

Tesis Doctoral

# Bases fisiológicas de la distribución de triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas

de la Vega, Gerardo José

2016

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

de la Vega, Gerardo José. (2016). Bases fisiológicas de la distribución de triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5973\\_DelaVega](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5973_DelaVega)

Cita tipo Chicago:

de la Vega, Gerardo José. "Bases fisiológicas de la distribución de triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5973\\_DelaVega](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5973_DelaVega)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Bases fisiológicas de la distribución de triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **Ciencias  
Biológicas**

**Lic. Gerardo José de la Vega**

**Director de tesis: Dr. Pablo E. Schilman**

**Consejero de Estudios: Dr. Pablo E. Schilman**

**Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecofisiología de Insectos, DBBE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA**

**Buenos Aires, Marzo del 2016**

**Fecha de defensa: 23 de Marzo del 2016**

## Bases fisiológicas de la distribución de triatomínos vectores de la enfermedad de Chagas

### Resumen

La enfermedad de Chagas o trypanosomiosis americana constituye un problema de salud pública en la mayoría de los países latinoamericanos y es considerada endémica desde México hasta el sur de Chile y Argentina. Esta tesis se basa en la hipótesis de que las características fisiológicas de las especies de triatomínos, vectores de la enfermedad, pueden constituir una limitación básica (no exclusiva) de su distribución geográfica dentro del continente, de acuerdo a su tolerancia a los factores físicos del ambiente (principalmente la temperatura y humedad). El objetivo general del proyecto fue estudiar las tolerancias fisiológicas de siete especies de triatomínos elegidos por relevancia epidemiológica, diferencias genéticas y distribución latitudinal y relacionarlas con su distribución geográfica. Se determinó, para las especies *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *T. vitticeps*, *T. delponteii*, *T. dimidiata*, *T. sordida* y *T. patagonica*, la Temperatura Crítica máxima (CTmax), la Temperatura Letal máxima, la Temperatura Crítica mínima (CTmin), el tiempo de recuperación a un shock térmico frío (chill-coma recovery time) y la resistencia a la desecación midiendo el contenido de agua total y crítico, así como la tasa de pérdida de agua. A partir de conocer los valores de las tolerancias fisiológicas se realizaron modelos de distribución de las especies para comprender los límites de estos triatomínos y la concordancia con patrones macroecológicos. Los resultados de los análisis fisiológicos en este trabajo nos permiten entender con mayor claridad el límite austral y la distribución de estos vectores en el continente ya que las especies que alcanzan zonas más australes tienen mayores rangos de tolerancia. Combinar los modelos de distribución de especies con enfoques mecanísticos permite entender el nicho ecológico de las especies. Además, en el caso de los vectores de enfermedades, entender el alcance latitudinal, conocer el nicho térmico fundamental y los límites fisiológicos de las diferentes especies podría servir para mejorar estrategias y la eficiencia del control vectorial a nivel local y/o regional.

Palabras clave: Temperatura, Humedad, Ecofisiología, Triatomínos

## Physiological traits of triatomines (Chagas disease vectors) distribution

### Abstract

Chagas disease or American trypanosomiasis is a public health issue in most Latin American countries and is considered endemic from Mexico to southern Chile and Argentina. This thesis based on the hypothesis that the physiological characteristics of Chagas disease vectors, triatomines, can be a (non-exclusive) basic limitation to their geographical distribution, according to environmental factors tolerances (mainly temperature and humidity). The objective was to understand the distribution of seven species of triatomines selected by epidemiological relevance, genetic differences and their latitudinal distribution by studying their physiological tolerances. The critical temperature maximum (CT<sub>max</sub>), upper lethal temperature, critical temperature minimum (CT<sub>min</sub>), chill-coma recovery time and resistance to desiccation were determined for *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *T. vitticeps*, *T. delpontei*, *T. dimidiata*, *T. sordida* and *T. patagonica*. Species distribution models were fitted and physiological tolerances were used to understand geographical limits and ecological patterns. The physiological analysis allow us to understand more clearly the southern limit and the distribution of these vectors in the American continent since species reaching southernmost areas have higher tolerances. Combining species distribution models with mechanistic approaches allows us to understand the ecological niche of the species. Furthermore, in the case of disease vectors, understanding the latitudinal range with the fundamental thermal niche and physiological limits could be used to improve strategies and efficiency of vector control at the local and regional level.

Keywords: Temperature, Humidity, Ecophysiology, Triatomines

## **Agradecimientos**

*A las instituciones y políticas de Estado que hicieron posible el desarrollo de esta tesis. Al CONICET, el MINCyT y la Universidad de Buenos Aires.*

*Al doctor Pablo Schilman quien enseñó y me hizo crecer tanto profesional como personalmente.*

*A Carmen Rolandi, compañera de laboratorio y amiga por ayudarme en distintas etapas de la tesis. Al laboratorio de Ecofisiología de Insectos, todo, quien ayudó tanto al desarrollo de experimentos como a mi formación profesional.*

*Al laboratorio de Fisiología de Insectos, por la formación formal e informal.*

*A mi familia y amigos, por el apoyo, comprensión y el debate sobre la forma de estudiar e investigar los distintos objetos de estudio.*

*A Carolina Coulin por su compañía eterna y nuestro hijo.*

*A Ramón, por su empuje y su pequeño latidito...*

*Tabla de contenidos*

*Título*

*Resumen*

*Abstract*

*Agradecimientos*

*Tabla de contenidos*

<b><i>Capítulo I. <u>Introducción General</u></i></b> .....	8
<i>Prólogo necesario</i> .....	8
<i>América Latina y los vectores de la enfermedad de Chagas</i> .....	9
<i>Macroecología: Patrones y Teorías en Ecología</i> .....	12
<i>Los límites de distribución de especies y el Nicho Ecológico</i> .....	14
<i>Macrofisiología: Fisiología de la distribución</i> .....	16
<i>Macroecología y macrofisiología en triatominos</i> .....	17
<i>Objetivos de la Tesis, hipótesis y predicciones</i> .....	18
<b><i>Capítulo II. <u>Materiales y Métodos Generales</u></i></b> .....	20
<i>Insectos experimentales</i> .....	20
<i>Mediciones con Respirimetría de Flujo Abierto</i> .....	20
<i>Puntos de presencia de los triatominos</i> .....	22
<i>Elección de las especies de trabajo</i> .....	24
<b><i>Capítulo III. <u>Tolerancias térmicas de los triatominos y su relación con la distribución</u></i></b> .....	28
<i>Introducción</i> .....	28
<i>Materiales y Métodos</i> .....	31
<i>Resultados</i> .....	36
<i>Discusión</i> .....	48
<i>Conclusiones</i> .....	54
<b><i>Capítulo IV. <u>Mecanismo de las Tolerancias Críticas máximas en triatominos</u></i></b> .....	56
<i>Introducción</i> .....	56
<i>Materiales y Métodos</i> .....	58
<i>Resultados</i> .....	61
<i>Discusión</i> .....	64
<i>Conclusiones</i> .....	67
<b><i>Capítulo V. <u>Tolerancias a la desecación de los triatominos y su relación con la distribución</u></i></b> .....	68
<i>Introducción</i> .....	68

<i> Materiales y Métodos.....</i>	<i>70</i>
<i> Resultados.....</i>	<i>75</i>
<i> Discusión.....</i>	<i>84</i>
<i> Conclusiones.....</i>	<i>90</i>
<i> Capítulo VI. <u>Discusión General y conclusiones finales</u>.....</i>	<i>91</i>
<i>     Sítensis de los principales resultados.....</i>	<i>91</i>
<i>     Enfoque ecofisiológico del control vectorial.....</i>	<i>96</i>
<i> Referencias.....</i>	<i>99</i>
<i> Anexos.....</i>	<i>111</i>



# Capítulo I

## Introducción General

### **Prólogo necesario**

*A principios del siglo XX el desarrollo de la agricultura brasilera intentaba conectar la producción de Belém en Amazonas con la capital en el sur. Un tendido ferroviario fue el proyecto que se vio frenado por una epidemia de malaria que azotaba a los trabajadores del ferrocarril en Lassance, un pueblo del estado de Mina Gerais en el centro del país. Hasta allí fue a trabajar el joven médico Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, se había recibido en 1903 y tenía gran experiencia en malaria además de la necesidad de un trabajo y un salario fijo. El ministerio de Salud Pública bajo la tutela de Oswaldo Cruz lo había contratado para una campaña en São Pablo y años mas tarde para otra en Rio de Janeiro, ciudad de sus dos amores, la joven Iris Lobo y el club Botafogo. Sus grandes resultados en la lucha contra la malaria y su prodigiosa labor, llevaron a que en 1907 articule la profilaxis de la malaria con el trabajo de investigador en Lassance. Por un lado sus campañas consistían en el trabajo como profesional de la salud y por otro como investigador, su visión holística de la problemática reconciliaba a la microbiología con las colecciones entomológicas. Su concepto de la medicina tropical en Brasil y el trabajo en el interior del país fueron transformando a la ciencia y a la salud pública brasilera (Kropf 2009).*

*Fue un ingeniero del ferrocarril el que le acercó un insecto perteneciente a la subfamilia de los triatominos que picaba a los trabajadores por la noche: “instalado en Lassance, en medio de una población acosada por el paludismo, las enfermedades parasitarias intestinales, la anemia tropical, el bocio y el cretinismo endémico, además de otros síndromes carenciales y parasitarios, el joven investigador detuvo su atención en unos insectos hematófagos que pululaban en las chozas de barro y paja de la zona, los "barbeiros". Estas chinches de gran tamaño se nutrían de la sangre del hombre y de los animales domésticos que habitaban los ranchos” (Romaña 1961). Tiempo antes, Chagas había analizado la sangre de unos monos y descrito un parásito del género Trypanosoma en ella, al observar que los insectos hematófagos que le acercó el ingeniero también se encontraban atacados por estos parásitos, dimitió ejemplares infectados a Oswaldo Cruz para realizar unas investigaciones. Oswaldo hizo que las chinches picasen a un mono de laboratorio y luego de 20 días encontró formas no descritas de tripanosomas en la sangre periférica del animal. Así, probando en el laboratorio con*

*ratas, cobayos, conejos y otros monos iniciaron el estudio del flagelado (Romaña 1961). Chagas describió entonces al nuevo integrante de los protozoos tripanosomástidos y en honor a su mentor le puso Trypanosoma cruzi.*

*En 1909 el joven Chagas tenía en vista esclarecer el hilo conductor de una “entidad mórbida humana bien caracterizada”: conocía al nuevo parásito, su vector y al reservorio en la naturaleza. Solo faltaba probar el caso en los humanos, por ello retornó a Lassance y sobre el análisis de sangre primero en un gato de una casa invadida por los “barbeiros” y luego de una niña con síntomas febriles, alto grado de anemia, numerosos ganglios inflamados e hipertrofia de tiroides, encontró gran cantidad de los flagelados que coincidieron con los descritos en el laboratorio (Chagas 1911, de Araujo-Jorge et al 2010). Chagas en casi cinco años pudo describir al agente etiológico y sus transformaciones, al vector, su hospedador, sus manifestaciones clínicas y la epidemiología; todo el ciclo completo de una de las enfermedades más importantes de Latinoamérica. Por desgracia, los aspectos clínicos de la enfermedad expuestos principalmente por el propio Carlos Chagas, condujeron a este investigador a describir el bocio como síndrome patológico fundamental causado por el Trypanosoma en el hombre. Llegó a designar la enfermedad con el nombre de “Tiroiditis parasitaria”, confusión que repercutió más tarde en forma desfavorable en el conocimiento de la nueva afección (Romaña 1961).*

*Varios trabajos se dieron a partir de los hallazgos de Chagas y su grupo, no sólo en Brasil sino también fueron realizados importantes aportes en Argentina y el resto de Latinoamérica, donde los triatomos eran ampliamente conocidos en las viviendas rurales. Así fue, que entender a la “Trypanosomiasis americana” con escala continental y no solamente como una “enfermedad de Brasil”, fue parte de un proceso que dejó al descubierto las posturas políticas de los detractores de Chagas y de aquellos que no comprendieron la problemática con su escala social. La polémica generó un ambiente de dudas. A pesar de esto, Chagas prosiguió sus investigaciones sobre el estudio de la forma cardíaca que desde 1916, luego de correcciones y especificaciones, primaba sobre la relación con el bocio y el tiroidismo. Tales dudas serían superadas a lo largo de las dos décadas que siguieron a su muerte ocurrida en 1934. Los estudios realizados por médicos argentinos y por discípulos de Chagas arrojarían un consenso sobre la enfermedad, como problema médico específico y como problema socialmente relevante en el continente americano (Romaña 1961, Kropf, 2003, 2009).*

## **América Latina y los vectores de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana constituye un problema de salud pública en la mayoría de países latinoamericanos y es considerada endémica desde México hasta el sur de Chile y Argentina. En los inicios de la década de los 90 se calculó que al menos 100 millones de personas estaban expuestas a contraer la infección y 18 millones estaban infectadas. Una década después, gracias

a los controles realizados, la estimación fue que aproximadamente 60 millones de personas habían salido del riesgo de contraer la enfermedad causada por colonias domésticas de algún triatomino (Schofield et al 2006). Para poder figurarse completamente la enfermedad, también hace falta conocer que existen distintas especies del vector capaces de transmitir la enfermedad a los humanos u otros mamíferos (Stevens et al 2011). Los Triatominos son insectos hematófagos que se clasifican como una subfamilia de la familia Reduviidae (Hemiptera, Heteroptera) y más de la mitad de las 141 especies actualmente reconocidas de triatominos han demostrado ser natural o experimentalmente infectados con *T. cruzi* (Lent y Wygodzinsky 1979, Schofield et al 2009). Habitan casi exclusivamente el continente americano entre las latitudes 46° N y 46°S (Carcavallo et al 1995, Schofield et al 2009) y a lo largo de América se conocen vulgarmente con distintos nombres y en diferentes lenguas como: “vinchuca”, es el nombre más común y utilizado desde Argentina hasta Perú, los otros nombres son: “chipo” en Venezuela, “pito” en Colombia y “barbeiro” en Brasil. La forma que los pueblos han utilizado para denominar a estos triatominos son varias y hacen referencia: a su forma de alimentación (“barbeiro”, “chinche bebe sangre”, “chinche besucona”), a sus piezas bucales (“chinche picuda”, “chinche hocicona”), a sus hábitos domiciliarios (“chirimacha” -que quiere decir en quechua “chinche que no soporta el frío”-) o al grado de conocimiento de la enfermedad (“sham-bui tá” -que en guaraní significa chinche que hace daño cuando defeca-) (Guhl et al 2009, Schofield et al 2009).

Así como varían los nombres según las regiones y países en América Latina, también varían las especies de triatominos. La importancia relativa como vectores dependerá de sus comportamientos, sus adaptaciones al domicilio, al peridomicilio o su preferencia por los ambientes silvestres. Además de otros factores que lo definirán como su grado de antropofilia y su hospedador elegido, el tiempo que le lleva alimentarse y el tiempo entre la alimentación y la defecación son otras variables que le dan la importancia como vector a la especie (Lent y Wygodzinsky 1979).

Varios triatominos han colonizado las casas humanas, en las que transmiten la enfermedad al hombre y sus animales domésticos, pero las especies epidemiológicamente más importantes son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *T. dimidiata* con distribución en distintos países (Schofield et al 2009, Patterson y Guhl 2010). Además existen otros vectores activos de la enfermedad de Chagas más localizados como: *Triatoma brasiliensis*, *T. guasayana*, *T. maculata*, *T. patagonica*, *T. phyllosoma*, *T. pseudomaculata*, *T. rubrofasciata* y *T. rubida*, *Panstrongylus chinai*, *P. megistus* y *P. rufotuberculatus*, *Rhodnius ecuadoriensis* y *R. pallens* (Lent y Wygodzinsky 1979).

En nuestro continente existen cuatro claras regiones epidemiológicas: México y América Central, la región Amazónica, la región Andina y el Cono Sur. Cada una de estas regiones tiene vectores principales y emergentes. En la región de México y América Central *R. prolixus* está asociado a ambientes domésticos pero se lo considera introducido de países sudamericanos, en tanto que *T. dimidiata* es

endémico y habita ecotopos domiciliarios y peridomiciliarios por lo que está ampliamente distribuido en la región. En 1997 se llevó a cabo la iniciativa Centroamericana para el control de Chagas donde se estableció entre los objetivos, eliminar *R. prolixus* de Centroamérica y reducir *T. dimidiata* de los domicilios (Patterson y Guhl 2010). En la región Amazónica existe gran diversidad de triatomíneos como así también de reservorios silvestres. Sin embargo, el principal vector es *R. prolixus* y otras especies del mismo género (*Rhodnius*) (Patterson y Guhl 2010, Stevens et al 2011). Por su parte, la región Andina posee como vector principal a *R. prolixus* en Venezuela y Colombia, a *T. dimidiata* en Colombia y Ecuador y *R. ecuadoriensis* en Ecuador. Cada una de estas poblaciones domiciliadas también posee focos silvestres, asociados con palmeras y palmas, que funcionan como reservorios de re-invasión luego de la aplicación de controles en la región. En la región del Cono Sur el vector principal, históricamente ha sido *T. infestans* pero otras especies están implicadas como vectores secundarios o emergentes, sobre todo a partir del control de *T. infestans* en algunas zonas como Uruguay, Brasil y algunas provincias de Argentina. En el noreste de Brasil, *T. brasiliensis* y *T. pseudomaculata* han mostrado fuertes tendencias para colonizar hábitats domésticos junto con *Panstrongylus megistus* en el sur de Brasil. Otras especies que han mostrado algún potencial para la domiciliación son *T. vitticeps*, y *T. rubrovaria* en Brasil. *Triatoma sordida* es un vector secundario importante en Paraguay, Bolivia, norte de Argentina y sur de Brasil (Patterson y Guhl 2010).

