TESIS DE MAESTRÍA PEDECIBA

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD CROMOSÓMICA EN *TRIATOMA INFESTANS*, PRINCIPAL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL CONO SUR

Lic. MARÍA JOSÉ FERREIRO LLANES

Genética de Triatominos

Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias. UdeLaR

Orientador: Dr. Francisco Panzera

Coorientador: Dra. Yanina Panzera

Coorientador: Dr. Ruben Pérez

Montevideo, Uruguay

2011

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN……6

INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES……..9-32

I.ENFERMEDAD DE CHAGAS……...9

I.i.Generalidades……...9

I.ii.Ciclo de la enfermedad de Chagas: *Trypanosoma cruzi*, vectores y hospederos……..9

I.iii.Características clínicas de la enfermedad de Chagas…….....11

I.iv.Control y prevención de la enfermedad de Chagas……....12

I.iv.a.Estrategias generales de prevención y tratamiento…….....12

I.iv.b.Campañas nacionales de erradicación de los triatominos vectores…….....13

I.iv.c.Campañas regionales de erradicación de triatominos vectores……..…...13

II.CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS TRIATOMINOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS……...14

II.i.Taxonomía y evolución de los triatominos……..……14

II.ii.Ciclo de vida……15

II.iii.Hábitats y hábitos……...16

II.iv.Cromosomas holocéntricos……16

III.*TRIATOMA INFESTANS*, PRINCIPAL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL CONO SUR……19

III.i.Morfología……...20

III.ii.Complemento cromosómico……..20

III.iii.Distribución geográfica de *T. infestans*: efecto de la implementación de campaña de control vectorial……..21

II.iv.Origen de la especie, domesticación y dispersión……..21

III.v.Resistencia de poblaciones de *T. infestans* a insecticidas piretroides……25

IV.VARIABILIDAD EN *TRIATOMA INFESTANS*……26

IV.i.Fenotipo antenal, tamaño y forma de alas……..26

IV.ii.Variabilidad mitocondrial……..26

IV.iii.Polimorfismo de microsatélites……27

IV.iv.Variabilidad de secuencias ITS-1 e ITS-2 del ADNr……...28

IV.v.Variabilidad en el tamaño genómico…...…….……29

IV.vii.Variabilidad cromosómica. Contenido y distribución de la heterocromatina.....…29

V.IMPORTANCIA DE LA REALIZACIÓN DE NUEVOS ANÁLISIS CITOGENÉTICOS PARA EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE *T. INFESTANS*……32

OBJETIVOS…….……33

HIPÓTESIS DE TRABAJO…….……..33

MATERIALES y MÉTODOS……..34-48

I.MATERIALES…….……...……34

II.MÉTODOS……..……..37

II.i.Obtención de las preparaciones citológicas……....37

II.ii.Bandeo C……37

II.iii.Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sonda del ADNr 18s de *T. infestans*...38

Obtención de la sonda del ADNr 18S……38

1) Busqueda en la base de datos de los genes ribosomales y diseño de cebadores……...38

2) Extracción de ADN genómico de *T. infestans*……40

3) Amplificación por PCR y purificación del producto…….……41

4) Clonación del producto de amplificación……..……..…….42

5) Minipurificación del plásmido y obtención del fragmento TR800……43

Marcaje de la sonda TR800 con dUTP-Cy3 por Nick translation……43

FISH con la sonda marcada TR800……44

II.iv.Microscopía, procesamiento y análisis de los resultados del bandeo C……..46

II.v.Microscopía, procesamiento y análisis de los resultados del FISH……..48

RESULTADOS……49-66

I.CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA MEDIANTE BANDEO C……49

I.i.Resultados generales del análisis de poblaciones de *T. infestans* por bandeo……...49

Autosomas con regiones heterocromáticas. Bandas C terminales……....49

Autosomas Heterocromáticos. Bandas C intersticiales……51

Cromosomas sexuales heterocromáticos……52

Cromosomas supernumerarios……53

I.ii.Análisis de la variabilidad de pares autosómicos en poblaciones de *T. infestans*……54

I.iii.Análisis de la variabilidad de patrones cariotípicos en *T. infestans*……57

Patrones cariotípicos exclusivos de cada grupo de localidades……59

Patrones cariotípicos compartidos entre grupos de localidades……61

II.LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DEL ADNr 45S POR FISH……...62

II.i.Obtención y marcaje de la sonda TR800……..62

II.ii.Localización del ADNr 45S con la sonda TR800……...63

III.RESUMEN DE LOS PRINCIPALES RESULTADOS DE BANDEO C Y FISH……..66

DISCUSIÓN……67-81

I.VARIABILIDAD DE LA HETEROCROMATINA EN *T. INFESTANS*……70

Contenido de la heterocromatina autosómica y caracterización de grupos……70

Contenido de la heterocromatina en los cromosomas sexuales X……71

Contenido de la heterocromatina autosómica intersticial……72

Cromosomas B……72

*Variabilidad de pares autosómicos en función del contenido de heterocromatina*73

Variabilidad de patrones cariotípicos……74

II.VARIABILIDAD EN LA LOCALIZACIÓN DEL CLUSTER ADNr 45S EN *T.INFESTANS*……74

III.HIPÓTESIS SOBRE EL SURGIMIENTO DEL GRUPO INTERMEDIO……79

Hipótesis de origen del Grupo Intermedio a partir del Grupo Andino……79

Hipótesis de origen del Grupo Intermedio por contacto secundario y cruzamiento entre los grupos Andino y No-Andino……79

CONCLUSIONES…..……...82

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS…….85-97

ANEXO……..98-107

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. *Trypanosoma cruzi*……..…10

FIGURA 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*……..11

FIGURA 3. Características clínicas de la enfermedad de Chagas……..12

FIGURA 4. Ciclo de vida de los triatominos……..15

FIGURA 5. Hábitats de los triatominos……..16

FIGURA 6. Actividad cinética de los cromosomas holocéntricos...……..17

FIGURA 7. Segregación meiótica de los cromosomas sexuales en *T. infestans*....…….18

FIGURA 8. Macho adulto de *T. infestans*……...20

FIGURA 9. Cariotipo del macho adulto de *T. infestans*…….21

FIGURA 10. Distribución geográfica de *T. infestans* en la década de los 80……21

FIGURA 11. Posibles rutas de dispersión de *T. infestans*……...23

FIGURA 12. Patrón de coloración diferencial de Dark Morph (A) y *T. infestans* (B)…...25

FIGURA 13. Esquema de la estructura del ADNr 45S……...28

FIGURA 14. Patrones cromosómicos de los machos de *T. infestans*…….31

FIGURA 15. Localización geográfica de los sitios de muestreo……36

FIGURA 16. Secuencia de ADNr 18S de *T. infestans*……39

FIGURA 17. Clasificación cromosómica por bandas C……47

FIGURA 18. Clasificación por bandeo C de los grupos cromosómicos de *T. infestans*….50

FIGURA 19. Porcentaje de autosomas con y sin heterocromatina en *T. infestans*…….51

FIGURA 20. Bandas C autosómicas intersticiales (I) en *T. infestans*…….52

FIGURA 21. Cromosomas sexuales en *T. infestans*……...52

FIGURA 22. Cromosomas supernumerarios en *T. infestans*……..53

FIGURA 23. Esquema de las variantes de los pares autosómicos en *T. infestans*……..54

FIGURA 24. Variantes de los pares autosómicos del Grupo Andino……55

FIGURA 25. Variantes de los pares autosómicos en el Grupo Intermedio…….56

FIGURA 26. Variantes de pares los autosómicos en el Grupo No-Andino……56

FIGURA 27. Electroforesis del producto de amplificación por PCR…….62

FIGURA 28. Marcaje de la sonda TR800 con *Cy3*……62

FIGURA 29. Localización por FISH del ADNr 45S en *T. infestans* del Grupo Andino....63

FIGURA 30. Localización por FISH del ADNr 45S en el Grupo No-Andino……...64

FIGURA 31. Localización por FISH del ADNr 45S en el Grupo Intermedio…...……65

FIGURA 32. Localización geográfica de los grupos cromosómicos Andino, No-Andino e Intermedio.....68

FIGURA 33. Esquema de cruces entre individuos de los Grupos Andino y No-Andino...77

TABLA 1. Procedencia geográfica de los individuos analizados por bandeo C y FISH…35

TABLA 2. Mezcla de PCR……...……...……....41

TABLA 3. Programa del termociclador……...41

TABLA 4. Solución de hibridación…….45

TABLA 5. Resumen del análisis de las poblaciones de *T. infestans* por bandeo C……54

TABLAS 6 y 7. Variabilidad de los pares autosómicos en *T. infestans*…….....54 y 57

TABLA 8. Variabilidad de los patrones cariotípicos en *T. infestans*…….....58

TABLA 9. Patrones cariotípicos exclusivos de cada grupo……60

TABLA 10. Patrones cariotípicos compartidos entre grupos……..61

TABLA 11. Resumen de las características citogenéticas de los grupos cromosómicos en *T infestans*……66

RESUMEN

A más de cien años de su descubrimiento en 1909, la Enfermedad de Chagas continúa representando un grave problema para la salud pública. Si bien se han realizado grandes esfuerzos para intentar controlar y/o erradicar esta enfermedad en nuestro continente, factores como la dificultad de diagnóstico y la ausencia de terapias o vacunas preventivas eficaces, han imposibilitado cumplir estos objetivos. Igualmente, cabe destacar, que en estos cien años se han logrado grandes avances en cuanto al conocimiento y prevención de la enfermedad, gracias al estudio de su agente etiológico, el *Trypanosoma cruzi*, y de sus vectores, los triatominos.

Los triatominos son insectos hemípteros hematófagos conocidos popularmente en nuestro país como "vinchucas". Hoy se reconocen 140 especies de triatominos, siendo *Triatoma infestans* uno de los principales vectores de la Enfermedad de Chagas en el Cono Sur. Esta especie está altamente adaptada al ambiente doméstico y peridoméstico, aunque también se encuentra en el ambiente silvestre. El estudio conjunto de la biología, ecología y estructura genética de sus poblaciones, combinado con el tratamiento con insecticidas piretroides, ha contribuido enormemente a interrumpir la transmisión de la Enfermedad de Chagas en varios países como Uruguay (en 1997), Chile (en 1999), Brasil (en 2006) y ciertas regiones de Paraguay y Argentina.

Triatoma infestans presenta gran variabilidad intraespecífica, revelada por diversos análisis fenotípicos y genotípicos. Un ejemplo de esta variabilidad, son las diferencias poblacionales en el contenido de heterocromatina constitutiva y en el tamaño genómico, descritas por Panzera y cols. en 2004. Estos autores definieron dos grupos cromosómicos alopátricos denominados "Andino" (poblaciones andinas de Bolivia y Perú) y "No-Andino" (poblaciones de Argentina, Paraguay, Brasil, Uruguay y Chaco boliviano). El Grupo Andino presenta bloques C heterocromáticos en 14-20 autosomas, mientras que el Grupo No-Andino sólo los presenta en 4-7 de sus autosomas. El Grupo Andino presenta mayor tamaño genómico (35 % más ADN) que el Grupo No-Andino. La existencia de estos dos grupos fue confirmada por diversos análisis moleculares con secuencias nucleares y mitocondriales.

La gran variabilidad encontrada entre poblaciones de *T. infestans* podría estar asociada a distintas capacidades de dispersión, de domesticidad e incluso vectoriales. Esta variabilidad también podría ser responsable del mantenimiento de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en países como Argentina, Bolivia, Paraguay y Perú. La implementación de estrategias más efectivas de control del Chagas, requiere de una

profundización y desarrollo de nuevos estudios de la variabilidad genética de *T. infestans*, lo que da surgimiento a esta tesis de Maestría.

En este trabajo de tesis, se profundizó en el estudio de los principales cambios cariológicos ocurridos durante la dispersión de *T. infestans* a través del Cono Sur, mediante el empleo de diferentes marcadores cromosómicos.

Se analizó por bandeo C la cantidad y distribución de heterocromatina constitutiva en nuevos especímenes de *T. infestans* provenientes de poblaciones andinas (Bolivia y Perú) y no andinas (Argentina y Paraguay). La mayoría de los individuos analizados pudieron clasificarse dentro de los grupos cromosómicos Andino y No-Andino, revelando una mayor distribución geográfica de la previamente descrita. Otros individuos, sin embargo, presentaron una cantidad intermedia de heterocromatina C, definiendo un nuevo grupo cromosómico al que denominamos Grupo Intermedio. El Grupo Intermedio se distribuye en la región norte de Argentina (Provincia de Salta) y sur de Bolivia (Departamento de Tarija). Esta región ha cobrado gran relevancia epidemiológica debido al reciente surgimiento de poblaciones resistentes a insecticidas piretroides.

Adicionalmente, se implementó un nuevo abordaje metodológico: el análisis de la localización cromosómica del ADN ribosómico (ADNr 45S) mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Para ello, diseñamos una sonda a partir de la secuencia del ADNr 18S de *T. infestans* publicada en el GenBank. El análisis de individuos de diversas poblaciones de *T. infestans* pertenecientes a los tres grupos cromosómicos reveló una llamativa variabilidad en la localización del cluster ribosomal 45S. En el Grupo Andino, el ADNr 45S se localiza en el par autosómico *III*, mientras que en el Grupo No-Andino se ubica en el cromosoma sexual X. En el Grupo Intermedio, el 50 % de los individuos analizados presenta un patrón de localización del ADNr 45S igual al Grupo No-Andino, es decir, en el cromosoma sexual X. El otro 50 % presenta la señal en uno de los cromosomas homólogos del par autosómico *III* y en el cromosoma sexual X.

Nuestros resultados evidencian que la dispersión de *T. infestans* a través de nuestro continente, desde regiones andinas a no andinas, no solo involucró reducción en el contenido de heterocromatina y el tamaño genómico, sino también reordenamientos genómicos de genes repetidos esenciales como los del ADNr 45S.

El hallazgo de un nuevo grupo cromosómico: el Grupo Intermedio, nos perimitió plantear dos posibles hipótesis acerca del origen, dispersión y evolución de *T. infestans*. Ambas hipótesis plantean el origen andino de la especie. La primera hipótesis supone que el

Grupo Intermedio se originó del Grupo Andino y posteriormente dió origen al Grupo No-Andino. La segunda hipótesis plantea que el Grupo Intermedio se originó recientemente por contacto secundario y cruzamiento entre individuos de los grupos Andino y No-Andino (originado previamente a partir del Grupo Andino). Los argumentos a favor o en contra de estas hipótesis son discutidos en esta tesis.

INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

I. ENFERMEDAD DE CHAGAS

I.i. Generalidades

La enfermedad de Chagas o *Trypanosomiasis americana* es una enfermedad parasitaria exclusiva del continente americano. Su agente patógeno, el protozoario *Trypanosoma cruzi*, es transmitido a la sangre de sus hospederos finales (generalmente vertebrados de sangre caliente, entre los que se incluye el hombre), a través de vectores. Estos vectores, son insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, conocidos vulgarmente como "vinchucas". *Triatoma infestans* (Klug, 1834), es la especie de triatomino considerada principal vector de la enfermedad en el Cono Sur, siendo responsable de más del 60 % de los casos registrados (Moncayo, 2003).

La *Trypanosomiasis americana* fue descrita por primera vez por el Dr. Carlos R. J. Chagas en 1909, cuando trabajaba en el Instituto hoy llamado Oswaldo Cruz en Rio de Janeiro. En 1910, la Academia Nacional de Medicina de Brasil pasó a denominarla "Enfermedad de Chagas" en su honor. Los tres períodos anátomo-clínicos de la enfermedad fueron definidos en 1940 por el Dr. Salvador Mazza y colaboradores en Argentina. En Uruguay, la primera evidencia de la enfermedad se publicó en 1923 por el Dr. Angel Gaminara, y en 1940, Rodolfo Talice caracterizó su epidemiología.

En 1993, la enfermedad de Chagas era considerada por la OMS y el Banco Mundial como la cuarta enfermedad transmisible con mayor impacto sobre la salud pública de las Américas, con unas 20 millones de personas infectadas y 100 millones expuestas. Si bien diversas iniciativas regionales implementadas a partir de la decáda de los 90, lograron la reducción del número de infectados a unos 9 millones, esta enfermedad es todavía una de las principales causas de trastornos cardíacos en la región, provocando cerca de 50.000 muertes por año (Schmunis, 2000; Schofield et al., 2006). Actualmente se estima que continuará siendo un problema sanitario en Latinoamérica durante los próximos 30 años.

I.ii. Ciclo de la enfermedad de Chagas: *Trypanosoma cruzi*, vectores y hospederos

Como se mencionó anteriormente, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozoario parásito intracelular *Trypanosoma cruzi* (Figura 1), denominado así por el Dr.

Chagas en honor a su mentor, el Dr. Oswaldo Cruz. El parásito *T. cruzi* pertenece a la superclase Mastigophora, orden Kinetoplastida, familia Tripanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero Schizotrypanum, sección Stercolaria. Se caracteriza por presentar tripomastigotas de 12 a 20 µm en forma de "c", con un cinetoplasto voluminoso cerca de la extremidad posterior del cuerpo, corta y puntiaguda.

FIGURA 1. ***Trypanosoma cruzi*.** Formas tripomastigotas.

El ciclo de vida de *T. cruzi* y por tanto el ciclo de la enfermedad de Chagas, alterna entre los vectores invertebrados (insectos triatominos) y sus huéspedes (vertebrados) (Figura 2). Entre los vertebrados se encuentran más de 180 especies de mamíferos (domésticas y silvestres). Los marsupiales y los Xenarthra (ej: mulita y tatú) son considerados los hospederos de *T. cruzi* más primitivos (Noireau et al., 2009). Los huéspedes carnívoros (ej: coatís, mapaches y zorros grises), los roedores salvajes y las especies domésticas (ej: perros, gatos y cerdos) son actualmente muy importantes en la transmisión de la enfermedad (Flynn et al., 1998; Hancock et al., 2005; Rosypal et al., 2007). Las aves son refractarias al parásito debido al efecto lítico de su sangre (Kierszenbaum et al., 1981), pero podrían tener un rol indirecto en su mantenimiento dado que constituyen alimento para los triatominos vectores. Se cree que los humanos fueron incluídos en el ciclo de transmisión de *T. cruzi* antes del año 500 AC (Rothhammer et al., 1985). Existen reportes paleontológicos de momias preincaicas peruanas y chilenas de unos 4000 años de edad y de cazadores y nómades de Brasil de unos 9000 años, que presentan infección con *T. cruzi* (Guhl et al., 1999; Aufderheide et al., 2004).

El ciclo de la enfermedad de Chagas comienza en los insectos triatominos vectores, con la ingestión de estadíos tripomastigotas del parásito *T. cruzi*, presentes en la sangre de huéspedes vertebrados infectados. Posteriormente, los tripomastigotas se convierten a estadíos epimastigotas en el intestino medio del insecto. Luego, se multiplican y finalmente se convierten en tripomastigotas metacíclicos infectivos en la porción terminal del intestino del insecto. En los vertebrados, la infección por *T. cruzi* se inicia en las capas dérmicas o mucosa conjuntiva, por estadíos tripomastigotas metacíclicos infectivos. Estos se transmiten

principalmente por excreciones del triatomino hematófago, transformándose en formas amastigotas con capacidad de multiplicarse por división binaria en unos cinco días. Posteriormente, se diferencian a formas tripomastigotas que son liberadas por la célula del hospedero al espacio intercelular y llegan al torrente sanguíneo. Una vez allí invaden las células de cualquier tejido y establecen focos en los órganos del huésped. El ciclo se reinicia en las células del retículo endotelial donde los tripomastigotas se transforman en amastigotas dando nuevos focos secundarios y generalizados.

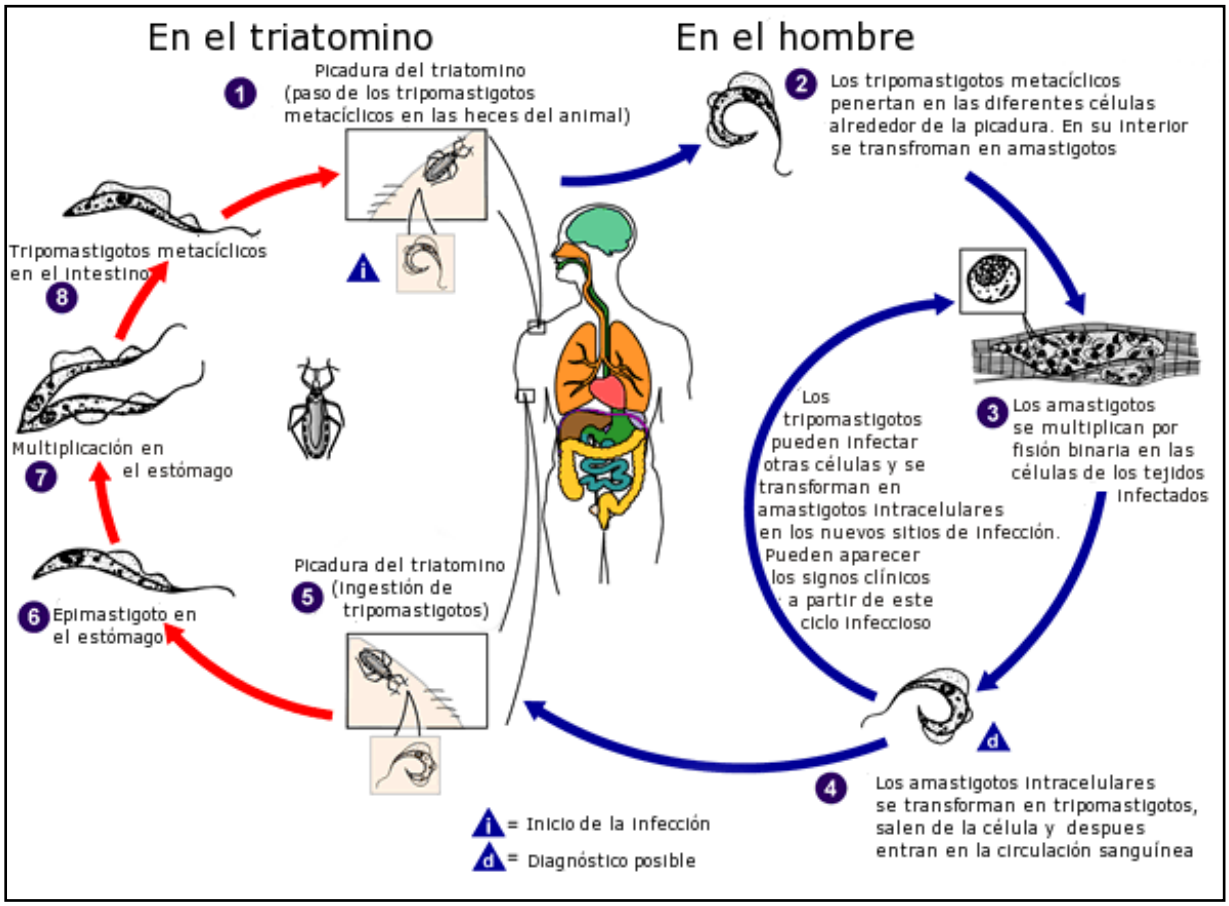

FIGURA 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Imagen obtenida de Noireau y cols. (2009).

Si bien la principal forma de transmisión del parásito *T. cruzi* es la vectorial (80 %), existen otros modos de infección menos frecuentes como el transfusional (16 %), materno-fetal (3 %), por ingestión oral (Yoshida, 2008) y por transplante de órganos (1 %).

I.iii. Características clínicas de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, una vez establecida, presenta un cuadro clínico variable (Figura 3). La fase inicial o aguda dura 1 ó 2 meses, y se caracteriza por la presencia del parásito *T. cruzi* en el torrente sanguíneo del huésped (detectado por ensayos parasitológicos,

hemocultivo, PCR, análisis serológico o anticuerpos específicos). Esta etapa inicial puede ser sintomática (fiebre, signo de Romaña, miocarditis y meningocefalitis, edema en la zona de la picadura) o asintomática, siendo letal en más de un 10 % de los casos (Coura, 2003). La fase crónica, denominada forma indeterminada, comienza cuando el parásito sale de la circulación e invade las células del organismo, en particular las musculares cardíacas y lisas. Esta etapa crónica tiene un período de latencia de unos 10-15 años, afectando a órganos musculares huecos como corazón e intestino, que se deforman generando adenopatía, hepatomegalia y esplenomegalia entre otros (Coura, 2003). El daño generado en los órganos infectados lleva por ejemplo al desarrollo de síntomas cardíacos (ej: taquicardia) en 27 % de los casos, síntomas digestivos (ej: desórdenes de motilidad, secreción y absorción especialmente en esófago y colon) en 20 % de los infectados, o desórdenes neurológicos en un 3 % (WHO, 2006).

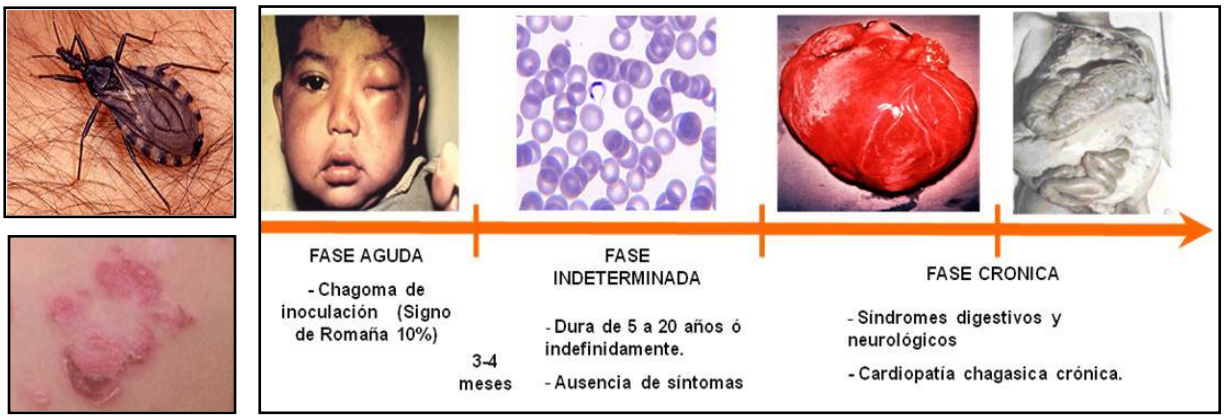

FIGURA 3. Características clínicas de la enfermedad de Chagas.

I.iv. Control y prevención de la enfermedad de Chagas

I.iv.a. Estrategias generales de prevención y tratamiento

En ausencia de vacunas y tratamientos preventivos de eficacia suficiente, las estrategias para combatir la enfermedad de Chagas se centran en el estudio del genoma y el proteoma del parásito *T. cruzi* y de sus vías metabólicas (Brener y Gazzinelli, 1997; Tarleton, 2001). Gracias a estos estudios se están ensayando nuevas drogas de posible acción tripanocida (ej: inhibidores de enzimas) y vacunas de ADN (Urbina, 2007). Otra estrategia se basa en la erradicación de los triatominos vectores domésticos y peridomésticos mediante el rociado de las casas con insecticidas piretroides. Estas sustancias se unen a receptores de los canales de sodio impidiendo la transmisión del impulso nervioso, lo que provoca la muerte del insecto (Stenersen, 2004). El éxito en la aplicación de insecticidas es favorecido por

características biológicas del insecto vector tales como reproducción lenta, poca movilidad, generaciones largas y estadíos de vida coexistentes en el mismo ambiente.

I.iv.b. Campañas nacionales de erradicación de los triatominos vectores

En Uruguay, el combate químico vectorial contra la enfermedad de Chagas se inició por Osimani, Verissimo y Bayceé-Carbonel en 1949. En 1972, se creó la "Organización de Lucha contra la Enfermedad de Chagas", bajo la dirección de Veríssimo y se implementó la campaña de control nacional de vectores. Esta campaña fue interrumpida por la dictadura militar y posteriormente retomada en 1983. En ese año, se realizó un relevamiento entomológico por departamento y se retomó el rociado químico de los sitios infestados. En 1985, la "Encuesta Seroepidemiológica Nacional de Enfermedad de Chagas" estimó alrededor de 37.000 personas infectadas con *T. cruzi* y una seroprevalencia de 1,3 % en todo el país. En ese mismo año se logró la completa eliminación de *T. infestans* en el Departamento de Artigas y seis años después en Soriano. A partir de 1991, ya en el marco de iniciativas regionales coordinadas, se logró la eliminación del vector en otros departamentos: Cerro Largo (1993), Río Negro (1994), Paysandú (1995), Florida (1996) y Salto (1997). En 1997, se realizó una nueva encuesta serológica decretando la interrupción de la transmisión vectorial y transfusional en nuestro país, siendo el primer país de Latinoamérica en lograr estos objetivos (OPS, 2009). Actualmente solo se reportan hallazgos de muy pocos ejemplares de *T. infestans* peridomiciliario en los Departamentos de Colonia y Tacuarembó.

I.iv.c. Campañas regionales de erradicación de los triatominos vectores

En 1991 comienza la denominada "Iniciativa del Cono Sur" (INCOSUR) en los siete países de Sudamérica donde se distribuía *T. infestans* (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay). Los objetivos principales fueron lograr la eliminación de *T. infestans* de las viviendas y peridomicilios, así como interrumpir la transmisión transfusional. Posteriormente en 1995, se constituyó una red denominada ECLAT (*Latin American Network for Research on the Biology and Control of Triatominae*), conformada por laboratorios de diferentes partes del mundo, encargados de estudiar los triatominos vectores (principalmente *T. infestans*) desde diversos enfoques. Estos enfoques incluían análisis morfométricos, isoenzimáticos, citogenéticos y moleculares. Ambas iniciativas lograron generar un mayor conocimiento de la biología y la ecología de *T. infestans*, contribuyendo a la interrupción de la transmisión vectorial en Uruguay (1997), Chile (1999), Brasil (2006), en algunas provincias

de Argentina (Jujuy, Neuquén, Río Negro, La Pampa, Entre Ríos) y en el Departamento de Amambay en Paraguay (Schmunis et al., 1996; Schofield y Dias, 1999; Schofield et al., 2006). En Bolivia, a pesar de los esfuerzos realizados, la prevalencia de la enfermedad de Chagas es una de las más altas de Sudamérica (Valencia, 1990; Guillén, 2002). El 55 % del territorio boliviano es endémico para la enfermedad, estimándose unos 1.8 millones de personas infectadas y unos 3.5 millones en riesgo de infección (SNS, 1994; WHO, 2002).

II. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS TRIATOMINOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

II.i.Taxonomía, distribución y origen de los triatominos

Los triatominos son insectos hematófagos del orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae. Se distribuyen principalmente por las Américas, desde los Grandes Lagos de EEUU (paralelo 40 de latitud norte) hasta el sur de Argentina (paralelo 46 de latitud sur), encontrándose asociados a una gran variedad de hábitats naturales y domésticos. La primera especie de triatomino fue descripta por De Geer en 1773, pero el primer informe corresponde a Fray Ferdinando de Lizarraga en 1590 durante sus visitas a conventos en Perú y Chile. Otros diversos personajes describieron a lo largo de la historia la presencia de vinchucas en Sudamérica. Entre ellos Charles Darwin durante su viaje del Beagle en 1835.

La clasificación de la subfamilia Triatominae se ha construído fundamentalmente en base a diversos caracteres morfológicos (Lent y Wygodzinsky, 1979). Dentro de la subfamilia hoy se reconocen 140 especies agrupadas en 5 tribus y 15 géneros (Schofield y Galvão, 2009). El género *Triatoma* (Laporte, 1832) es el más numeroso y está conformado por 80 especies, divididas en 3 grandes grupos: Rubrofasciata, Dispar e Infestans, que a su vez se subdividen en complejos y subcomplejos. La especie objeto de esta tesis, *Triatoma infestans*, está incluida en el Grupo Infestans, complejo infestans, subcomplejo infestans, junto con *Triatoma platensis* y *Triatoma delpontei*.

Si bien existe acuerdo en la clasificación de la subfamilia Triatominae, su origen es aún objeto de debate. Usinger (1944), basado en el hábito común de hematofagia, concluye que la subfamilia es un grupo monofilético. Lent y Wygodzinsky (1979) sugieren que la subfamilia evolucionó como grupo monofilético a partir de una subfamilia cercana de hematófagos facultativos llamada *Physoderinae*. Schofield (1988) propone un origen

polifilético, argumentando que la adaptación a la hematofagia habría surgido en varias formas predadoras, primero como formas libres, luego como hematófagos facultativos para llegar hasta los hematófagos obligatorios especializados, convergiendo por su adaptación a la hematofagia. El origen polifilético de la subfamilia es respaldado por análisis de morfometría (Gorla et al., 1997) y genes ribosomales del ADN mitocondrial (De Paula et al., 2005). Esta última hipótesis explica mejor la extensa distribución geográfica de la subfamilia y su asociación con una gran diversidad de huéspedes.

II.ii. Ciclo de vida

Los triatominos son exopterigotas hemimetábolos presentando tres fases: huevo, 5 estadios de ninfa y el imago o adulto (Figura 4). La duración del ciclo de vida depende de la densidad poblacional, que determina el grado de competencia por el alimento. Por ejemplo, *T. infestans* necesita unos 180-220 días para completar una generación.

El cambio entre los estadíos ninfales ocurre por muda del exoesqueleto, lo que permite el crecimiento del insecto y es dependiente del estado de desarrollo, temperatura y alimento disponible. La última muda provoca la metamorfosis de la ninfa a adulto, lo que ocurre más tempranamente en las hembras y está marcado por la salida de las alas (Buxton, 1930; Lent, 1948; Wigglesworth, 1972; Azambuja, 1985).

Los adultos viven en promedio de 8 a 16 meses. Las hembras pueden ser fecundadas poco después de la última muda y ponen unos 80-100 huevos por postura (incluso un año luego de la copulación). Los huevos eclosionan entre los 10-40 días posteriores a su puesta. Generalmente los insectos se vuelven más suceptibles a adquirir la infección por *T. cruzi* a partir del tercer estadio ninfal.

FIGURA 4. Ciclo de vida de los triatominos. La imagen esquematiza el ciclo de *Triatoma infestans*.

II.iii. Hábitats y hábitos

Los triatominos se encuentran tanto en ambientes naturales (rocas, nidos, cuevas, huecos de árboles) como domésticos y peridomésticos (gallineros, corrales, galpones), prefiriendo anidar en techos, grietas de muros y colchones, cercanos a fuentes de alimento (Figura 5). Existen diversas condiciones que permiten la adaptación de una especie de triatomino al ambiente humano. Ellas dependen del insecto (fisiología, duración del ciclo de vida), del hombre (sanidad, educación, tipos de vivienda), y del medio ambiente (clima, predadores, oferta alimentaria).

En general, los triatominos se dispersan activamente tanto caminando como por el vuelo atraídos por fuentes de luz. En estas especies, la dispersión pasiva por el hombre es tal vez el componente más importante en su dispersión geográfica. Permanecen inmóviles durante el día (ataxia) y salen de su escondite de noche, dirigiéndose hacia los humanos que están durmiendo y otros animales de sangre caliente, guiados por feromonas y por sensores de calor en sus antenas. Se alimentan de la sangre de sus huéspedes, generalmente una vez cada 4-9 días, pudiendo permanecer en ayuno durante largos períodos (ej: *T. infestans* puede ayunar hasta 9 meses). Luego de alimentarse, su abdomen crece por movimientos peristálticos, provocando la defecación del insecto. El *T. cruzi* que se encuentra en la materia fecal del insecto, puede ingresar por las heridas asociadas a la picadura.

