*. Otros autores con el uso de este marcador han demostrado que *T. dimidiata* presenta una gran variabilidad intraespecífica (Bargues et al., 2000, 2002, 2008).

De igual manera, los genes mitocondriales son ampliamente utilizados en estudios de genética de poblaciones y evolutivos de diferentes organismos (Irwin et al., 1991). El ADN mitocondrial tiene como característica su propagación maternal, abundancia (numerosas copias en una célula), la casi total ausencia de recombinación y la presencia de regiones altamente variables y conservadas (Simon et al., 1994). En *T. dimidiata* consta de 17019

pares de bases, 13 genes codificantes de proteínas y 22 tARNs (Dotson & Beard, 2001). Los árboles filogenéticos obtenidos a partir de secuencias de los genes mitocondriales 16S RNAr y citocromo b (*cyt b*) muestran también una clara divergencia entre las dos tribus Triatomini y Rhodniini (Lyman et al., 1999). Se destaca la utilidad del gen *cyt b* en la diferenciación de especies morfológicamente similares como *R. prolixus* y *R. robustus* (Lyman et al., 1999, Monteiro et al., 2000, Monteiro et al., 2003,) en el estudio de la diversidad genética de poblaciones de *T. infestans* en Bolivia (Giordano et al., 2005), en la determinación de la estructura genética en *T. brasiliensis* (Almeida et al., 2008), en el estudio de las poblaciones venezolanas de *R. prolixus* (Fitzpatrick et al., 2008) y en poblaciones de Centro-América de *T. dimidiata* (Dorn et al., 2009). Hasta el momento, no se había realizado el primer estudio genético poblacional que utilice este excelente marcador en las poblaciones de *R. prolixus* y *T. dimidiata* de Colombia, no teniéndose claro el verdadero estatus taxonómico de las poblaciones de *Rhodnius* presentes en las palmas de los Llanos Orientales de este país. La correcta determinación de estas especies vectoras es fundamental para la comprensión de su papel en la transmisión de la enfermedad de Chagas, conocimiento necesario para el desarrollo de nuevas y eficientes estrategias de control.

4. CAPITULO 2: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Rhodnius prolixus* EN ÁREAS ENDÉMICAS DE COLOMBIA.

4.1 INTRODUCCIÓN

Rhodnius prolixus (Hemíptera: Reduviidae) es el vector más importante de la enfermedad de Chagas en Venezuela, Colombia y parte de Centro América (Monteiro et al., 2001, Moncayo, 2003). Esta especie fue descrita por Stal en 1859 a partir de especímenes colectados en viviendas en el norte de Venezuela. La distribución de *R. prolixus* muestra una clara discontinuidad entre Sur y Centro América, ya que esta especie no ha sido registrada en Panamá ni en el sur de Costa Rica (Dujardin et al., 1998, Schofield & Dujardin 1999). Se destaca que *R. prolixus* es morfológicamente similar a *Rhodnius robustus*, el cual se encuentra en palmas en Brasil, norte de Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia (Lent & Wygodzinsky 1979).

En Centro América *R. prolixus* está estrictamente domiciliado, situación diferente se presenta en Venezuela y Colombia donde existen poblaciones silvestres (Gamboa 1963, Lopez et al., 2007, Fitzpatrick et al., 2008). La hipótesis evolutiva generada por Schofield and Dujardin 1999, propone que *R. prolixus* es esencialmente una especie doméstica derivada probablemente de poblaciones selváticas de *R. robustus* presentes en palmas en los llanos de Venezuela y el oriente de Colombia. Este proceso de especiación podría haber ocurrido en tiempos relativamente recientes reflejándose en la gran similitud morfológica y genética (Monteiro et al., 2003). Sin embargo, un reciente estudio molecular realizado por Fitzpatrick et al, (2008) en Venezuela sugiere escenarios más complejos, como la coexistencia en algunas zonas de estas dos especies y la demostración que *R. prolixus* selvático puede colonizar casas rurales.

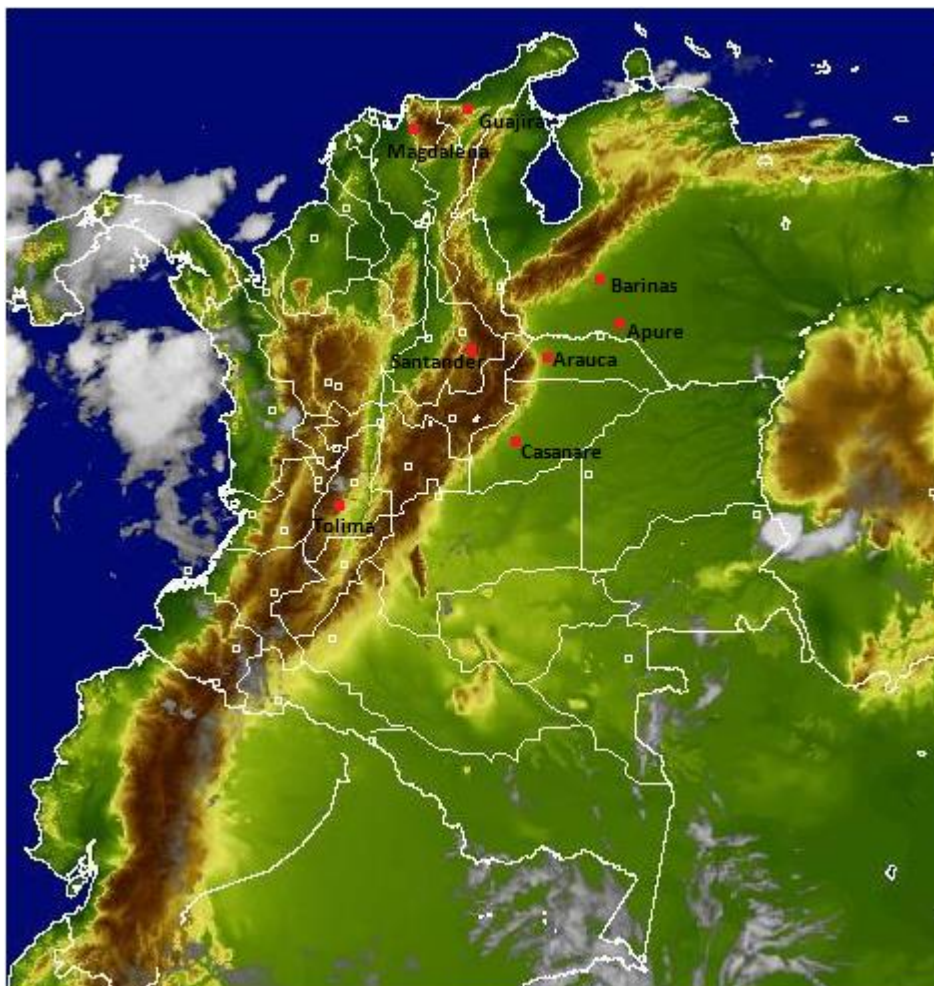
En Colombia, son pocos los estudios de caracterización genética de las poblaciones de *R. prolixus* domiciliados y selváticos no teniéndose claro el verdadero estatus taxonómico de las poblaciones selváticas. Es importante resaltar la utilidad del gen mitocondrial citocromo b en la diferenciación de especies morfológicamente similares como *R. prolixus* y *R. robustus* (Lyman et al., 1999, Monteiro et al., 2000., Monteiro et al., 2003, Fitzpatrick et al., 2008) y como marcador molecular en el estudio de las poblaciones de diferentes especies de Triatominae como *T. infestan*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata* y *R. prolixus* (Monteiro et al., 2004, Giordano et al., 2005, Almeida et al., 2008, Fitzpatrick et al., 2008, Dorn et al., 2009).

De tal manera, en el presente trabajo se utilizó el gen mitocondrial citocromo b como marcador molecular, con el fin de determinar la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *R. prolixus* en Colombia. Este conocimiento es fundamental en el desarrollo de nuevas y eficientes estrategias de control de la enfermedad de Chagas, además de ser imprescindible en la comprensión del origen, evolución, distribución y límites de expansión de esta importante especie vectora.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Área de estudio. El área de estudio comprende los departamentos de Magdalena, Guajira, Santander, Tolima, Arauca, y Casanare en Colombia y una zona fronteriza Venezolana con los estados de Apure y Barinas (Figura 1).

Figura 1. Mapa con el sitio de origen de los individuos *R. prolixus* del estudio.



Fuente: IDEAM con modificaciones realizadas en este trabajo.

En Colombia, estos departamentos pertenecen a tres regiones naturales: Sierra Nevada (Magdalena y Guajira), Zona Andina (Santander y Tolima) y los Llanos de la Orinoquía (Arauca y Casanare).

4.2.2 Insectos. Los individuos de *R. prolixus* fueron colectados en los años 2002 – 2004 (Tabla 1) por investigadores, personal del CINTROP (Biólogos y auxiliares de campo), técnicos de ETV y la comunidad de las zonas de estudio (Angulo et al., 2005b, 2007), utilizando la técnica hora/hombre en domicilio y peridomicilio y con trampas de cebo animal en el hábitat selvático (Angulo VM, datos no publicados) (Figuras 2 y 3). Los

insectos fueron identificados como *R. prolixus* en el laboratorio de entomología por medio de la clave taxonómica de Lent & Wygodzinsky (1979).

Tabla 1. Sitios de colecta de los individuos de *R. prolixus* del estudio.

País	Departamento	Municipio	Hábitat	n	Latitud	Longitud	Altitud
Colombia	Magdalena	Santa Marta	D	12	11°09'	73°18'	300
Colombia	Guajira	Dibulla	D	12	11°09'	73°18'	297
Colombia	Santander	Albania	D	3	5°45'	73°55'	1900
Colombia	Santander	Macaravita	D	3	6°28'	72°36'	1960
Colombia	Santander	Capitanejo	D	1	6°31'	72°39'	1744
Colombia	Santander	Molagavita	D	2	6°35'	72°49'	1849
Colombia	Tolima	Coyaima	D	12	3°47'	75°12'	350
Colombia	Arauca	Arauca	D	10	6°98'	71°12'	130
Colombia	Arauca	Arauca	S	5	6°58'	71°07'	150
Colombia	Arauca	Arauquita	S	2	6°34'	71°04'	142
Colombia	Casanare	Maní	D	7	4°50'	72°21'	163
Colombia	Casanare	Nunchía	D	1	5°36'	72°00'	225
Colombia	Casanare	Paz	D	4	5°50'	71°35'	181
Colombia	Casanare	Maní	P	4	4°24'	72°21'	163
Colombia	Casanare	Nunchía	P	2	5°36'	72°00'	225
Colombia	Casanare	Maní	S	18	4°24'	72°05'	167
Colombia	Casanare	Nunchía	S	1	5°36'	72°00'	225
Venezuela	Barinas	Bolívar	D	10	8°47'	70°30'	990
Venezuela	Barinas	Ezequiel Zamora	D	1	7°52'	71°14'	160
Venezuela	Apure	Guárico	D	2	6°09'	67°52'	140

D = Doméstico, P = Peridoméstico, S = Selvático

Figura 2. Sitios de colecta de algunos individuos de *R. prolixus* del estudio. A: Casa del departamento de Santander y B: Hábitat selvático del departamento de Casanare.



A



B

Fuente: CINTROP-UIS

Figura 3. Trampa con cebo animal (gallina), para colecta de insectos selváticos (Angulo VM).



Fuente: CINTROP-UIS

4.2.3 Extracción de ADN. El ADN se obtuvo a partir de tres patas de cada insecto que fueron conservadas en etanol absoluto a -20°C. Cada muestra fue congelada rápidamente en nitrógeno líquido y macerada. En la extracción de ADN se utilizó el kit *Wizard Genomic Purification* (Promega, Madison, WI), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para aislamiento de ADN en tejido animal. El ADN fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

4.2.4 Amplificación del gen mitocondrial citocromo b. Un fragmento de 630 pb del gen mitocondrial *cyt b* se amplificó mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores descritos por Monteiro et al (2003), CYTB7432F, 5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC y CYTB7433R, 5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA. La reacción se realizó en un termociclador (BIO-RAD Laboratories, Inc) con las siguientes condiciones: Desnaturalización a 94°C 5min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 s, hibridación a 47°C 30 s y extensión a 72°C 1 min; un paso final de extensión a 72°C 10 min. El producto amplificado fue visualizado en geles de agarosa 1% coloreados con bromuro de etidio (0.25 ug/L). En todos los experimentos se incluyeron controles negativos para verificar la ausencia de contaminación.