En 1991 los Ministros de Salud de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay pusieron en marcha una iniciativa para la eliminación de la enfermedad de Chagas en estos países. El énfasis de la campaña era utilizar métodos de control de triatomíneos establecidos, en un esfuerzo de cooperación internacional para eliminar las poblaciones de *T. infestans* en seis países de América del Sur. Los logros más importantes del programa (Iniciativa Cono Sur) fueron la interrupción en Uruguay (certificada en 1997 y 2012), Chile (en 1999), Brasil (en 2006), Paraguay oriental (en 2008), algunas partes de Argentina (2001, 2004, 2011, 2012) y sur de Perú (en 2012) que fueron certificados libre de transmisión vectorial (por *T. infestans*) (Patterson y Guhl 2010, PAHO 2012). La figura 1 resume gráficamente las regiones, vectores, iniciativas y certificaciones en el control de la enfermedad de Chagas en América Latina (figura 1).

Por otro lado si bien varios estados, provincias y departamentos de América Latina han obtenido el certificado que la Organización Panamericana de la Salud otorga, Abad-Franch y colaboradores (2013) establecen que la “certificación de la ausencia de transmisión de la enfermedad de Chagas por vectores nativos” carece de fundamento científico y podría debilitar sistemas de control y vigilancia a largo plazo, en detrimento de las personas que viven en condiciones de riesgo. En su lugar proponen una “certificación de buenas prácticas” de forma regular que podría ayudar a lograr el control de la enfermedad de manera sostenida (Abad-Franch et al. 2013).

Las distintas iniciativas se deben hacia los vectores (principales, secundario o emergentes) propios de

cada región, es decir, que si bien los triatomos tienen una distribución por casi todo el continente americano, no todos se encuentran en todas las regiones del territorio y las iniciativas son casi específicas con resultados que se deben a las características particulares de cada especie. Esto pone de manifiesto que existen límites en los rangos de distribución y rasgos singulares en cada una de las especies.

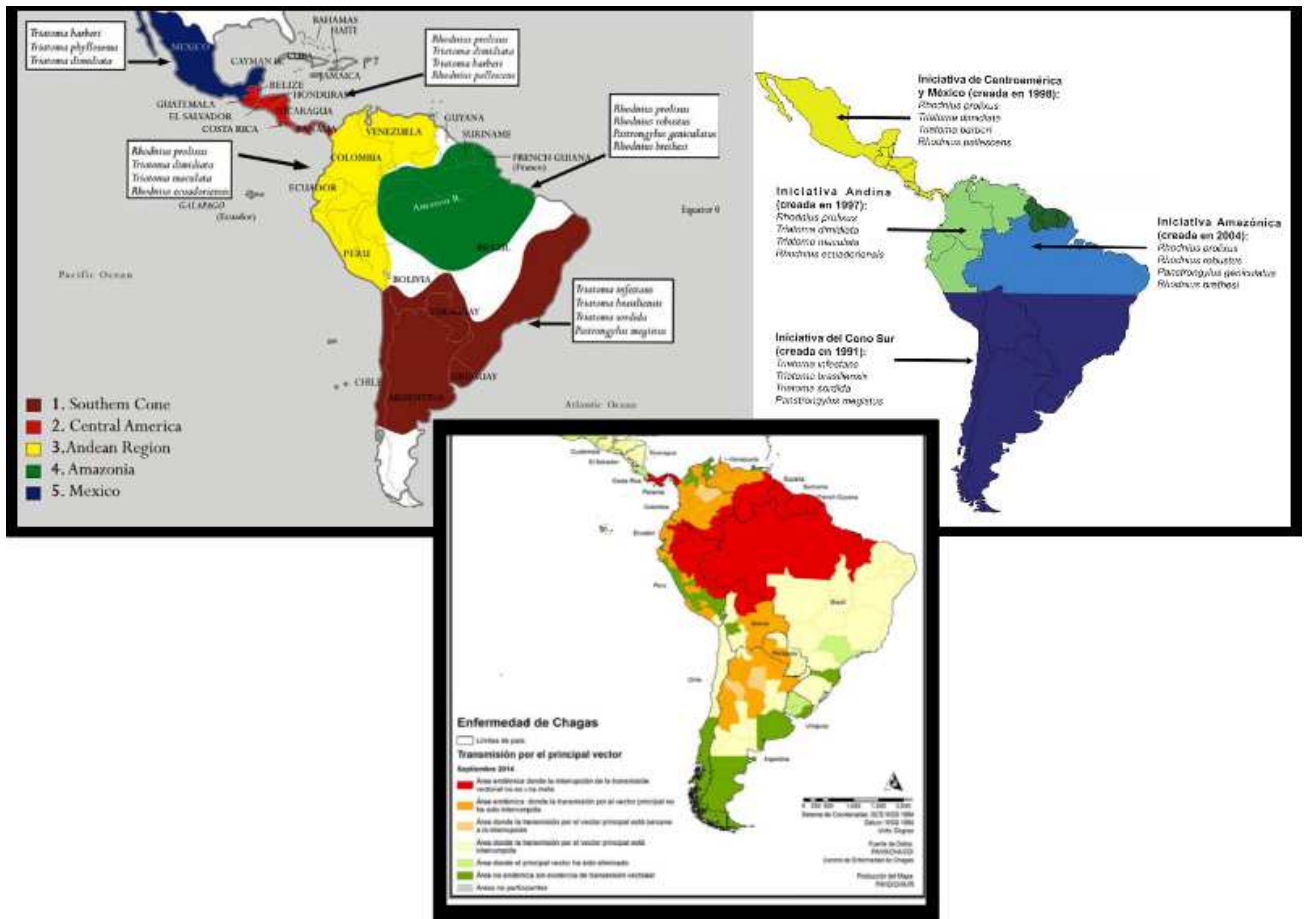


Figura 1. Se muestran las regiones eco-epidemiológicas y sus principales vectores, las iniciativas para la lucha vectorial en las regiones y sus principales resultados, por provincia y departamento certificado de interrupción vectorial.

### Macroecología: Patrones y Teorías en Ecología

El reconocimiento de la importancia de una perspectiva regional para comprender la estructura y la dinámica local ha permitido el desarrollo de la Macroecología, una disciplina útil para la comprensión de la abundancia y la distribución de las especies a grandes escalas espaciales y temporales (Gaston y Blackburn 2000). La diversidad y las áreas de distribución de las especies han sido desde siempre una

atracción fundamental en el campo de la ecología: ¿Por qué hay áreas con mayor cantidad de especies que otras? Este patrón ampliamente estudiado desde Wallace en 1878 hasta la actualidad, muestra que desde los polos hacia el ecuador la diversidad y riqueza de especies aumenta. Lo mismo fue observado a diferentes niveles taxonómicos, tanto a nivel de especie como de géneros, familias y órdenes (Taylor y Gaines 1999, Chown y Gaston 2002, Emerson y Kolm 2005). Si bien este patrón ha sido ampliamente documentado mediante aproximaciones empíricas y teóricas a lo largo de los años, todos los mecanismos propuestos aún no terminan de responder la pregunta original (Taylor y Gaines 1999, Chown y Gaston 2002).

Una de las aproximaciones para explicar la gran riqueza de especies en los trópicos, en comparación con la de los polos, fue el estudio de la variación de los rangos de distribución geográfica de las especies. En estos estudios se establece que, para los ambientes terrestres, las áreas de distribución tienden a reducirse cuando disminuye la latitud; es decir, la mayor riqueza en los trópicos se debería a que las áreas de distribución de las especies son menores. Este patrón latitudinal fue puesto a prueba primeramente para grupos de subespecies por el ecólogo argentino Eduardo Rapoport (Rapoport 1982) y posteriormente para grupos taxonómicos de mayor rango logrando una generalización por Stevens (1989). La denominada “Regla de Rapoport” (Stevens 1989) establece que: El área del rango geográfico de las especies es función de la latitud (o la altitud); a medida que la latitud (o altitud) desciende, se observa una disminución en el rango geográfico (Stevens, 1989, Brown et al 1996).

El gradiente latitudinal en la riqueza de especies es paralelo (y no simplemente coincidente) con el gradiente latitudinal del rango geográfico y el mecanismo, aparentemente, responsable de la producción de este último patrón macroecológico es sencillo. Para sobrevivir a mayores latitudes, los organismos deben ser capaces de soportar una mayor variabilidad en las condiciones climáticas que a menores latitudes. Esta idea, conocida como Hipótesis de Variabilidad Climática o Variabilidad Estacional, se basa en dos supuestos críticos. El primero es que hacia latitudes (o altitudes) mayores, el clima se vuelve más variable y el segundo, que las especies a latitudes (o altitudes) mayores exhiben tolerancias climáticas (fisiológicas) más amplias que las especies que habitan en latitudes (o altitudes) menores (Stevens 1989, Chown et al 2004).

Otros mecanismos propuestos para explicar la regla de Rapoport han sido: (1) las tasas diferenciales de extinción como consecuencia de glaciaciones sobre especies con rangos de distribución pequeños, (2) una menor competencia en latitudes más altas debido a la menor riqueza de especies, (3) la relación entre el área de distribución y la extensión de la superficie, especialmente en el Hemisferio Norte y (4) los límites biogeográficos, donde existe mayor facilidad de expansión del rango dentro de las provincias biogeográficas que entre ellas (Gaston y Blackburn 2000). Los primeros tres puntos se podrían resumir en los procesos evolutivos o ecológicos dentro de la Hipótesis de Tiempo Ecológico. Esta hipótesis propone que la diferencia entre la riqueza de especies de una zona y otra sería consecuencia del periodo suficiente para la recolonización o invasión posterior a una catástrofe ecológica. Sin embargo, aunque

este mecanismo potencialmente puede explicar patrones de riqueza a pequeña escala, es poco probable que proporcione una explicación general de los gradientes de riqueza latitudinales observados. Esto sugiere que la riqueza de las regiones entonces se podría explicar por el tiempo disponible para que las especies evolucionen y se llenen los hábitats y nichos en esas regiones. Esta hipótesis que se trata simplemente de tramos más largos de tiempo centrada en “especiación” en lugar de “colonización” se considera la Hipótesis de Tiempo Evolutivo (Gaston y Blackburn 2000). Si bien éstas hipótesis podrían ser responsables de la diferencia entre los hemisferios, ya que la última glaciación tuvo un efecto mayor sobre el hemisferio norte que el hemisferio sur (Markgraf et al 1995, Ezcurra et al 2014), no queda claro cómo podrían ser las responsables de la mayor riqueza de los trópicos comparado con latitudes más altas (Gaston y Blackburn 2000). Por otro lado y en relación al cuarto punto, si se pudiera demostrar que los límites biogeográficos son áreas en las que los cambios en las condiciones ambientales limitan la distribución de especies, esta explicación podría entenderse como una modificación de la Hipótesis de Variabilidad Climática, por ende entre los mecanismos que intentan explicar la regla de Rapoport dicha Hipótesis de Variabilidad Climática parece ser la hipótesis más adecuada para explicar la variación del rango geográfico según la latitud (Stevens 1989, Gaston y Blackburn 2000).

De todos modos parece ingenuo intentar explicar esta variación en términos de un solo factor ambiental o histórico. Tal vez pueda explicarse por una combinación de un pequeño número de factores, todos correlacionados con la latitud y que incluye: 1) la tasa de entrada de energía solar y su influencia en la productividad; 2) las condiciones ambientales abióticas relativamente constantes (tanto en la escala temporal de estaciones o millones de años); 3) las compensaciones entre la influencia de las interacciones ambientales en latitudes altas y las interacciones bióticas en los trópicos; y 4) el área (Brown 1999).

### **Los límites de distribución de especies y el Nicho Ecológico**

Desde una perspectiva macroecológica el resultado de las complejas interacciones entre la fisiología de las especies, sus rasgos ecológicos y las interacciones bióticas (intra e interspecíficas) determina los límites de distribución de las especies (Spicer y Gaston 1999). Las razones ecológicas para las “fronteras” de las especies y las hipótesis propuestas para explicar los límites han sido diversas (Hoffmann y Blows 1994) e incluyen tanto interacciones bióticas como la influencia de factores abióticos (Chown y Nicholson 2004). Por ejemplo, una teoría clásica originalmente derivada de Darwin y más tarde desarrollada por MacArthur, predice que, a lo largo de un gradiente ambiental determinado, las especies parecen estar limitadas en un extremo por factores físicos y por el otro lado serían los factores bióticos los que restringen su distribución (Brown et al 1996, Guisan y Thuiller 2005). Incluso MacArthur cuando publica su legendario libro, “Ecología geográfica”, en 1972 (mismo año en el que fallece), desconocía cuáles eran los mecanismos de este patrón en el que las interacciones bióticas tienden a limitar la distribución y abundancia en latitudes más bajas, mientras que factores abióticos eran

más propensos a ser el factor limitante en latitudes más altas (MacArthur 1972, Brown 1999).

Estos límites en la distribución de las especies se explican dentro de lo que se considera el Nicho Ecológico de la especie. El nicho es el subconjunto de condiciones ambientales que afectan a un organismo particular, donde el *fitness* medio de los individuos de una población es mayor o igual a uno. La mayoría de las conceptualizaciones modernas del nicho representan una versión de la idea de George Hutchinson como un espacio multidimensional cuyos ejes comprenden las condiciones y los recursos que limitan la supervivencia y la reproducción de un organismo: El llamado “hipervolumen n-dimensional” por Hutchinson en 1957. Esta definición es muy útil en el contexto de la comprensión de una distribución de las especies y la abundancia, ya que las dimensiones del espacio geográfico son un subconjunto de las dimensiones ambientales, que comprende sólo las que afectan al *fitness* de la especie. Así, el nicho también se define por el organismo, ya que las propiedades específicas del organismo determinan las variables ambientales relevantes (Kearney 2006; Gouveia et al 2014).

Una distinción muy útil dentro del concepto de nicho es la idea de Nicho Fundamental y Nicho Realizado. El primero es la región de la multidimensión dentro del hiperespacio ambiental donde el *fitness* de la especie es igual o mayor a uno; dicho de manera más sencilla serían solamente las características del ambiente necesarias donde la especie puede sobrevivir y reproducirse. En cuanto se incluyen las interacciones bióticas en el cálculo del nicho se obtiene el segundo tipo de nicho, el Nicho Realizado, que es generalmente de menor tamaño y muchas veces coincidente con la distribución de la especie (Kearney 2006). Bajo el concepto Hutchinsoniano de Nicho Realizado, las interacciones bióticas y las limitaciones en la dispersión podrían evitar que las especies ocupen la totalidad de áreas que fisiológicamente pueden tolerar (Gouveia et al 2014). Sin embargo, las especies no pueden sobrevivir y reproducirse en toda la gama de condiciones abióticas que podría encontrarse en un continente. Las condiciones ambientales varían en el espacio y el tiempo, y por lo tanto las poblaciones y especies son continuamente desafiadas para mantener su homeostasis. Para ello la evolución ha generado las adaptaciones fisiológicas, las tolerancias fisiológicas y la capacidad fisiológica de aclimatación a las condiciones en diferentes entornos a lo largo de los gradientes geográficos (Bozinovic et al 2011).

Por medio de las herramientas de sistemas de información geográfica (GIS, por sus siglas en inglés “*Geographical Information System*”) la dualidad nicho-espacio permitió el desarrollo del área dentro de la ecología de “modelado de nicho ecológico” (ENM, por sus siglas en inglés “*Ecological Niche Modelling*”, también conocida como “modelado de la distribución de las especies”, “*Species Distribution Modelling*” o SDM por sus siglas en inglés), que utiliza variables ambientales y datos de presencia para estimar, reconstruir y predecir la distribución geográfica de las especies en marcos espaciales y temporales determinados (Guisan y Zimmermann 2000, Gouveia et al 2014). Sin embargo, encontrar el modelo que predice con mayor precisión y exactitud la distribución actual o potencial de las especies ha sido siempre un gran desafío para los ecólogos, quienes han dado a conocer varios modelos de distribución de especies. Estos modelos correlacionan las variables climáticas con las distribuciones



observadas bajo la tesis general de que el mejor indicador de las necesidades climáticas de una especie es su distribución actual, la cual incluye de por sí las interacciones biológicas (Pearson y Dawson 2003). Sin embargo algunos autores determinan que en realidad los modelos correlativos son una simple descripción a partir de un análisis estadístico multivariado del Nicho Realizado y no una relación causal entre el ambiente, las presencias y el nicho (Kearney 2006, Kearney y Porter 2009). En su lugar han desarrollado los denominados modelos mecanísticos, que en cambio, consideran los atributos funcionales de las especies (comportamentales, morfológicos y/o fisiológicos) y su relación con los datos bioclimáticos (Kearney 2006; Kearney y Porter 2009). Estos últimos modelos son indudablemente mucho más difíciles de llevar a cabo, teniendo algunas veces menor poder predictivo en relación a los modelos correlativos, pero un poder explicativo considerablemente mayor (Kearney 2006).