FIGURA 5. Hábitats de los triatominos. Los triatominos habitan tanto en ambientes naturales (rocas, nidos, cuevas, huecos de árboles) como domésticos y peridomésticos (gallineros, corrales, galpones), prefiriendo anidar en techos, grietas de muros, colchones, cercanos a fuentes de alimento.

II.iv. Cromosomas holocéntricos

Los triatominos son interesantes por su importancia médica y desde el punto de vista citogenético, ya que poseen cromosomas sin centrómero localizado, denominados cromosomas holocéntricos. Este tipo de cromosoma no es exclusivo de los triatominos sino que está presente en diversos grupos eucariotas tales como otros insectos (lepidópteros,

hemípteros, dermápteros, odonatos), nemátodos, algunos arácnidos, plantas monocotiledóneas (familias Juncaceae y Cyperaceae), y en un grupo de algas verdes (por revisiones ver Pimpinelli y Goday, 1989; Mola y Papeschi, 2006).

Los cromosomas holocéntricos de triatominos poseen una organización cinética particular que genera diferencias en su comportamiento en mitosis y meiosis. En mitosis, las fibras del huso se unen a los cromosomas por un cinetocoro trilaminar ubicado en la superficie de toda la cromátida (Buck, 1967; Comings y Okada, 1972), resultando en la segregación paralela de cromátidas hermanas (movimiento holocinético) en anafase mitótica (Hughes-Schrader y Schrader, 1961). En meiosis, los microtúbulos se anclan directamente a la cromatina sin una estructura cinetocórica definida (Buck, 1967). La actividad cinética se restringe a las regiones teloméricas y el cromosoma se comporta como telocinético (Motzko y Ruthmann, 1984). En la meiosis I, uno de los extremos cromosómicos adquiere actividad cinética al azar, inactivándose posteriormente en la meiosis II, donde se activa el otro extremo cromosómico que no poseía actividad cinética en la primera división meiótica (Figura 6). Esto se denomina reversión de la actividad cinética (Nokkala, 1985). Debido a que ambos extremos de la cromátida puede mostrar actividad cinética, un bivalente puede tener diferentes orientaciones en la metafase I (Figura 6) (Pérez et al., 1997; 2000).

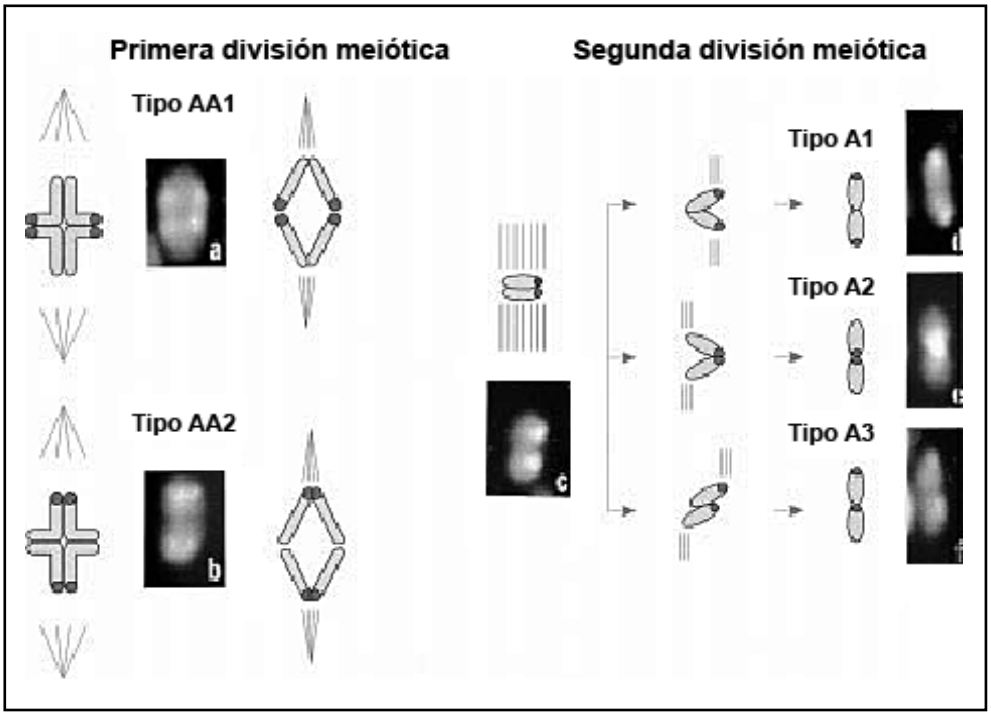

FIGURA 6. Actividad cinética de los cromosomas holocéntricos. Esquema de la segregación meiótica de los autosomas en triatominos. Imagen obtenida de Pérez y cols. (2000).

Los cromosomas sexuales de triatominos se comportan de manera diferente a los autosomas ya que no se aparean y permanecen como univalentes durante la primera división meiótica (Solari, 1979), (Figura 7). En la metafase I, los univalentes sexuales se disponen cercanos en la placa ecuatorial sin ninguna conexión física visible (asociación "a distancia") en el centro de un anillo formado por los bivalentes autosómicos (Ueshima, 1979). En anafase I, sus cromátidas hermanas segregan hacia los polos (segregación ecuacional). En metafase II, las cromátidas de los cromosomas X e Y aparecen asociadas por sus extremos (apareamiento "touch-and-go") formando un pseudobivalente en el centro del anillo de autosomas. En anafase II, estas cromátidas segregan hacia polos opuestos (segregación reduccional). Esta reversión en el orden de segregación de los cromosomas sexuales se denomina meiosis invertida o segregación post-reduccional (Hughes-Schrader y Schrader, 1961).

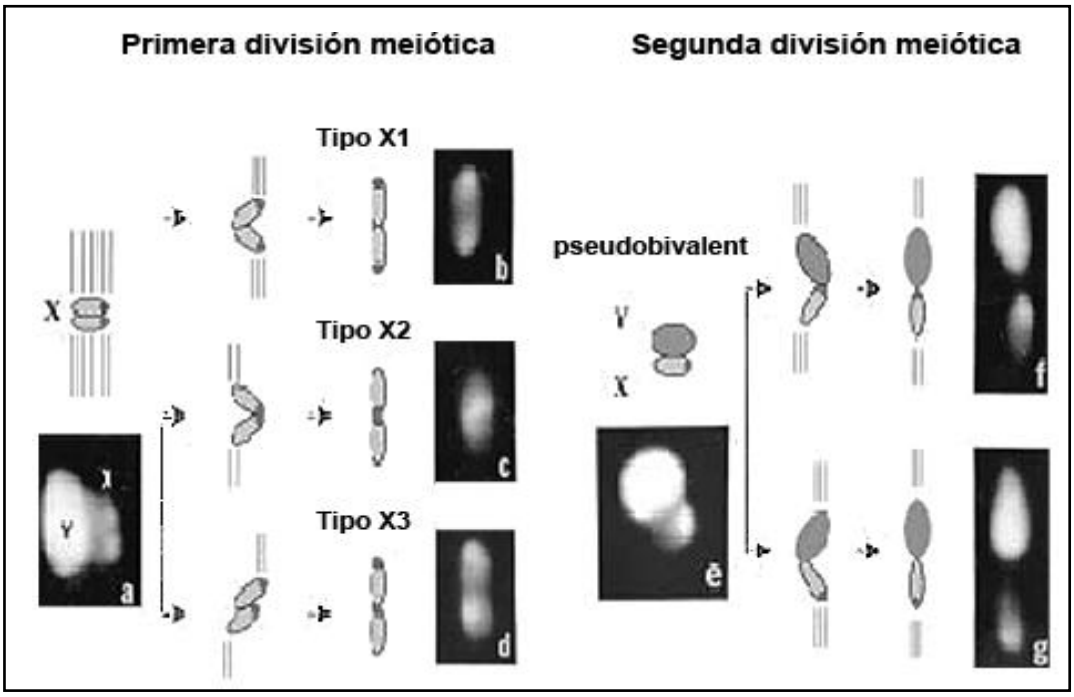

FIGURA 7. Segregación meiótica de cromosomas sexuales de triatominos. (Pérez et al., 2000).

Los sistemas con cromosomas holocéntricos poseerían una fuente de variabilidad y evolución cariotípica adicional a los sistemas con centrómero localizado, pues permiten la formación de cromosomas nuevos a partir de fragmentos originados en las divisiones celulares (Ueshima, 1979). Esto no es posible en sistemas de cromosomas con centrómero localizado, ya que los fragmentos acéntricos se pierden durante las divisiones celulares (White, 1973; Thomas, 1987). Los cromosomas holocéntricos, como poseen actividad cinética en toda su longitud, permiten que los fragmentos generados segregen regularmente. Papeschi (1994) propone que la fragmentación puede ser también resultado de la presencia de

secuencias teloméricas en posiciones intersticiales del cromosoma, lo que explicaría la rotura y la ganancia de nuevos telómeros funcionales en este proceso.

La ausencia de constricción primaria y la escasa diferenciación longitudinal dificultan el estudio de los cromosomas holocéntricos de triatominos. Una de las pocas técnicas citogenéticas clásicas que permite revelar, en algunos casos, una diferenciación longitudinal en los cromosomas holocéntricos, es la técnica de bandeo C. Esta técnica, desarrollada por Arrighi y Hsu en 1971, revela las regiones de heterocromatina constitutiva, conformada principalmente por regiones de ADN altamente repetidas. En los triatominos, este técnica ha resultado de gran utilidad para la caracterización y diferenciación de especies, y para detectar diferencias poblacionales en algunas especies, tales como *T. infestans* (Panzera et al., 1992; 2004).

El mapeo físico de genes por FISH representa una forma alternativa de obtener marcadores cromosómicos, principalmente en especies con cromosomas extremadamente uniformes como los triatominos. La técnica de FISH aporta además información acerca de la organización genómica, evolución y taxonomía de las especies. Su aplicación más común es el análisis de la localización cromosómica de las familias de ADNr.

Existen algunos antecedentes de estudios de la localización de genes ribosomales por FISH en Triatominae. Severi-Aguiar y cols. (2005, 2006), Morielle-Souza y cols. (2007) y Bardella y cols. (2010) analizaron por FISH, con sonda de ADNr 45S de *Drosophila melanogaster*, la distribución de este cluster ribosomal en diez especies de triatominos, entre ellas *T. infestans*, concluyendo que en Triatominae, la localización del cluster de ADNr 45S es un carácter específico de especie.

III. *TRIATOMA INFESTANS*, PRINCIPAL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL CONO SUR

Triatoma infestans es una de las especies de triatominos más adaptadas al ambiente doméstico y peridoméstico (Dujardin et al., 2002), razón por la cual se la asocia a más de la mitad de los casos de infección vectorial con *T. cruzi*. Estos hábitats preferenciales de la especie, si bien aumentan el riesgo de infección humana, han contribuído enormemente a frenar la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en gran parte de nuestro continente. Esto se debe al rociado preferencial de estas áreas localizadas de domicilio y peridomicilio con insecticidas piretroides. Sin embargo, recientemente se han registrado

divesos focos silvestres en Bolivia, Argentina, Paraguay y Chile (Dujardin et al., 1987; Noireau et al., 1997; 2000; 2005; Ceballos et al., 2009; Noireau, 2009; Bacigalupo et al., 2010). Estos focos silvestres pueden ser potenciales fuentes de re-infección de las áreas de domicilio y peridomicilio previamente controladas por rociado con el insecticida. La reciente aparición de poblaciones resistentes a piretroides en el norte de Argentina y sur de Bolivia (Cecere et al., 2004; Gürtler et al., 2004; Picollo et al., 2005; Cecere et al., 2006; Toloza et al., 2008) es otro factor que hace peligrar los logros hasta ahora obtenidos en la erradicación de *T. infestans*. Esto vuelve necesaria la reformulación de las campañas de control vectorial, para lo que es fundamental analizar el componente genético de la resistencia en la especie.

III.i. Morfología

Triatoma infestans mide unos 2.5 cm de largo, siendo los machos más grandes que las hembras. Su color de base es negro, presentando bandas de color amarillo-naranja en los trocánteres y en la base del fémur sobre los tres pares de patas. Se caracterizan por la presencia de alas finas y transparentes que cubren todo el abdomen en el adulto, rostro recto largo, probóscide cubierta de un anestésico y anticoagulante y antenas (Figura 8). Las alas son poco eficientes para el vuelo pero le sirven para dejarse caer sobre el huésped para alimentarse, y para el momento de la cópula.

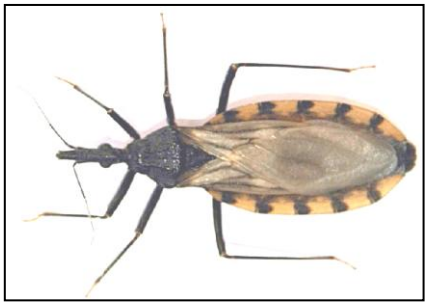

FIGURA 8. Macho adulto de *T. infestans.*

III.ii. Complemento cromosómico

El complemento cromosómico de *T. infestans* consta de 20 autosomas y un par de cromosomas sexuales (XX en hembras y XY en machos) (Schreiber y Pellegrino, 1950; Ueshima, 1979). Los tres primeros pares de autosomas (*I* a *III*) se denominan pares mayores, y son fácilmente distinguibles del resto por su mayor tamaño, con métodos de tinción convencional como la orceína acético láctica o el Giemsa. Los siete pares de autosomas restantes se diferencian levemente por su tamaño, haciendo muchas veces imposible distinguirlos entre sí. La Figura 9 corresponde al cariotipo de un macho de *T. infestans* (2n=20A+XY) obtenido por tinción convencional con orceína acético láctica.

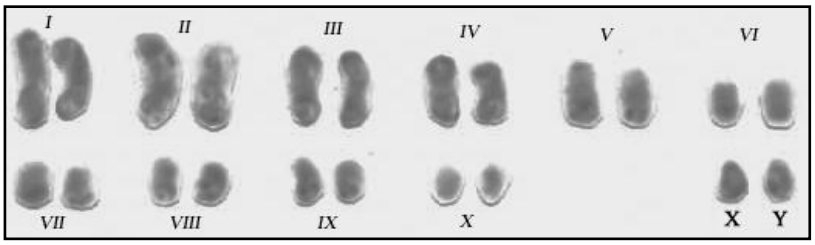

FIGURA 9. **Cariotipo de macho adulto de *T. infestans*.** 2n= 22 (20 autosomas + XY).

III.iii. Distribución geográfica de *T. infestans*: efecto de la implementación de campañas de control vectorial

En la década de los 80, *T. infestans* presentaba una amplia distribución geográfica que comprendía más de 6 millones de km^2 (Figura 10), incluyendo siete países: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay (Schofield et al., 2006). Desde la implementación en 1991 del programa INCOSUR (Schofield y Días, 1999), la distribución geográfica de esta especie se redujo en más de un 80 %, ocupando actualmente menos de 1 millón de km^2. Esta distribución abarca Bolivia, sur de Perú y la región del Gran Chaco, que involucra el norte de Argentina, sureste de Bolivia y noroeste de Paraguay.

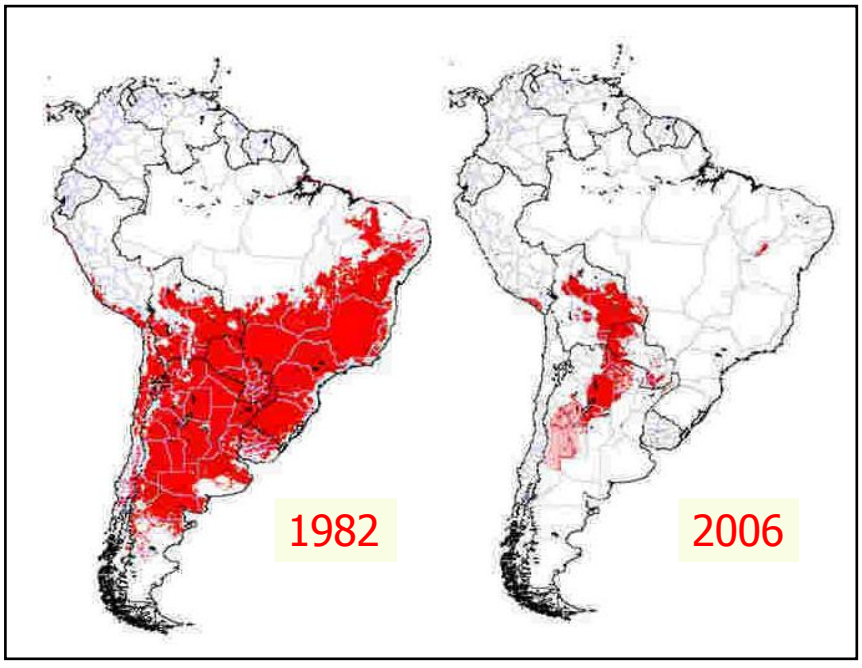

FIGURA 10. Distribución geográfica de *T. infestans* en la década de los 80.

III.iv. Origen de la especie, domesticación y dispersión

Hasta mediados de los años 90, *T. infestans* era considerada una especie doméstica y/o peridoméstica, con escasos reportes de poblaciones silvestres en los valles andinos de Cochabamba, Bolivia, a 2600 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Torrico, 1946; Dujardin

et al., 1987; Bermúdez et al., 1993). La presencia exclusiva, hasta ese entonces, de focos silvestres de *T. infestans* en la región andina boliviana de Cochabamba, llevó a sugerir a esta región como posible centro de origen, domesticación y dispersión de la especie a través de Sudamérica (*Hipótesis Andina*) (Usinger et al., 1966; Dujardin et al., 1987; Schofield, 1988). El descubrimiento de nuevos focos silvestres en este departamento boliviano (localidades de Cotapachi-2750 msnm- y Jamach'uma-2800 msnm-, Bermúdez et al., 1993; Noireau et al. 2005; Cortez et al., 2006), y estudios arqueológicos, históricos y genéticos (Panzera et al., 2004; Bargues et al., 2006) dieron apoyos adicionales al planteo de esta hipótesis de origen andino de *T. infestans*.

A partir de este siglo, se han encontrado otros focos silvestres andinos en los departamentos bolivianos de Chuquisaca, La Paz y Potosí (Noireau et al., 2005; 2007; Cortez et al., 2007). Análisis moleculares de individuos pertenecientes a las localidades de Sucre (Dpto. Chuquisaca), Potosí (Dpto. Potosí) y Vallegrande (Dpto. Santa Cruz) sugieren alternativamente a esta región como origen probable de la especie (Dujardin et al., 1998; Giordano et al., 2005).

Hipótesis Andina

La hipótesis andina plantea que *T. infestans* se originó en los valles mesotérmicos andinos de Cochabamba en Bolivia, y que inicialmente se encontraba asociada a roedores silvestres. La domiciliación inicial del vector se habría producido durante la domesticación de cobayos silvestres por tribus andinas hace unos 5.000 años AC (Usinger et al., 1966; Schofield, 1988).

Posteriormente a su domesticación inicial en Bolivia, *T. infestans* se habría dispersado al resto de nuestro continente, fundamentalmente por la acción del hombre. Esta dispersión habría ocurrido en dos etapas claramente diferenciadas, de acuerdo a Panzera y cols. (2007) (Figura 11). La primera etapa contempla una dispersión "andina" de las poblaciones domésticas hacia otras regiones andinas de Bolivia, sur de Perú y norte de Chile. Esto habría ocurrido en asociación con las migraciones de tribus preincaicas e incaicas, que practicaban el hábito de la cría de cobayos para su alimentación. La segunda etapa de dispersión, denominada "no andina", mucho más reciente, implica la dispersión de las formas domésticas de *T. infestans* desde el Chaco húmedo (norte de Argentina) hacia el sur (Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Esto pudo verse favorecido por los desplazamientos y asentamientos humanos consecuencia de las guerras de conquista. Reconstrucciones históricas sobre las

migraciones humanas indican que esta etapa de dispersión ocurrió principalmente durante los últimos 100 a 150 años (Schofield, 1988). A principios del siglo XX, *T. infestans* doméstico invadió el norte de Uruguay (Osimani, 1937), luego Perú (Lumbreras, 1972) y posteriormente Brasil (Schofield, 1988), alcanzando el Estado de Bahía a partir de 1970 (Barret et al., 1979) y el noroeste en 1980 (Silveira et al., 1984).

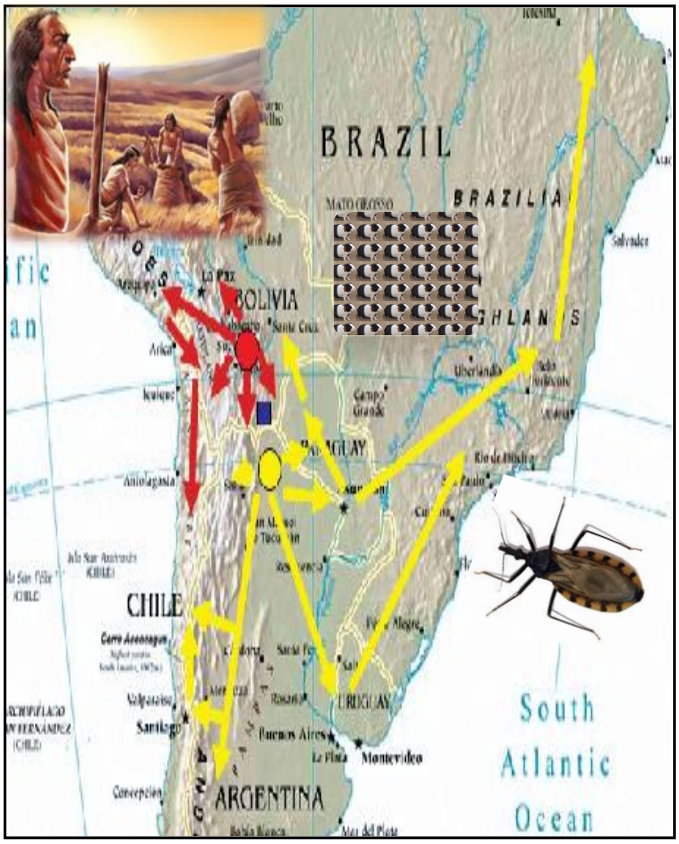

FIGURA 11. Posibles rutas de dispersión de *T. infestans*. En rojo, etapa de dispersión andina y en amarillo etapa de dispersión no andina. Imagen extraida de Panzera y cols. (2007).

Si bien la hipótesis de dispersión anteriormente expuesta es la más apoyada hoy en día, presenta varios cuestionamientos que sugieren tiempos históricos y métodos de dispersión alternativos.

Usinger y cols. (1966) plantearon que *T. infestans* pudo pasar fácilmente desde el ambiente silvestre andino (cuevas de roedores silvestres) al "doméstico" (cuevas habitadas por humanos), debido a las similitudes microclimáticas de ambos ambientes. Esto habría ocurrido en la era pre-colombina, previo a la fecha asociada con la domesticación de cobayos (5000 AC). La alternativa surge como posible explicación a la presencia de momias chilenas, peruanas y brasileras de 9000 años infectadas por *T. cruzi* (Lima et al., 2008).

Cortez y cols. (2010) proponen otras dos hipótesis de dispersión de *T. infestans* en nuestro continente, variantes de la hipótesis "andina tradicional". La primera sugiere que *T.*

infestans silvestre se dispersó en tiempos pre-colombinos en asociación con la producción y comercialización de maíz. La segunda variante sugiere que se dispersó recientemente en asociación con el peregrinaje a la Virgen Urkupiña, que se lleva a cabo en en el cerro de Cotapachi (Quillacollo, Cochabamba). Esta localidad forma parte del foco silvestre de *T. infestans* descrito por Cortez y cols. (2007).

Hipótesis Chaqueña

La Hipótesis Chaqueña, inicialmente planteada por Dias (1986) y sugerida nuevamente por Carcavallo y cols. en el 2000, propone que el origen de *T. infestans* es la región del monte seco subtropical del Chaco (sudeste de Bolivia, noroeste de Paraguay y norte de Argentina). Esta hipótesis se basa en el descubrimiento de nuevos focos silvestres en la región del Gran Chaco, por fuera de la región andina de Bolivia. Esta región del Chaco incluiría los valles interandinos bolivianos de Mataral (Dpto. Cochabamba -Noireau et al., 2005), Chaco Boliviano (Dpto. Santa Cruz -Noireau et al., 1997; 2000; 2005), Chaco Argentino (Provincia del Chaco -Ceballos et al., 2009) y el Chaco Central de Paraguay (Rolón et al., 2011).

Los individuos silvestres de las poblaciones del Chaco boliviano resultaron ser variantes melánicas de *T. infestans* silvestres, denominadas "Dark Morph" (DM). Se diferencian de los *T. infestans* domésticos de la misma región y de los silvestres de Bolivia, por su color negro y por presentar franjas conexivas más chicas y amarillas (Figura 12). Además, poseen una prevalencia de infección muy baja y mejor capacidad para volar. Se encuentran asociados a nidos de aves y huecos de árboles (a diferencia de las poblaciones silvestres andinas de ambientes rocosos, asociadas a roedores y marsupiales). Su posible origen es poco claro ya que los marcadores nucleares (cromosomas, tamaño genómico e ITS) los asemejan a *T. infestans* de poblaciones domésticas de Paraguay, Brasil y Uruguay (Noireau et al., 2000; Bargues et al., 2006), mientras que el análisis de fragmentos mitocondriales los asocian a poblaciones domésticas y silvestres de regiones andinas de Bolivia (Monteiro et al., 1999). Presentan cariotipos cromosómicos y haplotipos nucleares y mitocondriales exclusivos, lo que evidencia que constituyen una población genéticamente diferenciada de divergencia no reciente (Noireau et al., 1997; Panzera et al., 2004; Bargues et al., 2006; Piccinali et al., 2009).

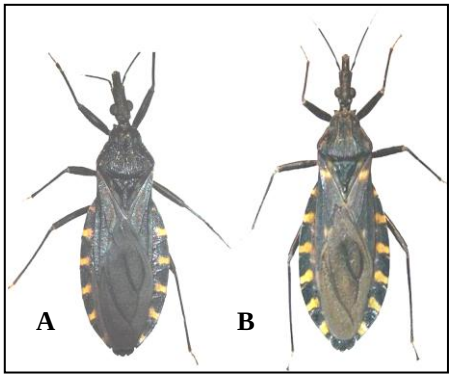

FIGURA 12. Patrón de coloración diferencial de Dark Morph (A) y *T. infestans* (B). Imagen extraída de Noireau y cols. (2009).

El descubrimiento de estas poblaciones silvestres de *T. infestans* en el Chaco (fuera de la región andina), la probable ancestralidad de algunos haplotipos de estos individuos silvestres (Piccinali et al., 2009), así como la presencia en esta región de las especies más emparentadas con *T. infestans* (*T. platensis* y *T. delpontei*), son argumentos que apoyan el origen chaqueño de la especie. Los defensores de la hipótesis andina proponen que las poblaciones silvestres del Chaco no serían las más ancestrales de la especie sino que habrían surgido a partir de poblaciones domésticas (originadas a partir de focos silvestres andinos) que retornaron al hábitat silvestre (Noireau et al., 2005).

III.v. Resistencia de poblaciones de *T. infestans* a insecticidas piretroides

La resistencia a insecticidas DDT y piretrinas se describió por primera vez en *Musca domestica* (Busvine, 1951). Se define como la habilidad adquirida por una población de insectos de tolerar dosis mayores de insecticidas tóxicos las cuales resultarían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie (Oppenoorth, 1958).

Los insectos resistentes ya existen en las poblaciones originales, aunque en bajas frecuencias, aún antes de exponerse al insecticida. Bajo el uso regular del insecticida, la condición genética previa, que confiere resistencia en ciertos individuos de la población, puede ser localmente seleccionada. Gradualmente, estos individuos mejor adaptados comienzan a sustituir a la población original (ya que los individuos no resistentes mueren), disminuyendo la efectividad del insecticida y conduciendo a fallas en el control de la población de insectos.

Entre 1997-2000, se llevó a cabo un programa de monitoreo de resistencia a deltametrina (el insecticida piretroide más usado) en diversas poblaciones de *T. infestans* (Cecere et al., 2006). Estos estudios revelaron focos de resistencia incipientes en las provincias argentinas de Catamarca, San Luis, Mendoza y Salta, así como en algunos departamentos de Bolivia (Potosí, Chuquisaca, Cochabamba y Tarija). En 2002, se confirmó

la presencia de poblaciones de *T. infestans* altamente resistentes a deltametrina en las localidades de Salvador Mazza (Prov. Salta, Argentina) y en Yacuiba (Dpto. de Tarija, Bolivia) (Picollo et al., 2005).

Una de las posibles explicaciones para el surgimiento de la resistencia a piretroides en estas poblaciones, es la de un aumento significativo (1.5 veces) en la capa protectora de hidrocarbonos de la cutícula de insectos resistentes con respecto a los suceptibles (Pedrini et al., 2009). Este aumento en el grosor de la cutícula dificultaría la penetración del insecticida y por tanto su efectividad.

IV. VARIABILIDAD EN *TRIATOMA INFESTANS*

Triatoma infestans presenta gran variabilidad en sus características morfológicas y genéticas (Dujardin y Tibayrenc, 1985; Dujardin et al., 1987; Panzera et al., 1992; 2004; Noireau et al., 2000; Catalá y Dujardin, 2001; Bargues et al., 2006). A continuación se resumen los principales antecedentes y aportes de estos estudios de variabilidad morfológica y genética de *T. infestans*.

IV.i. Fenotipo antenal, tamaño y forma de alas

Estudios de los fenotipos antenales y alares permitieron diferenciar poblaciones de *T. infestans* que se encuentran geográficamente separadas, sugiriendo bajos niveles de intercambio genético entre ellas (Dujardin et al., 1997; Abrahan et al., 2008). Los individuos andinos presentaron antenas más grandes, sensillas más complejas y más quimioreceptores que los individuos no andinos (Hernández et al., 2008). Los quimioreceptores generalmente están ligados al comportamiento sexual, a la búsqueda de hospedero y al vuelo, lo que sugiere diferencias en la percepción sensorial y/ o comportamiento relacionado al hábitat y al hospedero entre poblaciones de *T. infestans* de ambas regiones. Curiosamente, las poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides tienen un fenotipo alar diferente al del resto de las localidades estudiadas.

IV.ii. Variabilidad mitocondrial

El ADN mitocondrial es útil para estudios de genética de poblaciones en diversas especies, debido a que posee un genoma independiente al nuclear, más pequeño y circular, y

con gran número de copias por célula. Es de herencia materna y tiene una tasa de evolución relativamente rápida, respecto a otros marcadores de variabilidad poblacional. Se han desarrollado diversos métodos de análisis que permiten identificar mutaciones puntuales dentro de las regiones codificantes de este subgenoma. Esto lleva a caracterizar diversos haplotipos mitocondriales que definen poblaciones y permiten deducir relaciones interpoblacionales.

Los estudios de los genes de citocromo b y citocromo oxidasa I (COI) realizados en poblaciones domésticas y silvestres de *T. infestans* muestran que existe gran diversidad de haplotipos y una clara diferenciación entre individuos de regiones andinas y no andinas (Monteiro et al., 1999; Giordano et al., 2005; Piccinali et al., 2009).

Piccinali y cols. (2009) secuenciaron un fragmento de 661 bp del COI de individuos de *T. infestans* peridomésticos, domésticos, y/o silvestres de Argentina, Bolivia, Uruguay y Perú. Describieron 48 sitios polimórficos que diferencian 37 haplotipos, divididos en dos grandes clados, uno conformado por las poblaciones de Bolivia/Perú (región andina) y el otro por las poblaciones de Argentina/Uruguay (región no andina). Las secuencias COI de Bolivia se subdividieron a su vez en dos grupos: Andinas domésticas/silvestres y silvestres del Chaco. Las siete provincias argentinas analizadas en este estudio, fueron las que presentaron mayor diversidad nucleotídica. Dentro de este grupo, algunas poblaciones mostraron patrones de variabilidad compatibles con una expansión poblacional y/o fragmentación poblacional reciente, mientras que otras sugirieron ser resultado de cuellos de botella y/o mezcla de poblaciones.

IV.iii. Polimorfismo de microsatélites

Los microsatélites son marcadores genéticos altamente polimórficos, neutros, con herencia mendeliana, codominancia y altas tasas de mutación (Jarne y Lagoda, 1996; Roos et al., 1998), por lo que son excelentes herramientas para diferenciar y determinar la estructura poblacional.

En *T. infestans*, se han llevado a cabo análisis con el fin de identificar y caracterizar microsatélites que puedan diferenciar las diversas poblaciones de la especie. García y cols. (2004) y Marcet y cols. (2006) aislaron y caracterizaron más de 20 loci microsatélites, en poblaciones de *T. infestans* de los valles andinos de Cochabamba (Bolivia), siendo 8 de ellos altamente polimórficos.

IV.iv. Variabilidad de secuencias ITS-1 e ITS-2 del ADNr

En eucariotas, los genes que codifican el ARNr se organizan en dos unidades de repetidos transcriptos que se localizan en distintos cromosomas. La unidad transcripcional mayor, que da lugar al pre-ARNr 45S, se localiza en las regiones organizadoras de nucléolo (NORs) de los cromosomas nucleolares. Esta unidad incluye a los principales genes del ARNr (18S, 5.8S y 28S), dos espaciadores transcriptos internos que flanquean al gen 5.8S (ITS-1 e ITS-2), y una región intergénica o espaciador no transcripto (IGS o NTS) (Figura 13). Cada unidad se repite cientos de veces y se organiza formando clusters de arreglos repetidos directos, regulados por regiones espaciadoras intergénicas que separan los arreglos adyacentes (Long y Dawid, 1980).

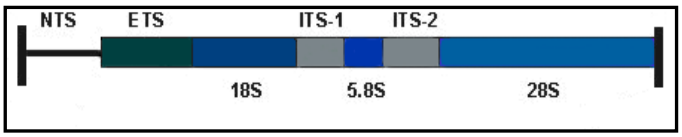

FIGURA 13. Esquema de la estructura del ADNr

El ADNr se ha empleado para inferir historias filogenéticas y para relacionar tanto especies cercanamente emparentadas como poblaciones. La cercana asociación entre regiones de ADNr en el nucléolo facilitaría la asociación entre cromosomas no homólogos que llevaría a la homogeinización de secuencias de ADNr entre individuos de una misma población. El ADNr presenta herencia mendeliana, y las distintas regiones que lo componen presentan diferentes tasas de evolución. Las regiones codificantes del ADNr están altamente conservadas tanto entre como dentro de las especies (Goldman et al., 1983; Raynal et al., 1984). En cambio, los espaciadores ITS-1 e ITS-2 varían a causa de deleciones, inserciones y secuencias de microsatélites (Almeyda-Artigas, 2000).

El análisis de las secuencias del ITS-1 en poblaciones de *T. infestans* evidenció tres haplotipos distintos (Bargues et al., 2006). El haplotipo TinfHA se encontró en todas las poblaciones, mientras que los otros dos haplotipos solo se observaron en poblaciones silvestres (TinfHB) y peridomésticas (TinfHC) de Cochabamba (región andina). Respecto al ITS-2, se encontraron cinco haplotipos denominados Tinf H1-H5. Las poblaciones analizadas de Perú, Brasil, Paraguay y Uruguay presentaron un solo haplotipo, mientras que las de Bolivia y Argentina exhibieron hasta cuatro haplotipos diferentes cada una, correspondiendo a Argentina la población más variable. El haplotipo TinfH1 se encontró solo en poblaciones de Bolivia y Perú (región andina, silvestres, peridomésticas y domésticas). El haplotipo TinfH2 fue el predominante en Chile, Paraguay, Argentina, Uruguay y Brasil (región no andina),

mientras que TinfH3 y TinfH4 fueron hallados exclusivamente en la región no andina de Argentina (Córdoba y Avellaneda, respectivamente). El haplotipo TinfH5 correspondió a individuos silvestres melánicos denominados "Dark Morph" de Bolivia (región no andina).