Los productos PCR fueron purificados utilizando los filtros (Montage™ PCR, Millipore) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estos productos purificados fueron almacenados a -20°C.

4.2.5 Secuenciación del gen mitocondrial citocromo b. La secuenciación del fragmento *cyt b* se llevó a cabo mediante PCR con el uso de un kit de nucleótidos marcados con reactivos fluorescentes (Big dyes™, Perkin Elmer Applied Biosystem, Foster City, CA) y con los mismos iniciadores descritos anteriormente. Se realizó purificación del nuevo producto mediante el uso de columnas (Centri-Sep, Princeton Separations, Adelphia, NJ) la cual se realizó de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante. Posteriormente los productos PCR fueron secados al vacío y almacenados a -20°C en

oscuridad. Ambas cadenas de ADN fueron analizadas en un secuenciador automático ABI 3100.

4.2.6 Análisis de datos:

4.2.6.1 Alineamiento. Las secuencias fueron alineadas usando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994) implementado en el programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) teniendo en cuenta los costos por defecto.

4.2.6.2 Análisis filogenético. En la confirmación del estatus taxonómico de las poblaciones presentes en las palmas (hábitat selvático), se realizó un análisis filogenético con los haplotipos obtenidos del estudio, un haplotipo de *R. prolixus* de Honduras y haplotipos de *R. robustus* derivados del trabajo de Monteiro et al, (2003) publicadas en el GenBank (AF421339, AF421340, AF421341, AF421342, AF421343). Adicionalmente como grupos externos se utilizó a *Rhodnius colombiensis* y *T. dimidiata*, secuenciados en el presente trabajo.

La relación entre las secuencias fue resuelta a partir de dos métodos de reconstrucción filogenética: El método de distancia, mediante el modelo Kimura dos Parámetros (K2P) y el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) implementado en MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) y el método de parsimonia con búsqueda heurística implementado en el programa PAUP 4.0 (Swofford, 1998). El soporte de los nodos de las topologías reconstruidas se validó mediante el análisis de *bootstrap* no paramétrico (Felsenstein, 1985) con 1000 replicas.

4.2.6.3 Análisis genético-poblacionales. A partir de las secuencias obtenidas, se analizó la composición nucleotídica A, T, C y G utilizando el programa MEGA 4.0. Posteriormente con el uso del programa DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003) se determinó el número de haplotipos (*h*), los sitios variables o polimórficos (*S*), el número de sitios informativos, la diversidad haplotípica (*Hd*) y la diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987).

El índice de diversidad haplotípica (**Hd**) es definido como la probabilidad que dos secuencias elegidas al azar en la población sean diferentes, este índice se estimó a partir de la siguiente ecuación:

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Donde n es el número de secuencias, k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i .

El índice de diversidad nucleotídica (π) se define como el número promedio de diferencias nucleotídicas entre todos los pares de haplotipos en la muestra, se estimó a partir de la siguiente ecuación:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij}$$

Donde d_{ij} es la proporción de diferencias nucleotídicas entre haplotipos i y j , k es el número de haplotipos, p_i y p_j son las frecuencias de los haplotipos i y j .

La estructura genética (subdivisión poblacional) se evaluó con el uso del mismo programa mediante los estadísticos F_{st} (Hudson et al., 1992) y G_{st} (Nei, 1973). Como un método indirecto de estimación de flujo génico entre las poblaciones se calculó el número de migrantes por generación (Nm) a partir de cada uno de estos estadísticos con las siguientes ecuaciones:

$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{F_{st}} - 1 \right)}{2}$$

$$Nm = \frac{0,5 * (1 - G_{st})}{G_{st}}$$

Este flujo génico poblacional fue evaluado a diferentes niveles, entre par de poblaciones, y entre hábitats de una localidad. Además, se determinó las relaciones entre las poblaciones estudiadas a partir de las distancias *Fst* (Hudson *et al.*, 1992), reconstruidas mediante el algoritmo NJ (Saitou & Nei, 1987), utilizando el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

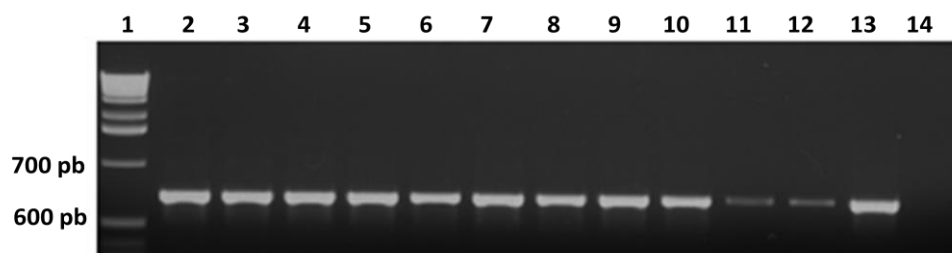
Una segunda exploración del nivel de estructura poblacional fue realizada mediante el análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) con el uso del programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Este análisis permite establecer cómo se encuentra estructurada la población y estimar el porcentaje de variación debido a cada nivel poblacional. Así, la variabilidad genética es explicada por distintos niveles jerárquicos de organización: dentro de las poblaciones (*Fst*), entre poblaciones dentro de grupos (*Fsc*) y entre grupos (*Fct*). En todos los análisis, se realizaron 10000 permutaciones.

Finalmente se realizó una red de haplotipos según el criterio de Parsimonia propuesto por Templeton (1987), implementado en el programa TCS 1.18 (Clement *et al.*, 2000). Las redes haplotípicas han sido propuestas como las mejores representaciones para datos intraespecíficos, ya que estos datos poseen gran cantidad de secuencias similares, algunas de las cuales pueden ser ancestrales (Posada & Crandall, 2001).

4.3 RESULTADOS

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 630 pb del gen mitocondrial *cyt b* (Figura 4), Este fragmento se secuenció en un total de 109 individuos correspondientes a siete poblaciones (Figura 1).

Figura 4. Electroforesis de agarosa del fragmento cyt b amplificado-



En el análisis se utilizó 611pb de este fragmento, encontrándose una composición nucleotídica de A= 0,315; C= 0,231; T=0,322; G=0,131, un total de 18 haplotipos de los cuales 13 se encuentran presentes en Colombia. El promedio de diversidad haplotípica (*Hd*) fue 0.5902 ± 0.055 y de diversidad nucleotídica (π) fue 0.00204 ± 0.0002 (Tabla 2).

Tabla 2. Diversidad genética de las poblaciones de *R. prolixus* de Colombia y una zona fronteriza Venezolana.

Población	Haplotipos observados	<i>S</i>	<i>Hd</i>	π
Guajira	H1	0	0.00000	0.00000
Magdalena	H1, H8, H9	2	0.55556	0.00106
Santander	H1, H8, H10	2	0.55556	0.00106
Tolima	H1	0	0.00000	0.00000
Arauca	H1, H7	3	0.48529	0.00254
Casanare	H1, H7, H11 - H18	9	0.75676	0.00235
Venezuela	H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7.	9	0.84615	0.00411
Total	H1-H18	16	0.59020	0.00204

S= sitios polimórficos *Hd*= diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica

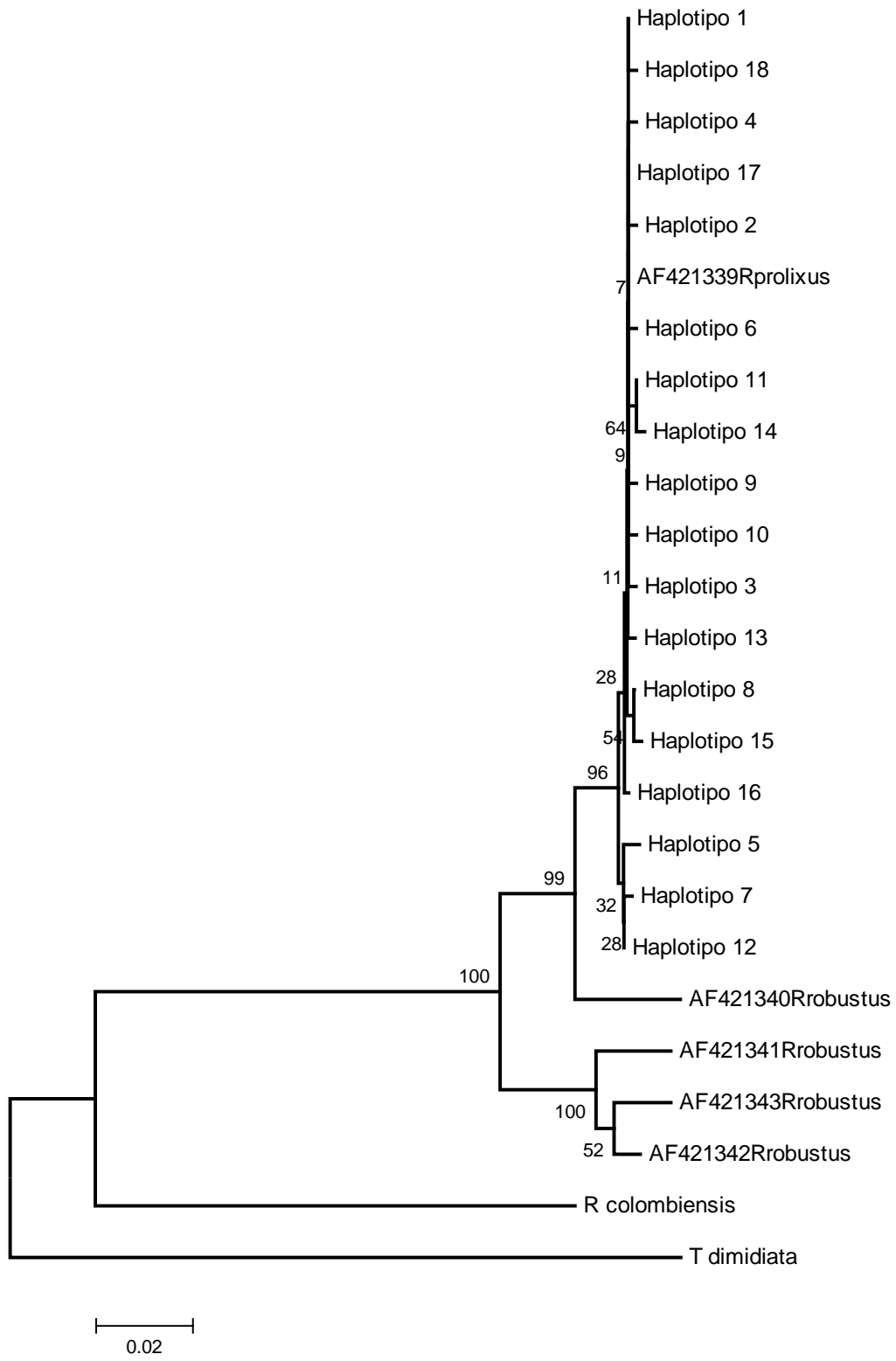
Todos los sitios variables o polimórficos (16) fueron mutaciones puntuales, cinco singletons y 11 sitios informativos para parsimonia. La Tabla 3 muestra estos sitios variables en forma detallada. Se destaca que el haplotipo 1 (HAP 1, H1) fue el más común y se presentó en todos los hábitats y en todas las localidades analizadas.

Tabla 3. Posiciones variables en los 18 haplotipos encontrados de *R. prolixus*.