### **Macrofisiología: Fisiología de la distribución**

Para entender cómo las características del Nicho Fundamental se reflejan en el espacio es necesario ver cómo se relacionan las distribuciones geográficas de las especies y sus características fisiológicas. La correlación existente entre las variaciones de los rasgos fisiológicos de las especies y los patrones de distribución espacial y temporal, y sus implicancias ecológicas, se considera como el puente entre Ecología y la Fisiología y se la denomina Macrofisiología (Chown et al 2004; Bozinovic et al 2011; Gouveia et al 2014). Este área interdisciplinaria con un enfoque de ecología fisiológica proporciona una perspectiva que tiene ver con la variación en rasgos fisiológicos a distintos niveles taxonómicos, y a escalas geográficas y temporales amplias, como un medio para comprender las consecuencias ecológicas y evolutivas a nivel intra e inter-específico (Chown et al 2004). Este enfoque reciente de la biodiversidad, busca elucidar los patrones de variabilidad fisiológica geográfica en el marco de la estructura jerárquica de la biodiversidad y entender los mecanismos que subyacen a estos patrones (Bozinovic et al 2011).

Los efectos fisiológicos del clima sobre las especies, en particular las especies ectotérmicas, suelen estar relacionados con el balance hídrico y el equilibrio térmico, por lo que los factores abióticos más importantes que influyen en la distribución y abundancia de los insectos son la disponibilidad del agua y la temperatura (Chown y Nicholson 2004). Según la Hipótesis de Variabilidad Climática, la tolerancia térmica debería correlacionar positivamente con el rango geográfico de la distribución de las especies, ya que la mayor variabilidad climática en latitudes elevadas funcionaría como el factor principal de selección. Aquellas especies que sean capaces de tolerar tal variación podrán habitar esas zonas o extender su área de distribución hacia ellas (Stevens, 1989, Chown y Nicholson 2004). Paradójicamente, si bien existe documentación para este tipo de patrones climáticos, las tolerancias fisiológicas de las especies a través de grandes gradientes latitudinales no han sido tan ampliamente evaluadas (Addo-Bediako et al. 2000, Chown et al. 2002).

## Macroecología y macrofisiología en triatomos

Así como el arreglo espacial de la riqueza de especies muestra un gradiente con mayor cantidad hacia el ecuador, la riqueza de especies de triatomos también es mayor en los trópicos y desciende hacia los polos. Sin embargo, su valor máximo no se encuentra sobre el ecuador, si no que se observa entre los 5° y 10° de latitud sur. Además, las diferencias entre los hemisferios también se observan si se tiene en cuenta el área geográfica habitable y la temperatura. En el hemisferio sur, producto de la cordillera de los Andes, se genera también un gradiente longitudinal donde la riqueza de especies aumenta hacia el este de América del sur (Rodríguez y Gorla 2004).

Otro patrón macroecológico que se observa teniendo en cuenta la totalidad de los géneros de los triatomos (*Tritoma*, *Rhodnius*, *Psammolestes*, *Panstrongylus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Hermanlenticia*, *Alberproseniini*, *Bolboderini* y *Cavernicolini*) es la regla de Rapoport. Gorla y Noireau (2010) analizaron el rango latitudinal de la distribución (la diferencia entre la latitud máxima y mínima de la distribución geográfica de las especies) en relación a la latitud y sus resultados mostraron un incremento lineal significativo del rango latitudinal de las especies desde el ecuador hacia los polos (es decir, más estrecho cerca del ecuador y más extenso hacia latitudes más altas), como predice la regla de la Rapoport. Por otro lado, Diniz-Filho y colaboradores (2013) mostraron que existe una conexión entre el patrón de diversidad y la riqueza de especies de triatomos y la distribución de los mismos, e identificaron un papel importante de la temperatura y la estacionalidad en la explicación de la variación en los patrones de diversidad. Por lo que la disponibilidad de hábitats para las poblaciones silvestres de especies de triatomos depende en gran medida de la estructura de la comunidad y de las condiciones ambientales. Otros autores mostraron que además de la riqueza de especies, la diversidad morfológica, también disminuye con la latitud; Fergani y colaboradores (2013) mostraron que las especies de triatomos más “similares” co-existirían cerca de los límites de distribución en asociación con los cambios de las variables ambientales.

Dada esta estrecha asociación entre las especies de triatomos y el hábitat, gran cantidad de estudios han utilizado variables ambientales a escala continental o regional para analizar la distribución geográfica de las especies de vinchucas. Se han realizado estudios tanto con análisis multivariado discriminantes y regresiones lineales, como modelado de nicho ecológico en donde los resultados muestran que las características ambientales son muy buenos indicadores de la distribución geográfica en las especies de triatomos (Gorla y Noireau 2010). Se pueden nombrar como ejemplo de resultados de la relación entre variables ambientales y distribución de triatomos a la variabilidad de la temperatura media del aire y la amplitud anual de la misma como las variables principales que definen la distribución geográfica de *T. infestans* (Gorla 2002); a la temperatura mínima promedio asociada a la distribución de *T. nitida* (Bustamante et al 2007). Además, la distribución de *R. prolixus* se correspondería con zonas de máxima temperatura absoluta y humedad relativa, aunque para *T. dimidiata*

se mostraría una asociación significativa y opuesta a las temperaturas máximas absolutas en Guatemala (Bustamante et al. 2007). Por otro lado, se mostró una asociación con las bajas humedades relativas con algunas especies del género *Rhodnius* en Brasil (Gurgel-Gonçalves et al 2012) y que la precipitación anual y precipitación anual del trimestre más húmedo aparentemente limitan la distribución espacial de *T. vitticeps* (de Souza et al 2010).

Paradójicamente y al igual que lo planteado en la sección anterior, existe gran cantidad de documentación para los patrones de distribución y su relación con las variables climáticas, sin embargo las tolerancias fisiológicas de los triatominos a través de grandes gradientes latitudinales nunca han sido evaluadas. Se podría citar como ejemplo de intentar entender la distribución a partir variables fisiológicas, aunque para una sola especie, al estudio de de Souza (2010) donde se demuestra una fuerte asociación entre la presencia de *T. vitticeps* y una alta humedad ambiental, que al parecer actuaría como un factor limitante en la distribución de este triatomino.

### **Objetivos de la Tesis, hipótesis y predicciones:**

En la presente investigación se trabajó bajo el precepto de que las características fisiológicas de cada especie de triatomino pueden constituir una limitación básica (no exclusiva) de su distribución geográfica de acuerdo a su tolerancia a los factores físicos del ambiente (principalmente la temperatura y la humedad). De esta manera las características y las tolerancias fisiológicas de cada especie de triatomino estarán relacionadas con su distribución en términos de ausencia / presencia geográfica, como una expresión de su tolerancia a los factores físicos del ambiente.

El objetivo general de la investigación fue:

- Estudiar las tolerancias fisiológicas de siete especies de triatominos elegidos por relevancia epidemiológica, diferencias genéticas y distribución latitudinal y relacionarlas con su distribución geográfica.

De este objetivo general se desprenden las siguientes hipótesis y predicciones:

- 1) Las variables ambientales definen los límites de distribución de los triatominos. *Las diferentes especies de vinchucas tendrán límites de distribución producto de un límite en las tolerancias fisiológicas a las variables ambientales.*
- 2) Existen patrones en la distribución geográfica que se explican a partir de las tolerancias fisiológicas de los triatominos. *En este caso las tolerancias fisiológicas servirán como mecanismo de explicación de los patrones de distribución de los triatominos.*

Como objetivo global de esta tesis también existe la idea, no menor, de aportar información y contribuir de forma positiva a los programas de control vectorial y al conocimiento general de estos vectores.

En los capítulos III, IV y V se desarrollan los objetivos específicos de las tolerancias fisiológicas a la temperatura y la humedad y su relación con la distribución geográfica.

# Capítulo II

## *Materiales y Métodos generales*

### *Insectos experimentales*

La mayoría de los triatominos utilizados fueron provenientes del Servicio Nacional de Chagas, Córdoba, Argentina y luego criados a  $28\pm 1^\circ\text{C}$ , 30-60% HR, bajo un fotoperíodo de 12:12 horas Luz/Oscuridad (inicio de la luz 8:00 horas) hasta alcanzar el estadio deseado para la realización de los ensayos. Las larvas fueron alimentadas semanalmente sobre gallinas vivas. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con las reglas de bioseguridad del Servicio de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. La cría, alimentación y cuidado de los insectos se realizó en conjunto con el Laboratorio de Fisiología de Insectos (DBBE-FCEN) en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

A excepción de lo expuesto en el anexo I para el desarrollo de esta tesis se trabajó con el V estadio larval. Los insectos llegados del Servicio Nacional de Chagas se encontraban en el IV estadio y luego de las alimentaciones, se los utilizaba una semana después de su ecdisis ya como estadio V y sin alimentar.

### *Mediciones con Respirimetría de Flujo Abierto*

Se describirá a continuación una metodología que se utiliza en gran parte de esta tesis, la respirometría de flujo abierto. Esta metodología tiene la ventaja de tener una alta resolución temporal y se utilizó para determinar parámetros como la temperatura crítica máxima, la temperatura letal superior, la tasa de liberación de agua, la tasa metabólica estándar o de reposo y la actividad motora. Para ello se utilizó un sistema de respirometría de flujo abierto de alta resolución TR-2 Sable System Internacional (SSI; Las Vegas, Nevada, EE.UU.) conectado con un analizador de  $\text{CO}_2$  infrarrojo (Li-Cor modelo LI-6251, resolución 0,1 ppm de  $\text{CO}_2$ ), unido a un detector de actividad AD-2 (SSI) (Lighton y Turner 2004) y un analizador de vapor de agua (RH-300, SSI). Se hizo circular aire libre de  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$  a un flujo de *ca.* 100 ml/min gracias a una bomba de aire con controlador de flujo (SS4, SSI), que tiene la capacidad de bombear el aire, medir y controlar su flujo, a través de tubos de 3 mm de diámetro interno de baja permeabilidad (Bev-A-Line) a una cámara de respirometría RC-M (con un volumen interno de *ca.* 13 ml; SSI). De allí, el aire pasó hacia el analizador de vapor de agua y luego el analizador de  $\text{CO}_2$  antes descriptos. Dentro de un gabinete (PTC-1 gabinete de efecto Peltier SSI) conectado a un controlador de

temperatura (Pelt-5, precisión  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ) se introdujo la cámara respirométrica con el insecto experimental dentro. Con el objetivo de equilibrar la temperatura del interior del gabinete PTC-1 y la cámara de respirometría, el flujo de aire pasa a través de un tubo de cobre en espiral (ca. 6,5 metros de largo) colocado dentro del gabinete. La temperatura cerca de la cámara de respirométrica se midió mediante una termocupla conectada a un termómetro digital de 4 canales (SSI TC-2000,  $0,2^{\circ}\text{C}$  de precisión y  $0,01^{\circ}\text{C}$  de resolución). Las salidas analógicas de los analizadores: de  $\text{CO}_2$ , vapor de agua, actividad, temperatura de la cámara y flujo de aire se conectaron a un conversor A/D (SSI UI-2, 16 bits, precisión básica = 0,05%) y se almacenaron en una computadora por medio del software de adquisición de datos ExpeData (SSI) (ver figura 1).

El aire de referencia (sin  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ) fue empujado a través del sistema de respirometría e iniciada la grabación. Después de registrado al menos 3 minutos de línea base constante (medido con la cámara respirométrica vacía), la grabación se detuvo, se colocó el insecto en la cámara de respirometría y se reanudó la grabación luego de 6-8 minutos (una vez que el  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  atmosférico que se introdujo en el sistema al abrir la cámara para colocar el insecto fue lavado). Al mismo tiempo, el perfil de temperatura controlada se inició con 15 minutos a  $35^{\circ}\text{C}$ , continuando con una rampa ascendente de  $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$  durante 78 minutos. La temperatura final se mantuvo durante 10 minutos para, finalmente, restablecer la temperatura del gabinete a  $35^{\circ}\text{C}$ . La concentración de  $\text{CO}_2$  en ppm, el vapor de agua en ml/h, la actividad en volts y la temperatura del aire dentro del gabinete de temperatura controlada en grados centígrados, se registraron a 1Hz hasta que la grabación se terminó manualmente.

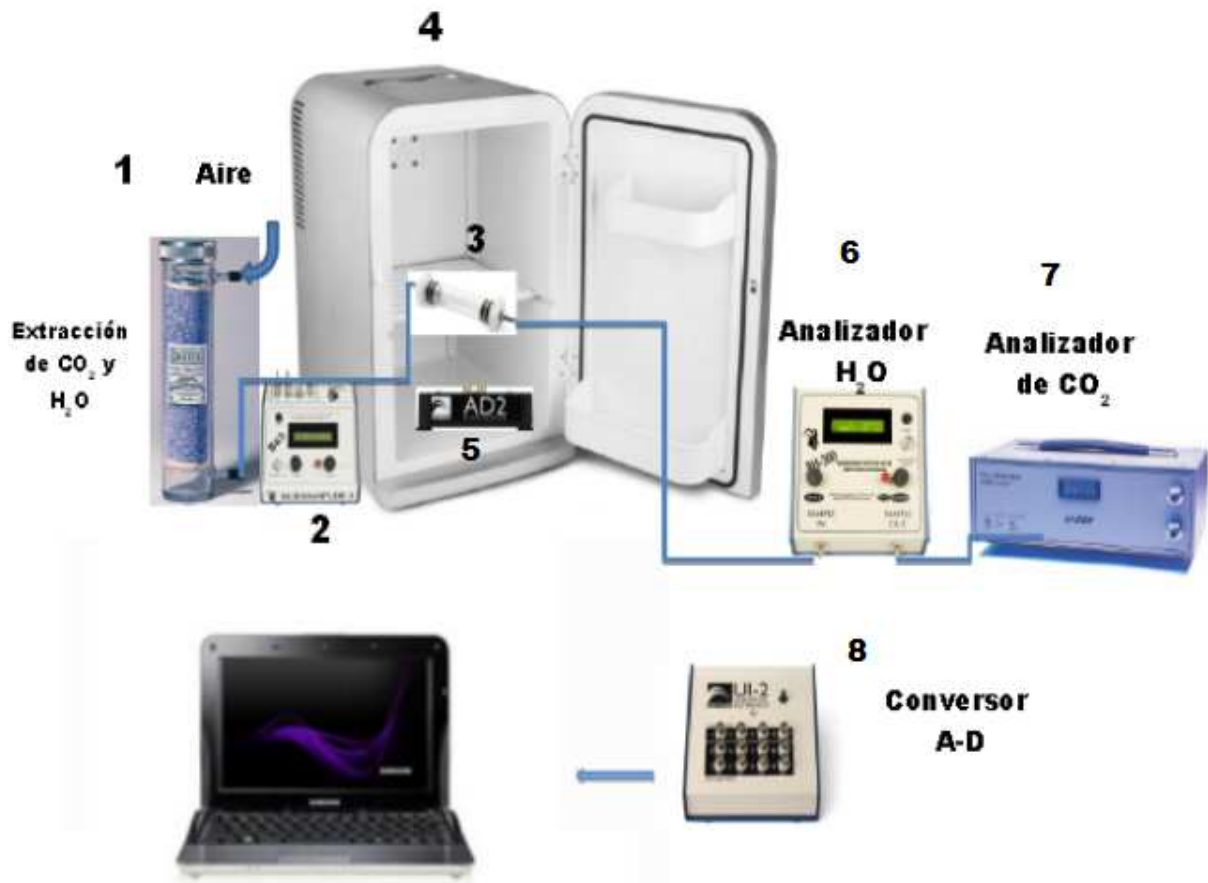


Figura 1. Esquema del sistema de Respirometría de Flujo Abierto. El circuito inicia al extraerle el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O al aire (1), este circula hacia la cámara respirométrica (3), a través de una bomba con flujo controlado (2), dentro del gabinete de temperatura (4) (controlado mediante un controlador de temperatura -no mostrado en la imagen). Luego, la actividad, la liberación de H<sub>2</sub>O y la producción de CO<sub>2</sub> son medidas por el detector de actividad (5), el analizador de H<sub>2</sub>O (6) y luego por el analizador de CO<sub>2</sub> (7). Todos los registros, incluido la temperatura (no mostrado en la imagen), son convertidos a una señal digital (8) y almacenadas en la computadora gracias al programa ExpeData (SSI). Esquema diseñado por Carmen Rolandi.

### ***Puntos de presencia de los triatominos***

Los datos o puntos de presencia de la distribución de las especies de triatominos se obtienen generalmente de la detección de colonias en los domicilios (o peridomicilios), muestreos focales en poblaciones silvestres o de la información sobre la intrusión en los domicilios de adultos silvestres. En consecuencia, mientras mayor es el proceso sinantrópico de un vector de la enfermedad de Chagas, con mayor detalle se conoce su rango geográfico. Sin embargo, existe un conocimiento incompleto de la distribución de las especies que tienen una distribución en ambientes silvestres o son vectores secundarios (Gorla y Noireau 2010).