IV.v. Variabilidad en el tamaño genómico

Los genomas eucariotas presentan una gran variación a nivel de secuencias y cantidad de ADN (Gregory, 2005). Esta variación está dada principalmente por diferencias en el contenido de ADN repetido del genoma.

El valor C describe la cantidad de ADN de un genoma haploide, y puede expresarse en picogramos (pg) o en pares de bases (pb), considerando que 1 pg de ADN equivale aproximadamente a 10^9 pb ó 1 Gb. Este parámetro se utiliza, entre otras cosas, para analizar la variación y evolución del contenido de ADN, tanto a nivel de especies como de poblaciones.

El valor en pg del contenido de ADN de un genoma se puede estimar mediante la técnica de citometría de flujo. Esta técnica mide la fluorescencia emitida por un agente fluorescente que se intercala en forma estequiométrica con el ADN nuclear. De esta forma, la fluorescencia medida por el citómetro será proporcional al contenido de ADN presente en las células.

Panzera y cols. (2004, 2006, 2007) analizaron por citometría de flujo el contenido de ADN de individuos de *T. infestans* provenientes de poblaciones de regiones andinas y no andinas, encontrando que las poblaciones andinas poseen alrededor de un 35 % más de ADN que los individuos de las regiones no andinas.

IV.vi. Variabilidad cromosómica del contenido y distribución de la heterocromatina

La variabilidad cromosómica de una especie puede analizarse mediante diversos métodos citogenéticos y cito-moleculares. El método de bandeo C (Arrighi & Hsu, 1971), que revela la localización cromosómica de la heterocromatina constitutiva, es uno de los principales métodos empleado para revelar variabilidad cromosómica en especies con cromosomas holocéntricos como *T. infestans*.

La heterocromatina se define como aquellas regiones cromosómicas que se tiñen fuertemente en profase (Heitz, 1928) y mantienen una organización compacta a través de todos los estadíos del ciclo celular. Existen dos tipos de heterocromatina que difieren en cuanto al contenido de secuencias, lo que determina su naturaleza permanente o reversible, asi

como su variabilidad y propiedades de tinción. La heterocromatina constitutiva, es idéntica para todas las células del organismo, generalmente no se expresa y se tiñe con la técnica de bandeo C. Es estable y conserva sus propiedades heterocromáticas durante todas las etapas del desarrollo y en todos los tejidos. La heterocromatina facultativa, en cambio, difiere en los distintos tipos celulares, es reversible y no se tiñe con la técnica de bandeo C. Su estado heterocromático depende de la etapa del desarrollo y del tipo celular.

La heterocromatina constitutiva está compuesta de secuencias repetidas que incluyen repetidos en tándem (ADN satélite: macro, mini y microsatélites) y secuencias repetidas dispersas (elementos genéticos móviles) (Sumner, 1972; Kliman y Hey, 1993; Hey y Kliman, 2002; Ashburner et al., 2004). Presenta un rol estructural en la constitución de centrómeros y telómeros. Además interviene en el apareamiento y segregación meiótica (Anderson, 1925). También es responsable del fenómeno de variegación por efecto de posición (Sumner, 1972) e influye en el número y distribución de quiasmas. Diversos autores señalan que la frecuencia de quiasmas disminuye drásticamente en regiones de eucromatina inmediatamente adyacentes a la heterocromatina, favoreciendo el mantenimiento de combinaciones alélicas coadaptadas (Kliman y Hey, 1993; Hey y Kliman, 2002; Ashburner et al., 2004). Adicionalmente, estudios genéticos y moleculares en ciertos insectos como *Drosophila melanogaster* demostraron que la heterocromatina constitutiva incluye también algunos genes fundamentales como aquellos responsables de la viabilidad y fertilidad de la especie (Williams y Robbins, 1992; Weiler y Wakimoto, 1995; Karpen et al., 1996; Elgin, 1996; Dernburg et al., 1996; Eissenberg y Hilliker, 2000; Henikoff et al., 2001; Coulthard et al., 2003; Fitzpatrick et al., 2005; Dimitri et al., 2005b; 2009).

La heterocromatina constitutiva puede estar altamente diferenciada en un taxón, entre especies o incluso entre poblaciones de una misma especie, mostrando heterogeneidad en su localización, tamaño y composición de secuencias. La variación en la heterocromatina puede resultar de la pérdida y ganancia de secuencias por intercambio cromosómico o por surgimiento de nuevos bloques C (Gatti et al., 1983; Rafael y Tadei, 2000; Rafael et al., 2003). El número de repetidos de ADN satélite de una especie puede variar por diferentes mecanismos como la transferencia no recíproca de ADN dentro y entre cromosomas (conversión génica, crossing-over desigual, transposición, intercambio mediado por ARN). El análisis comparativo de la composición y distribución cromosómica de bloques de secuencias repetidas de la heterocromatina es frecuentemente empleado para evidenciar relaciones cariotípicas dentro de taxones (Hamilton et al., 1990; Garagna et al., 1993; Modi, 1993).

Se ha observado variación intraespecífica en la cantidad de heterocromatina en diversos grupos de insectos, tanto con centrómero localizado como *Drosophila* (Blanchelot, 1991) como en especies con centrómero no localizado, como ciertos hemípteros y lepidópteros (Bizzaro et al., 1996; Manicardi et al., 1996; Spence et al., 1998; Mandrioli et al., 1999a; b; c; 2003; Mandrioli y Volpi, 2003). Esta variación podría estar relacionada con cambios de parámetros biológicos tales como volumen celular total, tasa de desarrollo y tamaño corporal.

En *T. infestans* se ha detectado variabilidad en la localización y número de bloques de heterocromatina constitutiva, en relación a la distribución geográfica de sus poblaciones (Panzera et al., 1992; 2004). Mediante bandeo C, Panzera y cols. (2004) diferenciaron dos grupos alopátricos, que denominaron Andino y No-Andino, por comportarse como grupos discretos y estar aparentemente restringidos a áreas geográficas particulares, andinas y no andinas, respectivamente (Figura 14). El Grupo Andino (poblaciones de Bolivia y Perú) presentó la mayor cantidad de autosomas con bloques C-heterocromáticos (entre 14 y 20 autosomas), heterocromatina C en el cromosoma sexual X y un mayor contenido genómico de ADN. El Grupo No-Andino (poblaciones de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) solo presentó bloques de heterocromatina C en 4-7 autosomas, no presentó heterocromatina en el cromosoma sexual X y presentó menor contenido de ADN por célula respecto a los individuos del Grupo Andino. Panzera y cols. propusieron a las diferencias en el contenido de heterocromatina constitutiva entre ambos grupos, como la causa más probable de la variación en el contenido de ADN (aprox. 35 %) entre las poblaciones de regiones andinas y no andinas de *T. infestans*.

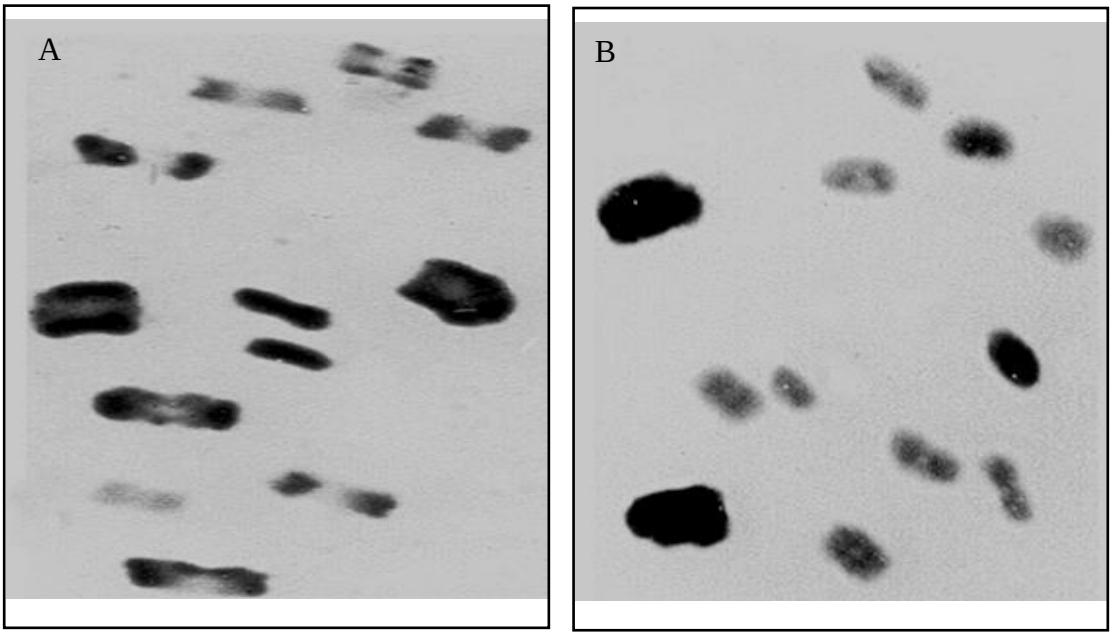

FIGURA 14. Patrones cromosómicos de machos de *T. infestans*. Las regiones oscuras corresponden a heterocromatina constitutiva revelada con bandeo C. A: Metafase I de un individuo del Grupo Andino. B: Metafase I de un individuo del Grupo No-Andino. Imagen obtenida de Panzera y cols. (2004).

V. IMPORTANCIA DE LA REALIZACIÓN DE NUEVOS ANÁLISIS CITOGENÉTICOS PARA EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD DE *TRIATOMA INFESTANS*

El estudio de la variación cromosómica en *T. infestans* es una importante herramienta genética para conocer y describir los cambios genómicos que ha sufrido esta especie durante los procesos de domesticación y dispersión (Panzera et al., 1992; 2004).

Esta Tesis plantea ampliar el análisis citogenético de *T. infestans* por bandeo C a nuevas regiones geográficas hasta ahora no estudiadas, de forma de determinar la extensión de la distribución de los grupos cromosómicos Andino y No-Andino, previamente definidos por Panzera y cols. (2004).

Además se plantea el empleo de nuevos marcadores cromosómicos que permitan revelar otros posibles cambios genómicos ocurridos durante la dispersión de *T. infestans*, de forma de contribuir a la comprensión de la evolución de su genoma.

Optamos por el análisis por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de la localización cromosómica del cluster ribosomal 45S en las diversas poblaciones de *T. infestans* bajo estudio.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la variabilidad cromosómica de *Triatoma infestans* a fin de contribuir a la comprensión de los cambios genómicos ocurridos durante su evolución y dispersión a través del Cono Sur.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar mediante bandeo C el contenido y distribución de la heterocromatina constitutiva en nuevas poblaciones de *T. infestans* de forma de ampliar y definir más detalladamente los límites de la distribución geográfica de los grupos cromosómicos previamente identificados (Andino y No-Andino).

2. Analizar mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) la distribución cromosómica del ADN ribosómico (ADNr 45S) en las poblaciones de *T. infestans.*

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- La distribución de los Grupos cromosómicos Andino y No-Andino, definidos por Panzera y colaboradores (2004) se corresponden con regiones geográficas andinas y no andinas respectivamente.

- El uso de otros marcadores cromosómicos, como el ADNr 45S, podría revelar la existencia de cambios genómicos adicionales a los ya descritos en *T. infestans.*

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

Se utilizaron gónadas de 292 individuos adultos (machos y hembras) de *T. infestans* procedentes de 38 localidades de Argentina, Brasil, Bolivia, Paraguay, Perú y Uruguay, involucrando poblaciones domésticas y peridomésticas, así como dos poblaciones silvestres de Bolivia (Cotapachi-Cochabamba y La Deseada-Potosí), (Tabla 1 y Figura 15).

A fin de facilitar su análisis por bandeo C y FISH, las 38 poblaciones se agruparon en 11 "grupos de localidades". Estos grupos de localidades reunen poblaciones incluidas en un mismo Departamento geográfico o Provincia, dependiendo de la subdivisión administrativa del país al que pertenece cada localidad estudiada. En el caso de Bolivia, la máxima división administrativa es el Departamento, luego la Provincia y finalmente el Municipio. En Argentina, la máxima división administrativa es la Provincia y luego el Departamento.

La mayor parte de los insectos fueron obtenidos a través de un proyecto financiado por la Comunidad Europea, coordinado por la Dra. Silvia Catalá del CRILAR en La Rioja (Argentina) durante los años 2005 y 2006. El área de colecta de especímenes se extendió desde los 67º45'S hasta los 59º48'O y desde los 18º36' a los 28º13'S. La altitud varió entre 129 a 3095 metros sobre el nivel del mar (msnm). La mayoría de los sitios de colecta fueron geo-referenciados por GPS (Tabla 1).

Las gónadas fueron extraídas de los insectos y fijadas en 3:1 (etanol absoluto: ácido acético glacial) para su preservación y se almacenaron en un freezer a -20°C en nuestro laboratorio hasta su procesamiento.

TABLA 1. Procedencia geográfica de los individuos analizados por bandeo C y/o FISH

PAIS	Provincia o Departamento	Dto. /Prov. o Municipio	Nº ref. mapa	Localidad	Altitud (msm)	Longitud W	Latitud S	N bandeo C	N FISH
Argentina	Catamarca	Tinogasta	19	Palo Blanco	1828	67º45`35´´	27º20`26´´	27	1
		Valle Viejo	6		490	65 50' 22"	28 33' 36"		
	Chaco	Almirante Brown	20	Pampa Ávila	107	61º30`44´´	26º59`50´´	24	
		Chacabuco	21	Tres Estacas	122	61º40'23"	26º54'30"	9	
	Formosa	Bermejo	7	Villa Escobar	66	58º66`66´´	26º61`66´´	5	
	La Rioja	Facundo Quiroga	8	San Antonio	326	66º15`00´´	29º28`33´´	7	
		San Martín	9	4 Esquinas	312	65º86`66´´	31 48' 03"		
		Castros Barros	24	Anillaco	1419	66º95`00´´	28º80`00´´		
	Salta	Rivadavia	17	La Unión	169	63º08`15´´	23º45`38´´	6	2
		San Carlos	18	San Carlos	2088	65º57´53``	25º48´33´´		
		Gral. José de San Martín	15	Salvador Mazza	834	63º41´21´´	22º01´24´´	52	10
	Santiago del Estero	Alberdi	22	Huachana	165	64º07`13´´	28º13`25´´	24	
		Silípica	23	Silípica	138	64º07`08´´	28º06`12´´		
Bolivia	Potosí	Sud Chichas	5	La Deseada	2921	65º41`34´´	21º31`19´´	8	2
	Chuquisaca	Sucre/ Oropeza	4	Carapari	1892	65º10´30´´	18º37´18´´	15	2
	Cochabamba	Aiquile/ Campero	1	Cotapachi	2618	66º17`25´´	17º25`55´´		2
			3	Mataral	1892	65º09´19´´	18º36´40´´		
			2	Bandorniyoc	1853	65º11´04``	18º30´03´´		
	Tarija	Gran Chaco Yacuiba	13	San Fco del Inti	610	63º36`35´´	21º49`41´´	31	2
			11	Est. Sunchal	558	63º22´01´´	21º41´17´´		
			14	Palmar Chico	610	63º36´45``	21º53´50``		
			25	Quebrada Busuy	387	63º27´87´´	21º16´75´´		
			27	El Barrial	387	63º40´54´´	22º02´22´´		
			12	Yaguacua	650	63º36´00´´	21º42´00´´		
		Gran Chaco Villamontes	10	San Antonio	429	63º28'47"	21º15'39"		
		O´Connor Entre Ríos	28	Suarurito	853	63º56'33"	21º16'56"		
			29	Tacuarandy	958	63º59'57"	21º23'03"		
Brasil	Paraíba		30	Monteiro	602	37º07'00"	07º53'29"		1
Paraguay	Boquerón		16	Jericó	115	59º48`41´´	22º35`46´´	37	3
			31	Tiberia	115	59º55'49´´	22º37'17"		
	Cordillera		32	San Bernardino	334	57º17'43"	25º18'26"		
	Presidente Hayes		33	Niya Toyish	126	59º52'32"	22º57'26"		
			34	Estancia Salazar	126	59º16'53"	23º04'41"		
	San Pedro		35	San Pedro	213	57º08`33´´	24º10`00´´		
Perú	Arequipa	Santa Rita de Siguas	26	San Antonio	1552	71º45`41´´	16º57`11´´	7	3
	Ica	Nazca	36	Nazca	588	74º95`00´´	14º83`33´´	11	
Uruguay	Rivera		37		223	55º33`01´´	30º53`55´´		2
	Río Negro		38		23	58º18`01´´	33º07`29´´		
Total								**263**	**29**

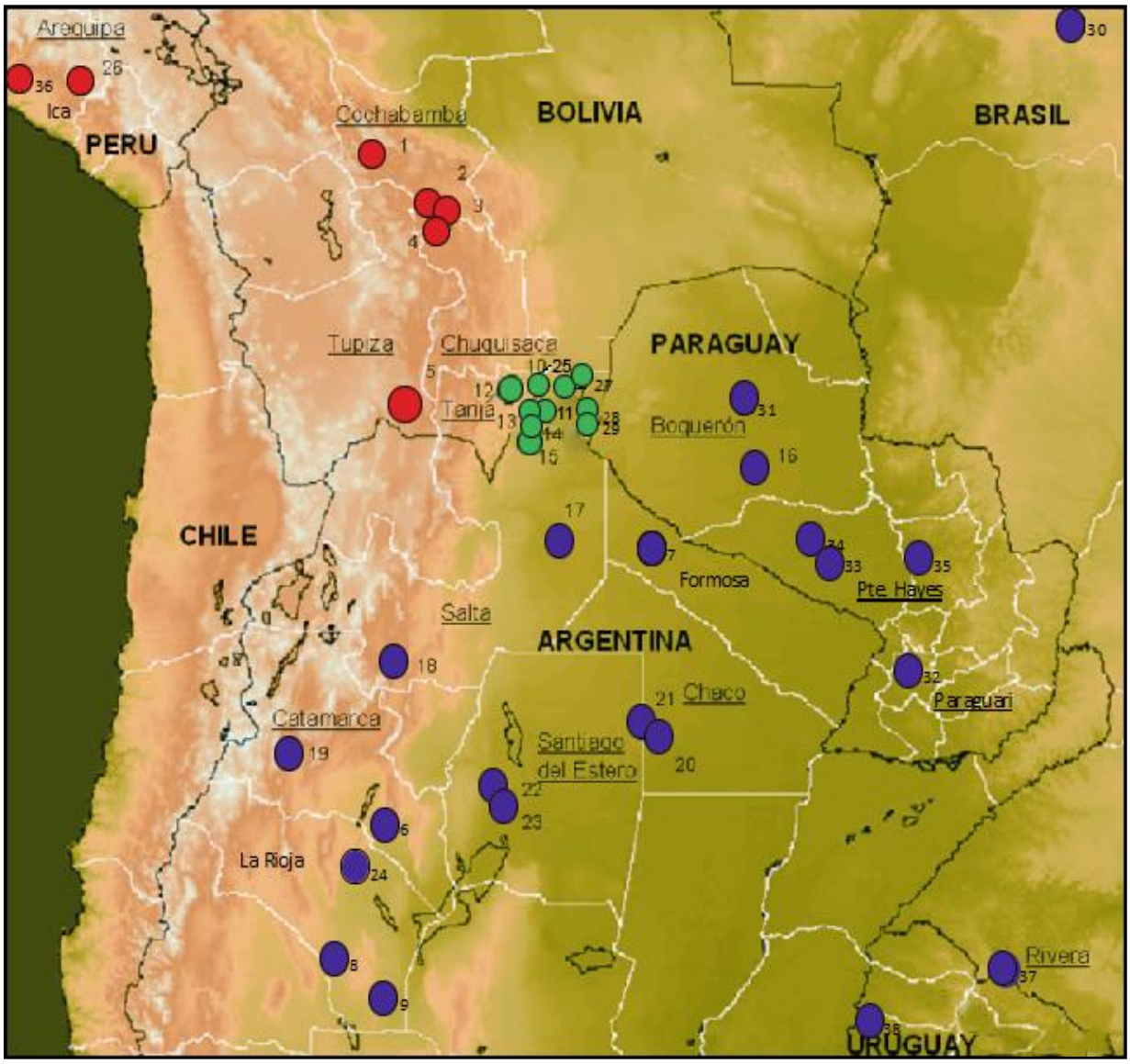

FIGURA 15. Localización geográfica de los sitios de muestreo. Las líneas negras muestran las fronteras nacionales, mientras que las líneas blancas delimitan las fronteras de las Provincias o Departamentos. Los colores del mapa representan la altitud (msnm) de cada región, siendo los tonos oscuros los sitios de menor elevación y los más claros los más elevados. Los puntos de colores señalan las localidades de colecta. En Rojo, localidades de Perú y Bolivia. En Azul, localidades de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. En verde, poblaciones de Bolivia (Tarija) y Argentina (Salta) de la región no andina, que limitan con la región andina y presentan resistencia a piretroides. **1:** Cotapachi, **2:** Bandorniyoc, **3:** Mataral; **4:** Carapari; **5**: La Deseada; **6:** Valle Viejo; **7:** Bermejo; **8:** San Antonio (La Rioja); **9:** Cuatro Esquinas; **10:** San Antonio (Bolivia); **11:** Estación Sunchal; **12:** Yaguacua; **13:** San Francisco del Inti; **14:** Palmar Chico; **15:** Salvador Mazza; **16:** Jericó; **17:** La Unión; **18:** San Carlos; **19**: Palo Blanco; **20**: Pampa Avila; **21**: Tres Estacas; **22**: Huachana; **23**: Silípica; **24**: Anillaco; **25**: Quebrada Busuy; **26:** Arequipa; **27**: El Barrial; **28:** Suarito; **29**: Tacuarandy; **30**: Monteiro; **31**: Tiberia; **32**: San Bernardino; **33**: Niya Toyish; **34**: Estancia Salazar; **35:** San Pedro; **36:** Nazca; **37**: Rivera; **38:** Río Negro.

II. MÉTODOS

II.i. OBTENCIÓN DE LAS PREPARACIONES CITOLÓGICAS

Los estudios cromosómicos se realizaron sobre preparaciones obtenidas mediante el método de aplastado. Los portaobjetos fueron previamente tratados con polilisina-L para mejorar la adherencia del material. Se disecaron las gónadas en ácido acético al 50 %, y las preparaciones se observaron al microscopio de contraste de fase. Se seleccionaron aquellas con mayor cantidad, adherencia y calidad de material cromosómico (elevado número de células en metafases de ambas divisiones meióticas) para su posterior bandeo e hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Se levantaron los cubreobjetos de las preparaciones seleccionadas con nitrógeno líquido y se dejaron resguardadas del polvo a temperatura ambiente para la aplicación del bandeo C y en un freezer a – 20°C para la aplicación del FISH.

II.ii. BANDEO C

La detección de regiones cromosómicas de heterocromatina C constitutiva, se realizó de acuerdo al método descrito por Sumner (1972), con modificaciones sugeridas por Pérez y cols. (1997, 2000). La técnica consiste básicamente en ocho pasos que se detallan a continuación.

- Hidrolización del material mediante inmersión de las preparaciones en un coplin con una solución de HCl 1N (80 ml de HCl 35 % en un litro de agua destilada) durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavado de las preparaciones con agua destilada.
- Incubación de las preparaciones en una solución de hidróxido de bario octohidratado ($Ba(OH)_2$. 8 H_2O) al 5 % durante 10 minutos a temperatura ambiente (3 g en 60 ml de agua destilada).
- Tres lavados con agua destilada con gotas de ácido acético glacial, para eliminar los restos de bario.
- Transferencia de las preparaciones a un coplin con 2xSSC (solución salina citratada: 17.5 g de NaCl y 8.8 g de $Na_3C_6H_5O_7$. $2H_2O$ disueltos en un litro de agua destilada) a 60°C e incubación por 30 minutos.
- Lavado con agua destilada hasta su coloración.

- Tinción de las preparaciones con solución de Giemsa al 2 % en agua destilada y chequeo y selección al microscopio óptico.
- Secado de las preparaciones seleccionadas y montaje definitivo con un montante sintético como Eukkit o Sandeural.

Los preparados bandeados seleccionados, se guardaron a temperatura ambiente hasta ser analizados detalladamente al microscopio óptico, en busca de fases de mitosis y meiosis de buena calidad, esquematizadas y fotografiadas con el fin de establecer la cantidad y distribución de la heterocromatina para cada individuo de *T. infestans* analizado.

II.iii. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) CON SONDA DE ADNr 18S DE *T. INFESTANS*

La técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) empleada en esta Tesis para la localización del cluster de ADNr 45S en diversas poblaciones de *T. infestans,* requirió del diseño y obtención de una sonda de ADN ribosómico específica de *T. infestans* y de su posterior marcaje con el fluorocromo Cy3-dUTP para su detección, tal como se describe en detalle a continuación.

OBTENCIÓN DE LA SONDA DE ADNr 18S

1) *Búsqueda en la base de datos de los genes ribosomales y diseño de cebadores*

A partir de la secuencia nucleotídica del ADNr 18S de *T. infestans* (Figura 16) publicada en el Genebank (*Acc. Number Y18750*), se diseñó (*Programa FAST PCR*) y mandó construir (*IDT DNA Technologies Inc.*) un juego de cebadores (Triato ribo Forward y Triato ribo Reverse) capaces de amplificar por PCR una región de 807 pb, utilizando como molde ADN genómico de *T infestans* de Uruguay.

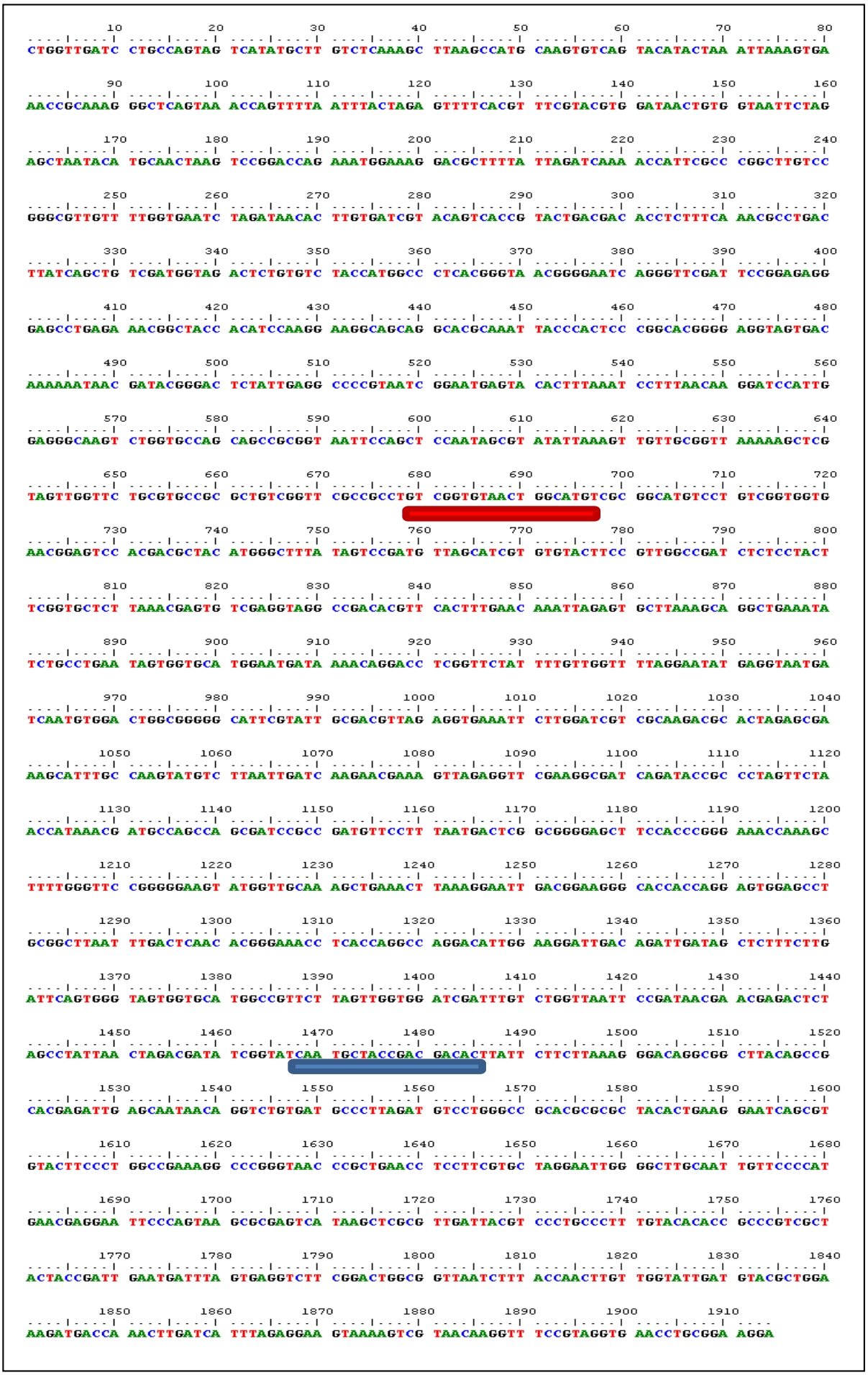
10 20 30 40 50 60 70 80
CTGGTTGATC CTGCCAGTAG TCATATGCTT GTCTCAAAGC TTAAGCCATG CAAGTGTCAG TACATACTAA ATTAAAGTGA
90 100 110 120 130 140 150 160
AACCGCAAAG GGCTCAGTAA ACCAGTTTTA ATTTACTAGA GTTTTCACGT TTCGTACGTG GATAACTGTG GTAATTCTAG
170 180 190 200 210 220 230 240
AGCTAATACA TGCAACTAAG TCCGGACCAG AAATGGAAAG GACGCTTTTA TTAGATCAAA ACCATTCGCC CGGCTTGTCC
250 260 270 280 290 300 310 320
GGGCGTTGTT TTGGTGAATC TAGATAACAC TTGTGATCGT ACAGTCACCG TACTGACGAC ACCTCTTTCA AACGCCTGAC
330 340 350 360 370 380 390 400
TTATCAGCTG TCGATGGTAG ACTCTGTGTC TACCATGGCC CTCACGGGTA ACGGGGAATC AGGGTTCGAT TCCGGAGAGG
410 420 430 440 450 460 470 480
GAGCCTGAGA AACGGCTACC ACATCCAAGG AAGGCAGCAG GCACGCAAAT TACCCACTCC CGGCACGGGG AGGTAGTGAC
490 500 510 520 530 540 550 560
AAAAAATAAC GATACGGGAC TCTATTGAGG CCCCGTAATC GGAATGAGTA CACTTTAAAT CCTTTAACAA GGATCCATTG
570 580 590 600 610 620 630 640
GAGGGCAAGT CTGGTGCCAG CAGCCGCGGT AATTCCAGCT CCAATAGCGT ATATTAAAGT TGTTGCGGTT AAAAAGCTCG
650 660 670 680 690 700 710 720
TAGTTGGTTC TGCGTGCCGC GCTGTCGGTT CGCCGCCTGT CGGTGTAACT GGCATGTCGC GGCATGTCCT GTCGGTGGTG
730 740 750 760 770 780 790 800
AACGGAGTCC ACGACGCTAC ATGGGCTTTA TAGTCCGATG TTAGCATCGT GTGTACTTCC GTTGGCCGAT CTCTCCTACT
810 820 830 840 850 860 870 880
TCGGTGCTCT TAAACGAGTG TCGAGGTAGG CCGACACGTT CACTTTGAAC AAATTAGAGT GCTTAAAGCA GGCTGAAATA
890 900 910 920 930 940 950 960
TCTGCCTGAA TAGTGGTGCA TGGAATGATA AAACAGGACC TCGGTTCTAT TTTGTTGGTT TTAGGAATAT GAGGTAATGA
970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
TCAATGTGGA CTGGCGGGGG CATTCGTATT GCGACGTTAG AGGTGAAATT CTTGGATCGT CGCAAGACGC ACTAGAGCGA
1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
AAGCATTTGC CAAGTATGTC TTAATTGATC AAGAACGAAA GTTAGAGGTT CGAAGGCGAT CAGATACCGC CCTAGTTCTA
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
ACCATAAACG ATGCCAGCCA GCGATCCGCC GATGTTCCTT TAATGACTCG GCGGGGAGCT TCCACCCGGG AAACCAAAGC
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
TTTTGGGTTC CGGGGGAAGT ATGGTTGCAA AGCTGAAACT TAAAGGAATT GACGGAAGGG CACCACCAGG AGTGGAGCCT
1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360
GCGGCTTAAT TTGACTCAAC ACGGGAAACC TCACCAGGCC AGGACATTGG AAGGATTGAC AGATTGATAG CTCTTTCTTG
1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
ATTCAGTGGG TAGTGGTGCA TGGCCGTTCT TAGTTGGTGG ATCGATTTGT CTGGTTAATT CCGATAACGA ACGAGACTCT
1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
AGCCTATTAA CTAGACGATA TCGGTATCAA TGCTACCGAC GACACTTATT CTTCTTAAAG GGACAGGCGG CTTACAGCCG
1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
CACGAGATTG AGCAATAACA GGTCTGTGAT GCCCTTAGAT GTCCTGGGCC GCACGCGCGC TACACTGAAG GAATCAGCGT
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
GTACTTCCCT GGCCGAAAGG CCCGGGTAAC CCGCTGAACC TCCTTCGTGC TAGGAATTGG GGCTTGCAAT TGTTCCCCAT
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760
GAACGAGGAA TTCCCAGTAA GCGCGAGTCA TAAGCTCGCG TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGTACACACC GCCCGTCGCT
1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
ACTACCGATT GAATGATTTA GTGAGGTCTT CGGACTGGCG GTTAATCTTT ACCAACTTGT TGGTATTGAT GTACGCTGGA
1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910
AAGATGACCA AACTTGATCA TTTAGAGGAA GTAAAAGTCG TAACAAGGTT TCCGTAGGTG AACCTGCGGA AGGA

FIGURA 16. Secuencia de ADNr 18S de *T. infestans* (Y18750): 1914 bp. En rojo se simboliza el cebador directo (TRIATO RIBO Foward 5´-GTC GGT GTA ACT GGC ATG T-3´) y en azul el cebador reverso (TRIATO RIBO Reverse 5´-GTG TCG TCG GTA GCA TTG A-3´).

2) *Extracción de ADN genómico* de *T. infestans*

La técnica de extracción de ADN empleada es una modificación de la técnica de Sambrook y cols. (1989) puesta a punto en nuestro laboratorio. Se emplearon patas y cabezas de individuos de *T. infestans* previamente preservados en alcohol absoluto y/o individuos disecados en el momento, en cantidad suficiente para obtener un buen rendimiento de extracción (3-6 individuos apróx.). El material fue dejado secar a temperatura ambiente, luego de lo cual fue macerado en mortero de loza mediante nitrógeno líquido. El polvillo resultante fue pasado a tubos eppendorf y se procedió a la extracción como se describe a continuación.