	1	1	2	2	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5		
POSICIÓN	3	8	0	1	1	7	0	7	0	3	5	6	3	4	5	7
NUCLEOTÍDICA	7	8	4	9	5	1	1	9	6	0	1	9	0	2	6	8
HAP 1	T	T	G	A	A	C	T	C	C	G	C	C	G	T	T	T
HAP 2	A	.	.	C
HAP 3	.	.	A
HAP 4	.	.	.	G
HAP 5	.	.	A	.	G	.	.	.	T	C	.	.
HAP 6	C
HAP 7	.	C	.	.	G	.	.	.	T
HAP 8	T
HAP 9	T
HAP 10	T
HAP 11	A
HAP 12	G	.	.	.	T
HAP 13	A
HAP 14	G	A
HAP 15	G	T
HAP 16	T
HAP 17	A	.	.	.
HAP 18	C	.

Con respecto al estatus taxonómico, la identidad de los individuos colectados en palmas fue establecida de acuerdo a los dos métodos de reconstrucción filogenética (Distancia y Parsimonia). Estos análisis muestran una clara separación entre *R. prolixus* y *R. robustus*, encontrándose todos los haplotipos del estudio presentes en palmas formando un grupo con *R. prolixus* (Figura 5), indicando la existencia de *R. prolixus* selvático. El haplotipo más común en el estudio (Hap 1) fue idéntico a *R. prolixus* de Honduras (AF421339).

Figura 5. Árbol Neighbor-Joining basado en el modelo Kimura 2P.



Las poblaciones de *R. prolixus* de los diferentes departamentos de Colombia y la zona fronteriza Venezolana presentaron un grado de diferenciación moderada ($F_{st} = 0.12345$, $G_{st} = 0.11085$, $p = 0.0001$). Las comparaciones entre par de poblaciones son descritas en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de *R. prolixus* basado en valores F_{st} y Nm respectivamente.

Población	Guajira	Magdalena	Santander	Tolima	Arauca	Casanare	Venezuela
Guajira	-	5.50	5.50	ND	1.10	4.08	4.90
Magdalena	0.08333	-	9.90	5.50	1.44	4.69	4.76
Santander	0.08333	0.04808	-	5.50	1.44	4.69	4.76
Tolima	0.00000	0.08333	0.08333	-	1.10	4.08	4.60
Arauca	0.31250	0.25763	0.25763	0.31250	-	4.24	38.61
Casanare	0.10913	0.09626	0.09626	0.10913	0.10555	-	20.84
Venezuela	0.09259	0.09505	0.09505	0.09804	0.01278	0.02343	-

Los valores de F_{st} se encuentran por debajo de la diagonal y los valores de Nm por encima de la diagonal.

Tabla 5. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de *R. prolixus* basado en valores G_{st} y Nm respectivamente.

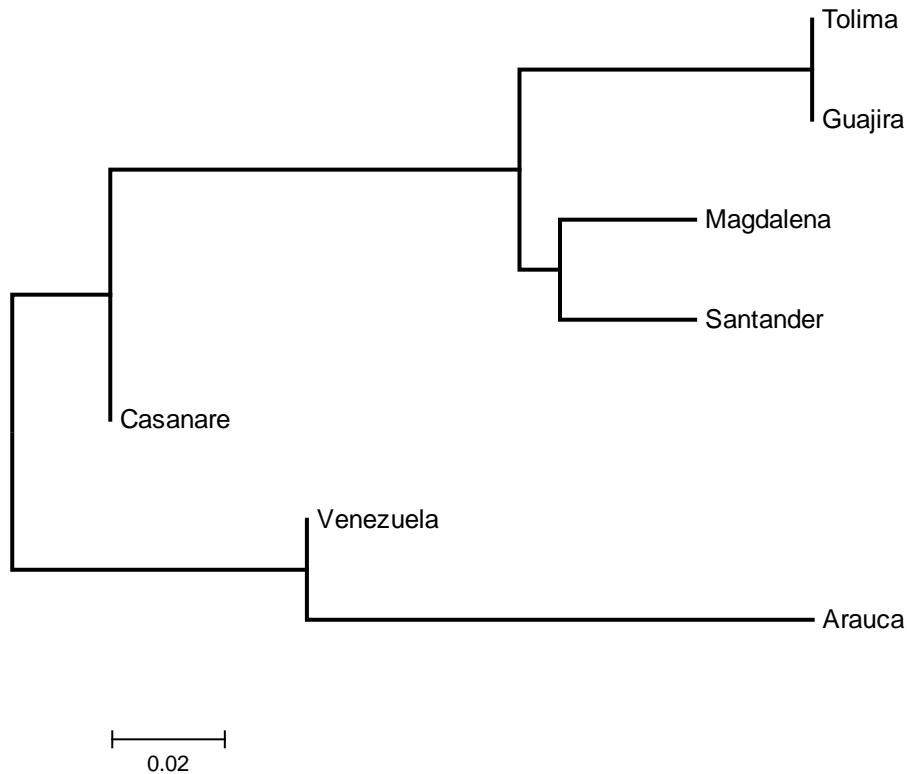
Población	Guajira	Magdalena	Santander	Tolima	Arauca	Casanare	Venezuela
Guajira	-	4.34	4.34	ND	2.64	4.46	2.29
Magdalena	0.10336	-	-45.00	4.34	10.68	17.09	16.69
Santander	0.10336	-0.01124	-	4.34	10.68	17.09	16.69
Tolima	0.00000	0.10336	0.10336	-	2.64	4.46	2.29
Arauca	0.15906	0.04474	0.04474	0.15906	-	10.14	20.48
Casanare	0.10083	0.02843	0.02843	0.10083	0.04699	-	34.00
Venezuela	0.17915	0.02909	0.02909	0.17915	0.02383	0.01449	-

Los valores de G_{st} se encuentran por debajo de la diagonal y los valores de Nm por encima de la diagonal.

Con los valores de distancias F_{st} entre pares de poblaciones de *R. prolixus* se construyó un árbol NJ, el cual permitió observar claramente que las poblaciones de la Sierra Nevada y la

zona Andina son más homogéneas que las encontradas en los Llanos Orientales de Colombia (Figura 6).

Figura 6. Árbol Neighbor-joining a partir de distancias F_{st} entre pares de poblaciones de *R. prolixus*.



Del mismo modo, los resultados del AMOVA presentan estructura poblacional en los tres enfoques realizados (Tabla 6), recuperándose el mayor porcentaje de variación intrapoblacional que interpoblacional. Se encuentra un índice de fijación mayor cuando se hace la comparación entre dos grandes grupos definidos por el análisis de distancia, las poblaciones localizadas al el oriente de los Andes (Arauca, Casanare y la zona fronteriza de Venezuela) y las que se encuentran al Occidente de esta importante cordillera (Guajira, Magdalena, Tolima y Santander).

Tabla 6. Análisis jerárquico de la variación genética en poblaciones de *R. prolixus*.

Estructura evaluada	Fuente de variación	GL	Componentes de varianza	% de variación	Índice de fijación
Todas las poblaciones (no agrupadas)	Entre poblaciones	6	0.05050 Va	6.50	Fst: 0.06496**
	Dentro de poblaciones	102	0.72698 Vb	93.50	
Tres regiones naturales (Sierra Nevada, andina y llanos orientales)	Entre regiones	2	0.02787 Va	3.54	Fct: 0.03543*
	Entre poblaciones dentro de las regiones	4	0.03161 Vb	4.02	Fsc: 0.04167
	Dentro de las poblaciones	102	0.72698 Vc	92.44	Fst: 0.07563**
Dos zonas geográficas (Occidente y Oriente de los Andes)	Entre zonas	1	0.05327 Va	6.66	Fct : 0.06662*
	Entre poblaciones dentro de las zonas	5	0.01929 Vb	2.41	Fsc : 0.02585*
	Dentro de las poblaciones	102	0.72698 Vc	90.93	Fst : 0.09075**

(* $p < 0.05$, ** $p < 0,01$)

Uno de los intereses de esta investigación era poder determinar el movimiento de los individuos de *R. prolixus* entre sus diferentes hábitats, los resultados indican dos escenarios en la zona de los Llanos Orientales de Colombia, en Arauca las poblaciones domésticas y selváticas de *R. prolixus* presentan un alto grado de diferenciación con flujo génico restringido, por el contrario las poblaciones de Casanare se comportan como una unidad panmíctica (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de *R. prolixus* de los diferentes hábitats en los Llanos orientales.

Poblaciones	<i>Fst</i>	<i>Nm</i>	<i>Gst</i>	<i>Nm</i>
Arauca doméstico Vs. Selvático	0.83333	0.10	0.74639	0.17
Casanare doméstico Vs. Selvático	-0.04652	-11.25	0.01572	31.30
Casanare doméstico Vs. Peridoméstico	0.00125	398.25	0.01403	35.14
Casanare Peridoméstico Vs. Selvático	0.03126	15.49	-0.00199	-251.92

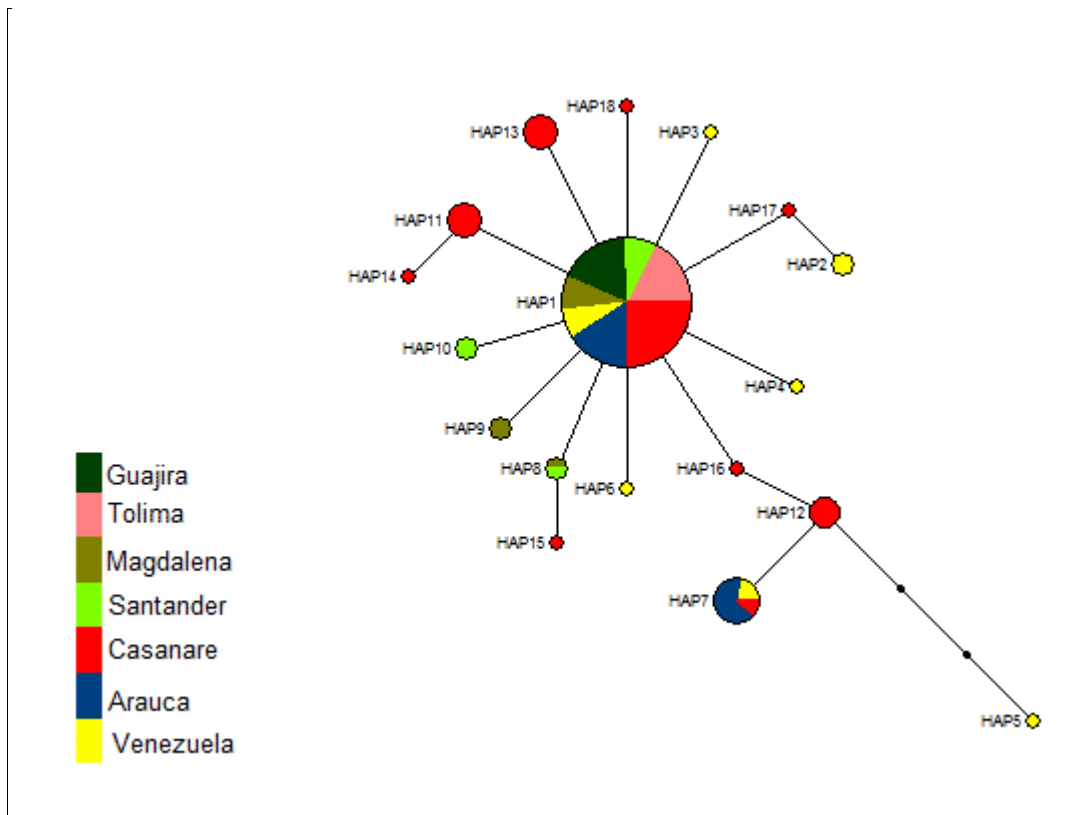
Tabla 8. AMOVA en poblaciones de *R. prolixus* de los diferentes hábitats en los Llanos Orientales de Colombia.