Por otro lado, existe una falta de centralización de la información de presencia de los triatominos (o al menos de acceso) a nivel nacional y regional. Es decir, no existe una base de datos que contenga información continental fiable y seria de la distribución de las distintas especies de vectores (principales y secundarios) de la enfermedad de Chagas.

En Brasil, si bien se puede acceder a la base de datos por municipios positivos de captura en domicilio y peridomicilio del Programa de Control (PCDCh-FUNASA), la información no es del todo completa. Esta información se refiere a los años 1979, 1985, 1990 y 1995 en todos los municipios dentro de los ocho distritos sanitarios: Caratinga, Diamantina, Januária, Montes Claros, Pirapora, Teófilo Otoni, Uberaba y Varginha. En este programa de control, la información sobre las capturas de triatominos sólo se registró cuando un municipio fue positiva para *T. vitticeps*, *T. infestans*, *T. sordida* o *Pastrongylus megistus*, en tanto que se categorizó como “otros” cuando existía la presencia de *Rhodnius neglectus*, *T. melanocephala*, *T. maculata*, *T. pseudomaculata* o *P. geniculatus*. En Argentina, sucede algo similar, sólo que además no se cuenta con una base de datos pública- o al menos de libre acceso. Por ejemplo, la Dirección de Zoonosis de la provincia de Neuquén realiza vigilancia activa de *T. infestans* en los domicilios y peridomicilios, en tanto que caracteriza a *T. patagonica* y *T. eratiruscyfomes* como “otros” debido a que revisten un papel menor en la epidemiología. Otro ejemplo es el caso de la dirección de Zoonosis en la provincia de San Juan, en donde no se hace una vigilancia activa con muestreo de los insectos, si no que los propios ciudadanos son los que llevan las capturas que realizan para determinar si el insecto capturado es un vector y si éste posee el parásito. Para ambos casos nacionales, las georreferencias o puntos de presencias quedan en el marco provincial y no son volcadas a una base de datos a nivel nacional (obs. Pers. del autor de esta Tesis).

Debido a la mencionada falta de centralización de la información y/o el libre acceso, en este trabajo se utilizó como “presencia” de las diferentes especies de triatominos al atlas con mapas que representa el rango de distribución de 115 especies de triatominos de Carcavallo y colaboradores (1999). Basado en estos mapas, Rabinovich (2013) generó una grilla de resolución de 0,1° (~ 10 km) y solapando los mapas construyó la base de datos (<http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.653959>). Lo importante de trabajar con los mapas de Carcavallo et al (1999) es que es una de las base de datos más amplias con todos los vectores establecidos para este trabajo, además, el hecho de utilizar datos de “pseudopresencia” tiene la ventaja de que no hay ningún error debido al sesgo de muestreo (muestreo por cercanías a las rutas, o por dificultad de acceso a cierto lugares, etc.) aunque puede conducir a una sobre estimación de los ambientes propicios en los modelos de distribución, sobre todo porque a gran escala la presencia según rangos geográficos pueden incluir algunas áreas inadecuadas (Graham y Hijmans 2006). En todas las distribuciones de las especies se tomaron al azar el 1% de los datos de “presencia” (ver figura 2). Esta selección incluye puntos de datos en el centro y en los extremos de la distribución completa de las especies suponiendo que los rangos de distribución son la expresión del nicho ecológico de una especie en el espacio (Sexton et al. 2009).



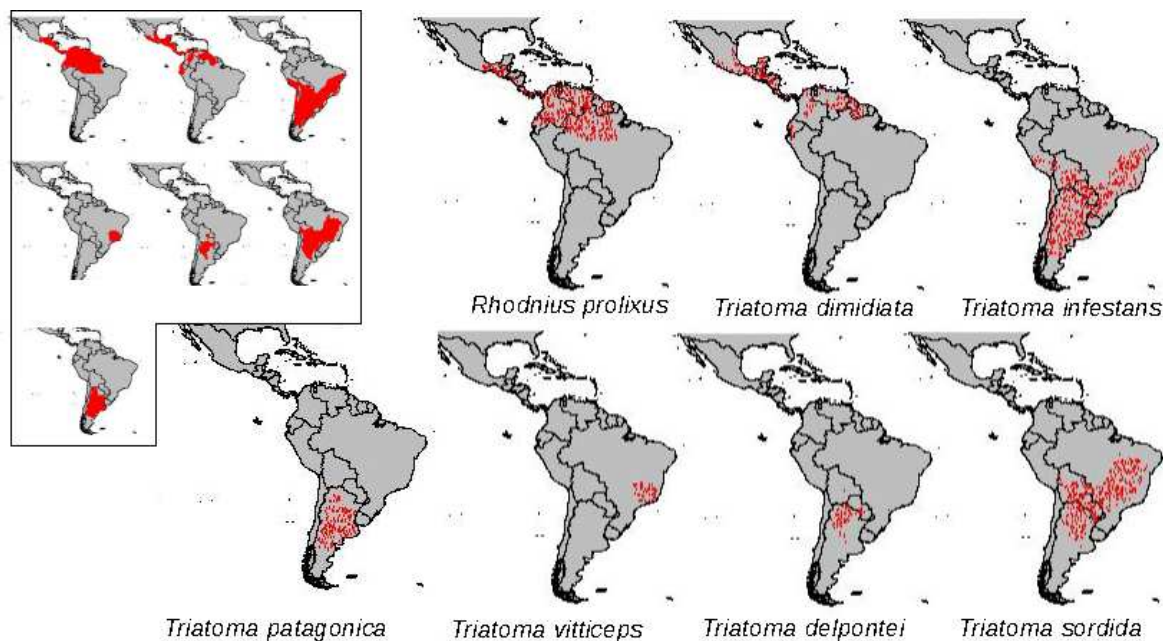


Figura 2. Rango de distribución propuesto por Carcavallo y colaboradores (1999) de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. delpontei*, *T. sordida* y *T. patagonica* en el pequeño recuadro superior izquierdo. En la figura del centro se observan los puntos utilizados en esta tesis (1% del total de puntos al pasar el rango geográfico a puntos de distribución geográfica en una escala 0,1° (ca. 10 km) por Rabinovich (2013).

### ***Elección de las especies de trabajo***

Para los objetivos de esta tesis se conformó una lista con las especies según su relevancia epidemiológica, distribución y relación filogenética. Tomando en cuenta los tres puntos y todas las especies que podían ser aportadas por el Servicio Nacional de Chagas para los experimentos, la lista quedó definida por:

*Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. delpontei* y *T. patagonica*.

La relevancia epidemiológica reviste con mayor importancia en *T. infestans* y *R. prolixus*, como los principales vectores de la enfermedad en Latinoamérica y *T. dimidiata* es el vector mas importante en América Central (Patterson y Guhl 2010). Por otro lado, *T. sordida* es un vector secundario en Argentina, Paraguay, Bolivia y el sur de Brasil y *T. vitticeps* también ha mostrado cierto grado domiciliación en Brasil.

En cuanto a la distribución de las especies se incluyó especies con distribución subtropical como *T. sordida*, *T. delpontei*, *T. infestans* y *T. patagonica* por su alcance austral y a especies tropicales como *T. dimidiata*, *R. prolixus* y *T. vitticeps* con una distribución muy clara sobre el centro este de Brasil (Gorla y Noireau 2010). Los mapas de Carcavallo y colaboradores (1999) postulan que la distribución *R. prolixus* alcanzaría gran parte del centro y norte de Brasil, aunque su distribución podría estar sobrestimada ya

que Gurgel-Gonçalves y colaboradores (2008) sugieren que sería *R. neglectus* quien estaría invadiendo casas en el centro de Brasil.

En relación a la filogenia se debe decir que la subfamilia Triatominae de la familia Reduviidae, se ha clasificado en 5 tribus y 15 géneros donde han existido clasificaciones basadas en caracteres morfológicos y comparaciones de caracteres citogenéticos y secuencias de ADN que muestran dificultades para alcanzar una clasificación estable del grupo. El género *Rhodnius* pertenece a la tribu Rhodiniini, con especies distribuidas en los llanos del norte América Latina, y a lo largo de la Catinga y el Cerrado al sur y al este del Brasil, es uno de los géneros parafiléticos con más representantes. Otro género con gran cantidad de especies pertenece a la tribu Triatomini con la distribución geográfica más amplia y gran variedad de ecotopos explotados es el género *Triatoma* (Schofield y Galvão 2009). La filogenia propuesta por Hypsa y colaboradores (2002) (figura 2), basada en caracteres moleculares, muestra la divergencia para las especies elegidas. Se observa que *T. sordida* pertenece al complejo “*Triatoma sordida*”, *T. patagonica* pertenece al complejo “*Triatoma circummaculata*”, mientras que *T. delpontei* junto con *T. infestans* pertenecen al complejo “*Triatoma infestans*”. Estos cuatro complejos forman al clado “*Triatoma*” que compartiría ancestro en común con *T. vitticeps*. Por otro lado se encuentra *T. dimidiata*, incluida en la filogenia propuesta por Hypsa y colaboradores (2002) en el género *Meccus* como *Meccus dimidiatus* (figura 3).

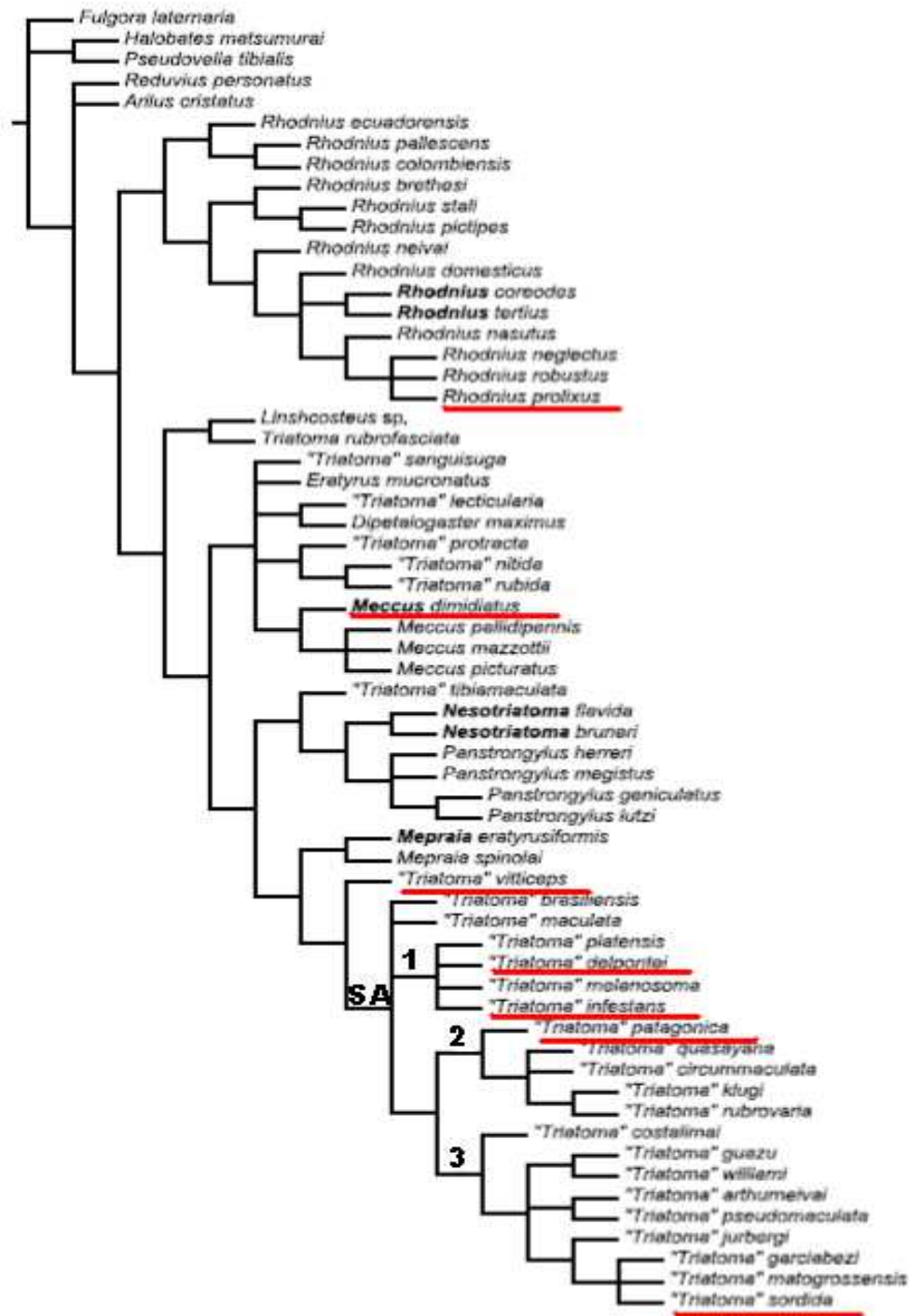


Figura 3. Filogenia propuesta por Hypsa y colaboradores (2002). SA, clado *Triatoma*; 1 Complejo *T. infestans*; 2 complejo, *T. circummaculata*; 3 complejo *T. sordida*. En rojo subrayado las especies utilizadas en esta Tesis.

Para observar si las tolerancias fisiológicas dependen de adaptaciones en las especies es necesario realizar los análisis excluyendo el efecto de la filogenia, para ello se realizaron los Contrastes Filogenéticamente Independientes (PICs por sus siglas en inglés “*Phylogenetical Independent Contrast*”)

(Felsenstein 1985). Estos análisis son necesarios debido a que especies más emparentadas filogenéticamente, tienden en general a parecerse más entre sí respecto a especies no emparentadas (Felsenstein 1985). El conservadurismo filogenético del nicho (o la conservación filogenética del nicho) postula que los fenotipos ancestrales y derivados de un linaje probablemente habitaron ambientes similares. Cuando un nuevo nicho ecológico se encuentra disponible, aquellas especies que ocupan un nicho similar son las mejores candidatas para invadir el nuevo nicho. Como consecuencia, especies cercanas serían fenotípicamente similares dado que ocupan nichos equivalentes por razones históricas, por lo que estarían sujetas a presiones selectivas semejantes. Es decir que la conservación filogenética del nicho se observa cuando un factor hace que dos o más especies próximas presenten un carácter ecológico en un grado de similitud superior a dos o más especies seleccionadas al azar del árbol filogenético (Felsenstein 1985, Losos 2008). Debido a que especies con rangos de distribución adyacentes seguramente estén relacionadas filogenéticamente se realizó este tipo de análisis (PIC) para determinar si los patrones de tolerancias y temperaturas o humedades en el área de distribución de los objetivos específicos guardan relación con la filogenia o si son independientes. El árbol filogenético fue construido usando secuencias alineadas del fragmento 16S ADNr para las 7 especies obtenidas de Hypsa y colaboradores (2002). Las longitudes de las ramas de este árbol se utilizaron para llevar a cabo contrastes filogenéticamente independientes para excluir la influencia de la relación filogenética en todas las correlaciones realizadas. Para la realización de los contrastes se forzó una raíz en el nodo saliente de *R. prolixus* y se trabajó con el paquete “caper” de R (Team R Core 2013) (figura 4).

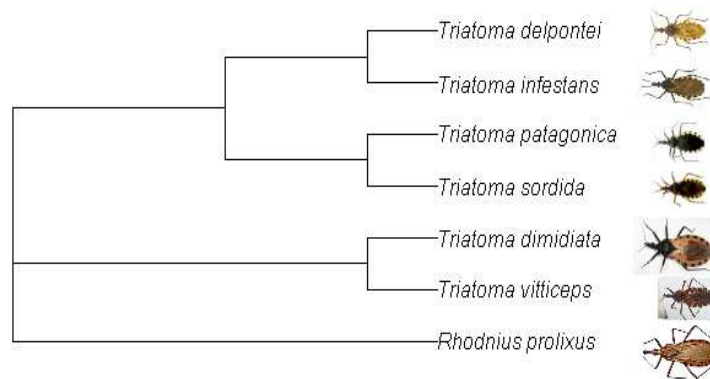


Figura 4. Filogenia de los triatominos con los que se trabajó. Se muestra la filogenia sin raíz y parsimoniosa sin incluir el largo de las ramas para las relaciones. Para la realización de los contrastes independientes de la filogenia se forzó una raíz en el nodo de *Rhodnius prolixus* y se consideró la longitud de las ramas.