- Adición de 1 ml de buffer de lisis por tubo.
- Adición de 40 µl de SDS 10 % y 5 µl de proteinasa K (20 ng/ml) por tubo.
- Incubación de 2 horas en baño a 65°C, agitando cada 10 minutos.
- Adición de 20 µl de RNAsa (10 ng/ml) a cada tubo.
- Incubación por 30 minutos a 55°C.
- Adición de 200 µl de acetato de potasio 5M a cada tubo y mezcla por inversión.
- Incubación de 30 minutos en hielo.
- Centrifugación de 15 minutos a temperatura ambiente y transferencia del sobrenadante a dos tubos eppendorfs en partes iguales.
- Realización de dos extracciones consecutivas con igual volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, invirtiendo los tubos y centrifugando 1 minuto cada vez.
- Recuperación de la fase superior y adición de igual volumen de cloroformo, invirtiendo el tubo hasta obtener una solución turbia y centrifugando 2 minutos.
- Transferencia de la fase superior a nuevos tubos.
- Precipitación toda la noche a -20°C con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 3 volúmenes de etanol absoluto frío.
- Al día siguiente se recupera el precipitado por centrifugación, se lava con etanol 70 % y se deja secar a temperatura ambiente.
- Resuspensión en un volumen aproximado de 30 µl de H_2O ultrapura.

3) *Amplificación por PCR y purificación del producto*

El ADN de *T. infestans* extraído como se describió previamente, fue chequeado y cuantificado mediante un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. La cuantificación también fue realizada mediante medición por espectrofotómetro. Este ADN fue utilizado como molde en una reacción de PCR empleando los cebadores específicos (TRIATO), en las condiciones que se detallan a continuación en las Tablas 2 y 3.

TABLA 2. Mezcla de PCR

Reactivos (Mezcla de PCR)	[**STOCK**] **1mM**	[**FINAL de reacción**] **0,1 mM**
Buffer	10 X	1 X
$MgCl_2$	50 mM	5 mM
dNTPs *Fermentas*	2 mM	0,2 mM
TRIATO RIBO F	10 µM	0,3 µM
TRIATO RIBO R	10 µM	0,3 µM
Taq polimerasa *Fermentas*	5 U/µl	0,25 U
Molde ADN *T. infestans*	1 µg/µl	10 ng
H_2O	……	Pcv
Volumen final por tubo	……	10 µl

TABLA 3. Programa del termociclador

		Tiempo	**Temperatura**
Desnaturalización inicial		5 minutos	94°C
35 CICLOS	**Desnaturalización**	30 segundos	94°C
	Annealing	40 segundos	48°C
	Extensión	1 minuto	72°C
Extensión final		7 minutos	72°C

El amplicón se corrió en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, junto con un marcador de peso molecular, para verificar su estado y tamaño (807 pb). La banda correspondiente al producto de amplificación deseado fue recortada del gel y purificada, tal cual se describe a continuación (*GFX gel band extraction kit*).

- Estimación del peso de la banda extraída del gel y adición de 1 volumen de buffer de captura.
- Incubación de 15 minutos a 60°C.
- Centrifugación y transferencia del volumen recuperado a una columna del kit.

- Incubación de 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugación 30 segundos a máxima velocidad, descartando el flujo de la columna.
- Transferencia de la columna a un nuevo tubo y adición de 500 µl de buffer de lavado.
- Centrifugación de 30 segundos a máxima velocidad y repetición de los dos pasos previos.
- Elución del material retenido en la columna en 50 µl de H_2O ultrapura, previa incubación 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugado 30 segundos a máxima velocidad.
- Cuantificación y secuenciación del producto amplificado para confirmar su identidad.

4) ***Clonación del producto de amplificación***

El producto de amplificación de ADNr 18S de *T. infestans* fue purificado y ligado al plásmido de clonación *pBluescript* mediante la T4 ADN ligasa de *Fermentas*, en una reacción ON a 22°C. La reacción de ligación fue detenida mediante una incubación de 10 minutos en baño a 65°C y almacenada a -20°C. Se realizó la transformación de células competentes como se detalla a continuación.

- Mezcla en Falcon estéril de 3 µl de producto de ligación y 100 µl de células competentes.
- Incubación 15 minutos en hielo.
- Shock térmico 45 segundos en baño a 42 ºC.
- Adición de 300 µl de SOC (al que previamente se agregó $MgCl_2$, $MgSO_4$ y glucosa).
- Crecimiento por agitación en shaker a 200 rpm, 1 hora y media a 37ºC.
- Plaqueo en placas de medio selectivo LB-agar-ampicilina-IPTG/XGal precalentadas a 37ºC, dejando secar e invirtiendo la placa para colocar en estufa a 37ºC ON.

Posteriormente, se realizó un screening por PCR, picando colonias blancas aisladas y resuspendiendolas en agua milli Q e hirviéndolas por 5 minutos. Se tomaron 2 µl de muestra como molde para PCR (realizado en las mismas condiciones que el PCR de ADN genómico) y se envió a secuenciar el producto de aquellas reacciones donde se amplificó el fragmento del tamaño esperado para confirmar su identidad. Las colonias confirmadas por PCR y secuenciación como positivas para la presencia del inserto de 807 pb correspondiente al

ADNr 18S (al que llamamos a partir de aquí TR800), se replaquearon, reaislaron y finalmente congelaron en glicerol al 50 % en un freezer a -80°C hasta su uso.

5) Minipurificación del plásmido y obtención del fragmento TR800

Se descongelaron los clones positivos de TR800, plaquearon en medio sólido LB ampicilina/IPTG/XGal y dejaron en estufa ON a 37°C. Posteriormente se picaron y crecieron en 5 ml de LB líquido con ampicilina a una concentración final de 50 ug/ml) toda la noche en un agitador shaker a 37°C. Se minipurificó su ADN plasmídico (TR800), mediante un kit de columnas comercial (*Marligen kit*), procediendo como se detalla a continuación.

- Adición de 250 µl de buffer G1 y resuspensión.
- Adición de 250 µl de buffer G2, mezcla por inversión y centrifugación 5 minutos a temperatura ambiente.
- Adición de 350 µl de buffer M3, mezcla por inversión y centrifugación 10 minutos a temperatura ambiente a 12000 rpm.
- Colocación del sobrenadante en la columna y centrifugación 1 minuto a 12000 rpm.
- Adición de 500 µl de buffer GX e incubación a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Centrifugado 1 minuto a 12000 rpm y adición de 700 µl de buffer G4 repitiendo el centrifugado.
- Elución del plásmido TR800 con 50 µl de H_2O ultrapura, mediante incubación 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugado 2 minutos a 12000 rpm.

El ADN plasmídico TR800 recuperado se corrió en gel de agarosa para chequear la reacción de purificación y se cuantificó por espectrofotometría o nanodrop previo a ser marcado para emplear como sonda en el FISH.

MARCAJE DE LA SONDA TR800 CON dUTP-Cy3 POR NICK TRANSLATION

El ADN plasmídico TR800, conteniendo el inserto de interés se marcó por el método de "Nick translation" (*Invitrogen*), mediante la incorporación del fluorocromo dUTP-Cy3 (*General Electric*), de acuerdo a la reacción que se detalla a continuación.

- Se tomó un volumen de TR800, correspondiente a 1 µg de ADN plasmídico, de acuerdo a la cuantificación previa.

- Se agregaron 5 µl de la mezcla de dNTPs (minus TTP), 1 µl de Cy3-dUTP, 5 µl de la mezcla de enzima pol I/DNasa I y H_20 hasta completar un volumen de 50 µl totales de reacción.
- Se mezcló, centrifugó 5 segundos e incubó a 15°C en oscuridad, por 1,5 horas.
- Mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, se chequeó la incorporación del fluorocromo a la sonda y que ésta presentara un tamaño inferior a 500 pb.
- Se detuvo la reacción con 5 µl de solución stop.
- Se precipitó ON con 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M y 2-3 volúmenes de etanol absoluto frío, y se lavó con etanol 70 %.
- Se resuspendió en agua a una concentración de 50 ng/µl.
- La sonda TR800, marcada con Cy3-dUTP, se almacenó protegida de la oscuridad a -20°C hasta ser usada en la hibridación de los preparados de *T. infestans* también almacenados a la misma temperatura.

FISH CON SONDA MARCADA TR800

La técnica empleada se basó en modificaciones de diversos protocolos a fin de ajustar las condiciones a los cromosomas de *T. infestans*. Una vez puesto a punto el protocolo, se descongelaron las preparaciones seleccionadas previamente para FISH y se pretrataron para hibridar con la sonda marcada TR800, y permitir la localización del cluster ribosomal 45S en la especie. A continuación se detallan los pasos de los dos días consecutivos de reacción de hibridación.

DÍA 1 FISH: Pretratamiento e hibridación

- Fijación de las preparaciones en 60 ml de 3:1 (etanol absoluto: ácido acético) durante 15 minutos.
- Deshidratación de las preparaciones con 60 ml de etanol 70 % por 5 minutos y pasaje a etanol 100 % por 5 minutos.
- Secado de las preparaciones a temperatura ambiente (TA) en una gradilla tapada por 30 minutos.
- Incubación de las preparaciones 30 minutos en estufa a 55-60ºC.

- Tratamiento con RNAasa [100µg/ml] en 2X SSC, en estufa a 37ºC por 1 hora (50 µl por preparación, cubiertos con film plástico).
- Tres lavados, cada uno por 5 minutos en 60 ml de 2X SSC.
- Tratamiento con pepsina [0,01 mg/ml] (dil. 1:100 de 1 mg/ml de pepsina en HCl 0,01 N), en estufa a 37ºC por 20 minutos.
- Tres lavados, cada uno por 5 minutos en 60 ml de 2X SSC.
- Fijación a TA en 3,7 % de formaldehído diluido en 1X PBS por 10 minutos.
- Tres lavados, cada uno por 5 minutos en 60 ml de 2X SSC.
- Deshidratación progresiva de las preparaciones en etanol 70 % (3 minutos) y 100 % (3 minutos).
- Secado 1 hora a TA en una gradilla tapada.
- Preparación de la solución de hibridación (SH o Mezcla Madre) en tabla 4.

TABLA 4. Solución de hibridación (SH)

[ ] STOCK producto	**[ ] final en SH**
Formamida 100 %	50%
20 X SSC	2 X
Dextran Sulfato50 %	7,5 %
H_2O	Pcv
Sonda TR800 [50 ng/µl]	1 µl/10
Total de volumen por preparación	10 µl

A partir de este momento se procede en oscuridad.

- Desnaturalización de la SH +sonda TR800 a 75ºC por 10 minutos.
- Colocación del tubo en hielo por 5 minutos. Centrifugación leve al finalizar el tiempo.
- Adición de 10 µl de la mezcla (SH + sonda) sobre cada preparación.
- Desnaturalización de preparaciones + SH en bloque térmico a 75ºC por 6 minutos.
- Sellado de las preparaciones con pegamento y colocación en cámara húmeda.
- Hibridación toda la noche en estufa a 37ºC.

DÍA 2 FISH: Lavados post hibridación y tinción de los cromosomas con DAPI

- Retirado de cubreobjetos en un coplin con 60 ml de 2X SSC.
- Lavado (2 veces) a 42ºC por 5 minutos en 60 ml de 2X SSC.
- Lavado (2 veces) a 42ºC por 5 minutos en 60 ml de 0,1X SSC.
- Lavado (1 vez) a 42ºC por 5 minutos en 60 ml de 2X SSC.
- Transferencia de las preparaciones a 60 ml de 2X SSC a TA.
- Adición de una gota de DAPI diluido en 2X SSC [2 μg/ml] a cada preparación. Colocación de cubreobjetos e incubación en oscuridad por 10 minutos.
- Montaje definitivo de las preparaciones en montante comercial Vectashield H-100 (*VectoLAb*), con cubres de 24 x 24 sellados con esmalte.
- Almacenaje a -20°C hasta su observación y análisis al microscopio, preservados de la luz.

II.iv. MICROSCOPÍA, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE BANDEO C

Los preparados de *T. infestans* sometidos a la técnica de bandeo C fueron analizados al microscopio óptico (Nikon Microphot-FX) y el patrón de distribución de bandas C fue esquematizado en un cuaderno de registro. Para cada individuo se fotografiaron imágenes de mitosis, metafase I y/o metafase II para poseer un registro por individuo de la distribución de las bandas C.

Los patrones de bandeo C fueron establecidos por individuo y localidad a partir de preparaciones cromosómicas de meiosis y mitosis goniales en el caso de los machos. En las hembras, la determinación se llevó a cabo solo por la observación de imágenes de mitosis goniales. La identificación de cada par autosómico fue realizada en función del tamaño, siendo posible la identificación de los primeros cuatro pares (*I* a *IV*). Los restantes pares autosómicos (*V* al *X)* se agruparon en una única clase debido a la imposibilidad de diferenciarlos entre sí por el tamaño u otro criterio. Los resultados fueron ingresados en tablas, a partir de las cuales se calcularon la media y el desvío estándar, y se construyeron gráficos mediante Excel.

Para cada individuo analizado por bandeo C, se determinaron los siguientes parámetros:

- Número de cromosomas autosómicos por complemento diploide con y sin bloques de heterocromatina, de acuerdo al criterio de clasificación cromosómico establecido por Panzera y cols. (1992) (Figura 17). El número total de autosomas heterocromáticos de un individuo resulta de la suma de sus cromosomas Tipo A (bloque C en un solo extremo) y tipo B (bloques C en ambos extremos cromosómicos) (Figura 17).
- Número de autosomas con bandas C intersticiales.
- Cromosoma sexual X con o sin heterocromatina C.
- Número de cromosomas supernumerarios.

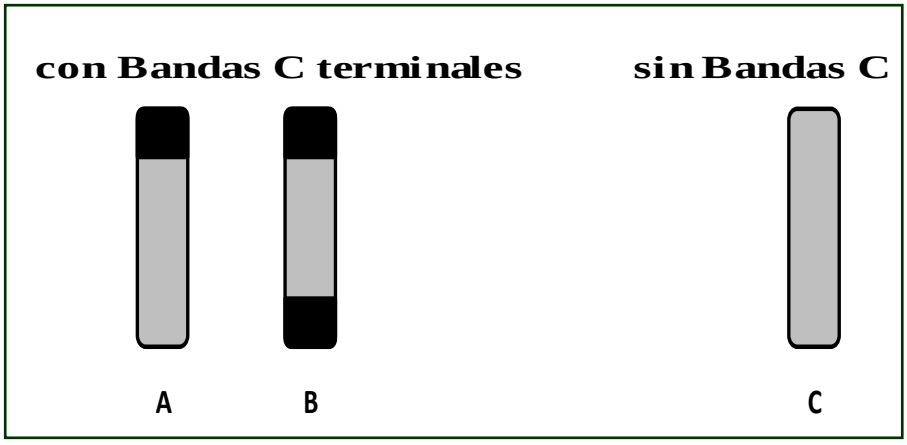

FIGURA 17. Clasificación cromosómica por bandas C. Los autosomas heterocromáticos con bandas C terminales se subdividen en: Tipo A (heterocromatina en un extremo cromosómico) y Tipo B (heterocromatina en ambos extremos). Los cromosomas sin heterocromatina se denominan Tipo C.

Para cada grupo de localidades de colecta se establecieron las siguientes variables:

- La media y el desvío estándar del número de cromosomas heterocromáticos, calculados a partir del número de cromosomas heterocromáticos de cada individuo (suma de cromosomas A+B).
- Promedio de individuos con: cromosomas tipo A, B y C, cromosomas con bandas autosómicas intersticiales (I), cromosomas X con heterocromatina y cromosomas supernumerarios, los cuales fueron expresados en porcentajes.

- Variabilidad de los tipos cromosómicos A, B y C para los diversos pares autosómicos (*I* a *IV* y *V-X*), expresada y graficada como frecuencias relativas a cada localidad.

Finalmente, se definieron y caracterizaron patrones cariotípicos generales, compartidos entre grupos de localidades y exclusivos de cada grupo de localidades analizado. Se contabilizó el número de patrones cariotípicos hallados y se calculó el índice de variabilidad de patrones cariotípicos, corregido por el número de individuos caracterizados en cada localidad, como cociente entre el número de patrones cariotípicos de la localidad y el número de individuos caracterizados en la misma, siendo 0 la localidad menos variable y 1 la más variable.

II.v. MICROSCOPÍA, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE FISH

Las imágenes de hibridaciones *in situ* fueron fotografiadas mediante un microscopio de fluorescencia (Axioplan2 HAL 100 Imaging Zeiss) ubicado en el Departamento de Genética Toxicológica del IIBCE, gentilmente cedido por el Dr. Folle. Además se utilizó un microscopio Nikon Modelo Eclipse 50i de la Facultad de Ciencias, recientemente adquirido con fondos de un proyecto CSIC. Las imágenes se capturaron y visualizaron en la computadora mediante los softwares acoplados a los microscopios antes mencionados (Programa Issis y Programa Nikon NIS elements F), y fueron almacenadas en formato tif para su posterior procesamiento y análisis.

El procesamiento detallado de las fotografías obtenidas fue realizado mediante el software comercial de imágenes Adobe Photoshop. Se ajustaron los valores de brillo y contraste y se combinaron los canales correspondientes al fluorocromo DAPI (azul) y a la señal Cy3 de la sonda ribosomal (rojo) en una sola imagen en cada fase celular fotografiada. Los individuos fueron clasificados en base a los patrones de señal ribosomal exhibidos.

RESULTADOS

I. CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA MEDIANTE BANDEO C

Mediante bandeo C, se analizó el patrón de distribución de la heterocromatina constitutiva en 263 individuos de *T. infestans*. Las características citogenéticas de cada individuo y localidad de procedencia se detallan en el Anexo. En la Tabla 5 se presenta el resumen general de los resultados obtenidos agrupando los individuos por Provincia y/o Departamento.

A continuación describiremos las principales características citogenéticas analizadas.

I.i. Resultados generales del análisis por bandeo C de las poblaciones de *T. infestans*

Autosomas con regiones heterocromáticas. Bandas C terminales

Considerando el número de autosomas con bloques heterocromáticos terminales (suma de cromosomas tipo A y B) (Figura 17), fue posible clasificar a la mayoría de los individuos de *T. infestans* analizados dentro de los dos grupos cromosómicos previamente definidos por Panzera y cols. (2004):

Grupo Andino: Entre 13 y 18 autosomas con bloques C heterocromáticos terminales, con una media de 15.22 y un desvío estándar de 1.24. Cuarenta y un (41) individuos pertenecientes a poblaciones de los valles andinos e interandinos de Bolivia (Departamentos de Cochabamba, Chuquisaca y Potosí) y de regiones andinas y de baja altitud de Perú (Departamentos de Arequipa e Ica, respectivamente) (Figura 18 A-B-C).

Grupo No-Andino: Entre 4 y 7 autosomas con bloques C heterocromáticos terminales, con una media de 5.79 y un desvío estándar de 0.58. Ciento treinta y nueve (139) individuos pertenecientes a poblaciones de Paraguay y Argentina (Provincias del Chaco, Catamarca, Santiago del Estero, Formosa, La Rioja y Salta, a excepción de Salvador Mazza) (Figura 18 D-E-F).

Los restantes individuos analizados no pudieron clasificarse dentro de ninguno de los grupos cromosómicos previos, por presentar un número intermedio de autosomas con heterocromatina terminal. Fueron por tanto clasificados dentro de un

tercer grupo, descrito por primera vez en este trabajo, al que denominamos Grupo Intermedio:

Grupo Intermedio: Entre 6 y 11 autosomas con bloques C heterocromáticos terminales, con una media de 8.18 y un desvío estándar de 1.09. Ochenta y siete (83) individuos pertenecientes a la localidad de Salvador Mazza (Provincia de Salta, Argentina) y localidades del Departamento de Tarija (Provincia de Gran Chaco, Bolivia), (Figura 18 G-H-I).

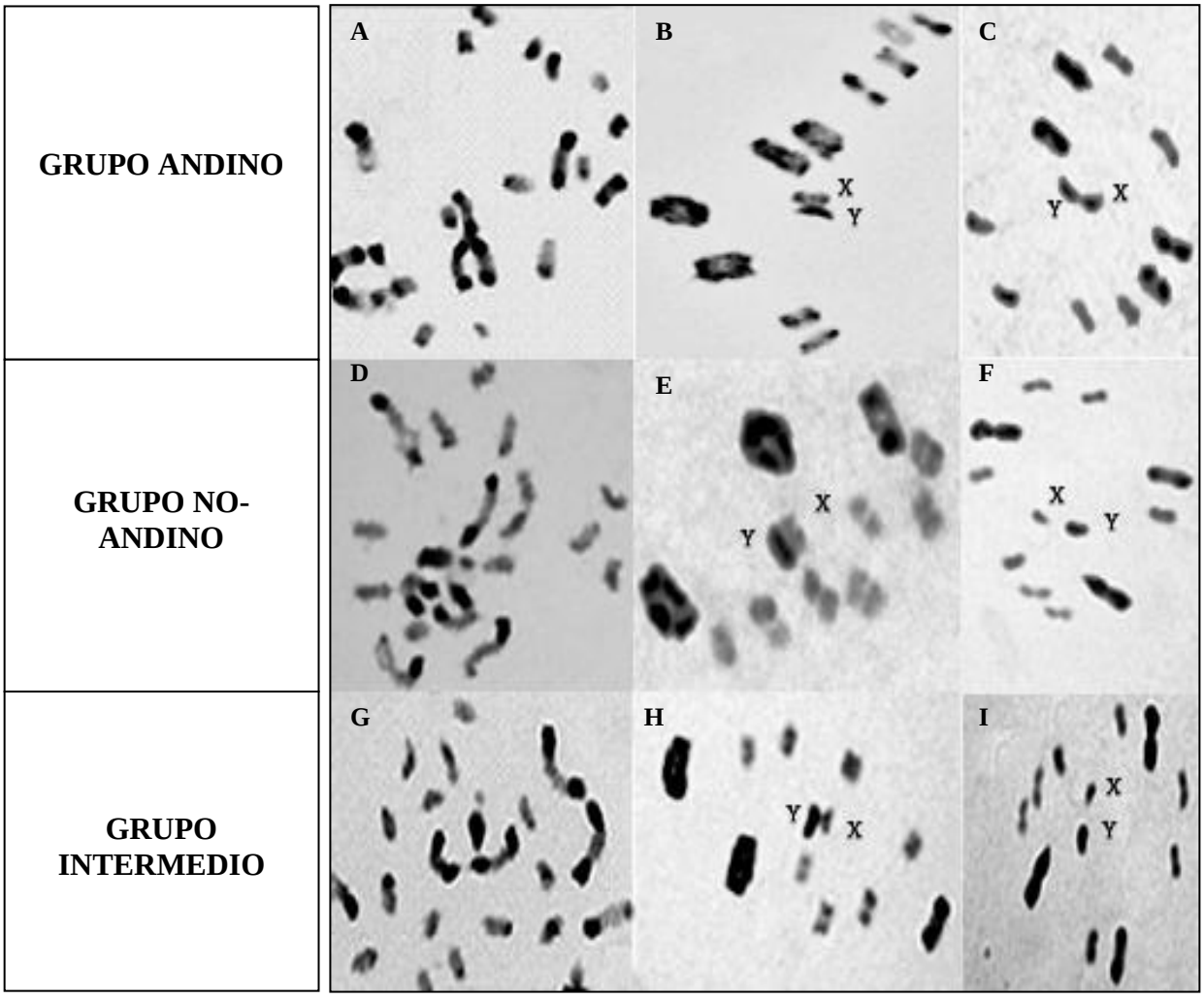

FIGURA 18. **Clasificación por bandeo C de los grupos cromosómicos de *Triatoma infestans.*** Imágenes de metafases mitóticas (A, D, G), metafases meióticas I (B, E, H) y metafases II meióticas (C, F, I). **Grupo Andino (A-C):** Presenta el mayor número de autosomas heterocromáticos. Se distribuye en Perú y los valles andinos de Bolivia (Dptos. Cochabamba, Chuquisaca y Potosí). **Grupo No-Andino (D-F):** Presenta el menor número de autosomas heterocromáticos. Se distribuye en Paraguay y Argentina (excepto Salvador Mazza en Salta). **Grupo Intermedio (G-I):** Presenta un número de autosomas heterocromáticos intermedio al de los otros dos grupos cromosómicos. Se distribuye en Argentina (Salvador Mazza, Salta) y Bolivia (Dpto. de Tarija).

De aquí en adelante se expondrán los resultados del análisis de los diversos grupos de localidades en función de la clasificación en grupos cromosómicos.

La Figura 19, representa el porcentaje relativo de cada tipo de cromosoma (A, B o C) en relación al número total de autosomas (20), en los tres grupos cromosómicos. Claramente se observa una disminución de las frecuencias de cromosomas heterocromáticos (tipos A y B), desde el Grupo Andino, pasando por el Intermedio y finalmente el No-Andino. Esta disminución es mucho más acentuada en los cromosomas tipo A que en los del tipo B. Como consecuencia de lo anterior, se observa un incremento en las frecuencias de cromosomas no heterocromáticos (tipo C) desde el Grupo Andino al Grupo No-Andino.

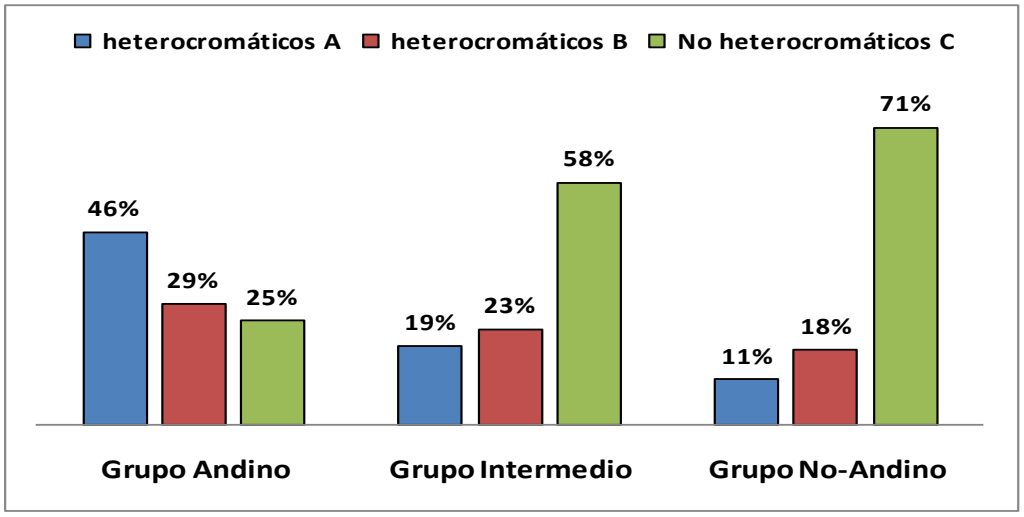

FIGURA 19. **Porcentaje de autosomas con y sin heterocromatina en *T. infestans*.** Las barras representan el porcentaje promedio de autosomas heterocromáticos (de tipo A y B), y no-heterocromáticos (tipo C). El Grupo Andino presenta el mayor porcentaje de cromosomas heterocromáticos (75 %). El Grupo Intermedio muestra un porcentaje intermedio de cromosomas heterocromáticos (42 %), mientras que el Grupo No-Andino exhibe el menor porcentaje de cromosomas heterocromáticos (29 %). La mayor frecuencia de cromosomas A y B se observa en el Grupo Andino, y la menor en el Grupo No-Andino, mientras que es intermedia en el Grupo Intermedio. La frecuencia de cromosomas C muestra una tendencia opuesta.

Autosomas heterocromáticos. Bandas C intersticiales

Las bandas C intersticiales, a diferencia de las C terminales, se observan en frecuencias muy distintas, incluso dentro de localidades pertenecientes a un mismo grupo cromosómico (Tabla 5 y Figura 20). Las poblaciones del Grupo Intermedio son las que presentan mayor porcentaje de individuos con bandas C intersticiales (91 % en Salvador

Mazza y 33 % en las localidades de Tarija, con una media de 62 %). Las poblaciones del Grupo Andino presentan un 30 % de individuos con autosomas con bandas intersticiales. Las poblaciones del Grupo No-Andino son muy variables: algunas como las de Paraguay, Formosa y La Rioja (Argentina) no presentan cromosomas con bandas intersticiales, mientras que en las localidades del Chaco (Argentina) los porcentajes varían entre un 4 % y un 32 % (con una media de 8 %).

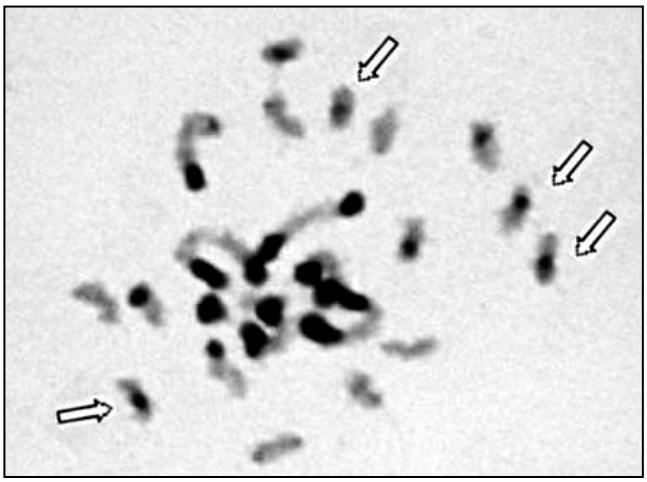

FIGURA 20. **Bandas C autosómicas intersticiales (I) en *T. infestans*.** Prometafase mitótica gonial de un individuo perteneciente al Grupo Intermedio. Las flechas señalan algunos de los autosomas con bandas C intersticiales.

Cromosomas sexuales heterocromáticos

Todos los individuos analizados presentan dos cromosomas sexuales: XX en las hembras y XY en los machos. El cromosoma Y es siempre heterocromático en los tres grupos cromosómicos, mientras que el cromosoma X puede ser eucromático o heterocromático (Tabla 5 y Figura 21). La totalidad de individuos del Grupo Andino presenta cromosomas X heterocromáticos. La totalidad de individuos del Grupo No-Andino poseen cromosomas X sin heterocromatina. En el Grupo Intermedio, el porcentaje de individuos con cromosoma X heterocromático varía entre un 14 % y un 30 % (media de 22 %).

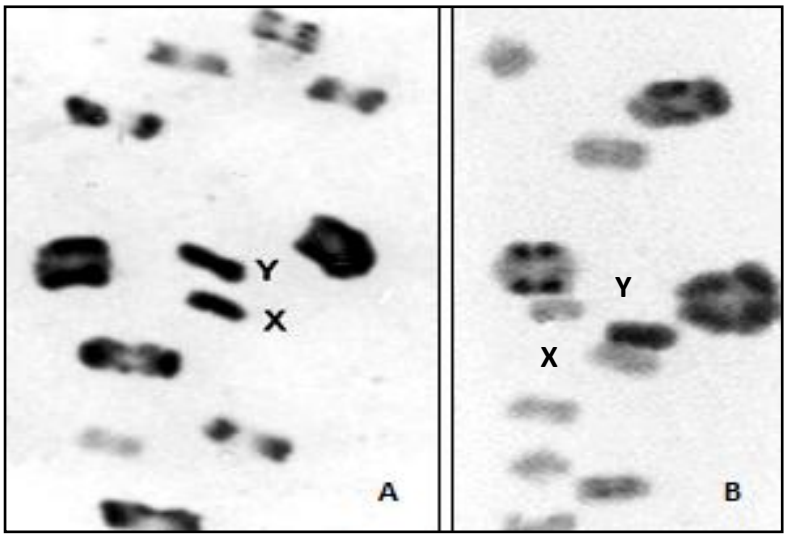

FIGURA 21. Cromosomas sexuales en *T. infestans*. Metafase I. (A) Grupo Andino. (B) Grupo No-Andino.

Cromosomas supernumerarios

Algunas de las poblaciones analizadas presentan individuos portadores de cromosomas supernumerarios (o cromosomas B), tanto eucromáticos como heterocromáticos. Estos cromosomas adicionales al complemento normal se encuentran en número variable, incluso dentro de un mismo individuo (de 1 hasta 3) (Figura 22 y Anexo). En todos los casos fueron observados exclusivamente en mitosis, nunca en meiosis, siendo siempre los más pequeños del complemento.

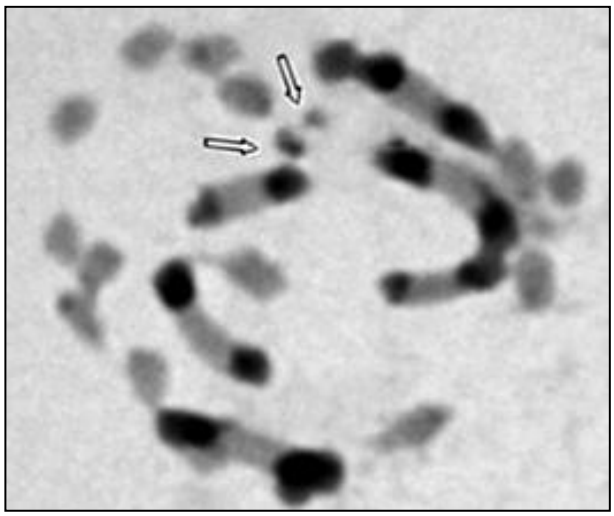

FIGURA 22. Cromosomas supernumerarios en *T. infestans*. Prometafase mitótica gonial. Las flechas muestran un cromosoma supernumerario eucromático y otro heterocromático (más oscuro).

El análisis de la frecuencia de cromosomas B por grupo de localidades reveló una gran variación en este parámetro (Tabla 5). Las poblaciones del Grupo Andino no presentan cromosomas supernumerarios detectables. La localidad de Salvador Mazza (Grupo Intermedio) es la que exhibe mayor porcentaje de individuos con estos cromosomas extra (83 %), seguida de las localidades no andinas del Chaco (34 %). En las restantes localidades del Grupo No-Andino el porcentaje de individuos que presentan estos cromosomas varía entre 0 y 17 % (media de 12 %).

TABLA 5. **Resumen de resultados del análisis de poblaciones de *T. infestans* por bandeo C**

Grupo cromosómico	Grupos de localidades	Número de individuos	% Autosomas heterocromáticos	% individuos con:		
				Cromosoma X heterocromático	Bandas C intersticiales	Cromosomas supernumerarios
ANDINO	Potosí/Cochabamba/Chuquisaca	23	75%	100%	100%	0%
	Perú	18	77%	100%	100%	0%
INTERMEDIO	Salta (S. Mazza)	52	42%	14%	14%	83%
	Tarija	31	42%	30%	30%	15%
NO-ANDINO	Paraguay	37	30%	0%	0%	0%
	Chaco	33	29%	0%	0%	34%
	Catamarca	27	30%	0%	0%	7%
	Salta (San Carlos y La Unión)	6	30%	0%	0%	17%
	Santiago del Estero	24	26%	0%	0%	4%
	Formosa	5	30%	0%	0%	0%
	La Rioja	7	32%	0%	0%	0%

I.ii. Análisis de la variabilidad de los pares autosómicos en poblaciones de *T. infestans*

Considerando los tres tipos de cromosomas descritos por Panzera y cols. (1992), se pueden definir hasta seis variantes de pares autosómicos (Figura 23).