Estructura evaluada	Fuente de variación	GL	Componentes de varianza	% de variación	Índice de fijación
Todas las poblaciones (Arauca)	Entre poblaciones	1	7.56857 Va	86.31	Fst: 0.86315**
	Dentro de poblaciones	15	1.20000 Vb	13.69	
Todas las poblaciones (Casanare)	Entre poblaciones	2	-0.02357Va	-2.15	Fst: -0.02147**
	Dentro de poblaciones	34	1.12126Vb	102.15	

(*p < 0.05, **p < 0,01)

Finalmente, la red de haplotipos para las poblaciones de *R. prolixus* analizadas presentó una forma de estrella con la presencia de un haplotipo dominante (Hap 1) y exceso de haplotipos raros (Figura 7). Cada haplotipo en promedio se conectó con otros por uno a tres pasos mutacionales, sugiriendo esto que no hay una ramificación profunda entre los haplotipos para esta especie en la zona de estudio. No hubo registro de haplotipos perdidos lo cual indica que se reunió la muestra para el análisis poblacional.

Figura 7. Red de haplotipos obtenida mediante parsimonia estadística a partir del programa TCS. El tamaño del círculo es directamente proporcional a la frecuencia del haplotipo y los círculos sólidos negros son pasos mutacionales.



4.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación son únicos y relevantes, ya que ellos comprenden el primer análisis genético poblacional del principal vector de la enfermedad de Chagas en Colombia (*R. prolixus*), con el uso de la herramienta de secuenciación de ADN. El análisis del gen mitocondrial citocromo b, permitió caracterizar las poblaciones de este vector en términos de diversidad y estructura.

En Colombia, *R. prolixus* se encuentra domiciliado en gran parte de su territorio, sin embargo, algunos estudios han reportado la presencia de poblaciones selváticas en palmas en el departamento de Casanare (Angulo & Esteban 2005, López et al, 2007, Guhl et al., 2007). La determinación taxonómica de estas poblaciones ha sido difícil debido a su gran similitud morfológica con la especie estrictamente selvática, *R. robustus*. Este estudio ayudó a resolver el interrogante de la existencia de *R. prolixus* selvático en Colombia, como se puede observar en la clara separación de los diferentes haplotipos de *R. robustus* descritos por Monteiro et al., (2003) y los haplotipos de *Rhodnius* encontrados en Colombia en hábitat doméstico y selvático (Figura 5).

Este resultado unido a la existencia de *R. prolixus* selvático en Venezuela, la cual ha sido descrita recientemente (Fitzpatrick et al., 2008), son una fuerte evidencia para sugerir que *R. prolixus* no se trata simplemente de una especie doméstica derivada de poblaciones de *R. robustus* presentes en palmas en los llanos de Venezuela y el oriente de Colombia, hipótesis evolutiva propuesta por Schofield and Dujardin (1997, 1999). Este trabajo discute algunas hipótesis de dispersión y origen de este vector.

El análisis de las secuencias del fragmento de 611 bp del gen *cyt b* entre las poblaciones de *R. prolixus* en Colombia y una zona fronteriza Venezolana reveló una baja diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00204 \pm 0.00027$) y una diversidad haplotípica de media a alta ($Hd = 0.5902 \pm 0.055$), lo cual según Avise (2000) podría indicar una expansión reciente o una historia evolutiva corta de la población. Adicionalmente la estructura encontrada en la red de haplotipos en forma de estrella (Figura 7) con la presencia de un haplotipo dominante (haplotipo 1) y exceso de haplotipos raros sugiere el mismo proceso (Avise 2000, Templeton, 2006).

Es importante resaltar que el haplotipo 1 está presente en todos los hábitats (doméstico y selvático) esto podría sugerir que los individuos de *R. prolixus* con este haplotipo presentes en palmas poseen la capacidad de colonizar casas. Adicionalmente, el haplotipo 1 fue idéntico al haplotipo descrito para individuos de *R. prolixus* de Honduras (AF421339,

Monteiro et al., 2003) y fue el haplotipo más común en Venezuela. Esta amplia distribución y su gran frecuencia lo proponen como un haplotipo ancestral.

Estos hallazgos podrían ayudar a dar explicación a la situación presentada en Centro América, donde *R. prolixus* se encuentra estrictamente domiciliado, dándose soporte a la hipótesis propuesta por el investigador Rodrigo Zeledón basada en registros históricos, donde las poblaciones de *R. prolixus* en Centro América se derivaron de un escape accidental de insectos de laboratorio utilizados para xenodiagnóstico en el Salvador en 1915, cuyo origen geográfico de los insectos era La Guayra, Venezuela, los cuales fueron llevados a formar una colonia en un laboratorio de París, donde se desarrolló esta técnica diagnóstica (Zeledon, 2004). La dispersión del Salvador a los otros países de Centro América probablemente se dio por medio de migraciones humanas, de esta forma *R. prolixus* habría invadido esta región en unas pocas décadas como una especie doméstica (Schofield & Dujardin 1997, Zeledón 2004).

Un proceso igual o similar debió ocurrir en la región al occidente de los Andes en Colombia, donde las poblaciones de *R. prolixus* se encuentran solamente domiciliadas, la alta homogeneidad de estas poblaciones (Figura 6) con la presencia del haplotipo 1 de forma exclusiva en los departamentos de Tolima y Guajira y de forma representativa en Santander y Magdalena, soportan la hipótesis del origen introducido de *R. prolixus* en esta región, probablemente por medio de migraciones humanas como fueron las expediciones de colonizadores, un ejemplo, la llevada a cabo por el explorador y conquistador Alemán Ambrosio Alfinger desde Falcon (Venezuela) hasta Santander en 1532 (Schofield & Dujardin, 1999).

De otro lado, la mayor diversidad nucleotídica y haplotípica encontrada en los Llanos Orientales de Colombia y la zona fronteriza de Venezuela (Tabla 2) y los resultados obtenidos por Fitzpatrick et al., (2008) con poblaciones de *R. prolixus* de Venezuela son evidencia para considerar que en estas regiones, el origen de *R. prolixus* es autóctono.

El grado de estructuración genética (moderada) presentado en las poblaciones de *R. prolixus* ($F_{st} = 0.12345$, $G_{st} = 0.11085$, $p = 0.000$) debido probablemente a un evento como la expansión de rango, no es un fenómeno poco frecuente en los vectores responsables de enfermedad, recientemente se ha encontrado evidencia de este proceso en *T. infenstans*, *Anopheles darlingi*, *Anopheles sinensis*, *Culex tarsalis* (Bargues et al., 2006, Mirabello & Conn, 2006, Jung et al., 2007, Venkatesan et al., 2007).

Esta investigación, tenía un interés específico al caracterizar genéticamente las poblaciones de *R. prolixus* de Colombia, y era poder conocer si existe flujo entre las poblaciones selváticas y domiciliadas, debido al riesgo epidemiológico que conlleva. Dos escenarios son observados en la región de los llanos orientales de Colombia, en Arauca las poblaciones domésticas y selváticas de *R. prolixus* presentan un alto grado de diferenciación ($F_{st} = 0.83333$ $G_{st} = 0.74639$) por el contrario las poblaciones de Casanare de estos mismos hábitats se comportan como una unidad panmíctica ($F_{st} < 0.05$, $G_{st} < 0.05$, $N_m > 1$). Futuras investigaciones son necesarias para dilucidar los posibles mecanismos responsables de estas diferencias.

Estos hallazgos muestran un importante riesgo de transmisión con *T. cruzi* para las poblaciones humanas presentes en el departamento de Casanare, debido a que los programas de control vectorial están dirigidos principalmente a la eliminación de las poblaciones domiciliadas. Por consiguiente, el diseño de nuevas y efectivas estrategias que eviten la incursión de las poblaciones selváticas de *R. prolixus* al domicilio es imperativo. Este estudio ha hecho una contribución fundamental al entendimiento de las poblaciones de *R. prolixus* en el contexto de la epidemiología de la enfermedad de Chagas y el control vectorial en Colombia.

5. CAPITULO 3: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Triatoma dimidiata* EN ÁREAS ENDÉMICAS DEL DEPARTAMENTO DE SANTANDER.

5.1 INTRODUCCIÓN

Triatoma dimidiata (Latreille, 1811) tiene una amplia distribución geográfica, encontrándose en México, Centro América y parte de la costa pacífica de América del Sur (Colombia, Ecuador y Perú). Actualmente es el vector principal de la enfermedad de Chagas en Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica y el segundo vector más importante en Honduras y Colombia (Dorn et al., 2007). Esta especie presenta un comportamiento ecléctico, con un amplio espectro de hospederos vertebrados incluyendo el hombre (Zeledón et al., 2005); se encuentra ocupando una gran variedad de hábitats doméstico, peridoméstico y selvático, destacándose su presencia en viviendas periurbanas y urbanas de buena construcción en pequeñas y grandes ciudades de América Central, Ecuador y Colombia (Zeledón et al., 2001).

La clasificación de *T. dimidiata* ha sufrido diversos cambios desde su descripción original. Con base a estudios morfológicos, Usinger en 1941 dio nombres subespecíficos como *T. dimidiata maculipennis* (algunas de las formas mejicanas), *T. dimidiata capitata* (algunas formas colombianas) y *T. dimidiata dimidiata* (formas de Centro América). Lent & Wigodzinsky en 1979 sinonimizó estas tres subespecies en una sola especie con la observación que al analizar suficientes especímenes eran indistinguibles morfológicamente, sugiriéndose una variación clinal, igualmente descrita por otros autores, la cabeza se vuelve relativamente más larga (y los ojos más pequeños) de norte a sur – siendo más cortas en algunos especímenes mejicanos (*maculipennis*) y más largas en algunas formas colombianas (*capitata*) pero convirtiéndose más corta nuevamente en las formas

ecuatorianas y peruanas (Schofield, 2005). Lent & Jurberg (1985), estudiaron las estructuras de la terminalia externa de los machos en individuos provenientes de Norte, Centroamérica y Suramérica, encontrando diferencias importantes, que apuntaban a la misma variabilidad observada en los caracteres cromáticos y a la relación entre la cabeza y el rostrum. Estudios moleculares basados en las secuencias del espaciador transcrito interno ITS-2 del ADN ribosomal de poblaciones de *T. dimidiata* de Centro América demostró una gran variabilidad intraespecífica, hasta el punto de sugerirse un status taxonómico específico en el caso de las poblaciones de la Península de Yucatán, México (Bargues et al, 2000, 2002, Marcilla et al., 2001). Es así, que en los últimos años se han venido adelantando estudios morfológicos y moleculares con el fin de esclarecer las relaciones y posición taxonómica de las poblaciones de *T. dimidiata* en toda su área de distribución.