# Capítulo III

## *Tolerancias térmicas de los triatominos y su relación con la distribución*

*Parte de este capítulo fue publicado con el título:*

*Geographical distribution, climatic variability and thermo-tolerance of Chagas disease vectors. Ecography, 38: 851–860. Autores: de la Vega, G. J., Medone, P., Ceccarelli, S., Rabinovich, J. and Schilman, P. E. (2015).*

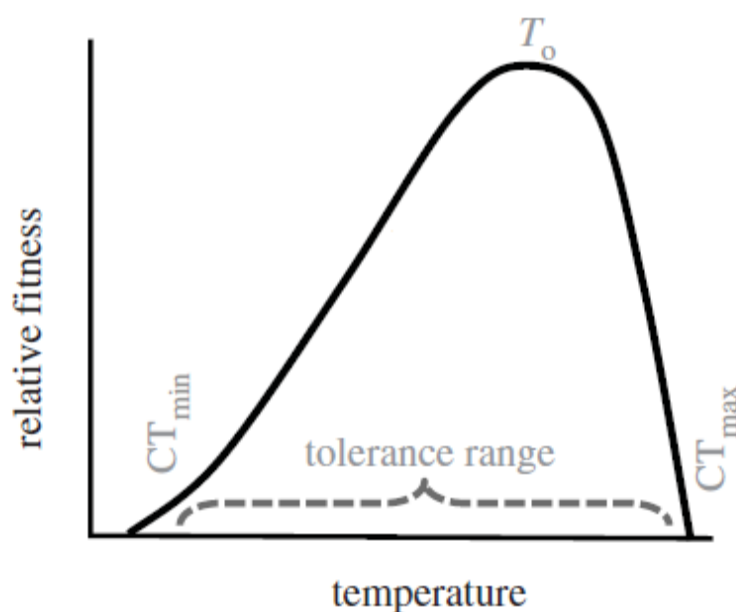
### **Introducción**

La temperatura afecta prácticamente todos los procesos fisiológicos de un organismo, por lo que la convierte en uno de los factores ambientales más importantes para la supervivencia (Stevens 1989; Chown y Terblanche 2007; Angilletta 2009). Tanto los patrones de distribución como los de abundancia están estrechamente relacionados con la temperatura ambiente, que además, puede ser factor que limite la distribución espacial de los organismos (Spicer y Gaston 1999). Los animales ectotérmicos, como los insectos, por medio de la actividad o diferentes comportamientos deben mantener sus procesos fisiológicos y el funcionamiento frente a los cambios de temperatura o a las temperaturas extremas. De esta manera, las características fisiológicas de las especies tienen un papel fundamental en las respuestas a los cambios ambientales y por ende en la distribución geográfica (Addo-Bediako et al 2000; Spicer y Gaston 1999). Por ejemplo, como se nombró en el capítulo I, bajo la Hipótesis de Variabilidad Climática (CVH), los organismos terrestres distribuidos en entornos muy variables (altas latitudes y/o altitudes) están adaptados para tolerar un amplio rango de condiciones climáticas a diferencia de los organismos de ambientes menos variables (por ejemplo, en bajas latitudes o altitudes). Es decir, las especies a mayores latitudes (o altitudes) desarrollan un rango más amplio de tolerancia a las condiciones climáticas extremas, y por lo tanto tendrán mayor probabilidad de alcanzar una mayor distribución geográfica que las especies a latitudes (o altitudes) menores (Chown et al 2004, Bozinovic et al 2011).

El rango de termo-tolerancia de los insectos es un parámetro que determina su nicho fisiológico (Spicer y Gaston 1999) y está delimitado por las temperaturas críticas (máximas y mínimas) dentro de las cuales los individuos pueden mantenerse activos (Chown y Nicolson 2004). Más allá de estas temperaturas el

insecto no puede responder a un cambio en la misma dirección y por lo tanto se vuelve vulnerable a la depredación o a temperaturas letales (Byrne et al 2003). Es así que las Temperaturas Críticas (CT, por “*Critical Temperatures*”) tienen un gran valor en los estudios ecológicos y evolutivos y pueden ser medidas por diferentes métodos (Mitchell et al 1993, Lighton y Turner 2004). La temperatura crítica mínima (CT<sub>min</sub>) es definida como la temperatura a la cual el insecto pierde la coordinación motora, en tanto que la temperatura crítica máxima (CT<sub>max</sub>) es definida como la temperatura a la cual suceden espasmos musculares (Terblanche et al 2006). Otras medidas relacionadas con la termo-tolerancia de los insectos incluyen la temperatura letal, los tiempos de recuperación al coma inducido por frío o “*chill-coma recovery time*” y los shocks de altas temperaturas (Chown y Nicolson 2004).

Una curva de performance (o *fitness*) de una especie está definida por sus límites térmicos que equivalen a las tolerancias críticas (figura 1). Más allá de estas temperaturas se encontrarán las temperaturas letales de la especie. Como se puede observar en la figura 1 la sensibilidad de los ectotermos a la temperatura difiere hacia ambos lados de una temperatura óptima, es decir, la performance aumenta a medida que aumenta la temperatura hasta una temperatura óptima y luego decae abruptamente (Huey et al 2012).



*Fig. 1.- Rangos de termo-tolerancia. En una curva de fitness relativo (“relative fitness”) en función de la temperatura se puede observar para una especie ectotérmica hipotética la temperatura óptima (“ $T_o$ ”) y los límites de tolerancia térmica delimitados por las temperaturas críticas (“ $CT_{min}$  y  $CT_{max}$ ”) (figura modificada de Huey et al 2012).*

El conocimiento de las tolerancias fisiológicas, como por ejemplo el rango de termo-tolerancia de las especies de insectos, contribuye a la identificación de las áreas activas en las que los insectos se pueden distribuir geográficamente, pero además, en el caso de vectores de enfermedades determina las áreas geográficas de posible transmisión vectorial o zonas que restrinjan al insecto. La enfermedad de Chagas

es una de las enfermedades transmitidas por vectores más importantes de América Central y del Sur (Schofield et al 2006). Los triatomíneos son los responsables de la transmisión vectorial y se distribuyen desde zonas tropicales e intertropicales hasta regiones de clima templado con inviernos fríos, como la Patagonia, en Argentina, o Indiana y Maryland, en los EE.UU. (Moncayo 1992, Carcavallo et al 1999). Gran cantidad de estudios se han realizado sobre los efectos de la temperatura en los triatomíneos. Los efectos del calor y la temperatura sobre los procesos fisiológicos y el comportamiento en *Rhodnius prolixus* y *Triatoma infestans*, los dos insectos vectores más importantes de la enfermedad, han sido relativamente bien estudiados: se han publicado trabajos sobre los aspectos generales de la termopreferencia de estas dos especies (Lazzari 1991, Canals et al 1997, Schilman y Lazzari 2004), como así también los efectos del calor y la temperatura en la búsqueda de refugio y alimentación (Lazzari y Núñez 1989a, 1989b, Ferreira et al 2007, Fresquet y Lazzari 2011), la producción de huevos y el tiempo de desarrollo (Clark 1935, Luz et al 1999), el cese de la muda (Okasha 1964, Okasha 1968a) y cambios en la tasa metabólica (Okasha 1968b, Rolandi et al 2014). También en otros triatomíneos se han realizado investigaciones sobre el efecto de la temperatura en los tiempos de desarrollo o ciclos de vida como son el caso de *T. dimidiata* y *T. vitticeps* (Zeledón et al 1970 y Carcavallo 1999). A su vez en *T. patagonica*, *T. delpontei* y *T. sordida*, Blaksley y Carcavallo (1968) estudiaron los efectos de temperaturas menores a cero grados sobre la mortalidad. También se han realizado estudios de termopreferencia en otros triatomíneos como *Triatoma spinolai* y *Pastrongylus megistus* (Canals et al 1997, Pires et al 2002), sin embargo, el rango de tolerancia térmica no ha sido caracterizado para ninguna de las especies de triatomíneos.

La comprensión de la abundancia y la distribución de los organismos (incluyendo vectores de enfermedades) por lo general implica el modelado de la distribución de la especie, ya sea utilizando modelos correlativos o un enfoque más mecanístico. Por ejemplo, ambos enfoques se han utilizado para estimar el impacto del clima en los vectores de malaria (Martin y Lefevre 1995), y se ha sugerido que una combinación de ambos puede proporcionar una mejor perspectiva tanto para el nicho fundamental como para el realizado. Para los modelos mecanicistas, por lo general se requiere una serie de información fisiológica básica, como los límites de tolerancia térmica entre otros (Lyons et al 2012). Asumiendo que el rango de una especie está determinado por la información que determinan los modelos mecanísticos, los modelos híbridos podrían generar mejores predicciones que la utilización de modelos correlativos basados solamente en variables ambientales (Buckley et al 2010).

El objetivo de este capítulo es explorar las posibles relaciones entre la termo-tolerancia y la distribución geográfica de siete especies de triatomíneos elegidos por su relevancia epidemiológica, distribución y relación filogenética. Estos son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. delpontei* y *T. patagonica*. Estas especies tienen relevancia epidemiológica primaria y secundaria en el continente americano, más precisamente desde el norte de México hasta la Patagonia

Argentina y tienen una divergencia filogenética que incluye dos géneros y distintos complejos y clados (ver capítulo II para información de la elección de las especies). Para las especies elegidas en este trabajo se combinaron dos enfoques metodológicos, el modelado de la distribución de especie (SDM, por “*Species Distribution Model*”) y el análisis de las termo-tolerancias fisiológicas. Para ello, primero se evaluaron los límites de tolerancia térmica de todas las especies midiendo CTmax, CTmin, temperatura letal superior (ULT, por “*Upper Lethal Temperature*”) y el “*chill-coma recovery time*” o el tiempo de recuperación al frío. Luego modelamos el nicho ecológico de cada especie utilizando variables climáticas e identificando el factor más importante para su distribución. Por último, se analizó la relación entre estos factores limitantes más importantes y el rango de termo-tolerancia que nos permite evaluar tanto hipótesis ecológicas como la CVH y aportar un enfoque distinto para la geo-epidemiología de la enfermedad de Chagas.

## ***Materiales y Métodos***

### ***Análisis fisiológicos***

Para todos los experimentos se utilizaron ninfas del quinto estadio sin alimentar de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. delponte* y *T. patagonica*, las cuales habían mudado una semana antes del comienzo de los experimentos. Los insectos fueron criados a 28°C con un fotoperíodo 12:12 luz / oscuridad (con inicio de luz a las 08:00 hs.) (para más detalles ver capítulo II, los insectos experimentales).

Para indagar sobre las termo-tolerancias de estas siete especies se determinó la temperatura crítica máxima (CTmax), la crítica mínima (CTmin), la temperatura letal superior (ULT) y el tiempo de recuperación al frío. Para los CTmax y ULT se utilizó un sistema de respirometría de flujo abierto que permite calcular el límite fisiológico mediante el análisis de la liberación de CO<sub>2</sub> y actividad en una rampa de temperatura ascendente (ver capítulo II, mediciones con respirometría de flujo abierto). La CTmax se definió en términos de actividad motora de la especie y por medio de la actividad respiratoria: la CTmax por actividad, fue entendida como el cese de la actividad motora controlada por las altas temperaturas y el comienzo de los espasmos musculares (Lighton y Turner 2004, Chown y Nicolson 2004, Klok et al 2004). Por lo tanto, se determinó la temperatura a la cual el insecto dejó de moverse. Por su parte, la CTmax respiratoria se definió por el cese del control espiracular durante el intercambio de gases del insecto bajo la metodología propuesta por Lighton y Turner (2004). Tanto para la determinación de la CTmax mediante la actividad como para la determinación de la CTmax respiratoria, se utilizó la suma de la diferencia absoluta (o simplemente el ADS, por “*Absolute Difference Sum*”) en cada variable. El ADS es una medida de la dinámica de variabilidad total, de hecho, es la suma acumulada de la diferencia absoluta entre puntos adyacentes (Lighton y Turner 2004) y resulta una curva de importante valor en la medición. Por ejemplo, en el momento en que un insecto deja de moverse, la curva mostrará una meseta. El ADS fue utilizado originalmente como un medio de traducción de la



medición del movimiento bidireccional en un vector de desplazamiento acumulado (Lighton et al 1993), pero ha demostrado ser de gran utilidad como una medida de la variabilidad en la dinámica tanto del perfil de liberación de CO<sub>2</sub> y como de la actividad. Para determinar la CT<sub>max</sub> más exactamente, de la curva de los residuos del ADS (vs el tiempo) se tomaron 5 segundos antes y 5 segundos después del punto de inflexión y se determinó la temperatura media para este intervalo de tiempo. Este punto de inflexión ayuda a determinar de manera objetiva el punto de la CT<sub>max</sub> (Lighton y Turner 2004). Luego de la CT<sub>max</sub> respiratoria, se determinó la ULT en el mismo registro, cuando la traza de CO<sub>2</sub> empieza a ser una línea simple, sin variaciones o perturbación debido a la inactividad de los espiráculos (válvulas que permiten el intercambio gaseoso entre el interior de las tráqueas y el ambiente). Cada individuo se pesó en una balanza analítica de precisión 0,1 mg (Mettler AJ100, OH, EE.UU.) antes de comenzar el ensayo.

Para medir la CT<sub>min</sub>, cada individuo fue puesto sobre una placa de temperatura (Pelt-plate, SSI) conectado a un controlador de temperatura Pelt-5 como el anteriormente descrito. Se generó un perfil de temperatura que inició con una temperatura constante de 20°C durante 15 min seguido por una rampa descendente a razón de 0,25°C/minuto durante 100 minutos. La temperatura final se mantuvo durante 10 minutos, y finalmente se re-estableció la placa de temperatura a 20°C. Los insectos se colocaron en forma individual directamente sobre la placa en un recipiente transparente de acrílico de diámetro de 5 cm sin base y con una malla de plástico en la parte superior. Las temperaturas se midieron mediante una termocupla (tipo T) unida a un termómetro digital de cuatro canales (TC-2000; SSI) lo más cerca posible al recipiente. Se definió la CT<sub>min</sub> como la pérdida de la función muscular coordinada (Terblanche et al 2006) y se determinó cuando los insectos dejaron de responder a una perturbación mecánica producida por un suave toque de un filamento delgado de cobre a través de la malla. La temperatura a la que esto ocurrió fue registrada manualmente por una marca superpuesta al perfil de temperatura, el cual se grabó en una computadora a través de un conversor A/D (UI-2, SSI) y con el software ExpeData (SSI).

El tiempo de recuperación al frío se determinó como el tiempo necesario de cada insecto para recuperarse de la exposición al frío (*ca.* 0°C). A bajas temperaturas los insectos entran en coma inducido por el frío, un estado reversible de parálisis (Mellanby 1939); el tiempo necesario para recuperarse de esta parálisis es una de las medidas más comunes de la tolerancia al frío de insectos y se ha utilizado para poner a prueba hipótesis y teorías ecológicas (Mellanby 1939, Macmillian et al 2012). Para esta medición los insectos fueron colocados individualmente durante cuatro horas en pequeños contenedores en hielo y agua dentro de un recipiente tapado de poliestireno expandido (telgopor). Luego se transfirieron a placas de Petri (70 mm de diámetro x 10 mm de alto), que en la base tenían un papel de filtro, dentro de un gabinete a temperatura controlada (28°C; la misma temperatura a la que los insectos fueron criados). Con una pinza mantenida en hielo (mismas condiciones de frío que los insectos), cada insecto se colocó en forma invertida, es decir con su parte ventral hacia arriba en el centro de la placa de

Petri. El tiempo de recuperación al frío se registró cuando los insectos recuperaron su posición normal (ventral hacia abajo) observándolos a través de un vidrio. Se registró como “no recuperado” si los insectos no recuperaron su posición normal al cabo de una hora. Los insectos que no se recuperaron se volvieron a observar 24 horas más tarde para determinar si se encontraban vivos o no.

### ***Análisis Geográfico***

Para el modelado de la distribución geográfica de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. delpontei* y *T. patagonica* nos basamos en los mapas de Carcavallo y colaboradores (1999) (*ver capítulo II, puntos de presencia de triatominos*). Para estas distribuciones se tomó una sub-muestra aleatoria del 1% de los datos para cada especie, lo que resultó en 390 puntos de datos “pseudo-presencia” de *R. prolixus*, 179 para *T. dimidiata*, 470 para *T. infestans*, 44 para *T. vitticeps*, 366 para *T. sordida*, 63 para *T. delpontei* y 159 para *T. patagonica*. Con el fin de ser más conservadores, no tomamos las “pseudo-ausencias” debido a los posibles errores que se pueden introducir (Mackenzie y Royle 2005). Un enfoque similar se utilizó en Richmond et al (2010). Utilizar los datos aleatorios de pseudo-presencia tiene la ventaja que elimina el problema del sesgo de muestreo, aunque se pueda sobre-estimar los ambientes posibles para el establecimiento de las especies, sobre todo porque a gran escala la “presencia” en rangos geográficos puede incluir algunas áreas inadecuadas, y por lo tanto tienden a exagerar las ocurrencias reales (Graham y Hijmans 2006, Hurlbert y Jetz 2007, Jetz et al 2008). Sin embargo, algunos modelos de distribución de especies (SDM), incluidos los modelos que utilizan solamente presencias, como MaxEnt, son robustos en la influencia de errores en los puntos de presencia (Graham et al 2008). Las variables ambientales utilizadas para modelar el hábitat propicio para el establecimiento de las especies e identificar el factor potencialmente limitante de la distribución fueron las variables bioclimáticas relacionadas con la temperatura y la precipitación en 5 arco-minutos de resolución (~10km) disponible en WorldClim ([www.worldclim.org](http://www.worldclim.org)). Se utilizaron las 19 variables bioclimáticas (más la altitud) definidas por WorldClim:

BIO 1 = Temperatura media anual

BIO 2 = Rango diurno medio (Media mensual \* (temp. máx. - temp mín.))