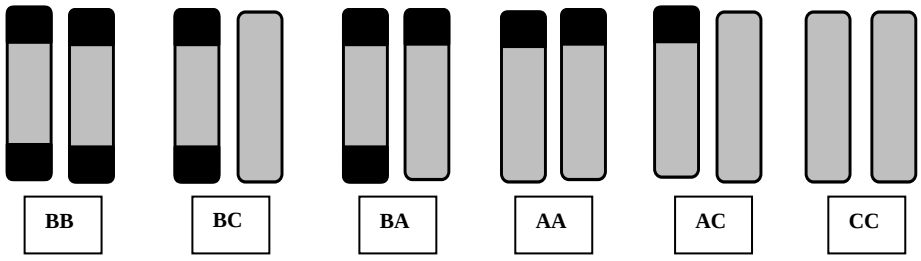

FIGURA 23. Esquema de las posibles variantes de pares autosómicos en *T. infestans*

Las seis variantes fueron encontradas únicamente en el par autosómico *III*, y cinco de ellas en el par *IV*, resultando ser por tanto los pares cromosómicos más variables (Tabla 6). El resto de los pares autosómicos muestran una menor variabilidad, presentando entre dos y tres variantes cada uno (Tabla 6).

TABLA 6. **Variabilidad de pares autosómicos en *T. infestans***

Total variantes/par cromosómico	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*
	3	**3**	**6**	**5**	**Promedio de 3**

A continuación se muestran los resultados del análisis de variabilidad de los 10 pares autosómicos discriminados por grupo cromosómico. En todos los grupos se observa que los pares *I-II* son siempre heterocromáticos y que a partir del par *IV*, la variante de par autosómico con ambos homólogos no-heterocromáticos (CC) es la más frecuente.

El Grupo Andino (Bolivia y Perú; N= 41) exhibe una mayor variabilidad de pares autosómicos respecto a los otros dos grupos, a pesar de que se analizó un menor número de individuos. (Figura 24)

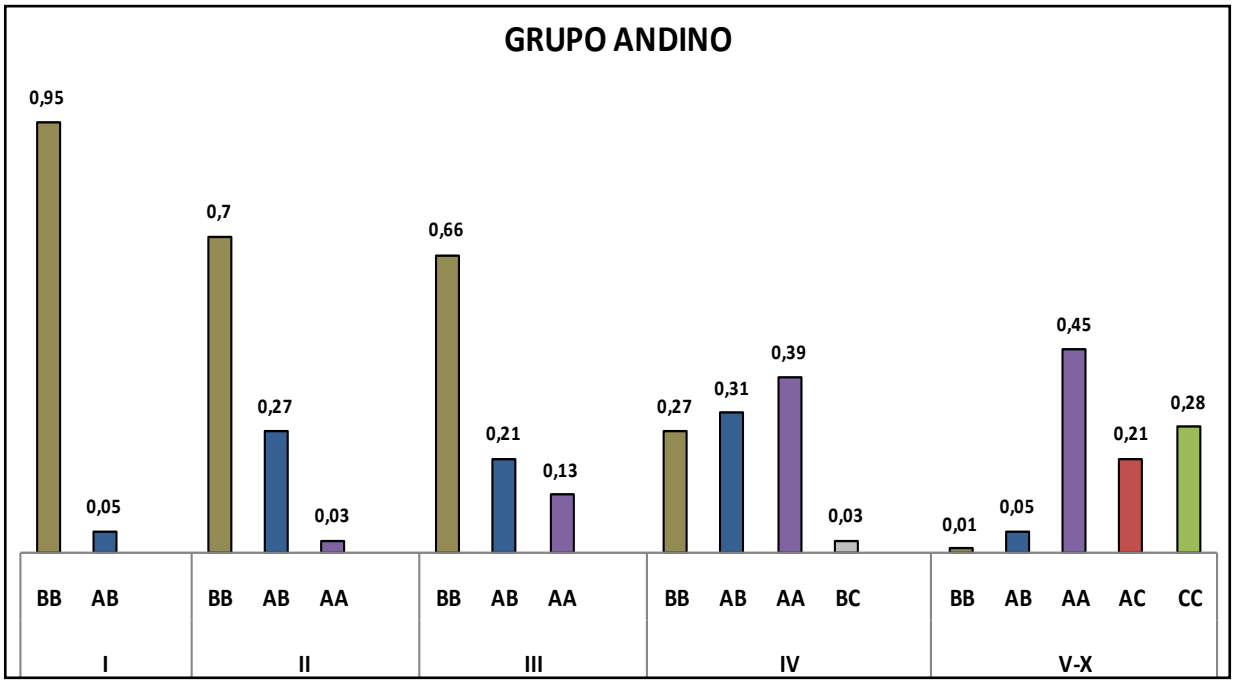

FIGURA 24. Variantes de pares autosómicos del Grupo Andino. Las barras representan las frecuencias promedio de variantes autosómicas. Las poblaciones andinas de Bolivia y Perú presentan variabilidad en sus 10 pares autosómicos (entre 2-5 variantes por par).

Los individuos del Grupo Intermedio (Salvador Mazza y Tarija; N= 83) presentan una variabilidad de pares autosómicos intermedia respecto a los otros dos grupos cromosómicos (Figura 25).

El Grupo No-Andino (N= 139) es el menos variable respecto a los pares autosómicos (Figura 26), a pesar de que se analizó un mayor número de individuos que en los otros dos grupos.

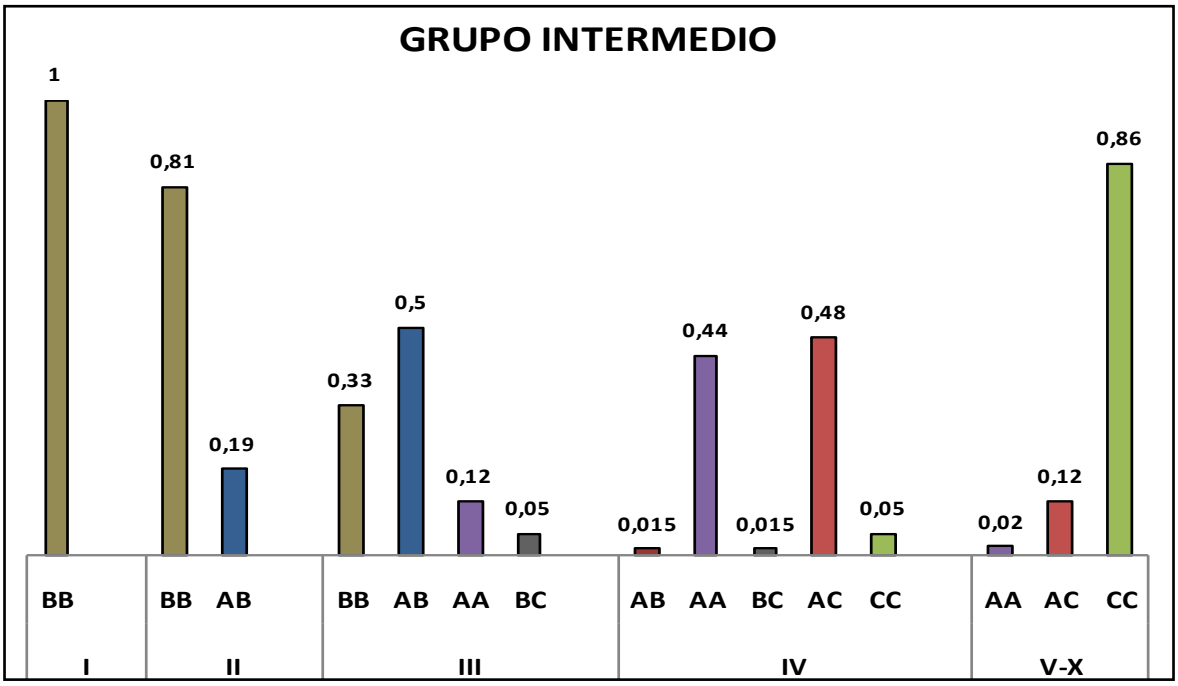

FIGURA 25. **Variantes de pares autosómicos en el Grupo Intermedio.** Las poblaciones de S. Mazza y Tarija presentan 9 de sus 10 pares autosómicos variables (1 a 5 variantes por par). El par *I* es siempre constante.

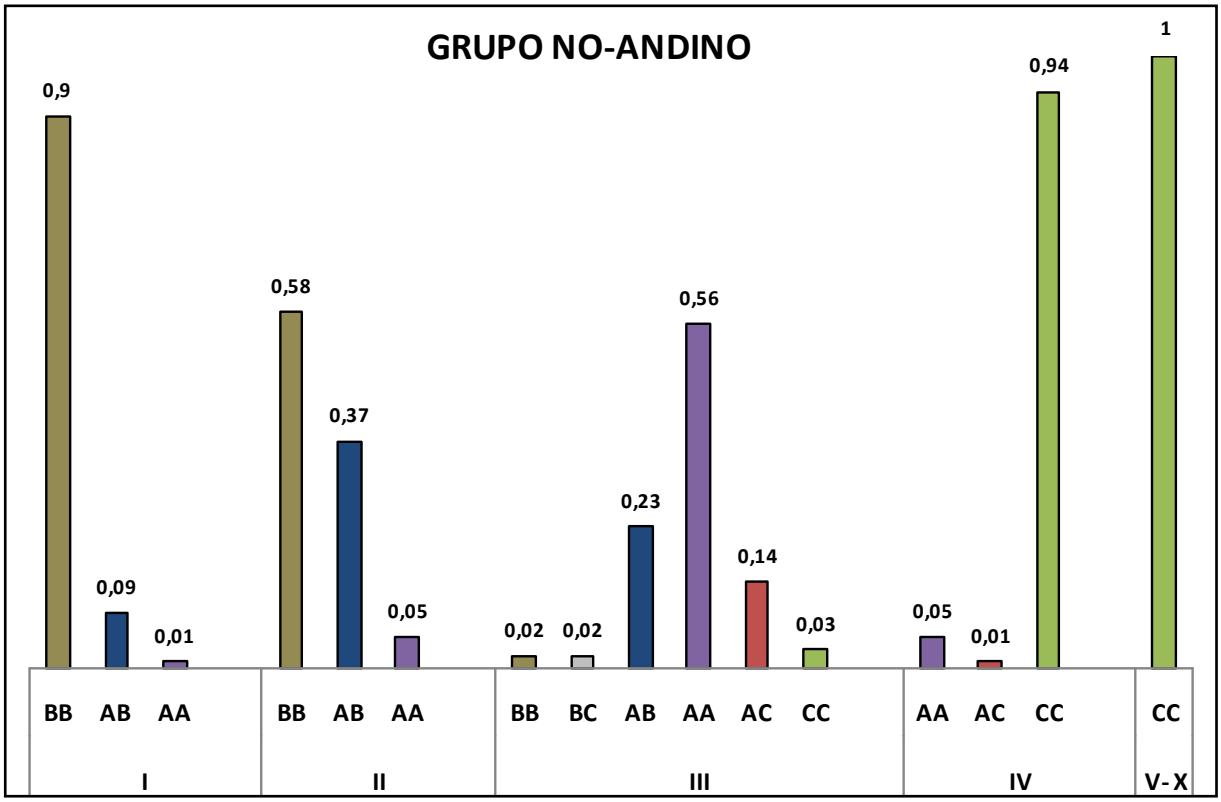

FIGURA 26. Variantes de pares autosómicos en el Grupo No-Andino. Las barras representan las frecuencias de variantes autosómicas. Las poblaciones no andinas presentan variabilidad en 4 de sus 10 pares autosómicos (entre 1-6 variantes por par). Los pares *V-X* son siempre constantes.

En resumen, analizando los resultados de la variabilidad de los pares autosómicos de los tres grupos cromosómicos en conjunto (Figuras 24-26), se observa una disminución de la variabilidad desde el Grupo Andino, pasando por el Intermedio, hasta llegar al No-Andino. Esto no es demasiado evidente en principio, ya que el número de individuos analizados en cada grupo es muy variable, pero se observa claramente si corregimos el número de patrones hallados dividiendo entre el número de individuos analizado en cada grupo (Tabla 7).

TABLA 7. Variabilidad de pares autosómicos de *T. infestans*

GRUPOS CROMOSÓMICOS	PARES AUTOSÓMICOS	N° variantes	N° individuos	Índice de Variabilidad*
ANDINO (A)	*I*	2	41	0,5 **(1)**
	II	3		0,7 **(1)**
	III	3		0,7 **(1)**
	IV	4		1 **(1)**
INTERMEDIO (I)	*I*	1	83	0,1 **(3)**
	II	2		0,2 **(2)**
	III	4		0,5 **(2)**
	IV	5		0,6 **(2)**
NO-ANDINO (NA)	*I*	3	139	0,2 **(2)**
	II	3		0,2 **(3)**
	III	6		0,4 **(3)**
	IV	4		0,3 **(3)**

***** 0 ≤ Indice de variabilidad ≤ 1, siendo 0 el menos variable y 1 el más variable. Calculado como el n° de variantes/n° individuos caracterizados, por 10. Los números 1-3 entre paréntesis indican el grado de variabilidad para cada par *I –IV* de un grupo cromosómico respecto a los otros, siendo (1) el más variable y (3) el menos variable. En todos los casos, a excepción del par *I*, se observa variabilidad decreciente entre los grupos, en el siguiente orden: A > I > NA.

I.iii. Análisis de la variabilidad de patrones cariotípicos definidos por bandeo C en *T. infestans*

El análisis de individuos de *T. infestans* mediante bandeo C y la clasificación de sus pares autosómicos *I* a *IV* (cromosomas de tipo A, B o C), permitió definir patrones cariotípicos. El número de patrones cariotípicos y el índice de variabilidad corregido por el número de individuos caracterizados en cada grupo de localidades se resumen en la Tabla 8.

TABLA 8. Variabilidad de patrones cariotípicos de *T. infestans* determinados por bandeo C

GRUPO	GRUPO DE LOCALIDADES	N° patrones cariotípicos	N° Individuos	Índice de variabilidad patrones (I-IV*)	Índice de variabilidad promedio
ANDINO	Cochabamba Chuquisaca Potosí (Bolivia)	15	23	0,66	0,47
	Arequipa e Ica (Perú)	5	18	0,28	
INTERMEDIO	Salvador Mazza (Salta, Argentina)	10	52	0,19	0,29
	Tarija (Bolivia)	12	31	0,38	
NO-ANDINO	Paraguay	8	37	0,22	0,4
	Chaco (Argentina)	8	33	0,24	
	Catamarca (Argentina)	10	27	0,37	
	S. Carlos/La Unión (Salta, Argentina)	4	6	0,65	
	Santiago del Estero (Argentina)	9	24	0,38	
	Formosa (Argentina)	2	5	0,4	
	La Rioja (Argentina)	4	7	0,57	

***** 0 ≤ Indice variabilidad ≤ 1, siendo 0 el menos variable y 1 el más variable. Calculado como el número de patrones cariotípicos/ número de individuos caracterizados en cada grupo de localidades.

Las localidades bolivianas del Grupo Andino fueron las que exhibieron mayor variabilidad de patrones cariotípicos. Las localidades no andinas de Salta y La Rioja (Argentina), presentaron también índices de variabilidad altos (mayores a 0,5). El resto de las localidades pertenecientes al Grupo No-Andino y las poblaciones del Grupo Intermedio, presentaron índices de variabilidad bajos y similares (entre 0,2 y 0,4), siendo la localidad de Salvador Mazza (Grupo Intermedio) la menos variable.

Se encontraron patrones cariotípicos exclusivos de cada grupo de localidades (Tabla 9) y patrones cariotípicos compartidos entre localidades de los tres grupos cromosómicos (Tabla 10). Debemos considerar que estos cariotipos fueron construídos únicamente a partir de los pares autosómicos *I* a *IV* (pares más fáciles de identificar inequívocamente debido a las características cromosómicas de la especie). Por esta razón, el número de patrones cariotípicos exclusivos de las localidades de los grupos Intermedio y Andino, que presentan diversas variantes de pares *V-X*, está levemente subestimado (Figuras 24 y 25). Sin embargo, esto no afecta al Grupo No-Andino que sólo presenta una única variable CC en estos pares restantes no considerados (Figuras 26). De la misma forma, debido a que el 86 % y el 100 %

de los pares *V-X* del Grupo Intermedio y No-Andino respectivamente presentan siempre la misma variante CC (Figuras 25 y 26), la consideración únicamente de los pares autosómicos *I-IV* para identificar cariotipos compartidos entre grupos de localidades, no afecta en gran medida nuestro análisis. Puede existir una leve subestimación de cariotipos compartidos principalmente entre el Grupo Andino y el Intermedio, y una leve sobreestimación de cariotipos compartidos entre los grupos Intermedio y No-Andino.

A) Patrones cariotípicos de T. infestans exclusivos de cada grupo de localidades

Grupo Andino:

Las poblaciones de Bolivia, con 15 patrones cariotípicos diferentes definidos por sus pares autosómicos *I-IV*, presentan el mayor índice de variabilidad (0.66) (Tabla 8). Nueve cariotipos son exclusivos de estas poblaciones y representan 43 % de los individuos analizados (Tabla 9). Las poblaciones de Perú presentan 5 patrones cariotípicos (Tabla 8), uno de los cuales es exclusivo, representando un 6 % de los individuos analizados en ellas (Tabla 9).

Grupo Intermedio:

La población de Salvador Mazza presenta 10 patrones cariotípicos, exhibiendo el menor índice de variabilidad (Tabla 8). Uno de ellos es exclusivo y representa un 13 % de los individuos analizados en la población (Tabla 9). Las poblaciones de Tarija presentan 12 patrones cariotípicos (Tabla 8), dos de los cuales son exclusivos y representan un 16 % de los individuos (Tabla 9).

Grupo No-Andino:

Las poblaciones de Paraguay presentan 8 patrones cariotípicos (segundo grupo de localidades menos variable, Tabla 8). Uno de ellos es exclusivo y representa un 13 % de los individuos (Tabla 9). Las poblaciones del Chaco argentino presentan 8 patrones cariotípicos (tercer grupo de localidades menos variable, Tabla 8). Tres de ellos son exclusivos y representan un 30 % de los individuos (Tabla 9). Las poblaciones de Catamarca (Argentina) exhiben 10 patrones cariotípicos (Tabla 8), dos de los cuales son exclusivos y representan un 7 % de los individuos (Tabla 9). San Carlos y La Unión (Salta, Argentina), presentan un índice de variabilidad de patrones cariotípicos alto de 0.65 (segunda posición, luego de Bolivia, Tabla 8). No se encontró ningún patrón exclusivo de estas localidades (Tabla 9). Las localidades de Santiago del Estero (Argentina), exhiben 9 patrones cariotípicos (Tabla 8), tres

de los cuales son exclusivos (25 % de los individuos, Tabla 9). Formosa (Argentina) presenta un índice de variabilidad bajo y ningún patrón exclusivo (Tablas 8 y 9). Por último, las poblaciones argentinas de La Rioja (tercera población más variables en cuanto a patrones cariotípicos, Tabla 8), tampoco presentan patrones exclusivos (Tabla 9).

TABLA 9. Patrones cariotípicos exclusivos de cada grupo de localidades

GRUPO CROMOSÓMICO	Grupos de localidades- proporción de patrones exclusivos*					Nº de individuos con patrones exclusivos**
ANDINO	**Cochabamba/ Chuquisaca/ Potosí (Bolivia) - (9/15= 0,6)***					**10/23 (0,43)**
	Pares cromosómicos	*I*	*II*	*III*	*IV*	
	Patrón 1	BB	AB	BB	BB	2
	Patrón 2	BB	AB	BB	AA	1
	Patrón 3	BB	AB	BB	AB	1
	Patrón 4 (B)	BB	AB	AA	AB	1
	Patrón 5 (S)	BB	AB	AB	BC	1
	Patrón 6 (M)	BB	AA	AA	AA	1
	Patrón 7 (C)	AB	AA	AA	AA	1
	Patrón 8 (S)	AB	AB	AA	AA	1
	Patrón 9 (S)	AB	BB	BB	BB	1
	Arequipa e Ica (Perú) - (1/5= 0,2)*					**1/18 (0,06)**
	Pares cromosómicos	*I*	*II*	*III*	*IV*	
	Patrón 1	BB	BB	AB	AB	1
INTERMEDIO	**Salvador Mazza (Salta, Argentina) - (1/10= 0,1)***					**7/52 (0,13)**
	Pares cromosómicos	*I*	*II*	*III*	*IV*	
	Patrón 1	BB	BB	BB	AC	7
	Departamento de Tarija (Bolivia) - (2/12= 0,17)*					**5/31 (0,16)**
	Pares cromosómicos	*I*	*II*	*III*	*IV*	
	Patrón 1	BB	BB	BC	AA	3
	Patrón 2 (Y)	BB	AB	AB	AC	2
NO-ANDINO	**Departamentos de Boquerón, Paraguari, San Pedro y Pte. Hayes (Paraguay) - (1/8= 0,13)***					**5/37 (0,13)**
	Pares cromosómicos	*I*	*II*	*III*	*IV*	
	Patrón 1	BB	BB	BB	CC	5
	Provincia del Chaco (Argentina) - (3/8= 0,38)*					**10/33 (0,3)**
	Pares cromosómicos	*I*	*II*	*III*	*IV*	
	Patrón 1	BB	BB	CC	CC	1
	Patrón 2	BB	AB	AC	CC	8
	Patrón 3	BB	AA	BC	CC	1
	Provincia de Catamarca (Argentina) - (2/10= 0,2)*					**2/27 (0,07)**
	Pares cromosómicos	*I*	*II*	*III*	*IV*	
	Patrón 1	BB	AB	AB	CC	1
	Patrón 2	AB	AA	AA	CC	1
	San Carlos y La Unión (Salta, Argentina) - (0/4= 0)*					**0/6 (0)**
	Provincia de Santiago del Estero (Argentina) - (3/9= 0,33)*					**6/24 (0,25)**
	Pares cromosómicos	*I*	*II*	*III*	*IV*	
	Patrón 1	AB	BB	AC	CC	2
	Patrón 2	AB	BB	CC	CC	3
	Patrón 3	AB	BB	BC	CC	1
	Provincia de Formosa (Argentina) - (0/2= 0)*					**0/5 (0)**
	Provincia de La Rioja (Argentina) - (0/4= 0)*					**0/7 (0)**

Cochabamba: B= Bandorniyoc, C= Cotapachi, M= Mataral; Chuquisaca: S= Sucre. Y= Yacuiba, E= Entre Ríos. B= exclusivo de Boquerón, P H= exclusivo de Pte Hayes. * Entre paréntesis se indica la proporción de cariotipos exclusivos de cada grupo de localidades analizado en relación al número total de cariotipos hallados en cada localidad. ** Entre paréntesis se indica la frecuencia de individuos con cariotipos exclusivos de cada grupo de localidades analizado**.**

B) Patrones cariotípicos de T. infestans compartidos entre grupos de localidades

El análisis de patrones cariotípicos de los 11 grupos de localidades muestreados, permitió identificar 21 cariotipos (I-XXI) compartidos entre diversas poblaciones (Tabla 10).

Existen dos patrones compartidos entre localidades del Grupo Andino (patrones I y II), uno entre localidades del Grupo Intermedio (patrón VI), y siete entre localidades del Grupo No-Andino (patrones XIV al XX). Cuatro patrones cariotípicos (III al V y XXI) fueron hallados compartidos entre localidades del Grupo Andino e Intermedio, y seis entre el Grupo Intermedio y el Grupo No-Andino (patrones VIII al XIII). No se encontró ningún patrón cariotípico exclusivamente compartido entre localidades de los grupos Andino y No-Andino.

TABLA 10. Patrones cariotípicos compartidos entre localidades y grupos cromosómicos

Patrones cariotípicos compartidos							
Pares cromosómicos	***I***	***II***	***III***	***IV***	**Grupos de localidades que lo comparten**		
Patrón I	BB	BB	BB	BB	A	2/11	Exclusivos Grupo Andino
Patrón II	BB	BB	BB	AB			
Patrón XXI	BB	BB	BB	AA	A + I	2/11	Perú (A) + S. Mazza (I)
Patrón III	BB	BB	AB	AA		4/11	Bolivia/Perú (A) + S. Mazza-Tarija (I)
Patrón IV	BB	AB	AA	BC		2/11	Bolivia (A) + Tarija (I)
Patrón V	BB	AB	AB	AB			
Patrón VI	BB	AB	AB	AA	I	2/11	Exclusivos Grupo Intermedio
Patrón VIII	BB	BB	AA	CC	NA + I	7/11	Todas las localidades no andinas
Patrón IX	BB	BB	AB	CC		4/11	S. Mazza (I) + S.Carlos/La Unión - Sgo. Estero- Parag. (NA)
Patrón X	BB	BB	AB	AC		3/11	S. Mazza- Tarija (I) + Paraguay (NA)
Patrón XI	BB	BB	AA	AC			S. Mazza - Tarija (I) + S.Carlos/La Unión (NA)
Patrón XII	BB	BB	AA	AA			S. Mazza- Tarija (I) + La Rioja (NA)
Patrón XIII	BB	AB	AA	AC			S. Mazza- Tarija (I) + Catamarca (NA)
Patrón XIV	BB	BB	AC	CC	NA	4/11	Paraguay- Chaco- Catamarca- Sgo. del Estero
Patrón XV	BB	AB	AA	CC		6/11	Paraguay- Chaco- Catamarca- Salta- Formosa- La Rioja
Patrón XVI	BB	AA	AA	CC		2/11	Chaco- Catamarca
Patrón XVII	BB	BB	BC	CC			Paraguay- Sgo. del Estero
Patrón XVIII	BB	AA	AC	CC			Chaco- Sgo. del Estero
Patrón XIX	AB	BB	AA	CC			Catamarca- Sgo. del Estero
Patrón XX	AB	AB	AA	CC			Catamarca - La Rioja

II. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DEL CLUSTER DE ADNr 45S POR FISH

II.i. Obtención y marcaje de la sonda TR800

Se amplificó por PCR con los cebadores específicos (TRIATO-F y TRIATO-R) diseñados a partir de la secuencia del ADNr 18S de *T. infestans*, publicada en la base de datos, el fragmento de 807 pb esperado (Figura 27). Posteriormente se confirmó su identidad por secuenciación automática y se realizó la clonación del amplicón (tal como se describe en detalle en Materiales y Métodos). Se generó así una sonda homóloga (TR800) del ADNr 18S de *T. infestans*.

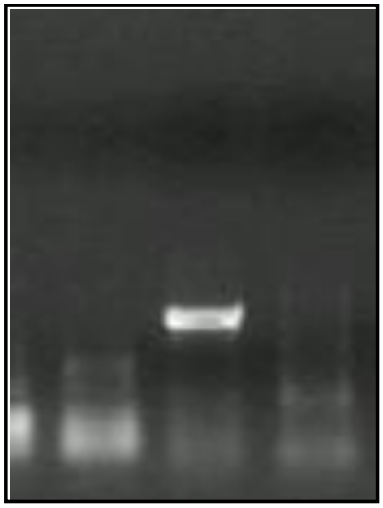

FIGURA 27. Electroforesis del producto de amplificación por PCR.

El ADN plasmídico se marcó posteriormente con el fluorocromo dUTP-Cy3 por el método de "Nick translation" (tal como se detalla en Materiales y Métodos). La incorporación exitosa del fluorocromo se chequeó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, y visualizada como un "smear" a la altura de la banda de 500pb del marcador de peso molecular *λ Hind III* (Figura 28).

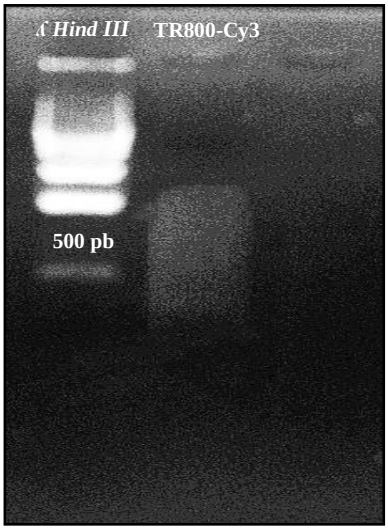

FIGURA 28. Gel de agarosa que muestra el resultado de la reacción de marcaje de la sonda TR800 con *Cy3-dUTP*.

La sonda TR800 así obtenida y marcada, fue empleada posteriormente para localizar por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) la posición cromosómica del cluster ADNr 45S en las diversas poblaciones de *T. infestans* analizadas.

II.ii. Localización del ADNr 45S por FISH con la sonda TR800

Se caracterizó por FISH la localización del cluster de ADN ribosómico 45S de individuos de *T. infestans* provenientes de 10 grupos de localidades (Tabla 1 Materiales y Métodos), discriminadas por grupo cromosómico.

POBLACIONES DEL GRUPO ANDINO

Se analizaron nueve individuos provenientes de poblaciones andinas de Perú y Bolivia, previamente asignadas por bandeo C al Grupo Andino. Todos los individuos presentaron un único locus para el cluster ADNr 45S localizado en uno de los bivalentes mayores, el par autosómico *III* (patrón Andino), tal como se observa en la Figura 29.

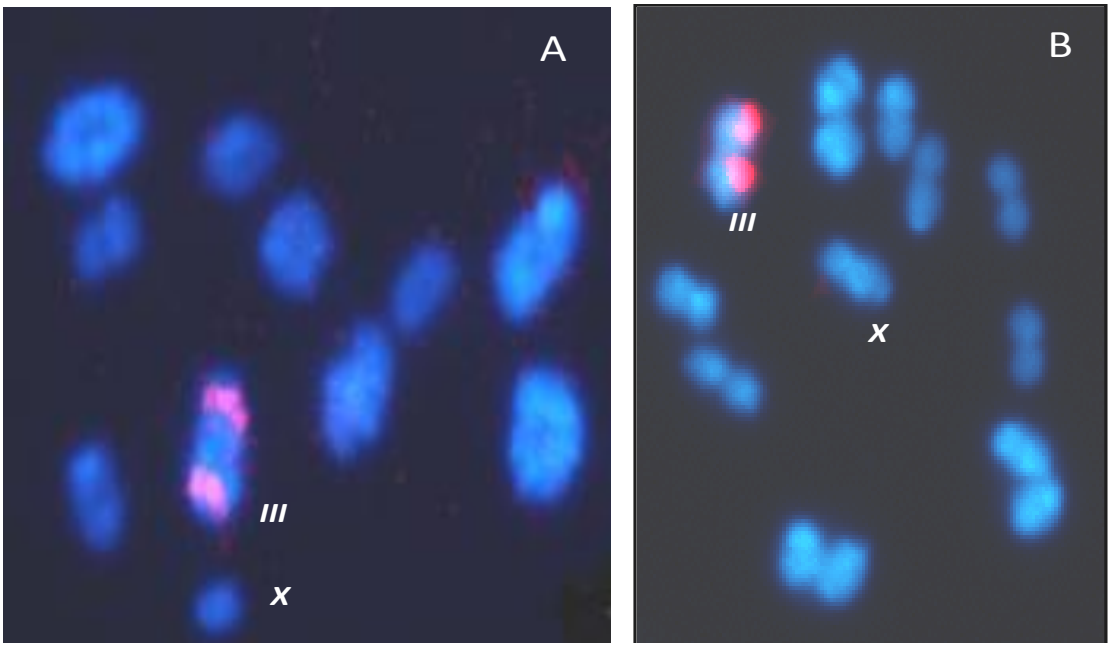

FIGURA 29. Localización por FISH del cluster de ADNr 45S en individuos de *T. infestans* del Grupo Andino. En azul se muestran los cromosomas teñidos con DAPI y en rojo la señal de la sonda ribosomal TR800. La señal de localización del ADNr 45S se localiza en el par autosómico *III* (patrón Andino)**(A)** Metafase I meiótica. **(B)** Metafase II meiótica.

POBLACIONES DEL GRUPO NO-ANDINO

Se analizaron nueve individuos provenientes de localidades no andinas de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Tabla 1 Materiales y Métodos), previamente asignadas por bandeo C al Grupo No-Andino. Todos los individuos presentaron un único locus para el cluster ADNr 45S localizado en el cromosoma sexual X (patrón No-Andino), tal como se observa en la Figura 30.

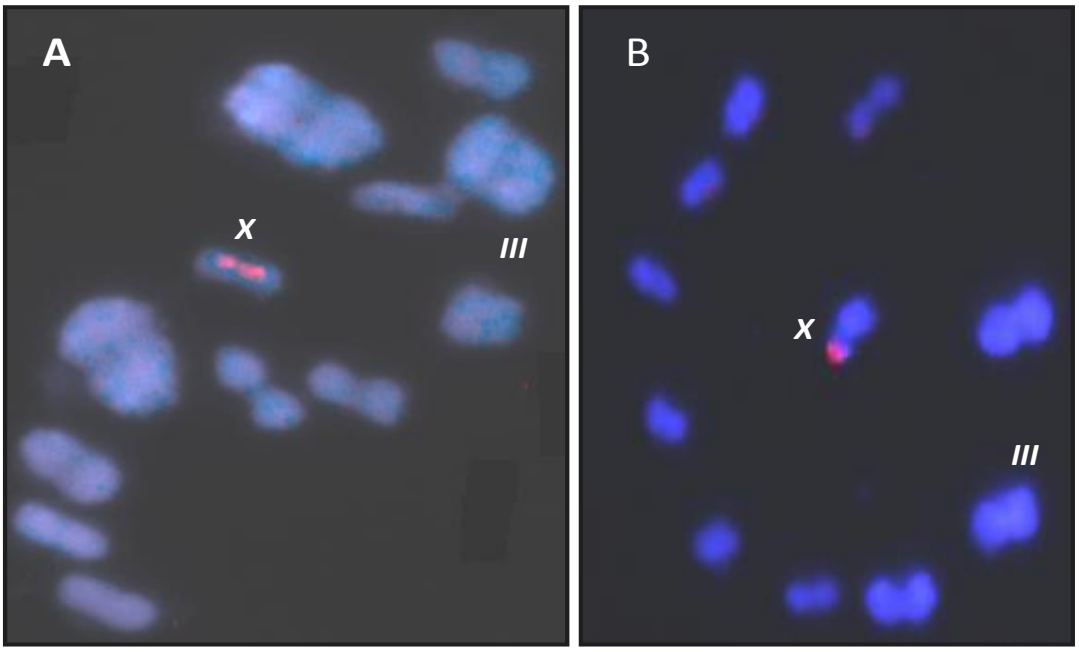

FIGURA 30. Localización por FISH del cluster de ADNr 45S en individuos del Grupo No-Andino. En azul se muestran los cromosomas contrateñidos con el fluorocromo DAPI y en rojo la señal de la sonda ribosomal TR800. La señal del ADNr 45S se localiza en el cromosoma sexual X (patrón No-Andino). (A) Metafase I meiótica. (B) Metafase II meiótica.

POBLACIONES DEL GRUPO INTERMEDIO

Siete de los doce individuos analizados pertenecientes a las localidades de Salvador Mazza y Tarija, previamente asignadas por bandeo C al Grupo Intermedio, presentaron un único locus para el cluster ADNr 45S, localizado en el cromosoma sexual X (patrón No-Andino). Los restantes cinco individuos, presentaron dos loci para el cluster de ADNr 45S, uno de ellos localizado en el cromosoma sexual X y el otro en uno de los homólogos perteneciente al par autosómico *III* (patrón heterocigota). Esto muestra una proporción aproximada de ocurrencia del 50% para cada una de las dos variantes de la señal ribosomal. La Figura 31 muestra ejemplos de las imágenes obtenidas para estas localidades.