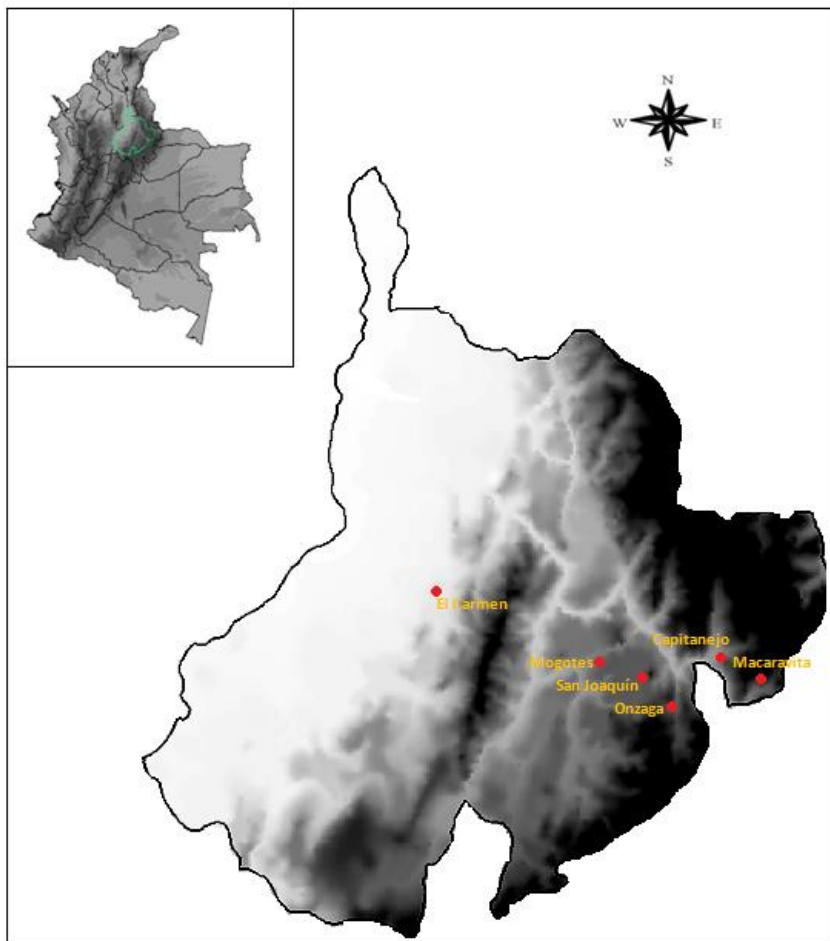
Análisis del fenotipo antenal, genitalia, caracteres morfométrico y RAPD han mostrado que la variación dentro de esta especie es más grande que la previamente considerada (Dorn et al 2003, Calderón et al., 2004, Bustamante et al., 2004, Lehmann et al., 2005, Fernández et al., 2005., Catalá et al 2005). Análisis morfométricos y de hidrocarburos cuticulares sugieren que una población selvática de Lanquin, Guatemala está sufriendo un proceso de especiación (Bustamante et al., 2004, Calderón et al., 2005). Variación cromosomal y el tamaño genómico sugiere que *T. dimidiata* puede representar un complejo de especies crípticas (icé indistinguibles morfológicamente, pero taxas aislados reproductivamente) (Panzeria et al., 2006). Un estudio muy reciente con ITS-2 en poblaciones de *T. dimidiata* de México, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá y Colombia demostró la existencia de 31 haplotipos con una clara distribución en cuatro grupos directamente relacionados a su origen geográfico. Se observó patrones de diversidad poblacional compatibles con el rango de subespecies ya descritas anteriormente (*T. d. dimidiata*, *T. d. capitata*, *T. d. maculipennis*) las cuales podrían haber seguido una radiación adaptativa a partir de formas ancestrales presentes en Guatemala (Bargues et al., 2008).

Las poblaciones de *T. dimidiata* en Colombia han sido poco estudiadas genéticamente, encontrándose hasta el momento sólo dos estudios reportados, un análisis de la estructura genética mediante RAPD de poblaciones de diferentes hábitats en Boavita, Boyacá, el cual mostró una baja diferenciación genética entre las poblaciones, indicando que las poblaciones no domiciliadas representan un riesgo epidemiológico en la transmisión de la enfermedad de Chagas (Ramírez et al., 2005) y el estudio de Bargas et al (2008) con ITS-2 ya descrito anteriormente. Por consiguiente, se realizó el presente estudio el cual utiliza el gen mitocondrial *cyt b* en la caracterización genética de las poblaciones de *T. dimidiata* colectadas en diferentes hábitats de áreas endémicas del departamento de Santander. Este conocimiento contribuye al entendimiento de aspectos evolutivos y biológicos de esta especie, que inevitablemente conlleva, al desarrollo de eficaces estrategias de control vectorial que nos aproximen a una erradicación de la enfermedad de Chagas en un futuro cercano.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Área de estudio. Este estudio fue realizado en áreas endémicas del departamento de Santander (Figura 8) el cual está situado en la región Andina, en la vertiente occidental de la cordillera oriental entre los 05° 42' y 08° 08' de latitud norte, y los 72° 26' y 74° 32' de longitud oeste (IGAC, 1984).

Figura 8. Mapa con el sitio de origen de los individuos *T. dimidiata* del estudio.



En el relieve del territorio santandereano se distingue dos grandes unidades fisiográficas: Valle Medio del Magdalena y la cordillera Oriental. El valle del Magdalena, al occidente del departamento, se caracteriza por un modelado plano y suavemente ondulado; en las márgenes del río Magdalena predomina la vegetación selvática y al oriente de éstas, se encuentra una faja de bosque ecuatorial. La cordillera Oriental ocupa la mayor parte del departamento en dirección general suroeste – noreste (IGAC, 1984, Flórez et al., 2006).

5.2.2 Insectos. Los individuos de *T. dimidiata* fueron colectados en algunos municipios del departamento de Santander en diferentes hábitats en los años 2002 – 2004 (Tabla 9, Figura 9) por investigadores, personal del CINTROP (Biólogos y auxiliares de campo),

técnicos de ETV y la comunidad de la zona de estudio (Angulo et al., 2006), utilizando la técnica hora/hombre en domicilio y peridomicilio y con trampas de cebo animal en el hábitat selvático (Angulo VM, datos no publicados) (Figura 10). Los insectos fueron identificados como *T. dimidiata* por el personal de entomología con el uso de la clave taxonómica de Lent & Wygodzinsky (1979).

Tabla 9. Sitios de colecta de los individuos de *T. dimidiata* del estudio.

Municipio	Vereda	Hábitat	n	Latitud	Longitud	Altitud
Macaravita	Buraga	Doméstico	9	6°27'55"	72°36'36"	1815
Macaravita	Huertas	Doméstico	2	6°30'04"	72°34'09"	1812
Macaravita	Buraga	Peridoméstico	10	6°28'00"	72°37'01"	1877
Macaravita	Juncal	Peridoméstico	1	6°29'51"	72°34'43"	1969
Macaravita	Buraga	Selvático	4	6°27'07"	72°37'29"	1825
Macaravita	Centro	Urbano	6	6°30'32"	72°35'45"	2432
Capitanejo	Chorreras	Selvático	8	6°31'39"	72°39'24"	1744
Capitanejo	Montecillo	Selvático	1	6°32'43"	72°42'28"	1052
Mogotes	Centro	Urbano	3	6°28'59"	72°57'59"	1687
San Joaquín	Centro	Urbano	4	6°25'59"	72°51'59"	2175
Onzaga	Centro	Urbano	3	6°21'00"	72°48'59"	2171
El Carmen	El Carmen	Colonia	5	6°41'22"	73°31'57"	990

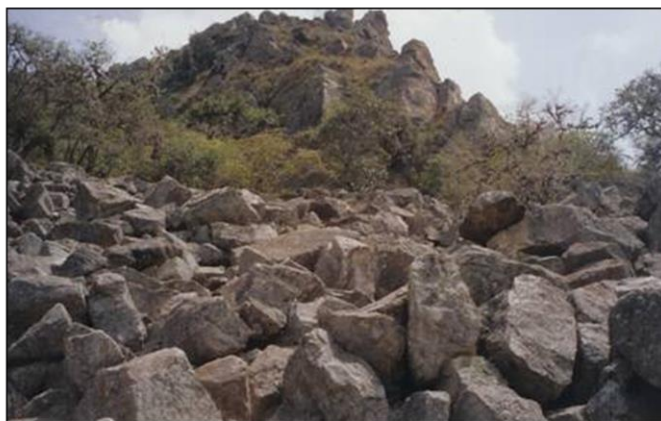
Figura 9. Diferentes hábitats de la zona de estudio. A: Doméstico, B: Peridoméstico, C: Selvático.



A



B



C

Fuente: CINTROP-UIS

Figura 10. Trampa con cebo animal (gallina) en la colecta de insectos selváticos (Angulo VM).



Fuente: CINTROP-UIS

5.2.3 Extracción de ADN. El ADN se obtuvo a partir de tres patas de cada insecto que fueron conservadas en etanol absoluto a -20°C. Cada muestra fue congelada rápidamente en nitrógeno líquido y macerada. En la extracción de ADN se utilizó el kit *Wizard Genomic Purification* (Promega, Madison, WI), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para aislamiento de ADN en tejido animal. El ADN fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

5.2.4 Amplificación del gen mitocondrial citocromo b. Un fragmento de 640 pb del gen mitocondrial *cyt b* se amplificó mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los iniciadores descritos por Monteiro et al (2003), CYTB7432F, 5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC y CYTB7433R, 5'-GC(AT)CCAATTCA(AG)GTTA(AG)TAA. La reacción se realizó en un termociclador (BIO-RAD Laboratorios, Inc) con las siguientes condiciones: Desnaturalización a 94°C 5min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 s, hibridación a 47°C 30 s y extensión a 72°C 1 min; un paso final de extensión a 72°C 10 min. El producto amplificado fue visualizado en geles de agarosa 1% coloreados con bromuro de etidio (0.25 ug/L). En todos los experimentos se incluyeron controles negativos para verificar la ausencia de contaminación. Los productos PCR fueron purificados utilizando los filtros (Montage™ PCR, Millipore) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Estos productos purificados fueron almacenados a -20°C.

5.2.5 Secuenciación del gen mitocondrial citocromo b. La secuenciación del fragmento *cyt b* se llevó a cabo mediante PCR con el uso de un kit de nucleótidos marcados con reactivos fluorescentes (Big dyes™, Perkin Elmer Applied Biosystem, Foster City, CA) y con los mismos iniciadores descritos anteriormente. Se realizó purificación del nuevo producto mediante el uso de columnas (Centri-Sep, Princeton Separations, Adelphia, NJ) la cual se realizó de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante. Posteriormente los productos PCR fueron secados al vacío y almacenados a -20°C en oscuridad. Ambas cadenas de ADN fueron analizadas en un secuenciador automático ABI 3100.

5.2.6 Análisis de datos. Las secuencias fueron alineadas usando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994) implementado en el programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) teniendo en cuenta los costos por defecto.

La diversidad genética se estimó con base en varios índices con el uso del programa DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003). Estos índices fueron: el número de haplotipos (***h***), el número de sitios segregantes o polimórficos (***S***), el número de sitios informativos, la diversidad nucleotídica (**π**) (Nei, 1987) y la diversidad haplotípica (***Hd***) (Nei, 1987).

Se estableció una relación de los diferentes haplotipos con el método de distancia, mediante el modelo K2P y el algoritmo NJ (Saitou & Nei, 1987) implementado en MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). El soporte de los nodos de la topología reconstruida se validó mediante el análisis de *bootstrap* no paramétrico (Felsenstein, 1985) con 1000 replicas. En este análisis se utilizó la secuencia publicada en el GenBank de *T. dimidiata* de México con Acceso No. AY062150 (Harris KD and Beard CB) y como grupo externo la secuencia de *Triatoma pallidipennis* publicada en el GenBank con Acceso No. DQ198814 (Pfeiler et al., 2006).

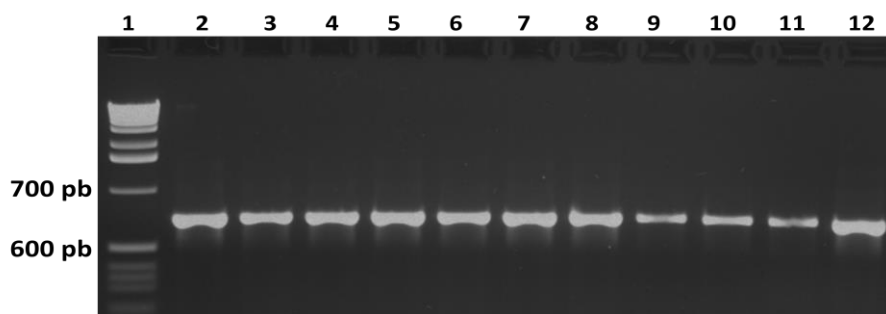
La subdivisión poblacional se evaluó mediante los estadísticos *Fst* (Hudson et al., 1992) y *Gst* (Nei, 1973). Como un método indirecto de estimación de flujo génico entre las poblaciones se calculó el número de migrantes por generación (*Nm*) a partir de cada uno de estos estadísticos. Esto se realizó con el programa DnaSP 4.0 (Rozas et al., 2003). Además, se determinó las relaciones entre las poblaciones estudiadas a partir de las distancias *Gst* (Nei, 1973) reconstruidas mediante el algoritmo NJ (Saitou & Nei, 1987), implementado en MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007).