BIO 3 = Isotermalidad (BIO2 / BIO7) (\* 100)

BIO 4 = Temperatura Estacional (desviación estándar \* 100)

BIO 5 = Temperatura Máxima del mes más cálido

BIO 6 = Temperatura Mínima del mes más frío

BIO 7 = Rango Anual de Temperatura (BIO5-BIO6)

BIO 8 = Temperatura Media del trimestre más húmedo

BIO 9 = Temperatura Media del trimestre más seco

BIO 10 = Temperatura Media del trimestre más cálido

BIO 11 = Temperatura Media del trimestre más frío

BIO 12 = Precipitación anual  
BIO 13 = Precipitación del mes más húmedo  
BIO 14 = Precipitación del mes más seco  
BIO 15 = Precipitación Estacional (coeficiente de variación)  
BIO 16 = Precipitación del trimestre más húmedo  
BIO 17 = Precipitación del trimestre más seco  
BIO 18 = Precipitación del trimestre más cálido  
BIO 19 = Precipitación del trimestre más frío

Para comparar y evaluar los análisis fisiológicos se seleccionaron las variables de temperatura ecológicamente relevantes BIO 5 y BIO 6.

Con el fin de evitar colinealidad entre variables, se realizó un análisis de correlación (matriz de Pearson) para todos los pares posibles de variables con BIO 5 y BIO 6 para cada especie utilizando la función *Rcorr* del paquete “Hmisc” (en el software R, Team R Core 2013). Las variables que correlacionaron ( $r > 0,7$ ) con BIO 5 o BIO 6 fueron excluidas para los nuevos análisis. Con las variables bioclimáticas explicativas restantes, se evaluó la multicolinealidad remanente por el “factor de inflación de la varianza” (VIF) para los modelos en todas las especies mediante la función *vif* del paquete de “car” (R Core Team 2013). Para calcular el VIF, se realizó un modelo lineal generalizado (GLM) con respuesta binomial (“presencia / ausencia”) y las variables bioclimáticas explicativas. Para los modelos se generaron diez mil puntos al azar de “pseudo-ausencias” que se incluyeron sólo para realizar los VIFs (Vanderwal et al 2009, Barbet-Massin et al 2012). Cualquier variable con VIF  $>10$  fue excluida (Zuur et al 2010). Las variables restantes se utilizaron para realizar el SDM en MaxEnt, un método de SDM que funciona con puntos de presencia solamente y que no utiliza puntos de “ausencias” si no puntos de “fondo” (Phillips et al 2006). El modelo produce una probabilidad de presencia continua de 0 a 1, que representa un índice relativo de las características del hábitat (Graham y Hijmans 2006, Phillips et al. 2006). Se utilizó la configuración default de los argumentos de la función *maxent* del paquete “dismo” en el software R (Hijmans y Elith 2013).

Con el fin de investigar los factores limitantes para la distribución geográfica, dentro de MaxEnt se utilizó el análisis de factores limitantes y su mapa respectivo (Elith et al 2010, Hill et al 2012). En cada pixel, el análisis de factor limitante reemplaza cada variable predictora por su valor medio en los sitios de presencia. Si un cambio resulta en una mayor probabilidad de ocurrencia, por lo tanto, la variable cambiada es considerada como un factor limitante (ver Elith et al 2010 y Hill et al 2012 para más detalles).

El modelo final de cada especie se corrió con validación cruzada de 10 iteraciones y el resultado de las predicciones fueron evaluados por el criterio promedio de AUC (área bajo la curva de la Característica Operativa del Receptor -ROC-), que varía de 0 a 1, donde un 0,5 no es mejor que al azar y 1 indicaría

que el modelo tiene perfecta capacidad para identificar las presencias frente a las ausencias. Aunque, el uso del AUC como método para evaluar los modelos de nicho ecológico obtenidos a partir de datos únicamente de presencia ha sido criticado (Lobo et al 2008), es muy útil en SDM para evaluar la contribución de las variables predictoras (Elith et al 2006, Terribile et al 2010). Las predicciones de MaxEnt se visualizaron y mapearon con el programa Quantum GIS 2.0 (“www.qgis.org”).

### ***Macrofisiología***

Para observar la relación entre las tolerancias fisiológicas y los análisis geográficos se relacionaron los valores de temperaturas críticas de cada especie con los valores de temperaturas mínimas del mes más frío (Bio 6) y temperaturas máximas del mes más cálido (Bio 5) dentro un área donde la probabilidad de presencia de cada especie supere un valor crítico en cada modelo. Para ello se tomó un área con los valores de probabilidad de presencia mayores a un valor crítico determinado por el valor de probabilidad máximo de la suma de sensibilidad (porcentaje de verdadero positivos) y especificidad (porcentaje de verdaderos negativos) (Svenning et al 2008). Este límite nos permite trabajar sobre los valores de probabilidad de presencia según el modelo para cada especie desacoplado de las coordenadas de “pseudo-presencias”, es decir transformamos los valores del índice de maxent (“suitability”) a valores binarios. En segundo lugar dentro de este límite (*i.e.*, probabilidad de presencia > 0,35) se tomaron los valores de las BIO 5 y BIO 6 para 1000 coordenadas al azar y se relacionaron con los valores de tolerancias máximas y mínimas.

Por otro lado, en relación a la CVH si las tolerancias a las bajas temperaturas dependen de la selección natural, especies expuestas a bajas temperaturas deberían mostrar una mayor tolerancia al frío, mientras que las especies que no están expuestas a bajas temperaturas tendrían temperaturas de tolerancias mayores. En contraste, si la tolerancia a las altas temperaturas está altamente conservada a través de las especies, se esperaría que la selección natural no esté actuando fuertemente en este rasgo, lo que resultaría en una relación débil entre las temperaturas máximas y la tolerancia a dichas temperaturas. Para examinar estas hipótesis ecológicas se realizó una regresión entre los parámetros biológicos (tolerancias) y los gradientes ambientales (las temperaturas máximas o mínimas). Esta regresión de tolerancias en función de temperaturas extremas es preferible a los gradientes geográficas generales (es decir, en función de la latitud o altitud), ya que estos últimos, por lo general, muestran una relación indirecta entre una variable biológica significativa y los gradientes ambientales (Araújo et al 2013). De todos modos también se realizaron las regresiones entre los análisis fisiológicos y la latitud, no solo como aporte a los patrones macroecológicos (CVH) si no que también sirven para entender las tolerancias de estos vectores y sus distribuciones en el continente.

## ***Análisis estadísticos***

Todos los análisis se realizaron bajo los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza inspeccionando gráficamente y con los test de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Cuando no se cumplieron estos supuestos, las variables fueron transformadas o se utilizaron modelos generalizados (GLS) con la función *varIdent* del paquete “nlme” de R (Team R Core 2013) para incluir la heterocedasticidad en el modelo estadístico según las especies. En las tablas se muestran las medias junto al desvío estándar que se compararon mediante la prueba de ANOVA. El error global se corrigió por corrección de Bonferroni (doce variables de análisis en respirometría:  $p < 0,004$ ; y dos variables para el análisis CTmin,  $p < 0,025$ ). Además para la relación entre las tolerancias fisiológicas y el gradiente latitudinal o térmico se asumieron dos tipos de análisis, uno (no realista) que asume una filogenia de tipo “estrella” donde todas las especies divergen al mismo tiempo y otro análisis que incluyó la relación filogenética de las especies utilizadas (Felsenstein 1985). Para ello se realizaron contrastes filogenéticamente independientes (PIC por “*Phylogenetically Independent Contrasts*”) usando la topología del árbol filogenético y la longitud de sus ramas (*ver Capítulo II, elección de las especies*).

## ***Resultados***

### ***Análisis Fisiológicos***

Las CTmax medidas por respirometría en todas las especies mostraron una dinámica de respuesta a la rampa de temperatura similar a la encontrada en otros insectos. La figura 2 muestra un ejemplo de la curva observada en los experimentos con siete fases similares a las descritas por Lighton y Turner (2004) en dos especies de hormigas del género *Pogonomyrmex*: 1) fase de **equilibrio** durante la cual la tasa de liberación de CO<sub>2</sub> (VCO<sub>2</sub>) es constante, 2) inicio de la **rampa** de temperatura, donde la VCO<sub>2</sub> empieza a aumentar exponencialmente, 3) fase de “**meseta pre-mortal**”, durante el cual la VCO<sub>2</sub> no aumenta con la temperatura, 4) un fuerte descenso en la VCO<sub>2</sub> durante el cual ocurre la “**caída mortal**”, donde el control espiracular (medida en el ADS de la VCO<sub>2</sub>) y la actividad (medido en el ADS de actividad) cesan abruptamente, 5) un “**valle post-mortal**”, indicado en el punto más bajo en VCO<sub>2</sub> para esta etapa, 6) un nuevo aumento de la VCO<sub>2</sub> (“**pico post-mortal**”), seguido de un lenta disminución de VCO<sub>2</sub> y 7) un clásico descenso exponencial que llega (si se continúa grabando durante el tiempo suficiente) de nuevo a los niveles de referencia. La CTmax ocurre durante la fase 4 (Fig. 2).

La tasa metabólica de los triatomíneos está influenciada por variables extrínsecas como la temperatura, entre otros factores (Rolandi et al 2014), así como por variables intrínsecas del insecto como la masa. Como existen diferencias significativas entre el peso de las especies (Tabla 1,  $F_{6, 88}=136,08$ ,  $p < 0,0001$ ) se buscó una medida de tasa metabólica que incluya a la masa de los insectos. Lighton y colaboradores (2001) desarrollaron la ecuación alométrica que relaciona el efecto de la masa sobre la tasa metabólica de los artrópodos (a excepción de garrapatas y escorpiones). Brevemente, se divide la tasa metabólica

expresada en micro watts ( $\mu\text{W}$ ) por la masa elevada a 0,856. Con esta nueva medida de tasa metabólica independiente de la masa se re-analizaron las fases de la curva de respirometría y se pudieron comparar las diferencias entre las tasas de las especies (Tabla 1). Este nuevo análisis se denominó Análisis independiente de la masa (Aim) por lo que se debió pasar la tasa de liberación de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{l}/\text{hs}$ ) a valores de tasa metabólica ( $\mu\text{W}$ ). Este pasaje implica determinar, según el tipo de alimentación, un cociente respiratorio ( $\text{RQ}=\text{producción de } \text{CO}_2 / \text{consumo de } \text{O}_2$ ). Para otros hematófagos se ha utilizado un RQ de 0,81 (Lighton et al., 1993, Sarfati et al., 2005) por lo que se decidió utilizar el mismo valor para triatominos.

En relación a la temperatura de **equilibrio** y la tasa de ascenso establecida para los experimentos,  $35^\circ\text{C}$  y  $0,25^\circ\text{C}/\text{min}$  respectivamente, la temperatura de los ensayos fue en promedio de  $34,5^\circ\text{C} \pm 0,13$  y la rampa de temperatura resultó en  $0,21^\circ\text{C}/\text{min} \pm 0,03$ , mostrando diferencias significativas con los valores nominales ( $T_{123}= 10.196$ ,  $p<0,0001$ ;  $T_{188}= 8,03$ ,  $p<0,0001$ ). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre las temperaturas de la fase de equilibrio y la rampa de temperatura entre las especies ( $F_{6,89}= 2,322$ ,  $p<0,04$ ;  $F_{6,89}=0,660$ ,  $p<0,68$ ). En la fase de equilibrio, en los momentos en que el insecto permanece inactivo es posible medir la tasa metabólica de reposo o estándar (SMR, por “*Standard Metabolic Rate*”) de los insectos, en la que se observaron diferencias significativas entre las especies para sus SMR independientes de la masa ( $F_{6,75}= 7,02$ ,  $p<0,0001$ ) (Tabla 1). Los análisis *a posteriori* muestran que las SMR independientes de la masa sólo son estadísticamente diferentes entre las especies *T. dimidiata* y *T. patagonica* y entre *T. dimidiata* y *T. sordida* y esta última con *T. delpontei* (Tabla 1).

Una vez que se inicia la **rampa** de temperatura tanto la actividad como la liberación de  $\text{CO}_2$  se incrementan progresivamente (figura 1). Este ascenso en la liberación de  $\text{CO}_2$  sucede de manera diferente según las especies ( $F_{6,88}= 17,42$ ,  $p<0,001$ ). *Rhodnius prolixus* es la especie que muestra una mayor sensibilidad a la temperatura con una tasa metabólica de  $2,60 \mu\text{W mg}^{-0,856} \pm 0,89$  por cada grado de temperatura, en tanto que *T. patagonica* es la que tiene menor sensibilidad (ver Tabla 1). Los contrastes *a posteriori* del modelo muestran que existen diferencias significativas entre algunas especies, donde *R. prolixus* es la única especie que muestra diferencias significativas contra todos los demás triatominos (Tabla 1). Otra medida interesante que resulta de ésta etapa es la duración del ascenso en la liberación de  $\text{CO}_2$ , en la que se observa que la mayoría de las especies poseen una duración mayor o similar a 40 minutos de ascenso (Tabla 1) aunque existen diferencias significativas entre ellas ( $F_{6,93}= 46,35$ ,  $p<0,0001$ ). Además, la especie *T. dimidiata* se comporta como una excepción y posee una duración de menos de 30 minutos por lo que el análisis *a posteriori* muestra que solo ésta especie posee diferencias significativas con todos los demás triatominos.

La curva de  $\text{CO}_2$  se observa creciente hasta la fase de **meseta** en la que alcanza la tasa máxima de liberación y allí se mantiene relativamente constante aunque la temperatura sigue incrementándose (fig. 2 fase 3). No se encontraron diferencias significativas entre la entrada y salida de la meseta para la liberación de  $\text{CO}_2$  en cada especie a excepción de *T. delpontei* (en la tabla 1 del anexo se muestran los

análisis comparativos de la liberación de CO<sub>2</sub> y de la temperatura para los valores de entrada y salida de la meseta (fase 3) en cada especie). Para la tasa de liberación de CO<sub>2</sub> máxima (Meseta, fase 3) el análisis independiente de la masa (Aim) muestra que existen diferencias entre los triatomos analizados ( $F_{6,88}=37,02$ ,  $p<0,0001$ ) en tanto que el test *a posteriori* muestra diferencias significativas entre las especies *R. prolixus*, *T. delpontei* y *T. dimidiata* (Tabla 1). A su vez, esta meseta tiene una duración significativamente diferente para cada especie ( $F_{6,93}=9,48$ ,  $p<0,0001$ ), siendo *T. infestans* y *T. sordida* las especies con menor duración de la fase de meseta (Tabla 1).

En la fase 4, luego de la liberación máxima de CO<sub>2</sub>, se observa un marcado descenso en la tasa de liberación hasta que adopta una forma de valle (fase 5) donde se considera que el individuo ha muerto. Durante esta fase 4 es posible determinar la CTmax de las especies tanto en la curva de VCO<sub>2</sub> como en la de actividad donde no se observaron diferencias significativas entre estos dos criterios, es decir, entre la determinación de la CTmax mediante respirometría y mediante la actividad en ninguna de las especies (tabla 2 del anexo). La comparación entre las CTmax de las especies sí arrojó diferencias significativas, tanto comparados en la curva de liberación de CO<sub>2</sub> como en la de actividad (CO<sub>2</sub>=  $F_{6,92}=33,3$ ,  $p<0,0001$ ; ACTIVIDAD=  $F_{6,92}=20,65$ ,  $p<0,0001$ ), y los análisis *a posteriori* mostraron que existen diferencias significativas entre las especies con valores extremos de 44,18°C para *T. dimidiata* y 49,45°C para *T. sordida* (Tabla 1). Por otro lado, también se determinó la temperatura a la cual los individuos perdían el control de los espiráculos mostrando una liberación característica en la curva de VCO<sub>2</sub> (fig. 1, fase 5), a la que se denominó la temperatura letal (ULT por “Upper Lethal Temperature”). La diferencia entre las ULT y la CTmax en la mayoría de las especies fue menor a 1°C por lo que, a excepción de *R. prolixus* y *T. infestans*, no se encontraron diferencias estadísticas entre la ULT y la CTmax de cada especie (Tabla 1 y tabla 3 del anexo). Si comparamos entre las especies los valores de la fase 5 podemos ver que existen diferencias significativas entre los triatomos para los valores de CO<sub>2</sub> ( $F_{6,88}=14,15$ ,  $p<0,0001$ ), como así también entre los valores de ULT ( $F_{6,90}=41,01$ ,  $p<0,0001$ ). Además, los análisis *a posteriori* mostraron que existen diferencias significativas entre algunas especies, por ejemplo, *T. dimidiata* tiene los valores de tasa metabólica más bajos ( $10,57 \mu\text{W mg}^{-0,856} \pm 2,39$ ) como así también los valores más bajos de ULT ( $44,96 \pm 1,32$ ), siendo significativamente diferente de *T. delpontei*, *T. infestans* y *R. prolixus* para la fase 5 (Aim) y de los demás triatomos para su valor de ULT (Tabla 1).