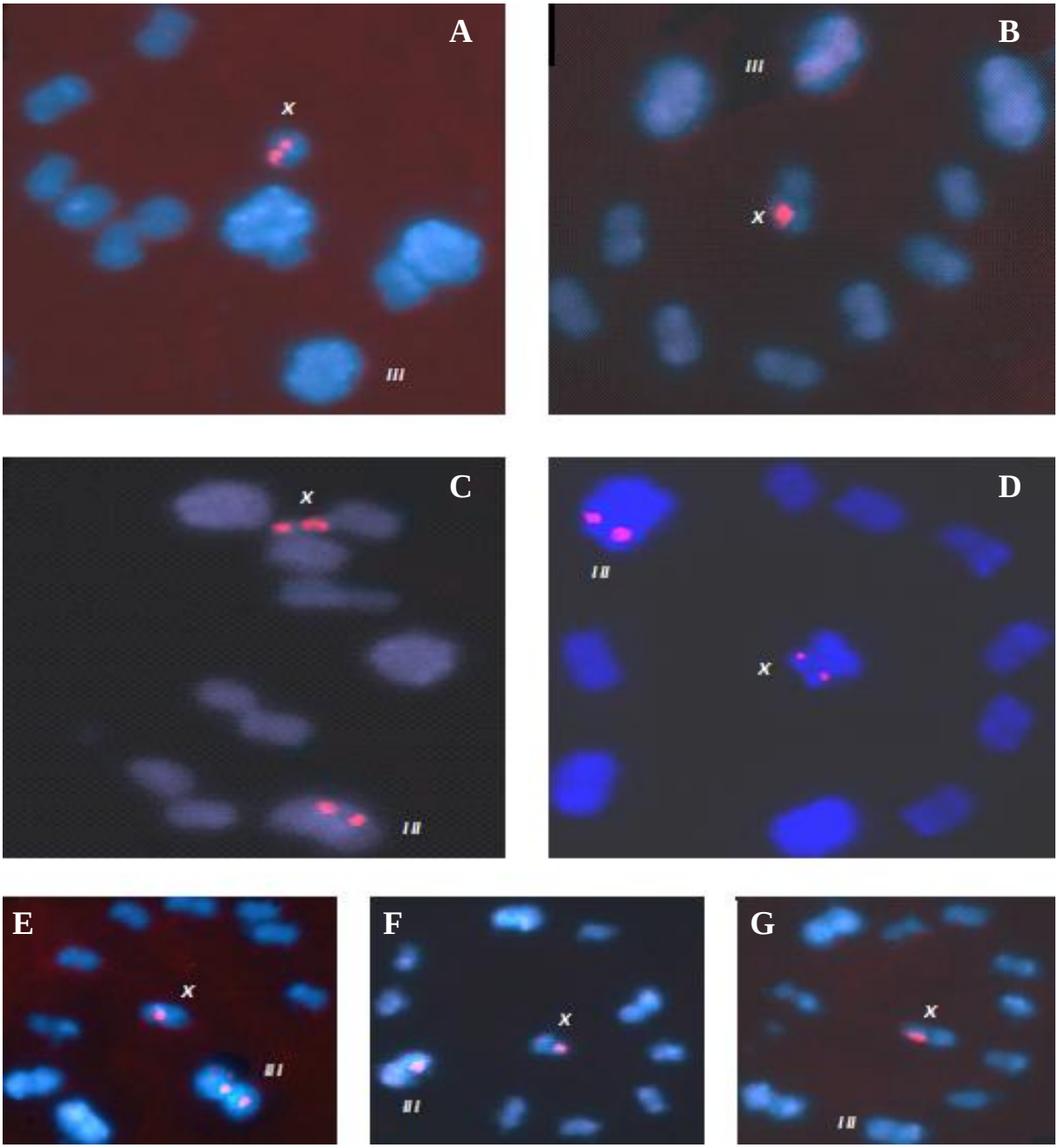

FIGURA 31. Localización por FISH del cluster de ADNr 45S en individuos del Grupo Intermedio. En azul: cromosomas teñidos con DAPI, en rojo: señal de la sonda ribosomal TR800. Las imágenes (A) y (B) muestran una metafase I y una metafase II respectivamente, de individuos que presentaron un patrón de localización del ADNr 45S igual al descrito en individuos del Grupo No-Andino, es decir la señal en el cromosoma sexual X (patrón No-Andino). (C) y (D) metafases I donde se observa la señal del ADNr 45S en dos cromátidas del bivalente *III*, y en ambas cromátidas del cromosoma X (patrón heterocigota). (E), (F) y (G) metafases II de individuos con patrón de ADNr 45S heterocigota, exhibiendo los patrones alternativos del cluster ribosomal en el cromosoma *III* como resultado de la segregación en anafase I: (E) ambas cromátidas con el ADNr 45S segregaron juntas), (F) segregaron juntas una cromátida sin señal y otra con señal y (G) segregaron juntas ambas cromátidas sin señal (polo opuesto al patrón descrito en (E).

III. RESUMEN DE LOS PRINCIPALES RESULTADOS DE BANDEO C Y FISH

La siguiente tabla (Tabla 11) resume los principales resultados generales del análisis citogenético por bandeo C y FISH para cada uno de los grupos cromosómicos descriptos (Andino, Intermedio y No-Andino): cantidad de autosomas con bandas heterocromáticas, proporción de individuos con cromosoma sexual X heterocromático, cromosomas supernumerarios y bandas C intersticiales, y por último, la localización cromosómica del cluster ADNr 45S.

TABLA 11. Resumen de las características citogenéticas de los grupos cromosómicos

Grupo cromosómico	% de autosomas heterocromáticos	% de individuos con:			Localización del cluster de ADNr 45S
		X heterocromático	bandas C intersticiales	cromosomas supernumerarios	
ANDINO	75%	100%	30%	0%	Par autosómico *III*
INTERMEDIO	42%	22%	62%	50%	Cromosoma X + autosoma *III* o Cromosoma X
NO-ANDINO	30%	0%	8%	9%	Cromosoma X

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis, se caracterizó la variabilidad citogenética de *Triatoma infestans* empleando las técnicas de bandeo C y FISH. Mediante bandeo C se determinó, para cada individuo, el número de autosomas y cromosomas sexuales X con heterocromatina, así como la presencia de cromosomas supernumerarios. Posteriormente los individuos se agruparon en grupos de localidades, estableciéndose la variabilidad de cada par autosómico. Además, se analizó la variabilidad de los patrones cariotípicos identificándose patrones exclusivos de cada localidad y grupo de localidades, y patrones compartidos entre grupos cromosómicos.

Nuestros resultados nos permitieron confirmar y ampliar la distribución geográfica de los grupos cromosómicos Andino y No-Andino (Figura 32) anteriormente descritos por Panzera y cols. (2004). En el Grupo Andino, se estudiaron individuos de nuevas poblaciones silvestres de Bolivia, pertenecientes a los Departamentos de Potosí (localidades de La Deseada, Ref. 5 Fig. 32) y Cochabamba (localidad de Cotapachi, Ref. 1 Fig. 32). También se analizaron individuos de nuevas poblaciones domésticas y peridomésticas de Bolivia (Departamentos de Cochabamba y Chuquisaca, Refs. 2-4 Fig. 32) y de Perú (poblaciones de baja altitud del Departamento de Ica, Ref. 36 Fig. 32). En el Grupo No-Andino, se estudiaron individuos de nuevas poblaciones domésticas de Argentina (Provincias de Catamarca, Chaco, Formosa y Salta, Refs. 6 y 19; 20-21; 7; 17-18 Fig. 32) y poblaciones de Paraguay (Ref. 16, 31-35 Fig. 32).

El Grupo Andino se distribuye no sólo en altitudes superiores a los 1800 metros, como había sido descrito previamente (Panzera et al., 2004), sino que también se encuentra en regiones de baja altitud (588 metros) como la ciudad de Nazca en Perú (Ref. 36 Fig. 32). El Grupo No-Andino se distribuye en altitudes entre 0 a 1500 metros (Panzera et al., 2004) y a 1800 metros (Palo Blanco, Catamarca, Argentina, Ref. 19 Fig. 32) o a 2088 metros (San Carlos, Salta, Argentina, Ref. 18 Fig. 32).

El análisis por bandeo C de nuevas poblaciones de *T. infestans* nos permitió además describir un nuevo grupo cromosómico, que denominamos Grupo Intermedio (Figura 32), por presentar características cromosómicas que lo diferencian de los otros dos grupos (cantidad de heterocromatina autosómica intermedia, elevada frecuencia de cromosomas supernumerarios, variabilidad intermedia de pares autosómicos y cariotipos exclusivos).

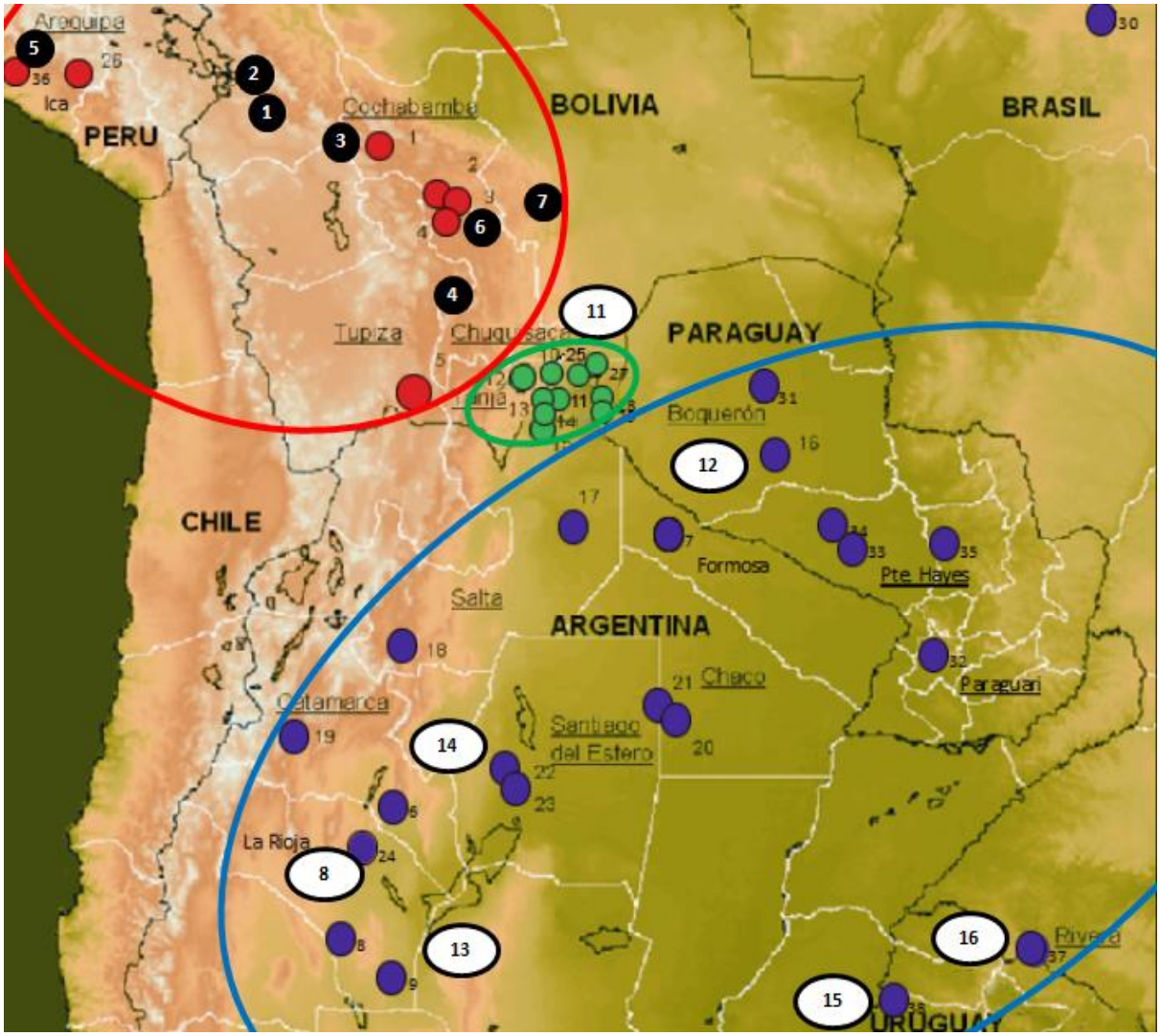

FIGURA 32. Localización geográfica de los grupos cromosómicos Andino, No-Andino e Intermedio. Las líneas negras muestran las fronteras nacionales, mientras que las líneas blancas delimitan las fronteras de las Provincias o Departamentos. Los colores del mapa representan la altitud (msnm) de cada región, siendo los tonos oscuros los sitios de menor elevación y los más claros los más elevados. Los puntos de colores señalan las localidades de colecta. En Rojo, localidades peruanas y bolivianas del Grupo Andino. En Azul, localidades del Grupo No-Andino (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay). En verde, poblaciones bolivianas de Tarija (norte de Bolivia) y Salvador Mazza (norte de Salta, Argentina), pertenecientes al Grupo Intermedio. **1:** Cotapachi, **2:** Bandorniyoc, **3:** Mataral; **4:** Carapari; **5**: La Deseada; **6:** Valle Viejo; **7:** Bermejo; **8:** San Antonio (La Rioja); **9:** Cuatro Esquinas; **10:** San Antonio (Bolivia); **11:** Estación Sunchal; **12:** Yaguacua; **13:** San Francisco del Inti; **14:** Palmar Chico; **15:** Salvador Mazza; **16:** Jericó; **17:** La Unión; **18:** San Carlos; **19**: Palo Blanco; **20**: Pampa Avila; **21**: Tres Estacas; **22**: Huachana; **23**: Silípica; **24**: Anillaco; **25**: Quebrada Busuy; **26:** Arequipa; **27**: El Barrial; **28:** Suarito; **29**: Tacuarandy; **30**: Monteiro; **31**: Tiberia; **32**: San Bernardino; **33**: Niya Toyish; **34**: Estancia Salazar; **35:** San Pedro; **36:** Nazca; **37**: Rivera; **38:** Río Negro.

Adicionalmente, se generó una sonda específica del ADNr 18S de *T. infestans*, y se identificó mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) la localización del cluster ribosomal 45S (ADNr 45S) en poblaciones pertenecientes a los tres grupos cromosómicos. Este marcador cromosómico permitió también diferenciar a los grupos Andino (señal de ADNr 45S en el autosoma *III*) y No-Andino (señal de ADNr 45S en el cromosoma sexual X). En el Grupo Intermedio, el 50 % de los individuos presentaron señales de hibridización en dos loci: una señal en el cromosoma sexual X y otra en uno de los homólogos del par autosómico *III* (señal heterocigota). La otra mitad de los individuos del Grupo Intermedio presentó la señal exclusivamente en el cromosoma sexual X, al igual que lo observado en el Grupo No-Andino.

Nuestros resultados apoyan un origen andino de *Triatoma infestans*. Esta conclusión se basa en que todos los individuos del Grupo Andino presentan heterocromatina en el cromosoma sexual X, al igual que las especies cercanamente emparentadas con *T. infestans* (*T. platensis* y *T. delpontei*). Además, si asumimos que la variabilidad debe ser mayor en poblaciones ancestrales respecto a las derivadas, el Grupo Andino es el que presenta la mayor variabilidad de patrones de bandeo C por lo que sería el ancestral.

La información obtenida a partir del análisis de la cantidad y distribución de heterocromatina constitutiva y la caracterización de patrones de localización del cluster ADNr 45S en los tres grupos cromosómicos, nos permitieron formular dos hipótesis acerca del origen del Grupo Intermedio. La primera hipótesis plantea que el Grupo Intermedio se originó directamente a partir del Grupo Andino, y posteriormente dió origen al Grupo No-Andino. La segunda hipótesis sugiere que el Grupo Intermedio se originó más recientemente por contacto secundario y cruzamientos entre individuos de los grupos Andino y No-Andino.

Por último, nuestros resultados muestran que *Triatoma infestans* presenta mayor variabilidad intraespecífica que la anteriormente descrita, no sólo en cuanto al contenido y localización de la heterocromatina constitutiva sino también en la localización cromosómica de los genes ribosomales.

A continuación, se discuten los principales resultados de esta tesis que fueron resumidos en los párrafos precedentes.

I. VARIABILIDAD DE LA HETEROCROMATINA EN *T. INFESTANS*

Contenido de la heterocromatina autosómica y caracterización de grupos cromosómicos

Si asumimos el origen andino de *Triatoma infestans*, planteado por diversos autores (Schofield 1988; Bargues et al. 2006) y apoyado por nuestros resultados de una mayor variabilidad de patrones de bandeo C en el Grupo Andino, deberíamos considerar al Grupo Andino (con mayor contenido de heterocromatina) como ancestral respecto a los otros dos grupos cromosómicos. De acuerdo a esta hipótesis, en *T. infestans* habría ocurrido una pérdida de heterocromatina autosómica durante su dispersión desde su centro de origen (Grupo Andino) hacia otras regiones no andinas de nuestro continente (Grupos No-Andino e Intermedio).

El contenido de heterocromatina de un genoma puede variar (ampliarse o reducirse) por cambios en el número de secuencias repetidas que la conforman (Hartl, 2000). Los diferentes tipos de repetidos que conforman la heterocromatina favorecen la ocurrencia de recombinación ectópica, tanto entre cromátidas hermanas (Britten y Kohne, 1968; Southern, 1975; Smith, 1976; Petrov, 2001) como entre cromosomas homólogos y no homólogos. Ambos fenómenos producen alteraciones en el número de repetidos de la heterocromatina, generando cromosomas con más secuencias repetidas (ganancia de heterocromatina) y cromosomas con menos repetidos (pérdida de heterocromatina).

Panzera y colaboradores (2004) plantearon que la reducción del contenido de heterocromatina en *T. infestans*, desde regiones andinas a no andinas, pudo haber surgido como respuesta a adaptaciones diferenciales a nuevos ambientes, cuya principal diferencia es la altitud. Estos autores propusieron que las poblaciones del Grupo Andino estarían adaptadas y colonizarían con mayor éxito ambientes de gran altitud, mientras que las poblaciones del Grupo No-Andino, estarían mejor adaptadas a ambientes domésticos de baja altitud. Panzera y cols. (2004) basaron su hipótesis en el hecho que todas las poblaciones del Grupo Andino identificadas hasta ese momento, se encontraban a altitudes superiores a 1800 msnm, mientras que todas las poblaciones del Grupo No-Andino se encontraban a menos de 1500 msnm. Nuestros resultados muestran que también existen poblaciones del Grupo Andino (Dpto. de Ica, Perú) que se encuentran a bajas altitudes (588 msnm), y poblaciones del Grupo No-Andino que se encuentran a altitudes superiores a los 1800 msnm (Palo Blanco y San Carlos en Argentina). La presencia de poblaciones con alto contenido de heterocromatina en ambientes de baja altitud, así como la de poblaciones con bajo contenido de heterocromatina

en ambientes de gran altitud, podría explicarse por una ausencia de competencia con los individuos mejor adaptados a estos ambientes.

La relación entre el contenido de heterocromatina y la altitud ha sido descrita en diversos organismos tales como plantas, peces y mamíferos (por revisión ver Acreche y cols. 2004). Acreche y cols. (2004) observaron que las poblaciones que se encontraban a elevadas altitudes presentaban un menor contenido de heterocromatina constitutiva que las que habitaban a bajas altitudes. En base a estas observaciones, estos autores sugieren una relación entre el contenido de heterocromatina y la altitud inversa a la planteada para *T. infestans* por Panzera y cols. (2004). Proponen que la menor cantidad de heterocromatina es una adaptación de los organismos a ambientes hipóxicos y fríos, característicos de las regiones de gran altitud. Una menor cantidad de heterocromatina insumiría un menor gasto energético en la duplicación del ADN, lo que representaría una ventaja selectiva en estos ambientes extremos (Ibraimov, 1993).

Contenido de heterocromatina en los cromosomas sexuales X

En *Triatoma infestans*, al igual que en todas las especies de la subfamilia Triatominae hasta ahora descritas, el cromosoma sexual Y es siempre heterocromático (Panzera et al., 2010). En cambio, se observa una gran variación interespecífica en relación a la presencia de heterocromatina en los cromosomas sexuales X. A nivel intraespecífico, solo dos especies de triatominos presentan variaciones de heterocromatina en este cromosoma sexual: *T. infestans* y *T. dimidiata* (Panzera et al., 2004; 2006). Los resultados obtenidos en esta tesis confirman la variabilidad de heterocromatina del cromosoma X descrita previamente en *T. infestans* (Tabla 5 y Figura 21). Todos los individuos del Grupo Andino poseen el X con heterocromatina, mientras que todos los individuos del Grupo No-Andino carecen de heterocromatina en dicho cromosoma. En el Grupo Intermedio, el 22 % de los individuos presenta cromosomas X con heterocromatina.

La presencia de heterocromatina en el cromosoma X de todos los individuos del Grupo Andino, al igual que lo observado en las especies estrechamente emparentadas, *T. delpontei* y *T. platensis* (Panzera et al., 1995), apoyan la ancestralidad de este grupo, tal como plantea la hipótesis andina.

Nuestros resultados sugieren que la dispersión de *T. infestans* hacia el sur de nuestro continente, no solo implicó pérdida de heterocromatina autosómica sino también pérdida de heterocromatina en el cromosoma sexual X (Grupos Intermedio y No-Andino), que puede ser

explicada por los mismos mecanismos anteriormente sugeridos para la pérdida de heterocromatina autosómica terminal.

Contenido de heterocromatina autosómica intersticial

Las poblaciones del Grupo Intermedio presentan un alto porcentaje de individuos con bandas C intersticiales (hasta 91 %). En el Grupo Andino, el porcentaje de individuos que las presentan es del 30 % en promedio, mientras que en Grupo No-Andino es del 8 % (Tablas 5 y 11).

La aparición de bandas C intersticiales autosómicas en las poblaciones del Grupo Intermedio pudo resultar de alguno de los mecanismos sugeridos por Sumner (1990), actuando de manera aislada o combinada: 1) translocación de toda o una parte de una banda heterocromática, 2) transformación de eucromatina en heterocromatina, o 3) amplificación de una secuencia repetida.

Asumiendo que el Grupo Andino (con alto contenido de heterocromatina autosómica terminal y bajo contenido de heterocromatina intersticial) es ancestral respecto al Grupo Intermedio (con menor proporción de autosomas con heterocromatina terminal y alta proporción de heterocromatina intersticial), se podría sugerir a la recombinación y transferencia de bandas heterocromáticas entre cromosomas, como mecanismo más simple para explicar la aparición de bandas C intersticiales (Sumner, 1990). Este mecanismo explicaría tanto la pérdida de heterocromatina autosómica desde el Grupo Andino a los otros dos grupos derivados, así como la ganancia de heterocromatina intersticial en el Grupo Intermedio. La transferencia de heterocromatina entre cromosomas homólogos y no homólogos podría estar favorecida por la polarización cromosómica en el núcleo, denominada "orientación de Rabl". Schweizer y Loidl (1983, 1987) sugirieron que la transferencia de heterocromatina entre regiones equilocales de un complemento puede ocurrir entre cromosomas no homólogos, debido a su proximidad espacial en el núcleo.

Cromosomas supernumerarios

La mayoría de las poblaciones de *T. infestans* pertenecientes a los Grupos Intermedio y No-Andino (exceptuando Formosa y La Rioja en Argentina, y las de Paraguay) presentaron individuos con cromosomas supernumerarios (cromosomas B) eucromáticos y/o heterocromáticos (Tabla 5 y Figura 22). Estos cromosomas B sólo pudieron ser detectados en

mitosis. El hecho de que no se observan en meiosis, puede deberse a su pequeño tamaño o bien a que se pierden antes de iniciar las divisiones meióticas.

Los cromosomas B se encuentran en gran diversidad de organismos y aparecen como adicionales al complemento normal (Camacho, 2004). Generalmente segregan de manera irregular y aparecen en número variable (entre individuos, entre poblaciones, incluso entre diferentes células de un mismo individuo). Son frecuentemente heterocromáticos y poseen secuencias de ADN repetido de tipo satélite, telomérico, elementos genéticos móviles e incluso genes ribosomales (Camacho, 2004). Algunos autores como White (1973) los consideran parásitos genómicos, ya que en la mayoría de los casos parecen no proporcionar ningún beneficio a sus portadores. Sin embargo, existen antecedentes de que los cromosomas B pueden alterar la expresión y recombinación génica modificando la fisiología del individuo que los presenta. Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de cromosomas B en el hongo patogénico *Nectria haematococca* que parasita la planta de arvejas, le confiere resistencia a los antibióticos empleados para combatirlo (Miao et al., 1991).

Este mismo fenómeno puede estar ocurriendo en ciertas poblaciones de *T. infestans* resistentes a piretroides, como Salvador Mazza. La altísima frecuencia de cromosomas B en esta población del norte argentino, podría estar relacionada con el fenómeno reciente de resistencia a insecticidas. Para evaluar la posibilidad de que la presencia de cromosomas B pudiera tener relación con la resistencia a piretroides en *T. infestans*, se debería analizar si poblaciones de insectos no resistentes llegan a adquirir eventualmente resistencia y si esto se asocia al surgimiento de cromosomas B y a la variación en el contenido de heterocromatina.

Variabilidad de los pares autosómicos en función del contenido de la heterocromatina

El análisis de variabilidad de los 10 pares autosómicos de *T. infestans* (*I-X*) reveló que los pares *III* y *IV* son los más variables, presentando seis y cinco variantes respectivamente (Tabla 6 y Figura 23). El análisis discriminado por grupo cromosómico muestra que las poblaciones del Grupo Andino son las más variables (Figura 24), seguidas de las poblaciones del Grupo Intermedio (Figura 25) y finalmente las poblaciones del Grupo No-Andino (Figura 26). Este último grupo presenta menor variabilidad cromosómica, pese a haber analizado cerca del doble de individuos que el Grupo Intermedio, y más del triple que el Grupo Andino (Figuras 24-26 y Tabla 7). Asumiendo que la variabilidad debe ser mayor en poblaciones ancestrales que en las derivadas, estos datos también apoyarían que el Grupo Andino es el ancestral, tal como lo postula la hipótesis andina.

Variabilidad de patrones cariotípicos en función del contenido y tipo de autosomas heterocromáticos

Considerando la variabilidad general de patrones cariotípicos y la proporción de cariotipos exclusivos, una vez más, la región andina boliviana de Cochabamba/Chuquisaca/Potosí es la que presenta la mayor variabilidad, apoyando la hipótesis de ancestralidad de estas poblaciones. La baja variabilidad cariotípica observada en las poblaciones peruanas del Grupo Andino sería reflejo de un reciente origen, tal como han sugerido Dujardin y cols. (1987) mediante marcadores isoenzimáticos. Nuestros resultados también evidencian una alta proporción de cariotipos exclusivos en las poblaciones no andinas del Chaco argentino, y una gran variabilidad cariotípica en las poblaciones de Salta, al igual que lo observado con análisis moleculares tanto de secuencias nucleares (Bargues et al., 2006) como mitocondriales (García et al., 2003; Piccinali et al., 2009; Ceballos et al., 2009). Estos resultados estarían apoyando la existencia de una gran variación genética en las poblaciones de *T. infestans* domésticas de esta región del norte de Argentina, así como también su ancestralidad respecto al resto de las poblaciones no andinas (centro y sur de Argentina, Paraguay occidental, Uruguay y Brasil).

La baja variabilidad de patrones cariotípicos y la baja proporción de cariotipos exclusivos en el Grupo Intermedio, podrían ser fácilmente explicadas por un origen más reciente de estas poblaciones. Alternativamente, el Grupo Intermedio podría tener un origen más antiguo, pero presentar aún así poca variabilidad debido a presiones selectivas como las de la aplicación de piretroides y selección de ciertos cariotipos resistentes al insecticida.

II. VARIABILIDAD EN LA LOCALIZACIÓN DEL CLUSTER ADNr 45S EN *T. INFESTANS*

La variación interespecífica en la localización de los genes ribosomales es un fenómeno ampliamente descrito, tanto en animales como en vegetales. En insectos como dípteros y mosquitos de las subfamilias de Culicinae y Anophelinae, los genes del ARNr se localizan principalmente en los cromosomas sexuales heterocromáticos (Hadjiolov, 1985; Marchi y Pili, 1994). En otras especies como *Musca domestica*, se presentan en autosomas con grandes bloques de heterocromatina (Parise-Maltempi y Avancini, 2007). También existen antecedentes de variación interespecífica en la localización de genes ribosomales en especies con cromosomas holocéntricos, como polillas y mariposas (Lepidoptera) e incluso Heteroptera (Nguyen et al., 2010; Papeschi y Bressa, 2006a, respectivamente).

En triatominos, se ha encontrado variación interespecífica en la localización del ADNr 45S (Severi-Aguiar et al., 2005; 2006; Morielle-Souza et al., 2007; Bardella et al., 2010). Estos autores analizaron por FISH la localización del ADNr 45S en diversas especies de triatominos, mediante una sonda de *Drosophila melanogaster*. En algunas especies como *T. tibiamaculata* y *T. protracta* la señal ribosomal se localizó en un par autosómico, mientras que en *T. platensis* y *T. infestans* se encontró en el cromosoma sexual X, concluyendo que en Triatominae la localización del cluster ADNr 45S es un carácter específico de especie.

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar la variación interespecífica del ADNr: 1) rearreglos cromosómicos estructurales, tales como translocaciones, inversiones, fisiones y fusiones cromosómicas (Hall y Parker, 1995; Hirai et al., 1996); 2) transposición del ADNr (Schubert y Wobus, 1985); y 3) recombinación ectópica (Maggini et al., 1991; Hanson et al., 1996).

Hanson y cols. (1996) postulan que cambios en la localización del ADNr entre especies estrechamente emparentadas pueden resultar de la translocación de repetidos del ADNr desde cromosomas que los tienen hacia otros que no los presentan por recombinación ectópica. Este fenómeno puede conducir a la transferencia de unas pocas unidades transcripcionales a una nueva localización (Nguyen et al., 2010). La redundancia genética de las regiones de ADNr y la tendencia a asociarse de los cromosomas con NORs (tanto homólogos como no-homógos) facilitarían la translocación no recíproca entre NORs (Goodpasture y Bloom, 1975; Schmid et al., 1987).

Los resultados de nuestro análisis por FISH de la localización del ADNr 45S en diversas poblaciones de *T. infestans* revelan, por primera vez, la existencia de variabilidad intraespecífica del cluster ADNr 45S (Figuras 29-31). Esto contradice lo propuesto por Severi-Aguiar y cols. (2005, 2006), Morielle-Souza y cols. (2007) y Bardella y cols. (2010), que en Triatominae la localización del cluster de ADNr 45S es un carácter específico de especie.

La variación intraespecífica en el número y localización de los genes ribosomales 45S se ha descrito en varias especies de plantas (Schubert y Wobus, 1985; Hanson et al., 1996; Shishido et al., 2000), peces (Capistano et al., 2008; Singh et al., 2009; Gross, et al., 2010) y anfibios (Andronico et al., 1985). Sin embargo, existen muy pocos antecedentes de variación intraespecífica del ADNr 45S en insectos. En mosquitos, por ejemplo, se ha encontrado variación en el número de copias del ADNr 45S (Kumar y Rai, 1990), detectada como heteromorfismos en el tamaño de señales fluorescentes de cromosomas homólogos. La

variación en el número de copias puede haberse producido por el corrimiento de la ADN polimerasa o crossing-over mitótico desigual (Gillings et al., 1987; Gallardo-Escárate et al., 2005). Otro ejemplo de variabilidad intraespecífica en la localización del ADNr 45S en insectos, es el trabajo de Cabrero y cols. (2003), quienes encontraron que en algunas poblaciones de la langosta *Eyprepocnemis plorans,* el ADNr 45S se localizaba en dos autosomas, mientras que en otras se localizaba adicionalmente en otros 2 a 6 autosomas, o incluso en todos los autosomas. Estos autores sugieren que esta variabilidad intraespecífica podría explicarse por los mismos mecanismos propuestos para explicar la variación interespecífica.

Todos los ejemplos de variación intraespecífica en el número y localización de copias del ADNr 45S implican la transferencia y posterior amplificación y/o deleción de algunas copias del cluster ribosomal entre distintos cromosomas. Nuestros resultados, en cambio, muestran una transferencia completa del cluster ADNr 45S desde un autosoma (par *III*, Grupo Andino) al cromosoma sexual X (Grupo No-Andino). Hasta donde tenemos conocimiento, este trabajo representa el primer reporte de un cambio completo en la localización cromosómica de los genes ribosomales entre distintos tipos de cromosomas del complemento (autosomas y cromosomas sexuales).

Este cambio en la localización de los ribosomales puede haber tenido un impacto importante en la evolución de las poblaciones andinas y no-andinas. El cruzamiento entre individuos con distinta localización de los ribosomales generará una descendencia que verá reducida su valor adaptativo por la posibilidad de generar descendientes con un menor número de repetidos ribosomales o incluso su total carencia (Figura 33). En este sentido, la variabilidad detectada entre los individuos andinos y no-andinos puede constituir un mecanismo de aislamiento postcigótico que favorece la separación entre las dos poblaciones. En el laboratorio se han obtenido híbridos F1 entre ambas poblaciones, aunque no se ha testado su valor adaptativo ni el de su descendencia (Panzera et al., 2004).

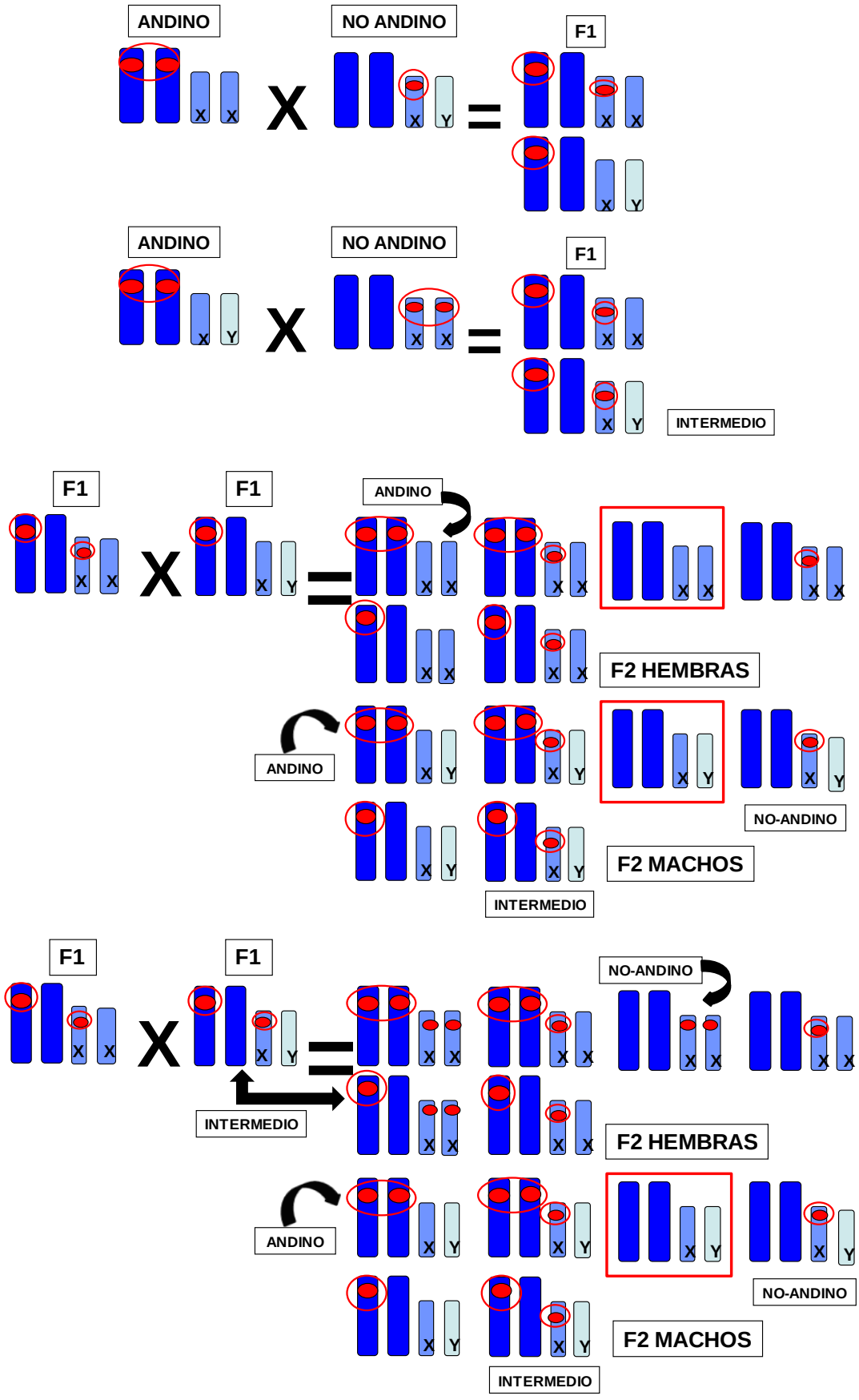

FIGURA 33. Esquema del cruzamiento entre individuos de los Grupos cromosómicos Andino y No-Andino. El cruzamiento entre la F1 resultante de ambos cruzamientos generará algunos individuos

carentes de cistrones ribosomales (recuadro rojo), y por tanto no-viables. En círculo rojo se indica la localización cromosómica del cluster ribosomal 45S.