Una segunda exploración del nivel de estructura poblacional fue realizada mediante AMOVA (Excoffier et al., 1992) con el uso del programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005). Se probó la hipótesis nula de no diferenciación genética entre las poblaciones de *T. dimidiata* en Santander, Colombia.

5.3 RESULTADOS

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 630 pb del gen mitocondrial *cyt b* (Figura 11). Este fragmento se secuenció en un total de 56 individuos correspondientes a seis poblaciones del departamento de Santander (Figura 8).

Figura 11. Electroforesis de agarosa del fragmento *cyt b* amplificado.



En el análisis se utilizó 614pb de este fragmento, encontrándose una composición nucleotídica de A= 0.313, C= 0.228 T= 0.339 G= 0.119, un total de 12 haplotipos, una diversidad haplotípica (Hd) = 0.808 ± 0.039 y una diversidad nucleotídica (π) = 0.02239 ± 0.00117 (Tabla 10).

Tabla 10. Diversidad genética en poblaciones de *T. dimidiata* de Santander, Colombia.

Población	Haplotipos observados	S	Hd	π
Macaravita	HapA, HapB, HapC, HapD, HapE, HapF, HapG	14	0.56745	0.00739
Capitanejo	HapH, HapI, HapJ, HapK	13	0.58333	0.00556
Mogotes	HapI	0	0.00000	0.00000
San Joaquín	HapI	0	0.00000	0.00000
Onzaga	HapI	0	0.00000	0.00000
El Carmen	HapL	0	0.00000	0.00000
Total	HapA - HapL	44	0.80800	0.02239

S= sitios polimórficos Hd= diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica

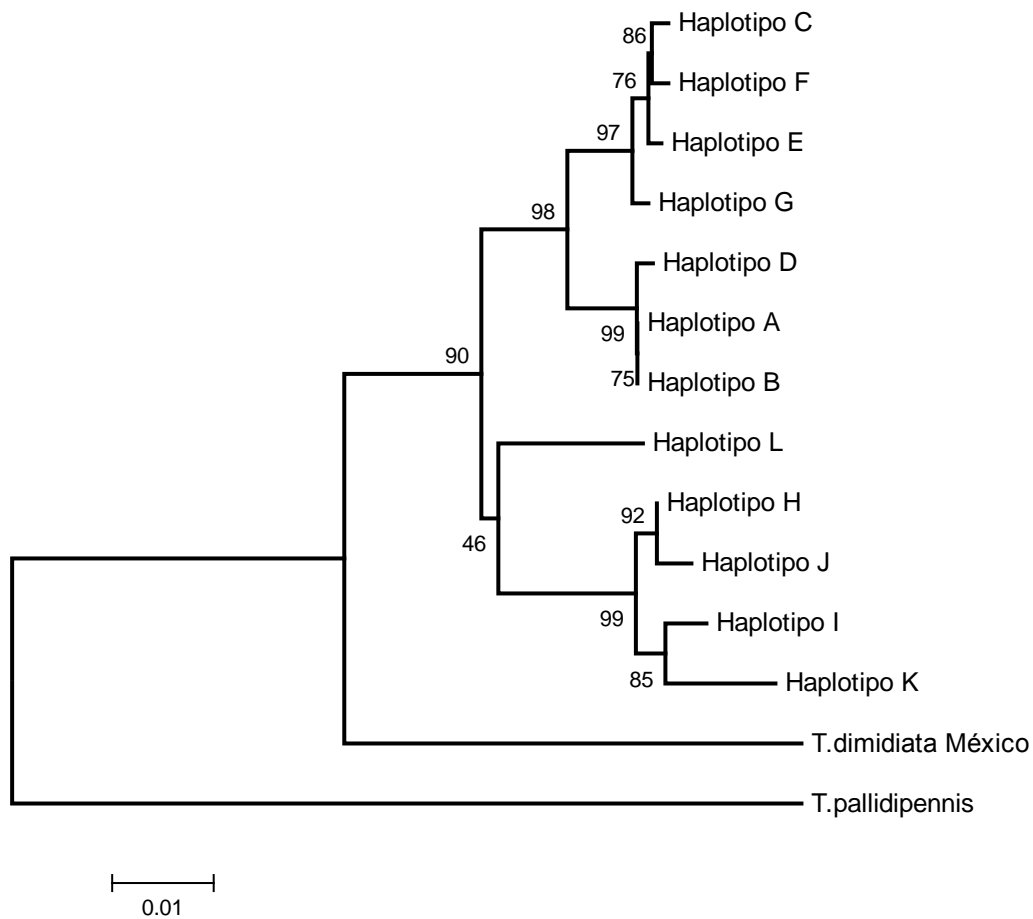
Además, se obtuvo un total de 44 sitios variables o polimórficos, de los cuales 37 son sitios informativos para parsimonia y siete singletones. La Tabla 11 muestra estos sitios variables en forma detallada.

Tabla 11. Posiciones variables en los 12 haplotipos encontrados de *T. dimidiata* en Santander, Colombia.

	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6
Posición	2	4	8	9	0	1	1	1	4	5	8	0	0	0	2	4	4	6	8	9	1	1	2	4	5	6	6	9	2	2	3	4	6	7	0	0	0	2	3	6	8	8	8	0		
Nucleotídica	6	1	6	5	7	0	6	7	9	8	9	1	3	6	7	5	8	6	1	9	1	2	6	5	1	6	8	2	2	5	8	7	7	0	0	3	6	1	4	3	0	1	7	3		
Hap A	A	A	T	T	T	T	C	C	G	T	G	C	T	A	A	A	T	C	A	T	C	C	C	A	T	T	C	C	T	T	G	G	A	T	T	T	C	A	A	C	G	T	T	C		
Hap B	A	.	A	G	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	G	.	A	.	.	T		
Hap C	A	.	A	G	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	G	G	.	A	.	.	T		
Hap D	.	.	.	C	
Hap E	A	.	A	G	.	C	T	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	G	.	A	.	.	T		
Hap F	A	.	A	A	G	.	C	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	G	.	A	.	.	T		
Hap G	A	.	A	.	.	G	G	.	C	C	.	.	.	G	.	A	.	.	T		
Hap H	C	.	T	T	A	C	.	.	C	G	.	T	.	G	C	.	T	G	C	.	.	T	G	C	.	.	C	.	.	.	C	.	C	T	.	G	.	.	.	T		
Hap I	G	.	.	.	C	.	.	T	A	C	.	.	C	G	.	T	.	G	C	.	T	T	G	C	.	.	.	C	.	A	.	.	C	.	C	T	.	G	T	.	.	.	T			
Hap J	C	.	T	T	A	C	.	.	C	G	.	T	.	G	C	.	T	G	C	.	.	T	G	C	.	.	T	C	.	.	A	.	C	.	C	T	.	G	.	.	.	T
Hap K	G	G	C	.	C	.	.	T	A	C	.	.	C	G	.	T	C	.	G	C	T	.	T	G	C	C	.	.	C	C	.	C	T	.	G	T	.	.	C	T		
Hap L	.	G	.	.	.	C	T	T	A	.	G	.	.	A	.	C	.	.	.	G	C	.	T	.	C	.	.	.	G	.	.	.	T	.	G	T	.	A	.	T		

En la relación de los haplotipos se observa claramente la formación de dos clados principales con las muestras de *T. dimidiata* de Santander, destacándose que en un clado se encuentran todos los haplotipos presentes en el municipio de Macaravita y el otro clado está compuesto por los haplotipos encontrados en Capitanejo, Mogotes, San Joaquín, Onzaga y el Carmen. De igual manera, se observa una marcada divergencia entre la muestra de *T. dimidiata* de México y los haplotipos de este vector en Santander (Figura 12).

Figura 12. Árbol Neighbor-Joining basado en el modelo K2P de haplotipos de *T. dimidiata* encontrados en Santander, Colombia.



Los valores de F_{st} y G_{st} indican altos niveles de subdivisión poblacional ($F_{st} = 0.90349$, $G_{st} = 0.48469$, $p = 0.0000$). La estimación del número de migrantes entre cada par de población (N_m) revela un escenario de flujo génico restringido ($N_m < 1.0$) (Tabla 12). Del mismo modo, los resultados de AMOVA hacen rechazar la hipótesis nula de no diferenciación entre las poblaciones de *T. dimidiata* de los diferentes municipios de Santander ($F_{st} = 0.788$, $p = 0.0000$) (Tabla 13). El mayor porcentaje de variación se encuentra entre las poblaciones que intrapoblacional.

Tabla 12. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de *T. dimidiata* de Santander.

Poblaciones	F_{st}	N_m	G_{st}	N_m
Macaravita Vs. Capitanejo	0.81041	0.12	0.21132	1.87
Macaravita Vs. MGSJOZ	0.90010	0.06	0.38059	0.81
Macaravita Vs. El Carmen	0.88098	0.07	0.27242	1.34
Capitanejo Vs. MGSJOZ	0.64674	0.27	0.51873	0.46
Capitanejo Vs. El Carmen	0.90607	0.05	0.46630	0.57
El Carmen Vs. MGSJOZ	1.00000	0.00	1.00000	0.00

MGSJOZ= Mogotes, San Joaquín y Onzaga.

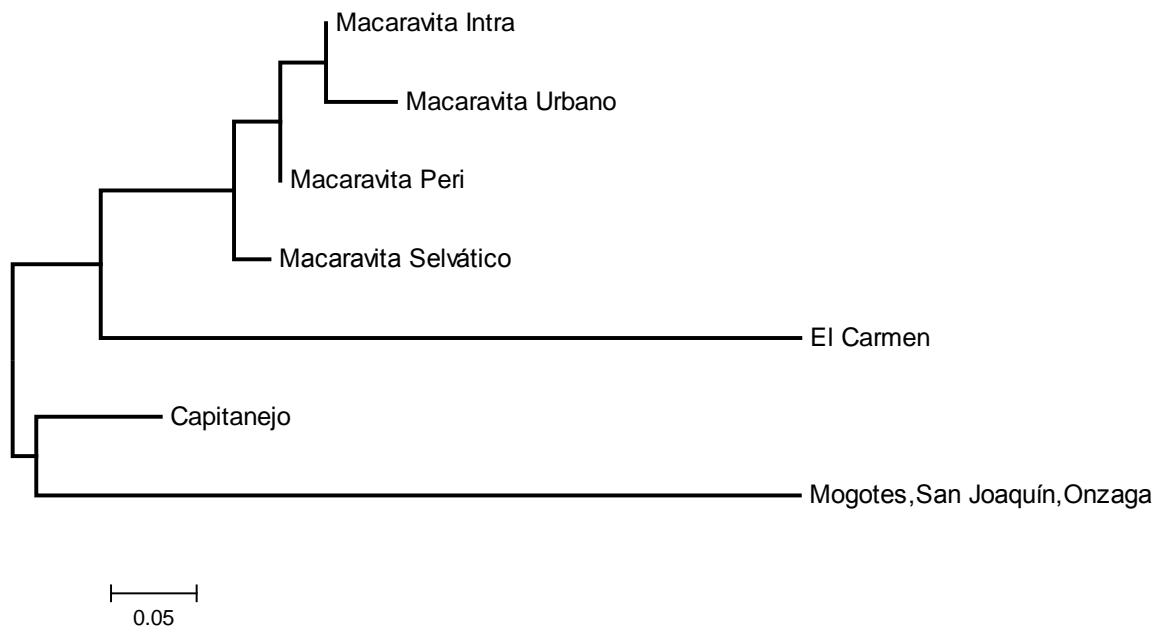
Tabla 13. AMOVA de las poblaciones de *T. dimidiata* de seis municipios en Santander.