Tabla 1.- Valores promedios de las distintas fases de los análisis de respirometría y límites térmicos para todas las especies de triatominos analizados. Letras distintas representan diferencias significativas entre las especies (p<0,004). Se muestran los valores medios con su desvío estándar.

Tabla 2.- Valores promedios de las temperaturas críticas mínimas y valor del rango de temperaturas críticas para todas las especies de triatominos. Letras distintas representan diferencias significativas entre las temperaturas críticas mínimas de las especies (p<0,025). Se muestran los valores medios con su desvío estándar.

TABLA 1.

	<i>R. prolixus</i>	<i>T. delpontei</i>	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. infestans</i>	<i>T. patagonica</i>	<i>T. sordida</i>	<i>T. vitticeps</i>
Total de insectos analizados	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>10</b>
masa de los insectos (vivos) (mg)	<b>29.43 ± 5.481</b> a	<b>116.16 ± 20.41</b> b	<b>131.32 ± 29.09</b> b	<b>72.46 ± 10.94</b> c	<b>46.45 ± 10.98</b> d	<b>34.28 ± 10.50</b> ad	<b>173.47 ± 23.49</b> e
<b>ESTABILIDAD</b>							
VCO <sub>2</sub> en Equilibrio (fase 1) (μl h <sup>-1</sup> )	<b>14.94 ± 10.99</b>	<b>51.49 ± 28.66</b>	<b>43.22 ± 13.74</b>	<b>22.92 ± 10.00</b>	<b>11.92 ± 5.41</b>	<b>8.14 ± 3.68</b>	<b>49.89 ± 16.73</b>
SMR ("standar metabolic rate") (μW)	<b>4.11 ± 1.80</b> ab	<b>4.87 ± 2.03</b> bc	<b>4.46 ± 1.10</b> b	<b>2.64 ± 1.08</b> abc	<b>2.68 ± 0.69</b> ac	<b>2.62 ± 0.88</b> a	<b>3.91 ± 1.48</b> ab
<b>SENSIBILIDAD</b>							
VCO <sub>2</sub> vs Temperatura (fase 2) (μl h <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup> )	<b>6.96 ± 2.52</b>	<b>10.35 ± 3.66</b>	<b>11.64 ± 4.75</b>	<b>6.55 ± 2.31</b>	<b>2.66 ± 0.79</b>	<b>2.23 ± 0.52</b>	<b>10.22 ± 1.14</b>
Aim (μW)	<b>2.60 ± 0.89</b> a	<b>1.23 ± 0.36</b> b	<b>1.28 ± 0.62</b> bc	<b>1.16 ± 0.40</b> bc	<b>0.71 ± 0.22</b> c	<b>0.76 ± 0.10</b> c	<b>0.86 ± 0.13</b> c
duración de rampa (fase 2) (min)	<b>41.82 ± 3.68</b> a	<b>46.93 ± 4.81</b> ad	<b>28.59 ± 5.74</b> b	<b>52.73 ± 2.44</b> c	<b>54.45 ± 5.03</b> c	<b>59.85 ± 8.92</b> c	<b>51.93 ± 5.34</b> cd
<b>RESISTENCIA</b>							
Temperatura inicio Meseta (fase 3) (°C)	<b>44.27 ± 0.81</b>	<b>45.47 ± 1.06</b>	<b>41.50 ± 0.98</b>	<b>46.51 ± 0.51</b>	<b>46.60 ± 1.16</b>	<b>48.30 ± 1.87</b>	<b>46.06 ± 1.12</b>
Temperatura final Meseta (fase 3) (°C)	<b>45.81 ± 0.69</b>	<b>47.04 ± 1.11</b>	<b>43.24 ± 1.08</b>	<b>47.34 ± 0.40</b>	<b>48.03 ± 0.82</b>	<b>49.41 ± 1.55</b>	<b>47.92 ± 0.83</b>
VCO <sub>2</sub> en Meseta (fase 3) (μl h <sup>-1</sup> )	<b>80.43 ± 18.19</b>	<b>169.49 ± 64.10</b>	<b>129.01 ± 31.93</b>	<b>116.25 ± 29.55</b>	<b>43.93 ± 14.27</b>	<b>41.40 ± 7.24</b>	<b>178.34 ± 22.97</b>
Aim (μW)	<b>30.38 ± 5.53</b> a	<b>19.92 ± 5.21</b> b	<b>13.71 ± 2.96</b> c	<b>20.68 ± 4.87</b> b	<b>11.42 ± 2.89</b> c	<b>14.42 ± 2.43</b> c	<b>15.04 ± 1.92</b> c
duración de Meseta (fase 3) (min)	<b>8.78 ± 3.67</b> a	<b>7.95 ± 2.85</b> a	<b>7.91 ± 5.04</b> ab	<b>3.63 ± 1.60</b> b	<b>6.49 ± 1.51</b> ac	<b>5.05 ± 1.57</b> ab	<b>7.89 ± 4.28</b> a
<b>LETALIDAD</b>							
VCO <sub>2</sub> en Valle (fase 5) (μl h <sup>-1</sup> )	<b>46.19 ± 16.98</b>	<b>176.44 ± 64.31</b>	<b>100.84 ± 29.93</b>	<b>104.97 ± 22.28</b>	<b>43.44 ± 13.28</b>	<b>37.44 ± 9.03</b>	<b>160.76 ± 39.61</b>
Aim (μW)	<b>17.59 ± 5.61</b> ab	<b>20.75 ± 5.38</b> a	<b>10.57 ± 2.39</b> c	<b>18.77 ± 4.17</b> ab	<b>11.32 ± 2.79</b> c	<b>12.88 ± 2.75</b> c	<b>13.53 ± 3.13</b> bc
<b>LÍMITES TÉRMICOS</b>							
CTmax Actividad (°C)	<b>45.81 ± 0.71</b> a	<b>47.47 ± 1.24</b> b	<b>44.90 ± 1.54</b> a	<b>47.21 ± 0.35</b> b	<b>47.77 ± 1.61</b> b	<b>49.46 ± 1.56</b> c	<b>47.83 ± 0.82</b> b
CTmax VCO <sub>2</sub> (°C)	<b>45.90 ± 0.68</b> a	<b>47.18 ± 1.05</b> b	<b>44.18 ± 0.99</b> d	<b>47.24 ± 0.41</b> b	<b>48.05 ± 1.01</b> bc	<b>49.45 ± 1.51</b> b	<b>48.13 ± 1.23</b> bc
ULT (°C)	<b>47.29 ± 0.59</b> a	<b>47.94 ± 1.21</b> ab	<b>44.96 ± 1.32</b> d	<b>47.92 ± 0.34</b> ab	<b>48.75 ± 0.76</b> b	<b>50.71 ± 1.36</b> c	<b>48.81 ± 0.67</b> b

TABLA 2.

	<i>R. prolixus</i>	<i>T. delpontei</i>	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. infestans</i>	<i>T. patagonica</i>	<i>T. sordida</i>	<i>T. vitticeps</i>
Total de insectos analizados	<b>25</b>	<b>17</b>	<b>23</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
CTmin (°C)	<b>6.04 ± 1.47</b> a	<b>4.10 ± 2.61</b> ac	<b>4.23 ± 2.53</b> ac	<b>0.65 ± 1.27</b> b	<b>0.82 ± 1.58</b> bd	<b>2.17 ± 1.48</b> cd	<b>3.90 ± 2.88</b> ac
Rango de tolerancia (CTmax-CTmin)	<b>39.86</b>	<b>43.08</b>	<b>39.95</b>	<b>46.59</b>	<b>47.24</b>	<b>47.28</b>	<b>44.23</b>



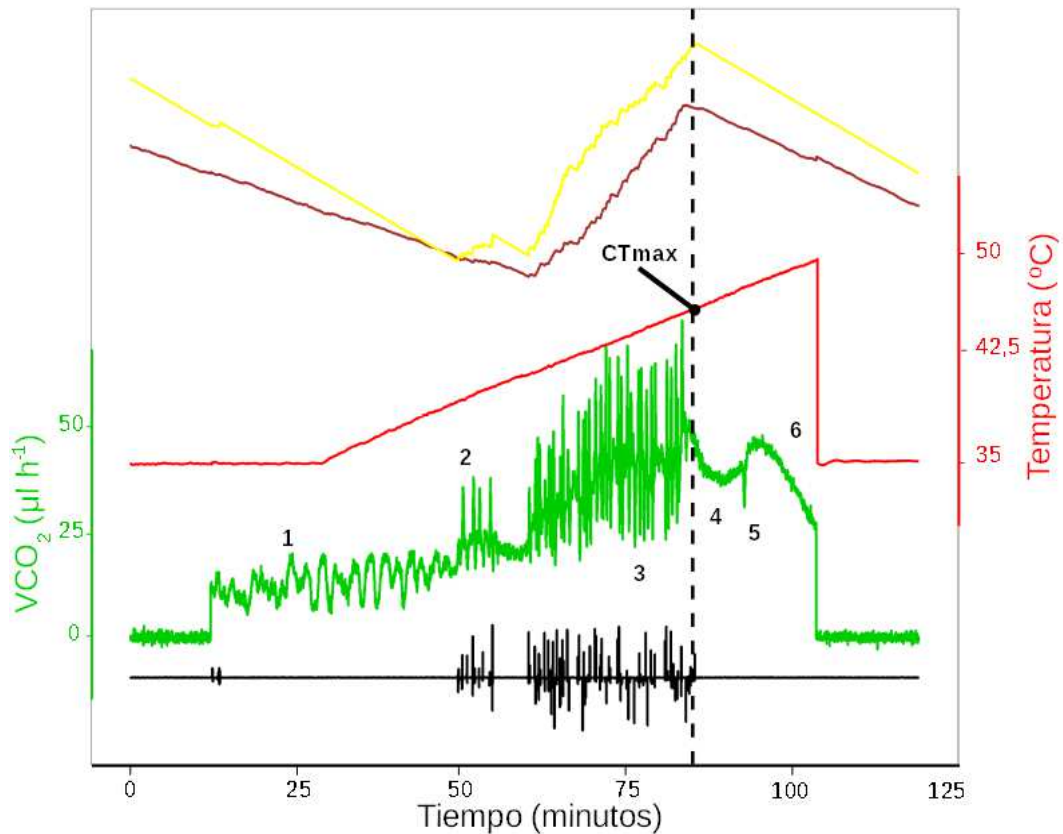


Figura 2.- Temperatura crítica máxima (CTmax) medida por respirometría en un triatomino. Se muestra un registro de una ninfa del 5to estadio de *T. sordida* (masa: 42,6 mg). En la curva de VCO<sub>2</sub> (verde) se observan claramente las siete etapas de respuesta (fases 1 a 6; ver el texto para más detalles y definiciones). La temperatura de equilibrio (rojo) fue 34,54°C. La tasa de ascenso fue de 0,25°C/min. CTmax= 47,05°C (espiracular) y 47,04°C (actividad). La curva inferior muestra la actividad (negro). En la parte superior, se muestran los residuos de la curva del ADS de actividad y VCO<sub>2</sub> utilizados para determinar objetivamente la CTmax (en amarillo y marrón, respectivamente; no se muestra su escala). La curva de VCO<sub>2</sub> (en verde) inicia y termina con una línea de base (registro con la cámara vacía). En abscisas se muestra el tiempo en minutos.

Para los experimentos de temperatura crítica mínima (CTmin) los análisis mostraron que existen diferencias significativas entre las especies ( $F_{6,142} = 40,40$ ,  $p < 0,001$ ). En la Tabla 2 se resumen los valores de CTmin para todas las especies y el análisis *a posteriori* realizado, además se incluye el rango de temperaturas críticas en el que las distintas especies se mantienen activas. Este rango muestra que *T. sordida*, *T. patagonica*, *T. infestans* son las especies que poseen un mayor rango de tolerancia.

El tiempo específico de recuperación luego de ser expuestos cuatro horas a *ca.* cero grados nos permite ver la sensibilidad a las bajas temperaturas por las distintas especies, obteniendo como resultado que, por ejemplo, para *R. prolixus*, *T. vitticeps* y *T. dimidiata* este tiempo de exposición a cero grados fue suficiente para mantener sin respuesta durante una hora a los individuos. Sin embargo, pasadas las 24

horas todos los insectos ya se habían recuperado, mostrando que la exposición de los insectos a cuatro horas a *ca.* cero grados no fue letal. El resto de las especies lograron recuperarse antes de finalizar el experimento (incluso antes de la media hora) ( $F_{3,70}= 19,25$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 3).

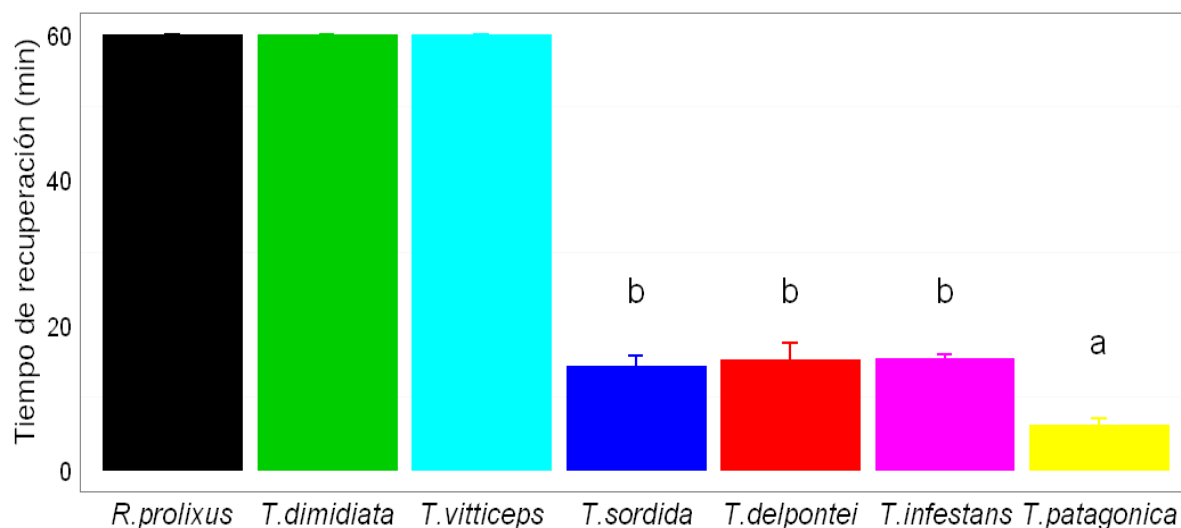


Figura 3.- Tiempo promedio en minutos de recuperación al coma inducido por frío según las especies. *R. prolixus*, *T. vitticeps* y *T. dimidiata* no se recuperaron durante el experimento (una hora de duración). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), solo se compararon estadísticamente las especies que se recuperaron antes de la hora.

### **Análisis Geográficos**

Luego del análisis de correlación entre las variables se realizaron modelos lineales generalizados binomiales de “presencia / ausencia” para la realización de los factores de inflación de la varianza (VIFs). Solo para *T. infestans* y *T. sordida* todos los VIFs fueron menores a 10. Las demás especies mostraron variables con valores superiores, las cuales se excluyeron y se corrieron nuevamente los modelos hasta observar valores de menores a 10. En la Tabla 3 se muestran las variables resultantes utilizadas para realizar los modelos de distribución en cada una de las especies con los valores de contribución relativa y el valor de AUC promedio de cada modelo.

Tabla 3.- Variables bioclimáticas utilizadas para realizar los modelos de distribución para cada una de las especies y sus contribuciones relativas.

Variables	<i>T. infestans</i>	<i>T. vitticeps</i>	<i>T. delpontei</i>	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. patagonica</i>	<i>T. sordida</i>	<i>R. prolixus</i>
BIO 1	-	-	-	-	-	-	-
BIO 2	3,3	-	-	-	-	-	-
BIO 3	29,1	18,0	62,2	34,0	-	24,5	29,8
BIO 5	6,0	13,1	9,0	8,8	5,3	1,4	3,7
BIO 6	31,7	34,0	14,2	30,9	5,2	31,3	43,1
BIO 7	-	9,0	-	-	66,8	-	-
BIO 12	13,9	-	14,6	8,5	-	21,8	2,1
BIO 15	7,3	25,8	-	9,4	6,4	3,2	1,7
BIO 18	-	-	-	8,3	-	12,5	-
BIO 19	8,6	-	-	-	16,3	5,4	19,7
AUC (MEDIA <sub>DS</sub> )	0,856±0,01	0,976±0,01	0,956±0,02	0,814±0,03	0,954±0,01	0,855±0,02	0,845±0,02

AUC= Área bajo la curva Característica Operativa del Receptor (ROC).