Diversos autores demostraron que las regiones donde se localiza el ADNr 45S son propensas a generar "sitios de fragilidad cromosómica". Estos sitios frágiles son lugares preferentes de roturas cromosómicas, recombinación y amplificación génica (Rassool et al., 1991; Coquelle et al., 1997; Schwartz et al., 2006). Estos sitios de inestabilidad cromosómica podría favorecer la transferencia del cluster ribosomal entre distintos cromosomas. En *Arabidopsis* deficientes de telomerasa, se ha demostrado que el ADNr 45S está involucrado en el ciclo rotura-fusión-puente y en la generación de rearreglos (Siroky et al., 2003). También existen ejemplos en *Allium* y *Neurospora*. Thomas y cols. (2001) reportaron grandes cantidades de rearreglos cromosómicos asociados a la variación en el número y posición de sitios del ADNr 45S en *Lolium rigidum*. Estos autores proponen que la subsecuente reunión de extremos rotos generados luego de las roturas cromosómicas, provocaría variación en el número y localización de clusters de ADNr 45S.

La existencia de sitios frágiles en el ADNr 45S también podría estar asociada a la generación de fragmentos cromosómicos (Coffee et al., 2002). En Heteroptera, estos fragmentos tendrán una mayor probabilidad de perpetuarse durante las divisiones celulares como cromosomas B por la naturaleza holocéntrica de sus cromosomas. Es llamativo que la población de Salvador Mazza (Grupo Intermedio), donde se observan dos patrones de localización del cluster de ADNr 45S, es la que posee el mayor porcentaje de individuos con cromosomas B (91%).

En resumen, la dispersión de *T. infestans* desde su origen (Bolivia) hacia el sur, no solo implicó una pérdida de secuencias repetidas como fue sugerido por Panzera y cols. (2004) y apoyado por nuestros resultados de bandeo C, sino que también involucró cambios en la posición de los genes ribosomales del cluster 45S, tal como muestran nuestros resultados de FISH. Este cambio de posición del ADNr 45S entre los grupos cromosómicos de *T. infestans*, estaría favorecido por la proximidad espacial, a nivel del cromocentro, entre el par autosómico *III* y el cromosoma X, durante la interfase y profase de ambas divisiones celulares. Este cambio del cluster ribosomal podría también estar asociado con la movilización de bloques de heterocromatina (pérdida de heterocromatina autosómica terminal y del cromosoma sexual X, y generación de bandas de heterocromatina intersticial) y con la generación de cromosomas B.

III. HIPÓTESIS SOBRE EL SURGIMIENTO DEL GRUPO INTERMEDIO

Los resultados resumidos y discutidos anteriormente, nos llevan a plantear dos hipótesis para explicar el surgimiento del Grupo Intermedio de *Triatoma infestans*, caracterizado por primera vez en esta tesis. Ambas hipótesis asumen el origen andino de la especie, y se sustentan en que el Grupo Intermedio presenta cantidades intermedias de heterocromatina entre los Grupos Andino y No-Andino, patrones cariotípicos compartidos con los dos grupos, y un nuevo patrón de localización del cluster de ADNr 45S.

1) **<u>Origen del Grupo Intermedio a partir del Grupo Andino</u>:**

   Los individuos del Grupo Intermedio derivarían directamente de individuos del Grupo Andino. Luego los individuos del Grupo Intermedio habrían originado al Grupo No-Andino.

En la población original de *T. infestans* (Grupo Andino) tuvo que haber ocurrido un evento ancestral de transferencia del ADNr 45S desde un autosoma al cromosoma sexual X. Esta nueva localización se debería haber establecido en la población que ya poseía el cluster ribosomal en la localización autosómica. Posteriormente tendría que haber ocurrido un evento de pérdida del cluster ribosomal en el par autosómico *III*. Este cambio persiste en la actualidad como un polimorfismo del cluster ribosomal en el par autosómico (patrón heterocigota del Grupo Intermedio). En las poblaciones del Grupo No-Andino, el cluster ribosomal tendría que haberse perdido completamente en el par autosómico.

Mediante el análisis de secuencias nucleares (ITSs), se calcula que la separación entre el Grupo Andino y No-Andino fue hace alrededor de 59.000 años (Bargues et al., 2006). Para aceptar la hipótesis propuesta debemos suponer que el polimorfismo actualmente observado, reflejado por la alta frecuencia (50%) de individuos con un patrón ribosomal heterocigota, se mantuvo desde su origen ancestral, lo cual es poco probable. De todas formas, actualmente no disponemos de datos con marcadores genéticos adicionales que nos permitan apoyar o desechar esta hipótesis.

2) **<u>Origen del Grupo Intermedio por contacto secundario y cruzamiento reciente entre los Grupos Andino y No-Andino</u>:**

   Las poblaciones del Grupo Intermedio se originaron recientemente por cruzamiento entre individuos de los Grupos Andino y No-Andino previamente aislados (contacto secundario) (Figura 33).

Esta hipótesis implica que durante el proceso de dispersión ancestral hacia regiones no andinas, las poblaciones del Grupo Andino dieron origen a las poblaciones del Grupo No-Andino, por medio de reorganizaciones genómicas que implicaron, además de la reducción de su genoma y disminución de la cantidad de heterocromatina, la transferencia completa de todo el cluster ribosomal 45S del par autosómico *III* al cromosoma sexual X. Las poblaciones de estos dos grupos cromosómicos se mantuvieron aisladas entre sí posiblemente por su mejor adaptación a distintos ambientes (alta y baja altitud). Recientemente, por razones desconocidas pero probablemente asociadas con actividades antropogénicas (tales como migraciones humanas y el control vectorial), ambos grupos cromosómicos entraron en contacto originando al Grupo Intermedio (Figura 33).

Considerando que la región del Grupo Intermedio (Salvador Mazza y Tarija) se encuentra a baja altitud (893 mnsm), la conjetura más plausible es que en esta región se encontraba el Grupo No-Andino. Esta suposición es apoyada por la detección de individuos no-andinos en regiones geográficamente muy próximas (La Unión, Salta). La migración reciente de individuos por transporte pasivo desde regiones andinas hacia el sur de Bolivia y norte de Argentina pusieron en contacto a individuos de Grupo Andino con individuos del Grupo No-Andino. De estos cruzamientos resultaron individuos con el patrón ribosomal heterocigota (Grupo Intermedio)(Figuras 32). La ausencia de individuos andinos en esta regíón híbrida se debería o bien a una relativa baja frecuencia y/o debido a la baja adaptación de los individuos andinos en ambientes de baja altitud. Lo que resulta muy llamativo es la alta frecuencia observada del patrón ribosomal heterocigota. Una explicación posible es que estos individuos tengan cierta ventaja adaptativa en esta región. No podemos descartar que esta ventaja adaptativa esté asociada con la resistencia a piretroides detectada en esta región. Esta idea sugiere que las poblaciones no-andinas que sufrieron introgresión con el genoma andino, adquirieron características genéticas nuevas (por ejemplo nuevas combinaciones alélicas) que permitieron el surgimiento de poblaciones con resistencia a insecticidas piretroides.

Informaciones derivadas de las actividades de control vectorial, sustenta el origen extremadamente reciente de las poblaciones del Grupo Intermedio. Datos proporcionados por el jefe del Programa de control vectorial de la Provincia de Salta (Dr. Alberto Gentile), indican que como producto del rociado con insecticidas piretroides, las localidades de Salvador Mazza presentaban, entre los años 1995 y 1998, índices de infestación domiciliar de *T. infestans* que variaban entre 0.5 y 0.8 %. A partir de 1998 se comienza a observar un incremento gradual en la presencia de los insectos en las viviendas, alcanzando valores de

entre 50 y 80 % en el 2003. Estas poblaciones resistentes a piretroides son las analizadas en esta Tesis.

Por lo tanto, bajo esta segunda hipótesis, la región de distribución actual del Grupo Intermedio, sería una zona híbrida relativamente reciente, formada por cruzamiento de dos poblaciones puras "parentales" (Grupos Andino y No-Andino), que generan una zona con genotipos intermedios o "mezcla" (con características de los otros dos grupos cromosómicos).

Las zonas híbridas se definen como áreas donde grupos de individuos genéticamente diferentes interaccionan y resulta como mínimo alguna descendencia de ancestralidad mezclada (Endler, 1977; Barton y Hewitt, 1989; Harrison, 1990).

Luego de que surge una zona híbrida, puede mantenerse (hibridación introgresiva) o desaparecer cuando se de la especiación completamente (Huxley, 1939; Mayr, 1963). Existen diferentes modelos que explican la permanencia temporal de una zona híbrida. En algunas situaciones la zona híbrida podría perpetuarse sin necesidad de dispersión de las poblaciones originales, ya que los híbridos poseen una mayor adaptación al ecosistema que las formas parentales (Moore, 1977). Si los híbridos poseen mayor valor adaptativo que los taxas parentales, la zona híbrida será estable y el valor adaptativo del híbrido se establecerá, generalmente en un ambiente intermedio al ocupado por los taxas parentales (Moore, 1977; Moore y Price, 1993; Good et al., 2000). Esta podría ser una posible explicación a la presencia del patrón ribosomal No-Andino en individuos del Grupo Intermedio de S. Mazza, así como la ausencia de individuos con el patrón Andino. En otros casos, la zona híbrida se mantiene a pesar de la selección en contra de los genotipos híbridos intermedios, gracias a la contínua dispersión desde las poblaciones puras y posterior hibridación, lo que se conoce como zona de tensión (Barton y Hewitt, 1989).

En resumen, los resultados del análisis de la heterocromatina y de la localización del cluster de ADNr 45S expuestos en esta tesis, pueden ser explicados, en principio, por las dos hipótesis planteadas para el surgimiento del Grupo Intermedio de *T. infestans*. Para discriminar entre ambas hipótesis, se deberían realizar nuevos análisis cromosómicos por bandeo C y FISH, ampliando las localidades muestreadas y el número de individuos caracterizados en el Grupo Intermedio. También se podrían realizar otros análisis moleculares, por ejemplo, de haplotipos mitocondriales y nucleares y marcadores fenéticos.

CONCLUSIONES

1. **Existe variabilidad citogenética poblacional en *T. infestans* que nos permite identificar tres grupos cromosómicos: Andino, Intermedio y No-Andino.**

Grupo Andino:

- No sólo se distribuye en regiones andinas de gran altitud (superiores a 1800 msnm), sino también en regiones de baja altitud de Perú (Ica, 588 msnm)
- Es el grupo cromosómico con mayor variabilidad cariotípica, apoyando su ancestralidad respecto a los otros dos grupos cromosómicos, y el origen andino de *T. infestans* (hipótesis andina tradicional)
- Presenta el mayor contenido de heterocromatina constitutiva autosómica respecto a los otros grupos derivados. Esto sugiere uno o varios eventos de pérdida de heterocromatina constitutiva durante el proceso de dispersión de *T. infestans* desde su centro de origen en Bolivia (Grupo Andino) hacia otras regiones de nuestro continente (grupos Intermedio y No-Andino)
- Presenta un patrón de localización cromosómica del cluster de ADNr 45S exclusivamente autosómico, a diferencia de los otros dos grupos cromosómicos donde el cluster también está presente (exclusivamente o no), en el cromosoma sexual X (Grupos No-Andino e Intermedio, respectivamente). Esto sugiere eventos de transferencia completa del cluster de ADNr 45S entre un autosoma (Grupo Andino) y el cromosoma sexual X (grupos Intermedio y No-Andino), durante la evolución de *T. infestans*, y representa el primer reporte de tal evento, al menos en insectos.

Grupo No-Andino:

- No sólo se distribuye en regiones no andinas de baja altitud (inferiores a 1500 msnm), sino también en regiones de gran altitud de Argentina (Palo Blanco-Catamarca a 1828 msnm y San Carlos-Salta a 2088 msnm)
- Posee menor variabilidad cariotípica respecto al Grupo Andino, por lo que sería un grupo cromosómico derivado del Grupo Andino ancestral

- Las poblaciones del norte de Argentina (Chaco y Salta) poseen mayor variabilidad que el resto de las poblaciones del Grupo No-Andino, apoyando su ancestralidad dentro de este grupo cromosómico
- Presenta el menor contenido de heterocromatina constitutiva autosómica respecto a los otros grupos y ausencia de heterocromatina en el cromosoma sexual X. Esto sugiere uno o varios eventos de pérdida de heterocromatina constitutiva durante la dispersión de *T. infestans*, no solo en los autosomas, sino también en los cromosomas sexuales

Grupo Intermedio:

- Identificado por primera vez en esta tesis y denominado así por poseer un contenido de heterocromatina constitutiva autosómica intermedio respecto a los otros dos grupos cromosómicos, entre otras características distintivas.
- Se distribuye en regiones no andinas de baja altitud que limitan con la región andina (Salvador Mazza-Salta-Argentina a 834 msnm y poblaciones del Departamento de Tarija-Bolivia 429-958 msnm). Todas estas poblaciones son altamente resistentes a insecticidas piretroides
- Posee menor variabilidad cariotípica respecto a los otros dos grupos cromosómicos, lo que podría implicar un origen reciente de estas poblaciones, o alternativamente, selección de ciertos cariotipos resistentes a piretroides
- Respecto a su origen, en este trabajo se postulan dos hipótesis: el Grupo Intermedio se originó ancestralmente a partir del Grupo Andino o bien el Grupo Intermedio es de origen reciente, siendo el producto de cruzamientos entre individuos de los Grupos Andino y No-Andino (contacto secundario). Se requiere el análisis de un mayor número de individuos y de poblaciones, así como nuevos estudios con otros marcadores moleculares para poder discriminar entre ambas hipótesis

2. **La variabilidad citogenética de *T. infestans* en cuanto al contenido y distribución de heterocromatina es mayor a la previamente descrita**

3. ***T. infestans*** **también presenta variabilidad en la localización de genes esenciales como los ribosomales, siendo éste el primer reporte de tal variación en la especie**

4. **Esta variabilidad implica un cambio completo del cluster de ADNr 45S desde una posición autosómica (Grupo Andino) a una en el cromosoma sexual X (Grupo No-Andino), siendo éste el primer reporte de tal cambio en un organismo**

5. **El cambio de posición del ADNr 45S entre los grupos cromosómicos de *T. infestans*, estaría favorecido por la proximidad espacial, a nivel del cromocentro, entre el par autosómico *III* y el cromosoma X, durante la interfase y profase de ambas divisiones celulares.**

6. **Este cambio del cluster ribosomal podría estar asociado con la movilización de bloques de heterocromatina (pérdida de heterocromatina autosómica terminal y del cromosoma sexual X, y generación de bandas de heterocromatina intersticial) y con la generación de cromosomas B.**

PERSPECTIVAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abrahan L., *et al*. 2008. Phenotypic diversity of *Triatoma infestans* at the microgeographic level in the Gran Chaco of Argentina and the Andean valleys of Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 660-666.

Acreche N., *et al*. 2004. Diversidad biológica de la Provincia de Salta. *Cuadernos FHYCS-UNJu* 22: 171-194.

Almeyda-Artigas R.J., *et al*. 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *J. Parasitol.* 86: 537-544.

Anderson E.G. 1925. Crossing over in a Case of Attached X Chromosomes in *Drosophila melanogaster. BMC Genet.* 10: 403-417.

Andronico F., *et al.* 1985. Molecular organization of ribosomal RNA genes clustered at variable chromosomal sites in *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela). *J. Mol. Biol.* 186: 219-229.

Ashburner M. 2004. Position effect variegation, pp. 1007–1038. En: *Drosophila: A Laboratory Handbook*, Ashburner M, Golic K and Hawley SW (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Aufderheide A.C., *et al*. 2004. A 9000-year record of Chagas' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2034–2039.

Azambuja P. 1985. Aspectos fidiológicos de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) I. Substancias inhibidoras da alimentaçao. II. Factores hemolíticos e antibacterianos induzidos. *Tese de Doutorado Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, Brasil.

Bacigalupo A., *et al*. 2010. Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105: 633–641.

Bardella V.B., *et al*. 2010. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera:Reduviidae). *Comparative Cytogenetics* 4: 141-149.

Bargues M.D., *et al*. 2006. Phylogeography of the Chagas Disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect. Genet. Evol.* 6: 46-62.

Barrett T.V., *et al*. 1979. An outbreak of acute Chagas' disease in the Sao Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Royal Soc. of Trop. Med. & Hyg.* 73: 703-709.

Barton N.H. & Hewitt G.M. 1989. Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* 341(6242): 497-503.

Bermúdez H., *et al*. 1993. Identification and characterization of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Central Bolivia. American. *Eur. J. Histochem.* 36: 303-309.

Bizzaro D., *et al*. 1996. Chromosomal localization of a highly repeated EcoRI DNA fragment in *Megoura viciae* (Homoptera, Aphididae) by nick translation and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res.* 4: 392–396.

Brener Z. & Gazzinelli R.T. 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114: 103-110.

Britten R.J. & Kohne D.E. 1968. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science* 161: 529-540.

Buck R.C. 1967. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*: the fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. *J. Ultrastruct. Res.* 18: 489–501.

Busvine J.R. 1951. Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature* 168: 193–195.

Buxton P.A. 1930. The biology of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus. Trans. R. Ent. Soc. Land.* 78: 337-436.

Cabrero J., *et al*. 2003. Comparative FISH analysis in five species of *Eyprepocnemidine* grasshoppers. *Heredity* 90: 377-381.

Camacho J.P., *et al*. 2004. The odd-even effect in mitotically unstable B chromosomes in grasshoppers. *Cytogenet. Genome Res.* 106: 325-331.

Capistano T.G., *et al*. 2008. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus aff. iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of the Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. *Int. J. Genet. Mol. Biol.* 31: 203-207.

Carcavallo R.U., *et al*. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomología y Vectores* 7: 1-99.

Catalá S. & Dujardin J.P. 2001. Antennal sensilla patterns indicate geographic and ecotopic variability among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *J. Med. Entomol.* 38: 423-428.

Ceballos L.A., *et al*. 2009. First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. *J. Med. Entomol.* 46: 1195-1202.

Cecere M.C., *et al*. 2004. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in Northwestern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71: 803–810.

Cecere M.C., *et al*. 2006. Reinfestation sources for Chagas Disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.*12: 1096-1102.

Coffee B., *et al*. 2002. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized *FMR1* gene in Fragile X syndrome. *Am. J. Hum.Genet.* 71: 923–932.

Comings D.E. & Okada T.A. 1972. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis and absent in meiosis. *Chromosoma* 37: 177–192.

Cortez M.R., *et al.* 2006. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Exp. Parasitol.* 114: 305-313.

Cortez M.R., *et al.* 2007. Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. *Acta Trop.* 102: 47-54.

Cortez M.R., *et al.* 2010. New insights on the spread of *Triatoma infestans* from Bolivia--implications for Chagas disease emergence in the southern cone. *Infect. Genet. Evol.* 10: 350-353.

Coulthard A.B., *et al.* 2003. Genetic analysis of the second chromosome centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genome* 46: 343-352.

Coura J.R. 2003. Tripanossomose, doença de Chagas. *Ciênc. Cult.* 55: 30-33.

De Paula A.S., *et al*. 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 35: 712-718.

Dernburg A.F., *et al*. 1996. Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* 86: 135-146.

Dias J.C.P. 1986. Aspectos socio-culturales y económicos relativos al vector de la enfermedad de Chagas. pp 289-305. En*: Factores biológicos y ecológicos de la Enfermedad de Chagas,* Vol. II. Carcavallo R, Rabinovich J, Ton R (eds.). OPS. Centro Panam Ecol Jum y Serv Nac Chagas. Bs. As, Argentina.

Dimitri P., *et al*. 2005. Transposable elements as artisans of the heterochromatic genome in *Drosophila melanogaster. Cytogenet. Genome Res.* 110: 165-172.

Dimitri P., *et al.* 2009. Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118: 419-435.

Dujardin J.P. & Tibayrenc M. 1985. Etude de 11 enzymes et données de génétique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann. Soc. Belg. Méd. Trop.* 65: 271–280.

Dujardin J.P., *et al*. 1987. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J. Med. Entomol.* 24: 40-45.

Dujardin J.P., *et al*. 1997. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J. Med. Entomol.* 34(5): 544-551.

Dujardin J.P., *et al*. 1998. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Med. Vet. Entomol.* 12: 20-29.

Dujardin J.P., *et al*. 2002. *Los vectores de la Enfermedad de Chagas.* En: *Classe des Sciences naturelles et médicales.* N.S. 25(3), 189 pp. Académie Royale des Sciences D´Outre-Mer, Bruxelles

Eissenberg J.C. & Hilliker A.J. 2000. Versatility of conviction: heterochromatin as both a repressor and an activator of transcription. *Genetica* 109: 19-24.

Elgin S.C.1996. Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 193-202.

Endler J.A. 1977. Geographic variation, speciation, and clines. *Monogr. Popul. Biol.* 10: 1-246.

Fitzpatrick K.A., *et al*. 2005. A genetic and molecular profile of third chromosome centric heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Genome* 48: 571-584.

Flynn J.J. & Wyss A.R. 1998. Recent advances in South American mammalian paleontology. *Tree* 13: 449–454.

Gallardo-Escárate C., *et al*. 2005. Fluorescence in situ hybridization of rDNA, telomeric (TTAGGG)n and (GATA)n repeats in the red abalone *Haliotis rufescens* (Archaeogastropoda: Haliotidae). *Hereditas* 142: 1–7.

Gaminara, A. 1923. Estudio experimental sobre *T. cruzi* y enfermedad de Chagas en el Uruguay. *An. Fac. Medicina*, Montevideo, VIII (3-4): 311-359.

Garagna S., *et al.* 1993. Genome distribution, chromosomal allocation, and organization of the major and minor satellite DNAs in 11 species and subspecies of the genus *Mus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 64: 247-255.

García B.A., *et al.* 2003. Short Report: Variation in mitochondrial 12s and 16s ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68: 692-694.

García B.A., *et al.* 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. *Mol. Ecol. Resour.* 4: 568–571.

Gatti M. 1983. A gene controlling heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 221: 83-85.

Gillings M.R., *et al.* 1987. X-Y exchange and coevolution of the X and *Y* rDNA arrays in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 116: 241-251.

Giordano R., *et al.* 2005. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 753-760.

Goldman W.E., *et al*. 1983. Mouse rDNA: sequences and evolutionary analysis of spacer and mature RNA regions. *Mol. Cell Biol.* 3: 1488-1500.

Good T.P., *et al*. 2000. Bounded hybrid superiority in an avian hybrid zone: effects of mate, diet, and habitat choice. *Evolution* 54: 1774-1783.

Goodpasture C. & Bloom S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37–50.

Gorla D.E., *et al*. 1997. Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Trop.* 63: 127-140.

Gregory T.R. 2005. The evolution of the Genome. *Elsevier Academic Press*, San Diego.

Gross, M.C., *et al*. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *J. Fish Biol.* 6: 1117-1127.

Guhl F., *et al*. 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.* 108(4): 401-407.

Guillén G. 2002. El control de la enfermedad de Chagas en Bolivia. En: *El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América: historia de una iniciativa internacional, 1991/2001*, AC Silveira (ed.), PAHO E-book.

Gürtler R.E., *et al*. 2004. Effectiveness of residual spraying of peridomestic ecotopes with deltamethrin and permethrin on *Triatoma infestans* in rural western Argentina: a district wide randomized trial. *Bull. World Health Organ.* 82: 196-205.

Hadjiolov A.A. 1985. The nucleolus and ribosome biogenesis. Springer-Verlag, Wien.

Hall M.J. & Parker J.S. 1995. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chrom. Res.* 3: 417–422.

Hamilton M.J., *et al*. 1990. Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from *in situ* hybridization. *Chromosoma* 99: 321-329.

Hancock K., *et al.* 2005. Prevalence of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in raccoons (*Procyon lotor*) from an urban area of northern Virginia. *J. Parasitol.* 91: 470–472.

Hanson R.E., *et al.* 1996. Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum L.*) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105: 55-61.

Harrison R.G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary processes. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 7: 129–156.

Hartl D.L. 2000. Molecular melodies in high and low C. *Nature Rev. Genet.* 1: 145–149.

Heitz E.1928. Das heterochromatin der Moose. I. Jahrb. Wiss. *Botanik* 69: 762-818.

Henikoff S., *et al*. 2001. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293: 1098-1102.

Hernández L., *et al*. 2008. Phenotypic variability associated to genomic changes in the main vector of Chagas disease in the southern cone of South America. *Acta Trop.* 106: 60-67.

Hey J. & Kliman R.M. 2002. Interactions between natural selection, recombination and gene density in the genes of *Drosophila*. *Genetics* 160: 595-608.

Hirai H., *et al*. 1996. Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma* 105: 190-196.

Hughes-Schrader S. & Schrader F. 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327-350.

Huxley J.S. 1939. Clines: an auxiliary method in taxonomy. BIJDR. Dierk.

Ibraimov A.I. 1993. Transferrin subtypes in some Eurasian and African populations. *Heredity* 43(1): 53-57.

Jarne P. & Lagoda P.J.L.1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11: 424–429.

Karpen G.H., *et al*. 1996. Centric heterochromatin and the efficiency of achiasmate disjunction in *Drosophila* female meiosis. *Science* 273: 118-122.

Kierszenbaum F., *et al*. 1981. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Parasitol.* 67: 656–660.

Kliman R.M. & Hey J. 1993. Reduced natural selection associated with low recombination in *Drosophila melanogaster. Mol. Biol. Evol.* 10: 1239-1258.

Kumar A. & Rai K.S. 1990. Chromosomal localization and copy number of 18S+ 28S ribosomal RNA genes in evolutionarly diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Hereditas* 113: 277-289.

Lent H. 1948. O Genero *Rhodnius* Stal (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Bras. Biol.* 8: 297-339.

Lent H. & Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. History* 163: 127–520.

Lima V.S., *et al*. 2008. Chagas disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1001–1002.

Long E.O. & Dawid I.B. 1980. Alternative pathways in the processing of ribosomal RNA precursor in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 138: 873-878.

Lumbreras H. 1972. El problema de enfermedad de Chagas en los diferentes departamentos del Perú. *Rev. Viernes Méd.* 23: 43-77.

Maggini F.T., *et al*. 1991. Structure and chromosomal localization of DNA sequences related to ribosomal subrepeats in *Vicia faba*. *Chromosoma* 100: 229-234.

Mandrioli M., *et al.* 1999a. Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Chromosoma* 108: 436-442.

Mandrioli M., *et al.* 1999b. The role of rDNA genes in X chromosome association in the aphid *Acyrthosiphon pisum*. *Genome* 3: 381-386.

Mandrioli M., *et al.* 1999c. NORs heteromorphism within a parthenogenetic lineage of the aphid *Megoura viciae*. *Chromosome Res.* 7: 157–162.

Mandrioli M., *et al.* 2003. Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Chromosome Res.* 11: 51–56.

Mandrioli M. & Volpi N. 2003. The genome of the lepidopteran *Mamestra brassicae* has a vertebrate-like content of methylcytosine. *Genetica* 1847: 1–5.

Manicardi G.C., *et al.* 1996. Heterochromatin heterogeneity in the holocentric X chromatin of *Megoura viciae* (Homoptera, Aphididae). *Genome* 39: 465-470.

Marcet P.L., *et al*. 2006. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Infect. Genet. Evol.* 6: 32–37.

Marchi A. & Pili E. 1994. Ribosomal RNA genes in mosquitoes: localization by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Heredity* 72: 599-605.

Mayr E. 1963. Animal Species and Evolution. *Harvard University Press.* Cambridge, Massachusetts.

Mazza S. & Jorg M.E. 1940. Períodos anátomo-clínicos de la enfermedad de Chagas. *Prensa Méd. Arg.* 27: 2361.

Miao V.P., *et al*. 1991. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* 254(5039): 1773-1776.

Modi W.S. 1993. Heterogeneity in the concerted evolution process of a tandem satellite array in meadow mice (*Microtus*). *J. Mol. Evol.* 37: 48-56.

Mola L.M & Papeschi A.G. 2006. Holokinetic chromosomes at a glance. *J. Basic & Appl. Genetics* 17: 17-33.

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

Monteiro F., *et al.* 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 229-238.

Moore W.S. 1977. An analysis of narrow hybrid zones in vertebrates. *Q. Rev. Biol.* 52: 263–277.

Moore W.S. & Price J.T. 1993. Nature of selection in the northern flicker hybrid zone and its implications for speciation theory. pp. 196–225. En: *Hybrid zones and the evolutionary process*. Harrison RG (ed.). Oxford University Press, New York.

Morielle-Souza A. & Azeredo-Oliveira M.T. 2007. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. *Genet. Mol. Res.* 6: 713-720.

Motzko D. & Ruthmann A. 1984. Spindle membranes in mitosis and meiosis of the heteropteran insect *Dysdercus intermedius*. A study of the interrelationship of spindle architecture and the kinetic organization of chromosomes. *Europ. J. Cell. Biol.* 33: 205-216.

Nguyen P., *et al*. 2010. Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138: 343-354.

Noireau F., *et al*. 1997. Detection of silvatic dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92: 583-584.

Noireau F., *et al*. 2000. Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from field collection to characterization. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 119-122.

Noireau F., *et al*. 2005. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends Parasitol.* 21: 7–10.

Noireau F., *et al*. 2007. Los focos silvestres de *Triatoma infestans* en Bolivia. Capitulo IX. pp. 205-213. En: *Triatominos de Bolivia y la Enfermedad de Chagas.*

Noireau F. 2009. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 60–64.

Nokkala S. 1985. Restriction of kinetic activity of holokinetic chromosomes in meiotic cells and its structural basis. *Hereditas* 102: 85-88.

Oppenoorth F.J. 1958. A mechanism of resistance to parathion in *Musca domestica* (L.). *Nature* 181(4606): 425-426.

O.P.S. 2009. Panzera F., *et al*. Vectores de la enfermedad de Chagas. Aportes e importancia de la investigación genética. pp. 197-219. En: *A 100 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas. Contribuciones desde Uruguay*. OPS y OMS (eds.).

Osimani J.J. 1937. Investigaciones acerca de la enfermedad de Chagas en el departamento de Paysandú. *An. Fac. Med. Montevideo, XXII,* 13pp.

Panzera F., *et al.* 1992. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestan*s (Hemiptera-Reduviidae). *Genome* 35: 1068-1074.

Panzera F., *et al.* 1995. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). *Chromosome Res.* 3: 143-150.

Panzera F., *et al.* 2004. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 438-446.

Panzera F., *et al*. 2006. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Trop. Med. Intern. Health* 11: 1092-1103.

Panzera F., *et al.* 2007. Genome size determination in Chagas Disease transmitting bugs (Hemiptera-Triatominae) by flow cytometry. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76: 516-521.

Panzera F., *et al.* 2010. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogen. Genome Res.* 128: 77-87.

Papeschi A.G. 1994. Chromosome rearrangements in *Belosfoma plebejum* (Stil) (Belostomatidae, Heteroptera). *Caryologia* 47: 223-231.

Papeschi A.G. & Bressa M.J. 2006a. Classical and molecular cytogenetics in Heteroptera. *Res. Adv.*

Entomol. 1: 1-9.

Parise-Maltempi P.P. & Avancini R.M. 2007. Comparative cytogenetic study in Muscidae flies. *Braz. J. Biol.* 67: 945-950.

Pedrini N., *et al*. 2009. Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e434.

Pérez R. 1996. Tesis Maestría PEDECIBA. Análisis cariológico de especies del género *Triatoma* (Hemiptera-Reduviidae), con énfasis en *Triatoma infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en el Uruguay. pp. 128.

Pérez R., *et al.* 1997. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 5: 47-56.

Pérez R., *et al*. 2000. Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 8: 17-25.

Petrov D.A. 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* 17: 23-28.

Piccinali RV., *et al.* 2009. Molecular population genetics and phylogeography of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in South America. *J. Med. Entomol.* 46: 796-809.

Picollo M.I., *et al*. 2005. High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J. Med. Entomol.* 42: 637-642.

Pimpinelli S. & Goday C. 1989. Unusual kinetochores and chromatin diminution in *Parascaris*. *Trends Genet.* 5: 310-315.

Rafael M.S. & Tadei W.P. 2000. Heterochromatin variation in chromosomes of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root and *A.* (*N.*) *nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae). *Genet. Mol. Biol.* 23: 67-70.

Rafael M.S., *et al*. 2003. Location of ribosomal genes in the chromosomes of *Anopheles darlingi* and *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) from the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98: 629–635.

Raynal F., *et al*. 1984.Complete nucleotide sequence of mouse 18 S rRNA gene: comparison with other available homologs. *FEBS Lett.* 167: 263-268.

Rolón M. 2011. First report of colonies of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, using a trained dog. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 5: e1026.

Roos M.H., *et al*. 1998. Polymorphic DNA markers in the genome of parasitic nematodes. *J. Helminthol.* 72: 291-294.

Rosypal A.C., *et al.* 2007. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia, *Vet. Parasitol.* 149: 172–177.

Rothhammer F., *et al.* 1985. Chagas' disease in pre-Columbian South America. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68: 495–498.

Sambrook J., *et al.* 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, pp. 660.

Schmid M., *et al.* 1987. Chromosome banding in Amphibia. IV. Constitutive heterochromatin, nucleolus organizers, 18S . 28S and 5S ribosomal RNA genes in Ascaphidae, Pipidae, Discoglossidae and Pelobatidae. *Chromosoma* 95: 271-284.

Schmunis G.A., *et al.* 1996. Interruption of Chagas' disease transmission through vector elimination. *Lancet* 348: 1171.

Schmunis G.A., *et al*. 2000. Transfusion-transmitted infectious diseases in Argentina, 1995 through 1997. *Transfusion* 40(9): 1048-1053.

Schofield C.J. 1988. Biosystematics of Triatominae. pp. 287-312. En: *Biosystematics of Haematophagous Insects. Systematics Association*. Special Vol. 37. Service MW (ed.). Clarendon Press, Oxford.

Schofield C.J. & Dias J.C.P. 1999. The Southern Cone initiative against Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 42: 1-27.

Schofield C.J., *et al*. 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22: 583-588.

Schofield C.J. & Galvao C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatomina. *Acta Trop.* 110: 88-100.