Estructura evaluada	Fuente de variación	GL	Componentes de varianza	% de variación	Índice de fijación	p
Todas las poblaciones (no agrupadas)	Entre poblaciones	6	6.17919 Va	78.89	Fst: 0.78887	0.00000
	Dentro de poblaciones	49	1.65378 Vb	21.11		

Con los valores de distancias G_{st} entre pares de poblaciones de *T. dimidiata* se construyó un árbol NJ, que nos permitió observar la formación de dos clados principales, el primero

compuesto por las poblaciones de los diferentes hábitats de Macaravita las cuales forman un grupo bastante homogéneo y las poblaciones del municipio del Carmen y el otro clado corresponde a las poblaciones de Capitanejo y los municipios de Mogotes, San Joaquín y Onzaga (Figura 13).

Figura 13. Árbol Neighbor-joining a partir de distancias G_{st} entre pares de poblaciones de *T. dimidiata*.



Finalmente, se estableció que las poblaciones de *T. dimidiata* presentes en diferentes hábitats (Doméstico, peridoméstico y selvático) se comportan como una unidad panmíctica ($F_{st} < 0.05$, $N_m > 1$) (Tabla 14).

Tabla 14. Diferenciación genética y flujo génico entre poblaciones de *T. dimidiata* de los diferentes hábitats del municipio de Macaravita.

Poblaciones	<i>Fst</i>	<i>Nm</i>	<i>Gst</i>	<i>Nm</i>
Doméstico Vs Peridoméstico	-0.05341	-9.86	0.00424	117.33
Doméstico Vs Selvático	-0.05287	-9.96	0.04694	10.15
Peridoméstico Vs Selvático	-0.10805	-5.13	0.05897	7.98
Urbano Vs Selvático	0.06452	7.25	0.08247	5.56
Urbano Vs Doméstico rural	-0.06234	-8.52	0.00824	60.19
Urbano Vs Peridoméstico rural	0.01636	30.07	0.02501	19.49

5.4 DISCUSIÓN

Triatoma dimidiata presenta una gran variabilidad intraespecífica la cual ha sido descrita con el uso de marcadores fenéticos y genéticos (Dorn et al, 2007). Encontrándose estudios que dividen a esta especie en diferentes grupos (dos a cuatro), en el que el tamaño de muestra y el poder de resolución de los marcadores utilizados podrían jugar un papel determinante (Bustamante et al., 2004., Calderón et al., 2005, Catalá et al., 2005, Panzera et al., 2006, Bargues et al., 2008). La presente investigación fue realizada a una escala geográfica más fina con un excelente marcador, el gen mitocondrial *cyt b*, con el objetivo claro de aportar al esclarecimiento de lo que se encuentra incluido bajo la denominación de *T. dimidiata*.

Es importante resaltar que este es el segundo estudio genético que utiliza la herramienta de la secuenciación de ADN en poblaciones de *T. dimidiata* de Colombia. El primero ha sido un estudio filogeográfico (siete países) realizado por Bargues et al. (2008) con el uso del marcador nuclear (ITS-2), Colombia es representada con 31 individuos de cinco departamentos, de los cuales tres corresponden a Santander. El presente estudio amplía esta muestra a 56 individuos para este departamento, los insectos son colectados en diferentes hábitats y en un periodo de tiempo corto (tres años), características fundamentales para evitar el conocido efecto Wahlund (Hart & Clark 2005) muchas veces responsable de malas interpretaciones en estudios genético-poblacionales.

El gen mitocondrial *cyt b* ha demostrado ser muy útil en caracterizar las diferentes especies de Triatominae (Lyman et al., 1999, Monteiro 2003, Giordano et al., 2005, Martinez et al., 2006, Pfeiler et al., 2006, Almeida et al, 2008, Fitzpatrick et al., 2008, Dorn et al., 2009). En este trabajo el análisis de un fragmento de 614 pb del gen *cyt b* mostró una rica composición de A-T (65.3%), concordante con lo reportado para el genoma mitocondrial de insectos (DeSalle et al., 1987). El alto número de sitios polimórficos (44), los valores de π (0.02239 ± 0.00117) y *Hd* (0.808 ± 0.039) con la presencia de 12 haplotipos (Tabla 11) demuestran una gran heterogeneidad de las poblaciones de este vector. Esta característica ha sido igualmente evidenciada con el uso de este marcador en poblaciones de *T. dimidiata* de Centro América (Dorn et al., 2009).

Un hallazgo interesante es la marcada divergencia observada entre la muestra de *T. dimidiata* de México y los haplotipos de este vector en Santander (Figura 12), lo cual podría deberse a un proceso de aislamiento por distancia el cual también ha sido sugerido por Bargues et al (2008). Estos autores mostraron en sus análisis filogenéticos de poblaciones de *T. dimidiata* de varios países la formación de dos grandes clados, el primero correspondiente a las poblaciones presentes en la península de Yucatán, el norte de Guatemala y algunas de Honduras el cual le proponen un estatus específico llamado provisionalmente *Triatoma sp. aff. dimidiata*. El segundo clado, corresponde a algunas poblaciones presentes en México, Guatemala y Honduras y todas las poblaciones de Ecuador, Panamá y Colombia. Este clado es formado por tres grupos, los cuales correspondieron a las tres subespecies inicialmente propuestas para *T. dimidiata* (*T. d. dimidiata*, *T. d. maculipennis*, *T. d. capitata*), donde las poblaciones de *T. dimidiata* de Panamá y Colombia serían *T. d. capitata* (Bargues et al., 2008).

Esta investigación revela que las poblaciones de *T. dimidiata* de Santander presentan un alto grado de diferenciación genética ($F_{st} = 0.90349$, $G_{st} = 0.48469$), el mayor porcentaje de la variación se dio interpoblacionalmente (Tabla 13). Es importante resaltar que en otras áreas pequeñas, *T. dimidiata* ha presentado el mismo comportamiento, un ejemplo, es Campeche, México donde las poblaciones de este vector forman dos clados bien

diferenciados (Tamay et al., 2008) y otro es observado en Petén, Guatemala (Dorn, et al., 2009).

En la relación de los haplotipos encontrados en el estudio, se observa claramente la formación de dos clados principales (Figura 12), destacándose que en un clado se encuentran todos los haplotipos presentes en el municipio de Macaravita y el otro clado está compuesto por los haplotipos encontrados en Capitanejo, Mogotes, San Joaquín y Onzaga formando un grupo y el haplotipo L presente en el Carmen. En el árbol NJ de las distancias *Gst* entre las diferentes poblaciones (Figura 13), se observa igualmente la gran separación de las poblaciones de Macaravita en sus diferentes hábitats con las poblaciones de Capitanejo y los municipios de Mogotes, San Joaquín y Onzaga. Se destaca que los individuos del municipio del Carmen (haplotipo L) aunque diferenciados se encuentran esta vez formando un clado con los individuos de Macaravita, lo cual podría indicar que se necesita un mayor número de individuos en esta región para aclarar su verdadera posición. Es importante anotar, que estos individuos procedían de colonia, de diferentes generaciones (F1, F2, F3), la dificultad que existe en el muestreo en esta zona y la presencia de un haplotipo no encontrado en los otros municipios obligó a incluirlos en el estudio.

La gran cercanía de los municipios de Macaravita y Capitanejo con la alta diferenciación genética de sus poblaciones de *T. dimidiata* ($F_{st} = 0.81041$, $G_{st} = 0.21132$) podrían sugerir un proceso de especiación simpátrica en esta región, en el cual aislamiento geográfico no es necesario para el aislamiento reproductivo. Sin embargo, estos hallazgos unido a lo presentado en las poblaciones de *T. dimidiata* de Petén, Guatemala y Yucatán, México, en el que dos grupos distintos son encontrados en simpatría (Dorn et al, 2009), soportan la hipótesis, que lo que se encuentra hoy día conocido como *T. dimidiata* es un complejo de especies crípticas, con la urgente necesidad de más estudios genéticos y fenéticos que utilicen un buen número de marcadores y una muestra representativa de toda el área de distribución de este importante vector.

Finalmente, este trabajo establece el alto riesgo de transmisión con *T. cruzi* de la población humana del municipio de Macaravita al encontrarse que las poblaciones de *T. dimidiata* de los diferentes hábitats se comportan como una unidad panmíctica ($F_{st} < 0.05$, $Nm > 1$). Situación igualmente descrita en el estudio de la estructura genética de poblaciones domésticas, peridomésticas y selváticas de *T. dimidiata* en el municipio de Boavita, Boyacá (Ramírez et al., 2005). Por consiguiente, el control de estas poblaciones peridomésticas y selváticas es un verdadero reto para los programas de control vectorial de la enfermedad de Chagas en Colombia.

6. CONCLUSIONES

- El gen mitocondrial *cyt b* demostró ser un marcador muy útil en el estudio de las características genéticas de las poblaciones de *R. prolixus* y *T. dimidiata* de áreas endémicas de Colombia.
- Las poblaciones de *R. prolixus* de Colombia y una zona fronteriza Venezolana presentan un grado de estructura genética moderado.
- Se confirma la presencia de *R. prolixus* selvático en palmas de los Llanos Orientales de Colombia, y además se establece la capacidad de colonizar las viviendas humanas de estos insectos selváticos.
- Se establece un alto riesgo de transmisión con *T. cruzi* de las poblaciones humanas del departamento de Casanare, por el flujo continuo de las poblaciones selváticas de *R. prolixus* a las viviendas.
- Las poblaciones de *T. dimidiata* del departamento de Santander, Colombia presentan una estructura con un alto grado de diferenciación genética.
- Se establece un alto riesgo de transmisión con *T. cruzi* de las poblaciones humanas de los departamentos del municipio de Macaravita (Santander), por la existencia de flujo de las poblaciones selváticas de *T. dimidiata* a las viviendas.
- El diseño de nuevas y efectivas estrategias de control de la enfermedad de Chagas, que eviten la incursión de las poblaciones selváticas de *R. prolixus* y *T. dimidiata* al domicilio, es imperativo.

BIBLIOGRAFIA

Abad-Franch F, Monteiro FA. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cien* 2005; 77(3): 437-454.

Almeida CE, Pacheco RS, Haag K, Dupan S, Dotson EM, Costa J. Inferring from the cyt b gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(5): 791-802.

Anderson JM, Lai JE, Dotson EM, Cordon-Rosales C, Ponce C, Norris DE, Beard CB. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *Infect Genet Evol* 2002; 1: 243–248.

Angulo VM. Ensayo de estrategias y vigilancia de *Triatoma dimidiata*, en Colombia. En: Guhl F editor. Memorias Primer Taller internacional sobre control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Bogotá 2005a: 91-102.

Angulo VM, Luna KP, Vallejo GA, Dotson E, Esteban L. Estudio de la estructura poblacional de *R. prolixus* domiciliado en Colombia y la frontera Colombo-Venezolana para el monitoreo de los programas de control. Informe final. Colciencias, 2005b.

Angulo VM, Esteban L. *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) en palmas asociadas al domicilio humano en los llanos orientales de Colombia. I congreso Internacional Salud en el Trópico. 2005. Villavicencio, CD.

Angulo VM, Luna KP, Dotson E, Esteban L, Farfán AE. Estudio de las características ecológicas y genéticas de poblaciones silvestres y domiciliadas de *Triatoma dimidiata* en

Santander y sus implicaciones en el diseño de estrategias de control. Informe final. Colciencias, 2006.

Angulo VM, Luna KP, Vallejo GA, Dotson E, Esteban L. Determinación del estatus taxonómico de poblaciones de *Rhodnius spp.* presentes en domicilio, peridomicilio y palmas del Nor-Oriente Colombiano y sus implicaciones en la transmisión de *Trypanosoma cruzi*. Informe final. Colciencias, 2007.

Añez N, Crisante G, Rojas A. Update on Chagas disease in Venezuela- A review. Mem Ins Oswaldo Cruz 2004; 99(8) 781-787.

Apt W, Aguilera X, Arribada A, Gomez L, Miles MA, Widmer G. Epidemiology of Chagas disease in northern Chile: Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from domestic and sylvatic transmission cycles and their association with cardiopathy. Am J Trop Med Hyg 1987; 37: 302-307.

Avise JC. Phylogeography - The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA. 2000.

Bargues MD, Klisiowicz DR, Gonzalez-Candelas F, Ramsey JM, Monroy C, et al. Phylogeography and Genetic Variation of *Triatoma dimidiata*, the Main Chagas Disease Vector in Central America, and Its Position within the Genus *Triatoma*. PLoS Negl Trop Dis 2008; 2: e233. doi:10.1371/journal.pntd.0000233.

Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, Oconnor JE, Gonzalez F, Galvao C, Jurberg J, Carvallo RU, Dujardin JP, Mas-Coma S. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. Infect Genet Evol 2006; 6(1):46-62.

Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Scofield CJ, Mas Coma S. Triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi*: A molecular perspectiva based on nuclear ribosomal markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 1-6.

_____ Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2000; 95(4): 567-573.

Barker GC. Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (1) 21-24.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol* 1973; 27: 347-383.

Brenière SF, Carrasco R, Revollo S, Aparicio G, Desjeux P, Tibayrenc M. Chagas disease in Bolivia. Clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41(5): 521-529.

Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 111: 95-105.

Buscaglia CA, Di Noia JM. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes Infect* 2003; 5(5):419-27.

Bustamante DM, Monroy C, Menes M, Rodas A, Salazar-Schettino PM, et al. Metric variation among geographic populations of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *J Med Entomol* 2004; 41: 296–301.

Calderon CI, Dorn P, Melgar S, Chavez JJ, Rodas A, et al. A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. *J Med Entomol* 2004; 41: 882–887.

Calderon-Fernandez G, Juarez MP, Ramsey J, Salazar Schettino PM, Monroy MC, Ordonez, R, Cabrera M. Cuticular hydrocarbon variability among *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Mexico and Guatemala. *J. Med. Entomol* 2005; 42, 780–788.

Catalá S, Sachetto C, Moreno M, Rosales R, Salazar-Schetrino PM, et al. Antennal phenotype of *Triatoma dimidiata* populations and its relationship with species of phyllosoma and protracta complexes. *J Med Entomol* 2005; 42: 719–725.

Clement M, Posada D, Crandall KA. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 2000; 9 (10): 1657- 1660.

DeSalle R, Freeman T, Prager EM, Wilson AC. Tempo and mode of sequence variation in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J Mol Evol* 1987; 42: 1076–1084.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be Called “cruzi” Complex? A review of the parasite diversity and potential of selecting population after in vitro culture and mice infection. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2003; 98(1): 1 – 12.

Dias JCP, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 1999; 94:103-121.

_____ The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 1(4):373-83.

Dias JCP. Epidemiology of Chagas disease. In S Wendel, Z Brener, MS, Camargo, A Rassi (eds). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on Transfusional and Clinical Medicine. ISBT Brasil 92. São Paulo, 1992; 49-80.

Dorn PL, Melgar S, Rouzier V, Gutierrez A, Combe C, Rosales R, Rodas A, Kott S, Salvia D, Monroy CM. The Chagas vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. J Med Entomol 2003; 40, 436–440.

Dorn P, Monroy C, Curtis A. *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. Infect Genet Evol 2007; 7:343-352.

Dorn PL, Calderon C, Melgar S, Moguel B, Solorzano E, et al. Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3(3): e393. doi:10.1371/journal.pntd.0000393.

Dotson EM, Beard CB. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. Insect Mol Biol 2001; 10: 205–215.

Dujardin JP, Muñoz M, Chavez T, Ponce C, Moreno J, Schofield CJ. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. Med Vet Entomol 1998; 12:113–115.

Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F. Los vectores de la enfermedad de Chagas. Academie Royale desSciences d’Outre Mer, Brussels. 2002.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 1992; 131: 479–491.

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.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies : An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39 : 783-791.

Fernandez GC, Juarez GC, Monroy C, Menes M, Bustamante DM. Intraspecific variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Guatemala based on chemical and morphometric analyses. *J Med Entomol* 2005; 42: 29–35.

Fitzpatrick S, Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Monteiro FA, Miles MA. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(4): e210.

Galvao C, Carcavallo R, Da silva Rocha 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.

Gamboa CJ. Comprobación de *Rhoniuss prolixus* extradomiciliario en Venezuela. *Bol Of San Pan* 1963; 54: 18–25.

García AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Valente SAS, Frame IA, Stothard JR, Miles MA. Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 1998; 35: 38–45.

Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2000; 95(4): 557 – 65,

Giordano R, Pizarro JC, Paulk S, Stevens L. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. Mem Inst Oswaldo cruz 2005;100(7): 753-760.

Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ. Biosystematics of Old World Triatominae. Acta Trop. 1997; 63(2):127-140

Guhl F, Schofield CJ. Prioridades para el control vectorial en los países andinos: *Rhodnius prolixus* en Colombia y Venezuela, *Triatoma dimidiata* en Colombia y Ecuador, *Rhodnius ecuadoriensis* en Ecuador y Perú. En: Guhl F editor. Memorias Primer Taller internacional sobre control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Bogotá 2005; 245 – 252.

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(1):143-162.

Harry M, Poyet G, Romaña CA, Solignac M. Isolation and characterization of microsatellite markers in the bloodsucking bug *Rhodnius pallescens* (Heteroptera, Reduviidae). Mol Ecol 1998; 7 (12): 1784-6.

Hartl DL, Clark AG. Principles of Population Genetics, Fourth Edition Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 2005.

Hudson R, Boos D, Kaplan N. A statistical test for detecting population subdivision. Mol Biol Evol 1992; 9 : 138-151.

Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Santander Aspectos geográficos. 1984.

Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Mol Evol* 1991; 32: 128-144.

Jung J, Jung Y, Min GS, Kim W. Analysis of the population genetic structure of the malaria vector *Anopheles sinensis* in South Korea based on mitochondrial sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77(2):310-315.

Lehmann P, Ordoñez R, Ojeda-Baranda R, Mendez de Liria J, Hidalgo-Sosa L. Morphometric analysis of *Triatoma dimidiata* populations (Reduviidae: Triatominae) from Mexico and northern Guatemala. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 477–482.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 1979; 163:127-250.

Lent H, Jurberg J. Sobre a variação intra-específica em *Triatoma dimidiata* (Latreille) e *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst OswaldoCruz* 1985; 80: 285–299.

Lewinsohn R. Carlos Chagas (1879-1934): The discovery of *Trypanosoma cruzi* and of American Trypanosomiasis (foot notes to the history of Chagas disease). *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg* 1979; 73(5):513-552.

López DC, Jaramillo C, Guhl F. Population structure and genetic variability of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: reduviidae) from different geographic areas of Colombia. *Biomédica* 2007; 27 Suppl 1:28-39.

Loxdale HD, Lushai G. Molecular markers in entomology. *Bull Entomol Res* 1998; 88: 577–600.

Luquetti AO, Miles MA, Rassi A, de Rezende JM, de Souza AA, Pova MM, Rodríguez I. *Trypanosoma cruzi* zymodemes associated with acute and chronic Chagas disease in central Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 462- 470.

Lyman DF, Monteiro FA, Escalante A, Cordon C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 377-386.

Macedo M, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo cruz* 2004; 1: 1-12.

Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon E, Salazar PM, Abad- Franch F, et al. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol* 2001; 18(1):136-142.

Martinez FH, Villalobos GC, Cevallos AM, Torre Pde L, Lacleste JP. Taxonomic study of the Phyllosoma complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCytB sequences. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 41: 279–287.

Miles M, Pova M, Prata A, Cedillos RA, De Souza A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease?. *Lancet* 1981a; 8234: 1336-1340.

Miles MA, Souza AA, Pova M. Chagas disease in the Amazon basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belem, Pará State, Brazil. *J Med Entomol* 1981b; 18: 266 – 278.

Mirabello L, Conn JE. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity* 2006; 96(4):311-321.

Molina JA, Gualdrón LE, Brochero HL, Olano VA, Barrios D, Guhl F. Distribución e importancia Epidemiológica de las especies de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomédica* 2000; 23: 344-360.

Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Ins Oswaldo Cruz* 2003; 98(5): 577-591.

Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and Molecular Taxonomy of the *Rhodnius* derived from mitochondrial and nuclear sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 460-465.

Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius robustus*. *Mol Ecol* 2003; 12 (4): 997-1006.

Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 2004; 32: 46–56.

Nei M. Analysis of gene diversity in subdivides populations. *Proc Natl Acad Scie USA* 1973; 70(12) : 3321-3323.

Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press. New York. 1987.

Panzer F, Ferrandis I, Ramsey J, Ordonez R, Salazar-Schettino PM, et al. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with

different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Trop Med Int Health* 2006;11:1092–1103.

Pérez R, Panzera Y, Scafiezzo S, Mazzella MC, Panzera F, Dujardin JP, Scvortzoff E. Cytogenetics as a tool for triatomine species distinction (Hemiptera - Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87(3): 353–361.

Pfeiler E, Bitler BG, Ramsey JM, Palacios-Cardiel C, Markow TA. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Phylogenet Evol* 2006; 41: 209–221.

Posada D, Crandall KA. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* 2001; 16: 37-45.

Prata A. Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. *Lancet Infect Dis* 2001; 92- 100.

Ramirez CJ, Jaramillo CA, Delgado MP, Pinto N, Aguilera G, Guhl F. Genetic structure of sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from an endemic zone of Boyaca, Colombia. *Acta Trop* 2005; 93:23-9.

Rozas J, Sanchez-Delbarrio J, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 2003; 19: 2496-2497.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4 :406-425.

Sandoval CM, Joya MI, Gutierrez R, Angulo VM. Cleptohaematophagy of the triatomine bug *Belminus herreri*. *Med vet Entomol* 2000; 14: 100-101.

Schofield CJ (Editor). Sistemática y distribución de los triatominos. En: Triatominae. Biología y control. 1994.

Schofield, CJ. Propuestas de estrategias para el Control de *Triatoma dimidiata* en Colombia. En: Guhl F editor. Memorias Primer Taller internacional sobre control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes, Bogotá 2005; 52-59

_____ *Trypanosoma cruzi*- The vector- parasite paradox. Mem Inst Oswaldo cruz 2000; 95 (4):535-544.

_____ Chagas disease, triatomine bugs, and bloodloss. Lancet 1981;13: 1(8233):1316.

Schofield CJ, Dujardin JP. Theories on the evolution of *Rhodnius*. Actual Biol 1999; 70: 183-197.

_____ Chagas disease vector control in Central America. Parasitol Today 1997;13(4) 143-144.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase Chain Reaction primers. Ann Entomol Soc Am 1994; 87: 651–701.

Swofford, DI. PAUP 4.0 : Phylogenetic analysis using Parsimony. Version 4. Sinauer, Associates, Sunderland, MA. 1998.

Tamay-Segovia P, Alexandre-Aguilar R, Martínez F, Villalobos G, de la Serna FJ, de la Torre P, Laclette JP, Blum-Dominguez S, Espinoza B. Two *Triatoma dimidiata* clades (Chagas disease vector) associated with different habitats in southern Mexico and Central America. Am J Trop Med Hyg 2008; 78(3):472-478.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24: 1596-1599.

Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV, Ceron CR. Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz J Biol* 2006; 66: 703-708.

Templeton AR, Boerwinkle E, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 1987; 117: 343-351.

Templeton AR. *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. Wiley-Liss; 1 edition 2006.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(22):4673-80.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:115-119.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31: 472-481.

Venkatesan M, Westbrook CJ, Hauer MC, Rasgon JL. Evidence for a population expansion in the West Nile virus vector *Culex tarsalis*. *Mol Biol Evol* 2007; 24(5):1208-18.

WHO (World Health Organization), *Technical Report Series Control of Chagas disease*, ed, W.H.O. Publications, Geneva 2002.

Zeledón R, Montenegro VM, Zeledón O. Evidence of colonization of Man-made ecotopes by *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) in Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(5):659-660.

Zeledón R. Some historical facts and recent issues related to the presence of *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) (Hemiptera: Reduviidae) in Central America. Entomol Vect 2004; 11:233-246.

Zeledón R, Calvo N, Montenegro VM, Lorosa ES, Arévalo C. A survey on *Triatoma dimidiata* in an urban area of the province of Heredia, Costa Rica. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(6):607-612.