Schreiber G. & Pellegrino J. 1950. Eteropicnosi di autosomi come possible meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici). *Sci. Genet.* 3: 215–226.

Schubert I. & Wobus U. 1985. *In situ* hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium. Chromosoma* 92: 143-148.

Schweizer D. & Ehrendorfer F.1983. Evolution of C-band patterns in Asteraceae-Anthemideae. *Biol. Zentralb.* 102: 637-655.

Schweizer D. & Loidl J. 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chrom. Today* 9: 61-74.

Severi-Aguiar G.D. & de Azeredo-Oliveira M.T. 2005. Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of triatomines (Heteroptera, Triatominae). *Genet. Mol. Res.* 30: 704-709.

Severi-Aguiar G.D., *et al.* 2006. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Heteroptera, Triatominae). *Genetica* 126: 141-151.

Shishido R., *et al.* 2000. Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Mol. Gen. Genet.* 263: 586-591.

Silveira A.C., *et al.* 1984. Distribução de Triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83. *Rev. Bras. malariologia e doenças tropicais* 36: 15-312.

Singh M., *et al*. 2009. Extensive NOR site polymorphism in geographically isolated populations of Golden mahseer, *Tor putitora. Genome* 52:783-789.

Siroky J., *et al*. 2003. Rearrangements of ribosomal DNA clusters in late generation telomerase-deficient Arabidopsis. *Chromosoma* 112: 116-123.

Smith G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191: 528–535.

S.N.S. 1994. *Chagas, en Bolivia: el trabajo del programa piloto de control SNS/CCH*. Ministerio de Desarrollo humano, La Paz, Bolivia, 94 pp.

Solari A.J. 1979. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* 72: 225-240.

Southern E.M. 1975. Long range periodicities in mouse satellite DNA. *J. Mol. Biol.* 94: 51-69.

Spence J.M., *et al*. 1998. A 169-base pair tandem repeat DNA marker for subtelomeric heterochromatin and chromosomal rearrangements in aphids of the *Myzus persicae* group. *Chromosome Res.* 6: 575.

Stenersen J. 2004. *Chemical Pesticides. Mode of Action and Toxicology*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.

Sumner A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304-306.

Sumner A.T. 1990. *Chromosome banding.* London Unwin Hyman Limited.

Talice R., *et al*. 1940. *Los 100 primeros casos confirmados de la enfermedad de Chagas en el Uruguay*. *Ed. Monteverde*, 349 pp, Montevideo.

Tarleton R.L. 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 31: 550-554.

Thomas B. & Devi P.U. 1987. Chromosome protection by WR-2721 and MPG-single and combination treatments. *Strahlenther. Onkol.* 163: 807-810.

Toloza A.C., *et al*. 2008. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J. Med. Entomol.* 45: 421-426.

Torrico R.A .1946. Hallazgo de *Eratyrus mucronatus*, infestación natural de 'vinchucas' de cerro y *Eutriatoma sordida* en Cochabamba. *Ann. Lab. Central de Cochabamba* 1: 19-23.

Ueshima N. 1979. *Insecta 6. Hemiptera II: Heteroptera.* En: *Animal Cytogenetics.* Vol. 3. John B (ed.). Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart.

Urbina J.A. 2007. *Avances de la quimioterapia específica de la Enfermedad de Chagas*. En: Taller del Cono Sur: "Actualización de la Tripanosomiasis Americana". 177-197 pp.

Usinger R.L. 1944. *The Triatominae of North and Central America and the West Indies*. *Public Health Bull.*

Usinger R.L., *et al*. 1966. The biosystematics of Triatominae. *Ann. Rev. Entomol*. 11: 309-330.

Valencia A. 1990. *Investigación epidemiológica nacional de la Enfermedad de Chagas.* En: *Ministerio de Previsión Social y Salud Pública*, La Paz, Bolivia, 184 pp.

Weiler K.S. & Wakimoto B.T. 1995. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.* 29: 577-605.

White M.J.D. 1973. *Animal Cytology and Evolution,* 3rd Edn. Cambridge: Cambridge University Press, London.

Wigglesworth V.B. 1972. *The principles of insect physiology*. Chapman and Hall.

Williams S.M. & Robbins L.G. 1992. Molecular genetic analysis of *Drosophila* rDNA arrays. *Trends Genet.* 8: 335-340.

W.H.O. World Health Organization. 2002. *Control of Chagas disease*. *Techn. Rep. Ser.* 905, Geneva.

W.H.O. World Health Organization. 2006. Chagas. http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm (accessed on 09/Oct/2006).

Yoshida N. 2008. *T. cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol. Int.* 2: 105-109.

ANEXO

ANEXO I. INDIVIDUOS ANALIZADOS POR BANDEO C:

La siguientes 11 tablas detallan los códigos de identificación (N°) y el sexo (M= macho y H= hembra) de todos los individuos analizados por bandeo C, clasificados por Grupo cromosómico (Andino, Intermedio y No-Andino), y subclasificados en los 11 grupos de localidades muestreadas. Para cada individuo se detallan las principales características citogenéticas analizadas, y la media (MED) y desvío estándar (SD) en cada grupo de localidades:

1) El tipo cromosómico (A, B o C) en cada par autosómico *I, II, III, IV* y *V-X*

2) número total de autosomas heterocromáticos (A+B)

3) número de autosomas tipo A

4) número de autosomas tipo B

5) número de autosomas no heterocromáticos tipo C

6) XC+: presencia (SI) o ausencia (NO) de heterocromatina en el cromosoma sexual X

7) I: número de cromosomas con bandas C intersticiales

8) Crom. B: presencia (SI) o ausencia (NO) de cromosomas supernumerarios (B)

GRUPO ANDINO														
BOLIVIA. DEPARTAMENTOS DE POTOSÍ, COCHABAMBA Y CHUQUISACA														
Nº	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	crom. B	Localidades
7853	M	BB	BB	BB	BB	AA, AC o CC	14	6	8	6	SI	0	NO	La Deseada, Sud Chichas, Dpto. Potosí.
7854	M	BB	BB	BB	BA	AA, AC o CC	14	7	7	6	SI	3	NO	La Deseada, Sud Chichas, Dpto. Potosí.
7855	M	BB	BB	BB	BB	AA, AC o CC	15	7	8	5	SI	0	NO	La Deseada, Sud Chichas, Dpto. Potosí.
7856	M	BB	BA	BB	BB	AA, AC o CC	14	7	7	6	SI	0	NO	La Deseada, Sud Chichas, Dpto. Potosí.
7857	M	BB	BB	BB	AB	AA, AC o CC	14	7	7	6	SI	2	NO	La Deseada, Sud Chichas, Dpto. Potosí.
7858	M	BB	AB	BB	BB	AA, AC o CC	17	10	7	3	SI	0	NO	La Deseada, Sud Chichas, Dpto. Potosí.
7859	M	BB	BA	BB	AA	AA, AC o CC	14	9	5	6	SI	0	NO	La Deseada, Sud Chichas, Dpto. Potosí.
7860	M	BB	BA	BB	BA	BB, AA, AC o CC	17	9	8	3	SI	0	NO	La Deseada, Sud Chichas, Dpto. Potosí.
6555	M	AB	AA	AA	AA	AA o AC	18	17	1	2	SI	0	NO	Cotapachi, Dpto. Cochabamba
7863	M	BB	AA	AA	AA	AA, AC o CC	15	13	2	5	SI	0	NO	Mataral, Dpto. Cochabamba
7865	M	BB	BB	AB	AA	AA, AC o CC	15	10	5	5	SI	0	NO	Mataral, Dpto. Cochabamba
7874	M	BB	AB	AA	BC	AA, AC o CC	14	10	4	5	SI	0	NO	Bandorniyoc, Dpto. Cochabamba
7875	M	BB	AB	AA	AA	AA, AC o CC	15	12	3	5	SI	0	NO	Bandorniyoc, Dpto. Cochabamba
7876	M	BB	AB	AA	AA	AA o AC	17	14	3	3	SI	3	NO	Bandorniyoc, Dpto. Cochabamba
7877	M	BB	BB	BB	BB	AA, AC o CC	15	7	8	5	SI	1	NO	Bandorniyoc, Dpto. Cochabamba
7878	M	BB	AB	AA	AB	AB o AC	15	10	5	5	SI	3	NO	Bandorniyoc, Dpto. Cochabamba
7883	M	BB	AB	AA	AA	AA o AC	14	11	3	6	SI	0	NO	Carapari, Oropeza, Prov. Sucre, Dpto. Chuquisaca
7884	M	AB	AB	AA	AA	AA, AC o CC	13	11	2	7	SI	0	NO	Carapari, Oropeza, Prov. Sucre, Dpto. Chuquisaca
7885	M	BB	BB	BB	BA	AA, AC o CC	14	7	7	6	SI	0	NO	Carapari, Oropeza, Prov. Sucre, Dpto. Chuquisaca
7886	M	BB	BB	AB	AA	AA, AC o CC	15	10	5	5	SI	1	NO	Carapari, Oropeza, Prov. Sucre, Dpto. Chuquisaca
7887	M	BB	AB	AB	BC	AA, AC o CC	15	10	5	5	SI	0	NO	Carapari, Oropeza, Prov. Sucre, Dpto. Chuquisaca
7888	M	BB	AB	AB	AB	AA, AC o CC	15	10	5	5	SI	0	NO	Carapari, Oropeza, Prov. Sucre, Dpto. Chuquisaca
7889	M	BA	BB	BB	BB	BB, AA o AC	18	9	9	2	SI	0	NO	Carapari, Oropeza, Prov. Sucre, Dpto. Chuquisaca
TOTAL:	**23**					**MEDIA**	**15,09**	**9,70**	**5,39**	**4,87**	**1**	**0,26**	**0**	
MACHOS:	**23**					**SD**	**1,38**	**2,62**	**2,29**	**1,36**				
HEMBRAS:	**0**													

PERÚ														
Nº	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	crom. B	Localidades
4818	M	BB	BB	AB	AB	AA o CC	16	10	6	4	SI	0	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
4819	M	BB	BB	BB	BB	AA o CC	14	6	8	6	SI	0	NO	Ciudad Moquegua. Dpto. Moquegua.
8136	M	BB	BB	BB	AB	AA o CC	16	9	7	4	SI	0	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8137	M	BB	BB	BB	BB	AA o CC	18	10	8	2	SI	2	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8138	M	BB	BB	BB	BB	AA, AC o CC	15	7	8	5	SI	0	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8139	M	BB	BB	BB	BB	AB, AA, AC o CC	17	8	9	3	SI	2	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8144	M	BB	BB	BB	AB	AA, AC o CC	15	8	7	5	SI	3	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8146	M	BB	BB	BB	AA	AA, AC o CC	15	9	6	5	SI	0	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8149	M	BB	BB	BB	AB	AA o CC	16	9	7	4	NO	2	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8150	M	BB	BB	AB	AA	AA, AC o CC	15	10	5	5	NO	0	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8185	M	BB	BB	AB	AA	AA o CC	14	9	5	6	SI	0	NO	Ciudad Nazca, Prov. Nazca. Dpto. Ica.
8157	M	BB	BB	AB	AA	AA, AC o CC	15	10	5	5	NO	0	NO	San Antonio, Dist.Santa Rita de Siguas. Dpto. Arequipa
8160	M	BB	BB	BB	AA	AA, AC o CC	15	9	6	5	SI	0	NO	San Antonio, Dist.Santa Rita de Siguas. Dpto. Arequipa
8161	M	BB	BB	BB	AA	AA, AC o CC	14	8	6	6	SI	0	NO	San Antonio, Dist.Santa Rita de Siguas. Dpto. Arequipa
8162	M	BB	BB	BB	AB	AA, AC o CC	16	9	7	4	SI	3	NO	San Antonio, Dist.Santa Rita de Siguas. Dpto. Arequipa
8165	M	BB	BB	BB	AA	AA, AC o CC	15	9	6	5	SI	0	NO	San Antonio, Dist.Santa Rita de Siguas. Dpto. Arequipa
8169	M	BB	BB	AB	AA	AA, AC o CC	15	10	5	5	SI	0	NO	San Antonio, Dist.Santa Rita de Siguas. Dpto. Arequipa
8170	M	BB	BB	BB	AB	AA, AC o CC	16	9	7	4	SI	3	NO	San Antonio, Dist.Santa Rita de Siguas. Dpto. Arequipa
TOTAL:	**18**					**MEDIA**	**15,39**	**8,83**	**6,56**	**4,61**	**0,83**	**0,33**	**0**	
MACHOS:	**18**					**SD**	**1,04**	**1,10**	**1,20**	**1,04**				
HEMBRAS:	**0**													

GRUPO INTERMEDIO														
ARGENTINA, PROVINCIA SALTA.														
Nº	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	crom. B	Localidades
7466	M	BB	BB	AB	AA	AC	9	4	5	11	**SI**	3	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7467	M	BB	BB	AB	AA	AC	9	4	5	11	**SI**	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7468	M	BB	BB	BA	AA	CC	8	3	5	12	NO	3	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7469	M	BB	BB	BA	AA	AA o CC	10	5	5	10	**SI**	5	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7470	M	BB	BB	BB	AC	AC o CC	8	2	6	12	NO	5	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7471	M	BB	BB	AA	AA	AC o CC	9	5	4	11	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7472	M	BB	BB	BB	AA	CC	8	2	6	12	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7473	M	BB	BB	BB	AC	AC o CC	9	3	6	11	NO	3	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7474	M	BB	BB	BB	AA	CC	8	2	6	12	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7475	M	BB	BB	BA	AC	AC o CC	9	4	5	11	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7476	M	BB	BB	BB	AA	CC	8	2	6	12	NO	4	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7477	M	BB	BB	AA	AA	AC o CC	9	5	4	11	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7478	M	BB	BB	BB	AC	CC	7	1	6	13	NO	5	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7479	M	BB	BB	BA	AA	CC	8	3	5	12	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7480	M	BB	BB	BA	AC	CC	7	2	5	13	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7481	M	BB	BB	BA	AA	AC o CC	9	4	5	11	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7482	M	BB	BB	BA	AA	CC	8	3	5	12	NO	6	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7483	M	BB	BB	AA	AA	CC	8	4	4	12	NO	2	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7484	M	BB	BB	AA	AA	AC o CC	9	5	4	11	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7485	M	BB	BB	AA	AA	CC	8	4	4	12	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7506	M	BB	BB	BA	AC	CC	7	2	5	13	**SI**	0	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7507	M	BB	BB	BA	AC	AC o CC	8	3	5	12	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7508	M	BB	BB	BA	AA	CC	8	3	5	12	NO	4	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7509	M	BB	BB	BA	AC	AC, AA o CC	10	5	5	10	**SI**	4	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7510	M	BB	BB	BB	AC	CC	7	1	6	13	NO	8	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7511	M	BB	BB	BA	AC	AC o CC	8	3	5	12	**SI**	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7512	M	BB	BB	BA	AC	CC	7	2	5	13	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7513	M	BB	BB	BA	AC	CC	7	2	5	13	NO	3	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7514	M	BB	BB	BA	AA	CC	8	3	5	12	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7515	M	BB	BB	BB	AA	CC	8	2	6	12	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7516	M	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	NO	4	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7517	M	BB	BB	AA	AA	CC	8	4	4	12	NO	0	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7518	M	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	**SI**	3	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7486	H	BB	BB	BB	AC	AC o CC	9	3	6	11	NO	3	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7487	H	BB	BB	BA	AC	CC	7	2	5	13	NO	5	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7488	H	BB	BB	BA	AA	AC o CC	9	4	5	11	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7489	H	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	NO	5	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7490	H	BB	BB	BB	AA	CC	8	2	6	12	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7491	H	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	**SI**	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7492	H	BB	BB	AB	AA	AC o CC	9	4	5	11	NO	5	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7493	H	BB	BB	AA	AA	AC o CC	9	5	4	11	NO	4	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7494	H	BB	BB	AB	AA	AC o CC	9	4	5	11	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7495	H	**BB**	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	6	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7496	H	BB	BB	BB	AC	AC o CC	9	3	6	11	NO	5	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7497	H	BB	BB	BA	AC	AC, AA o CC	10	5	5	10	**SI**	3	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7498	H	BB	BB	BA	AA	CC	8	3	5	12	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7499	H	BB	BA	BA	AA	AC o CC	10	4	6	10	NO	4	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7500	H	BB	BB	BA	AA	CC	8	3	5	12	NO	6	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7502	H	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	NO	0	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7503	H	BB	BB	BB	AC	AC o CC	9	3	6	11	NO	2	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7504	H	BB	BB	AB	AA	AC o CC	9	4	5	11	NO	0	NO	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
7505	H	BB	BA	BA	AA	AC o CC	10	4	6	10	NO	0	SI	Salvador Mazza, Departamento José de San Martín.
TOTAL:	**52**					**MEDIA**	**8,21**	**3,17**	**5,04**	**11,79**	**0,16**	**0,91**	**0,82**	
MACHOS:	**33**					**SD**	**1,02**	**1,12**	**0,71**	**1,02**				
HEMBRAS:	**19**													

BOLIVIA, DEPARTAMENTO TARIJA.														
Nº	**Sexo**	***I***	***II***	***III***	***IV***	***V-X***	**A+B**	**A**	**B**	**C**	**X C+**	**I**	**crom. B**	**Localidades**
7804	H	BB	AB	AA	AA	AC o CC	10	7	3	10	NO	2	SI	San Francisco, Munic. Yacuiba
7806	H	BB	BB	AA	AC	AC o CC	8	4	4	12	NO	0	SI	San Francisco, Munic. Yacuiba
7807	H	BB	BB	AB	AA	AC o CC	8	3	5	12	NO	1	NO	San Francisco, Munic. Yacuiba
7809	M	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	NO	1	NO	San Francisco, Munic. Yacuiba
7810	M	BB	BB	AA	AC	AC o CC	8	4	4	12	NO	1	NO	San Francisco, Munic. Yacuiba
7811	M	BB	AB	AB	AC	CC	7	3	4	13	NO	1	NO	San Francisco, Munic. Yacuiba
7812	H	BB	BB	AB	AC	AC o CC	8	3	5	12	NO	0	NO	Estación Sunchal, Munic. Yacuiba
7814	H	BB	BB	AB	AC	CC	7	2	5	13	NO	1	NO	Estación Sunchal, Munic. Yacuiba
7815	H	BB	BB	AB	AC	AC o CC	8	3	5	12	NO	2	NO	Estación Sunchal, Munic. Yacuiba
7818	M	BB	AB	AA	AC	AC o CC	8	5	3	12	NO	1	SI	Estación Sunchal, Munic. Yacuiba
7819	M	BB	BB	AA	AA	AC o CC	9	5	4	11	NO	0	NO	Estación Sunchal, Munic. Yacuiba
7820	H	BB	BB	AB	AC	AC o CC	8	3	5	12	NO	2	SI	Palmar Chico, Munic. Yacuiba
7821	H	BB	BB	AB	AC	AC o CC	8	3	5	12	NO	1	NO	Palmar Chico, Munic. Yacuiba
7824	M	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	NO	0	SI	Palmar Chico, Munic. Yacuiba
7825	M	BB	BB	AA	AC	AC o CC	8	4	4	12	NO	0	NO	Palmar Chico, Munic. Yacuiba
7826	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Palmar Chico, Munic. Yacuiba
7832	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Quebrada Busuy, Munic. Yacuiba
7833	M	BB	AB	AA	AC	CC	7	4	3	13	NO	0	NO	Quebrada Busuy, Munic. Yacuiba
7834	M	BB	AB	AA	AC	AC o CC	8	5	3	12	**SI**	0	NO	Quebrada Busuy, Munic. Yacuiba
7838	M	BB	BB	AB	AC	AC, AA o CC	10	5	5	10	NO	0	NO	El Barrial, Munic. Yacuiba
7839	M	BB	BB	AA	AA	AC o CC	9	5	4	11	**SI**	0	NO	El Barrial, Munic. Yacuiba
7840	M	BB	BB	BC	AA	CC	7	2	5	13	NO	1	NO	Yaguacua, Munic. Yacuiba
7842	M	BB	BB	BC	AA	AC o CC	8	3	5	12	NO	0	NO	Yaguacua, Munic. Yacuiba
7843	M	BB	BB	AB	AC	AC o CC	8	3	5	12	NO	0	NO	Yaguacua, Munic. Yacuiba
7907	M	BB	AB	AB	AC	CC	7	3	4	13	NO	0	NO	San Antonio, Munic. VillaMontes
7912	M	BB	BB	BC	AA	AC o CC	9	4	5	11	NO	0	NO	Suarito, Munic. Entre Rios
7913	M	BB	AB	AB	AB	AC o CC	9	4	5	11	NO	0	NO	Suarito, Munic. Entre Rios
7920	M	BB	BB	AB	AA	AC, AA o CC	11	6	5	9	NO	0	NO	Suarito, Munic. Entre Rios
7923	M	BB	BB	AB	AC	AC o CC	8	3	5	12	NO	0	NO	Suarito, Munic. Entre Rios
7926	M	BB	AB	AA	BC	AA o CC	9	5	4	11	**SI**	0	NO	Suarito, Munic. Entre Rios
7929	M	BB	BB	AB	AA	AC, AA o CC	11	6	5	9	NO	0	NO	Tacuarandy, Munic. Entre Rios
TOTAL:	**31**					**MEDIA**	**8,13**	**3,77**	**4,35**	**11,87**	**0,09**	**0,38**	**0,16**	
MACHOS:	**23**					**SD**	**1,23**	**1,28**	**0,71**	**1,23**				
HEMBRAS:	**8**													

GRUPO NO- ANDINO														
PARAGUAY														
Nº	Sexo	I	II	III	IV	V-X	A+B	A	B	C	X C+	I	crom. B	Localidades
7081	M	BB	BB	BB	CC	CC	6	0	6	14	NO	0	NO	Tiberia, Dpto. Boquerón.
7085	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Tiberia, Dpto. Boquerón.
7112	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Bernardino, Dpto. Cordillera.
7115	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Bernardino, Dpto. Cordillera.
7116	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	San Bernardino, Dpto. Cordillera.
7117	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	SI	0	NO	San Bernardino, Dpto. Cordillera.
7118	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Bernardino, Dpto. Cordillera.
7119	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Bernardino, Dpto. Cordillera.
7120	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Pedro, Dpto. San Pedro.
7121	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Pedro, Dpto. San Pedro.
7123	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Pedro, Dpto. San Pedro.
7124	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Pedro, Dpto. San Pedro.
7125	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Pedro, Dpto. San Pedro.
7127	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Pedro, Dpto. San Pedro.
7128	M	BB	BB	BB	CC	CC	6	0	6	14	NO	0	NO	Tiberia, Dpto. Boquerón.
7129	M	BB	BB	BB	CC	CC	6	0	6	14	NO	0	NO	Tiberia, Dpto. Boquerón.
7130	M	BB	BB	BC	CC	CC	5	0	5	15	NO	0	NO	Tiberia, Dpto. Boquerón.
7132	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Tiberia, Dpto. Boquerón.
7134	M	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	Niya Toyish, Dpto. Presidente Hayes.
7135	M	BB	BB	BB	CC	CC	6	0	6	14	NO	0	NO	Niya Toyish, Dpto. Presidente Hayes.
7136	M	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	Niya Toyish, Dpto. Presidente Hayes.
7137	M	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	Niya Toyish, Dpto. Presidente Hayes.
7138	M	BB	BB	AB	AC	CC	7	2	5	13	NO	0	NO	Estación Salazar, Dpto. Presidente Hayes.
7140	M	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	Estación Salazar, Dpto. Presidente Hayes.
7629	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Tiberia, Dpto. Boquerón.
7639	M	BB	AB	AA	AA	CC	8	5	3	12	NO	0	NO	Jope, Dpto. Boquerón.
7640	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Estación Salazar, Dpto. Presidente Hayes.
7642	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Estación Salazar, Dpto. Presidente Hayes.
7932	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
7933	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
7934	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
7935	M	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
7936	M	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
7945	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
7949	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
7954	M	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
7956	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Jericó, Dpto. Boquerón
TOTAL:	37					MED	6,03	1,73	4,30	13,97	0,03	0	0	
MACHOS:	37					SD	0,44	1,02	0,85	0,44				
HEMBRAS:	0													

ARGENTINA, PROVINCIA DEL CHACO.														
Nº	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	crom. B	Localidades
7682	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7684	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	SI	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7685	H	BB	AA	AA	CC	CC	6	4	2	14	NO	2	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7686	H	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	3	SI	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7687	M	BB	BB	CC	CC	CC	4	0	4	16	NO	1	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7688	M	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7689	M	BB	BA	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7690	M	BB	BA	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7691	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	3	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7692	M	BB	AA	BC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7693	M	BB	BA	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	SI	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7694	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	1	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7695	M	BB	AA	AA	CC	CC	6	4	2	14	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7696	M	BB	BA	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7698	M	BB	BA	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7700	M	BB	AA	AC	CC	CC	5	3	2	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7701	M	BB	BA	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7702	M	BB	AA	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7703	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7704	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7705	M	BB	BA	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7706	M	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7707	H	BB	BA	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7708	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Pampa Avila, Dpto. Almirante Brown.
7723	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	1	SI	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
7724	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	2	SI	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
7725	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	SI	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
7726	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	SI	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
7727	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	2	NO	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
7728	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	3	SI	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
7729	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
7730	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
7731	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Tres Estacas, Dpto. Chacabuco.
TOTAL:	**33**					**MED**	**5,58**	**2,18**	**3,39**	**14,42**	**0**	**0,27**	**0,24**	
MACHOS:	**24**					**SD**	**0,56**	**0,77**	**0,66**	**0,56**				
HEMBRAS:	**9**													

ARGENTINA, PROVINCIA CATAMARCA.														
Nº	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	crom. B	Localidades
7426	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7427	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	SI	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7428	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	2	SI	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7429	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7430	M	BB	AA	AA	CC	CC	6	4	2	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7431	M	BB	BA	BA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7432	M	AB	AA	AA	CC	CC	6	5	1	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7433	M	AB	BB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7434	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7435	M	AB	AB	AA	CC	CC	6	4	2	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7437	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7438	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7439	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7440	M	BB	BA	AA	AC	CC	7	4	3	13	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7441	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7442	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7443	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7444	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
7445	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Palo Blanco, Dpto. Tinogasta.
6645	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Dpto. Valle Viejo
6646	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Dpto. Valle Viejo
6649	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Dpto. Valle Viejo
6651	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Dpto. Valle Viejo
6653	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Dpto. Valle Viejo
6654	M	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Dpto. Valle Viejo
6655	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Dpto. Valle Viejo
6656	M	BB	AB	AA	AC	CC	7	4	3	13	NO	0	NO	Dpto. Valle Viejo
TOTAL:	**27**					**MED**	**6,04**	**2,85**	**3,19**	**13,96**	**0**	**0,04**	**0,07**	
MACHOS:	**27**					**SD**	**0,34**	**0,86**	**0,74**	**0,34**				
HEMBRAS:	**0**													

ARGENTINA, PROVINCIA SALTA														
Nº	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	crom. B	
7800	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	SI	San Carlos, Dpto. San Carlos..
7801	H	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	San Carlos, Dpto. San Carlos..
7802	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	San Carlos, Dpto. San Carlos..
7803	M	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	NO	0	NO	San Carlos, Dpto. San Carlos..
7794	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	2	NO	La Unión, Dpto. Rivadavia.
7795	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	La Unión, Dpto. Rivadavia.
TOTAL:	**6**					**MED**	**6,00**	**2,17**	**4,00**	**13,83**	**0**	**0,17**	**0,17**	
MACHOS:	**4**					**SD**	**0,00**	**0,75**	**0,63**	**0,41**				
HEMBRAS:	**2**													

ARGENTINA. PROVINCIA SANTIAGO DEL ESTERO.														
N°	**Sexo**	***I***	***II***	***III***	***IV***	***V-X***	**A+B**	**A**	**B**	**C**	**X C+**	**I**	**crom. B**	**Localidades**
6156	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Dpto. Avellaneda
7072	M	BB	AA	AC	CC	CC	5	3	2	15	NO	0	NO	Dpto. Figueroa
7074	M	BB	AA	AC	CC	CC	5	3	2	15	NO	0	NO	Dpto. Figueroa
7735	H	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7736	H	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7737	H	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7738	M	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7739	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7740	M	BB	BB	BC	CC	CC	5	0	5	15	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7741	M	AB	BB	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7742	M	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7743	M	BB	BB	AB	CC	CC	6	1	5	14	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7745	M	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Huachana, Dpto. Alberdi.
7765	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7766	M	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7767	M	BB	BB	AC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7768	M	AB	BB	AC	CC	CC	5	2	3	15	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7769	M	AB	BB	BC	CC	CC	5	1	4	15	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7770	M	AB	BB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7771	M	AB	BB	CC	CC	CC	4	1	3	16	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7772	M	AB	BB	CC	CC	CC	4	1	3	16	NO	5	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7773	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7782	H	AB	BB	CC	CC	CC	4	1	3	16	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
7784	H	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	Silípica, Dpto. Silípica.
TOTAL:	**24**					**MED**	**5,21**	**1,50**	**3,71**	**14,79**	**0**	**0,04**	**0**	
MACHOS:	**18**					**SD**	**0,66**	**0,78**	**0,81**	**0,66**				

ARGENTINA. PROVINCIA FORMOSA.														
N°	**Sexo**	***I***	***II***	***III***	***IV***	***V-X***	**A+B**	**A**	**B**	**C**	**X C+**	**I**	**crom. B**	**Localidades**
4751	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	NO	NO	Villa Escobar, Dpto. Bermejo
4752	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	NO	NO	Villa Escobar, Dpto. Bermejo
4753	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	NO	NO	Villa Escobar, Dpto. Bermejo
4755	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	NO	NO	Villa Escobar, Dpto. Bermejo
4756	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	NO	NO	Villa Escobar, Dpto. Bermejo
TOTAL:	**5**					**MED**	**6,00**	**2,60**	**3,40**	**14,00**	**0**	**0**	**0**	
MACHOS:	**5**					**SD**	**0,00**	**0,55**	**0,55**	**0,00**				
HEMBRAS:	**0**													

ARGENTINA. PROVINCIA DE LA RIOJA.														
N°	**Sexo**	***I***	***II***	***III***	***IV***	***V-X***	**A+B**	**A**	**B**	**C**	**X C+**	**I**	**crom. B**	**Localidades**
6610	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	NO	NO	San Antonio, Dpto. Facundo Quiroga.
6612	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	NO	NO	San Antonio, Dpto. Facundo Quiroga.
6614	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	NO	NO	San Antonio, Dpto. Facundo Quiroga.
6633	M	BB	BB	AA	AA	CC	8	4	4	12	NO	NO	NO	4 esquinas. Dpto. San Martin.
6634	M	BB	AB	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	NO	NO	4 esquinas. Dpto. San Martin.
6636	M	AB	AB	AA	CC	CC	6	4	2	14	NO	NO	NO	4 esquinas. Dpto. San Martin.
6643	M	AB	AB	AA	CC	CC	6	4	2	14	NO	NO	NO	Anillaco, Dpto. Castro Barros.
TOTAL:	**7**					**MED**	**6,29**	**3,14**	**3,14**	**13,71**	**0**	**0**	**0**	
MACHOS:	**7**					**SD**	**0,76**	**0,90**	**0,90**	**0,76**				
HEMBRAS:	**0**													

ANEXO II. RESUMEN DE LOS INDIVIDUOS ANALIZADOS POR FISH:

Patrón de ADNr 45S ANDINO: señal de localización en el par autosómico *III*

Patrón de ADNr 45S NO-ANDINO: señal de localización en el cromosoma sexual X

Patrón de ADNr 45S INTERMEDIO: señal de localización en el par autosómico *III* y en el crom. X

GRUPO ANDINO															
N°	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	Fragmentos	Patrón de ADNr 45S	Localidades
3803	M	BB	BB	AB	AA	AA, AC o CC	17	12	5	3	**SI**	0	NO	**ANDINO**	PERÚ-Arequipa
3804	M	BB	BB	AB	AA	AA, AC o CC	17	12	5	3	**SI**	0	NO	**ANDINO**	PERÚ-Arequipa
4818	M	BB	BB	AB	AB	AA o CC	16	10	6	4	**SI**	0	NO	**ANDINO**	PERÚ-Ica-Nazca
7853	M	BB	BB	BB	BB	AA, AC o CC	14	6	8	6	**SI**	0	NO	**ANDINO**	BOLIVIA-Potosí-Tupiza
7854	M	BB	BB	BB	BA	AA, AC o CC	14	7	7	6	**SI**	3	NO	**ANDINO**	BOLIVIA-Potosí-Tupiza
7875	M	BB	AB	AA	AA	AA, AC o CC	15	12	3	5	**SI**	0	NO	**ANDINO**	BOLIVIA-Cochabamba
7877	M	BB	BB	BB	BB	AA, AC o CC	15	7	8	5	**SI**	1	NO	**ANDINO**	BOLIVIA-Cochabamba
7884	M	AB	AB	AA	AA	AA, AC o CC	13	11	2	7	**SI**	0	NO	**ANDINO**	BOLIVIA-Chuquisaca-Oropeza
7889	M	BA	BB	BB	BB	BB, AA o AC	18	9	9	2	**SI**	0	NO	**ANDINO**	BOLIVIA-Chuquisaca-Oropeza
N= 9															

GRUPO NO-ANDINO															
N°	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	Fragmentos	Patrón de ADNr 45S	Localidades
3214														**NO ANDINO**	URUGUAY-Rivera
3225														**NO ANDINO**	URUGUAY-Río Negro
3441														**NO ANDINO**	BRASIL-Paraiba
7125	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	**NO ANDINO**	PARAGUAY occidental-San Pedro
7443	M	BB	BA	AA	CC	CC	6	3	3	14	NO	0	NO	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Catamarca-Palo Blanco
7795	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-La Union
7803	M	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	NO	0	NO	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-La Union
7933	M	BB	BB	AA	CC	CC	6	2	4	14	NO	0	NO	**NO ANDINO**	PARAGUAY-Boqueron
7942														**NO ANDINO**	PARAGUAY-Boqueron
N= 9															

GRUPO INTERMEDIO															
N°	Sexo	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V-X*	A+B	A	B	C	X C+	I	Fragmentos	Patrón de ADNr 45S	Localidades
7466	M	BB	BB	AB	AA	AC	9	4	5	11	**SI**	3	SI	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7474	M	BB	BB	BB	AA	CC	8	2	6	12	NO	4	SI	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7477	M	BB	BB	AA	AA	AC o CC	9	5	4	11	NO	2	SI	**INTERMEDIO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7478	M	BB	BB	BB	AC	CC	7	1	6	13	NO	5	SI	**INTERMEDIO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7479	M	BB	BB	BA	AA	CC	8	3	5	12	NO	2	SI	**INTERMEDIO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7511	M	BB	BB	BA	AC	AC o CC	8	3	5	12	**SI**	2	SI	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7512	M	BB	BB	BA	AC	CC	7	2	5	13	NO	2	SI	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7513	M	BB	BB	BA	AC	CC	7	2	5	13	NO	3	SI	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7515	M	BB	BB	BB	AA	CC	8	2	6	12	NO	2	SI	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7518	M	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	**SI**	3	SI	**NO ANDINO**	ARGENTINA-Salta-Salvador Mazza
7810	M	BB	BB	AA	AC	AC o CC	8	4	4	12	NO	1	NO	**INTERMEDIO**	BOLIVIA-Tarija-San Fco,Yacuiba
7824	M	BB	BB	AA	AC	CC	7	3	4	13	NO	0	SI	**INTERMEDIO**	BOLIVIA-Tarija-Palmar Chico, Yacuiba
N= 12															