Se observa en la tabla 3 que la variable Bio 6 es una de las que más aporta a los modelos de distribución de los triatominos, donde sólo para *T. delpontei* y *T. patagonica* no fue la que más contribuyó, y en su lugar fue la Bio 3 y Bio 7 respectivamente. Sin embargo, estas variables incluyen el efecto de la Bio 6 en su fórmula ( $Bio\ 3 = Bio\ 2 / Bio\ 7 \times 100$ ;  $Bio\ 7 = Bio\ 5 - Bio\ 6$ ). Además, para *T. dimidiata* la Bio 3 es la que más aporta con la Bio 6 como segunda. No obstante los análisis de importancia relativa por permutaciones (tabla 14 del anexo) y el análisis de jackknife para las variables sobre el AUC del modelo (figuras 3.1:7 del anexo) muestran que las variables Bio 3 y Bio 6 poseen un gran efecto para cada modelo. Los mapas resultantes de los modelos realizados en maxent se muestran en la figura 4 (4A). Como se puede observar en dichos mapas, existe un solapamiento de zonas con condiciones ambientales propicias para el establecimiento de más de una especie pero a la vez se observan zonas donde ninguna es capaz de desarrollarse (*i.e.*, en los Andes y algunos ambientes del centro-norte de Brasil). Sólo *T. patagonica* y *T. vitticeps* parecen estar circunscriptas a un solo país (Argentina y Brasil respectivamente), mientras que las demás especies, según el modelo se reconocen ambientes propicios para regiones de más de un país. A partir del análisis de maxent, se determinó qué variables son las que limitan la distribución espacial de las especies (figura 4B). Como se observa en los mapas, el factor más limitante de la distribución espacial se define como el factor con principal influencia en las zonas donde

la probabilidad de presencia es baja. Este factor limitante en la mayoría de los modelos de distribución de las especies fue la temperatura mínima del mes más frío (Bio 6, color violeta en la figura 4B) a excepción del modelo de distribución de *T. patagonica* y *T. vitticeps* en las fue que el rango anual de temperaturas (Bio 7= Bio 5 – Bio 6).

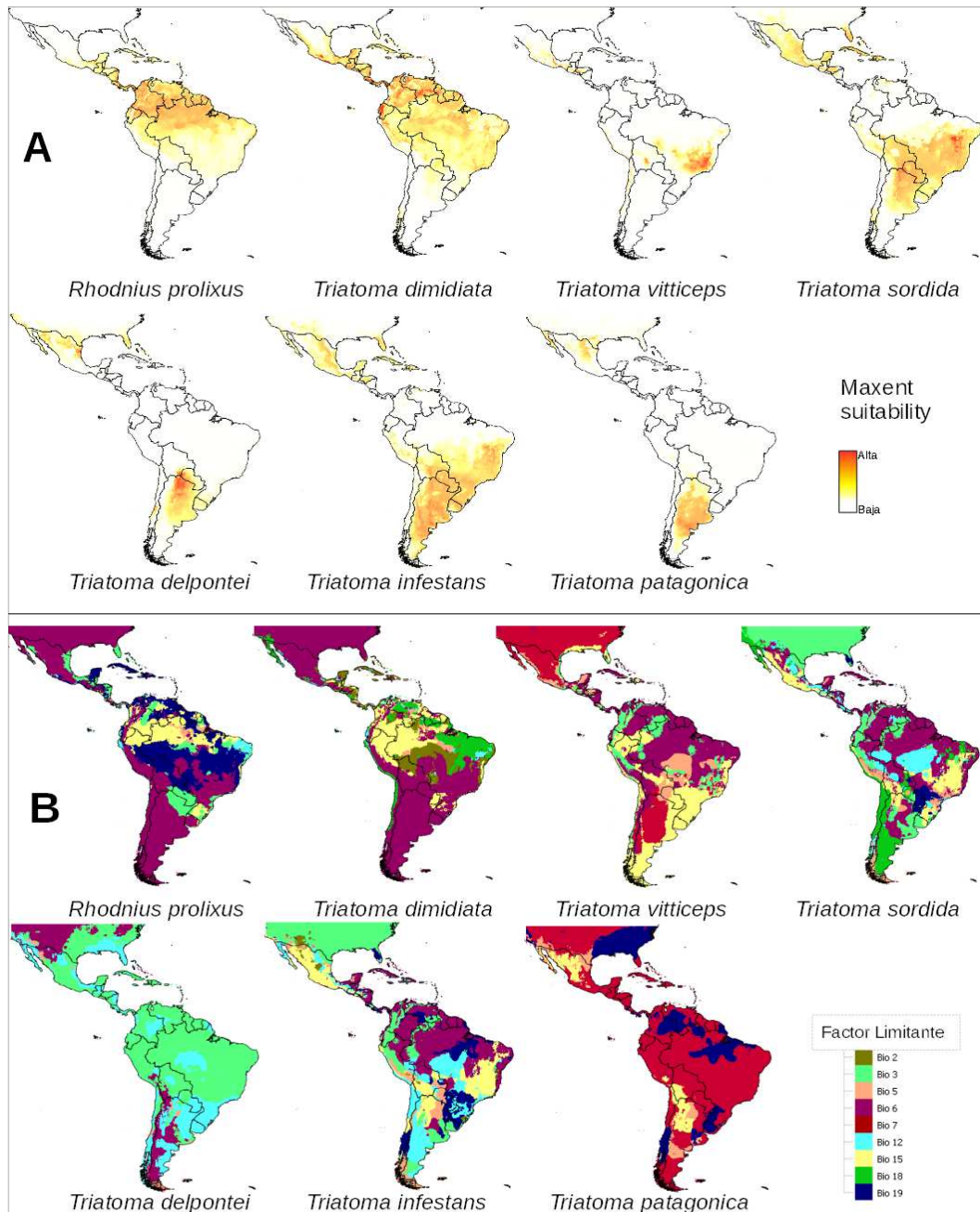


Figura 4.- Índice de condiciones ambientales propicias para la distribución de siete especies de triatominos y mapas de las variables ambientales limitantes para su distribución. En la figura A se muestran los mapas resultantes del modelado de la distribución para las siete especies de triatominos con maxent y el índice de condiciones ambientales propicias (o simplemente “Maxent suitability”). En la figura B se muestran los factores limitantes de la distribución para las especies en cada pixel del mapa.

## ***Macrofisiología***

En la figura 5 se muestra la relación entre los límites fisiológicos críticos medidos (CTmax y CTmin) las temperaturas extremas (Bio 5 y Bio 6) para 1000 puntos al azar sobre la extensión del mapa. Además se encuentra coloreado según la probabilidad de presencia de cada especie y la elipse de confianza de las temperaturas extremas (Bio 5 y Bio 6) sobre las probabilidades de “presencia” mayores al valor crítico (máximo de la suma de sensibilidad (porcentaje de verdadero positivos) y especificidad (porcentaje de verdaderos negativos)). Este criterio de corte dependiente de cada modelo de distribución se encuentra en la tabla 15 del anexo. En términos de la temperatura máxima del mes más cálido, podemos ver que en la mayoría de las especies la probabilidad de presencia nunca supera valores de temperatura de 40°C, y que los valores que se encuentran dentro de las elipses de confianza (95%) están a más de 10 grados de distancia aproximadamente de las CTmax. Sin embargo, *T. dimidiata* es una de las especies que posee valores de probabilidad de presencia alta en zonas con temperaturas máximas mayores a 40°C y que su CTmax se encuentra a menos de 7°C de distancia de los valores máximos de temperatura dentro de la elipse de confianza. Por otro lado, la relación entre las temperaturas mínimas de las zonas de distribución de las especies y las TCmin se comporta de manera distinta a la relación entre las temperaturas máximas de los meses más cálidos y los CTmax. Sólo en las especies *T. dimidiata*, *R. prolixus* y *T. vitticeps* las elipses de confianza (95%) se encuentran por encima de los valores de CTmin y no se encuentran valores de probabilidad de presencia altos en puntos con temperaturas mínimas que sean menores a cero grados. Por su parte observando la elipse de confianza de *T. delpontei*, *T. infestans* y *T. patagonica* vemos que poseen probabilidades de presencia altas en zonas con temperaturas incluso menores a sus CTmin, en tanto que en *T. sordida* se observa que la elipse de confianza se encuentra a muy cercana a los valores de su CTmin e incluso existen zonas con probabilidades de presencia medias con temperaturas mínimas del mes más frío menores a cero grados.

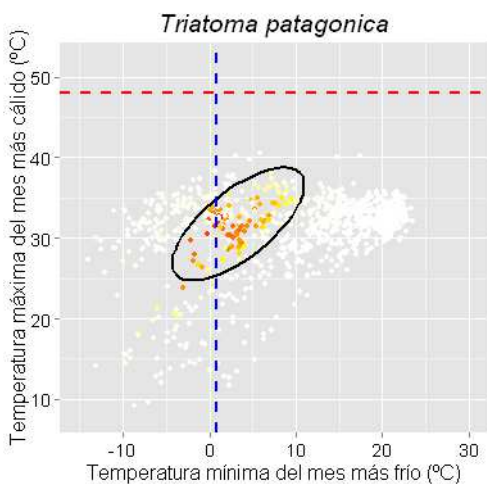
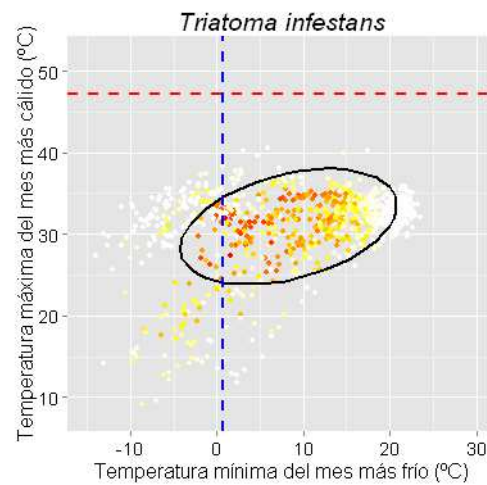
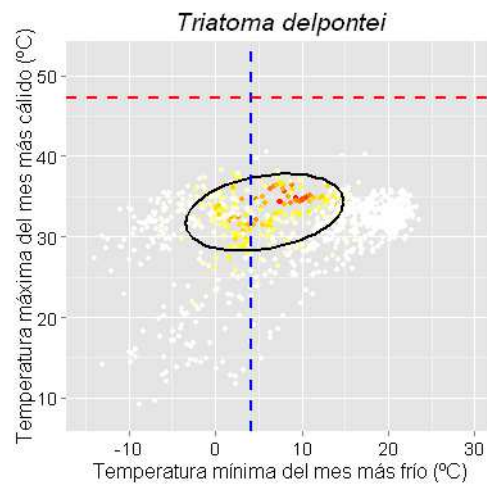
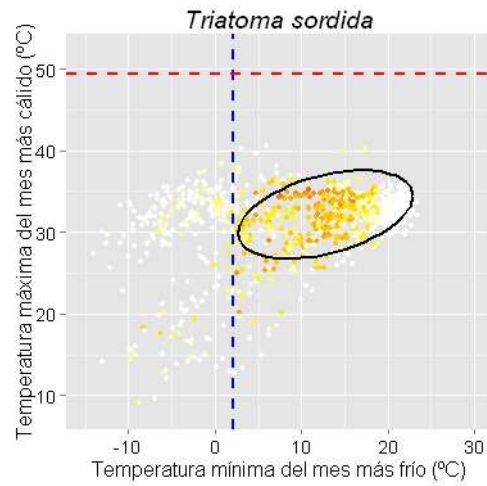
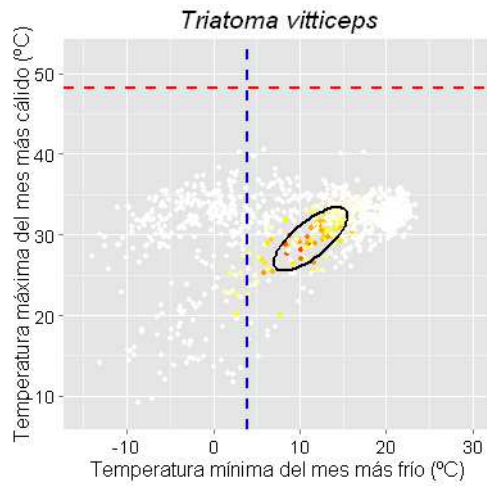
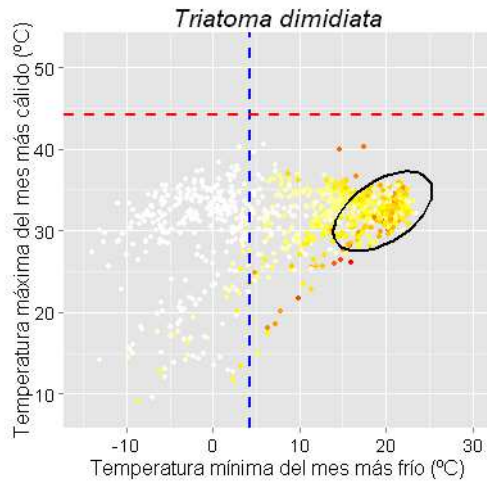
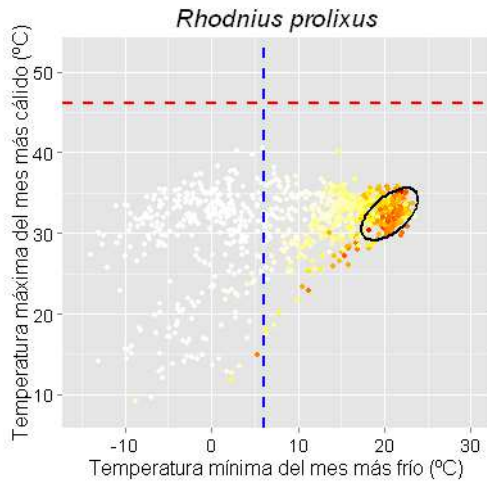


Figura 5.- Relación entre los límites fisiológicos críticos (CTmax y CTmin) las temperaturas extremas mínima del mes más frío y máxima del mes más cálido (Bio 6 y Bio 5) para 1000 coordenadas al azar según la probabilidad de presencia (“maxent suitability”) de cada especie. Se muestra la elipse de confianza (95%) para valores de probabilidad de “presencia” mayores al valor máximo de la suma de sensibilidad (porcentaje de verdaderos positivos) y especificidad (porcentaje de verdaderos negativos).

Como se observa en la figura 4A, las especies *R. prolixus*, *T. dimidiata* y *T. vitticeps* poseen una distribución tropical en tanto que las demás especies tienen una distribución marcada en los dos hemisferios en las zonas subtropicales o templadas. Debido a esta diferencia se tomó como punto medio de la distribución la posición de la máxima probabilidad de presencia de cada especie para entender el patrón de relaciones que muestran las especies entre las tolerancias y las temperaturas en su distribución. Para las especies subtropicales se tomaron los valores de probabilidad del hemisferio sur.

Las especies seleccionadas no comparten el patrón propuesto por Rapoport que establece que a medida que las especies se distribuyen hacia los extremos latitudinales, la extensión del rango geográfico es mayor. Para estos siete triatomíneos el rango latitudinal no varía a medida que las especies se distribuyen hacia el sur (rango latitudinal ~ latitud= pendiente= 0,12,  $F_{1,5}= 0,03$ ,  $p=0,85$ ,  $r^2=0,0007$ ), sin embargo la amplitud térmica disminuye hacia las zonas tropicales (amplitud térmica ~ latitud= pendiente= -5,19,  $F_{1,5}= 37,2$ ,  $p<0,002$ ,  $r^2=0,85$ ). A su vez, las especies con su distribución más austral tienen menores temperaturas mínimas del mes más frío (Bio 6) (pendiente= 0,18,  $F_{1,5}= 24,05$ ,  $p< 0,002$ ,  $r^2=0,88$ ), pero sin variación latitudinal en las temperaturas máximas del mes más cálido (Bio 5) (pendiente= -0,08,  $F_{1,5}= 0,20$ ,  $p=0,67$ ,  $r^2=0,02$ ) (Figura 4 del anexo).

Con el objetivo de comprender en mayor profundidad éstos patrones se evaluó si las temperaturas críticas (CTmax y CTmin) de las especies estaban en función de la temperatura y de la latitud de los puntos de máxima probabilidad. Este nuevo análisis mostró que tanto para las temperaturas extremas (Bio 5 o Bio 6) del centro de la distribución, como para el valor de latitud de dicho centro, existe una relación lineal positiva con la CTmin pero no con las CTmax (CTmax ~ Bio 5= pendiente= 0,34,  $F_{1,5}= 3,96$ ,  $p=0,10$ ,  $r^2=0,44$ ; CTmax ~ latitud= pendiente= -0,05,  $F_{1,5}= 1,67$ ,  $p=0,25$ ,  $r^2=0,24$ ); (CTmin ~ Bio 6= pendiente= 0,24,  $F_{1,5}= 19,76$ ,  $p< 0,007$ ,  $r^2=0,79$ ; CTmin ~ latitud= pendiente= 0,11,  $F_{1,5}= 11,51$ ,  $p<0,02$ ,  $r^2=0,69$ ). Además, se observó que en el rango de tolerancia (CTmax-CTmin) mantiene la relación latitudinal (CTmax-CTmin ~ latitud= pendiente= -0,17,  $F_{1,5}= 7,98$ ,  $p=0,03$ ,  $r^2=0,61$ ) (Figura 6).

En un enfoque más realista incluyendo la relación filogenética entre las especies, los resultados de los Contrastes Filogenéticamente Independientes (PIC) entre los rasgos fisiológicos (CTmin, CTmax y el rango de termotolerancia) y las variables de temperatura y latitud de la distribución de cada especie mantienen los sentidos de las pendientes y los niveles de significancia de los patrones anteriormente observados (figura 6).

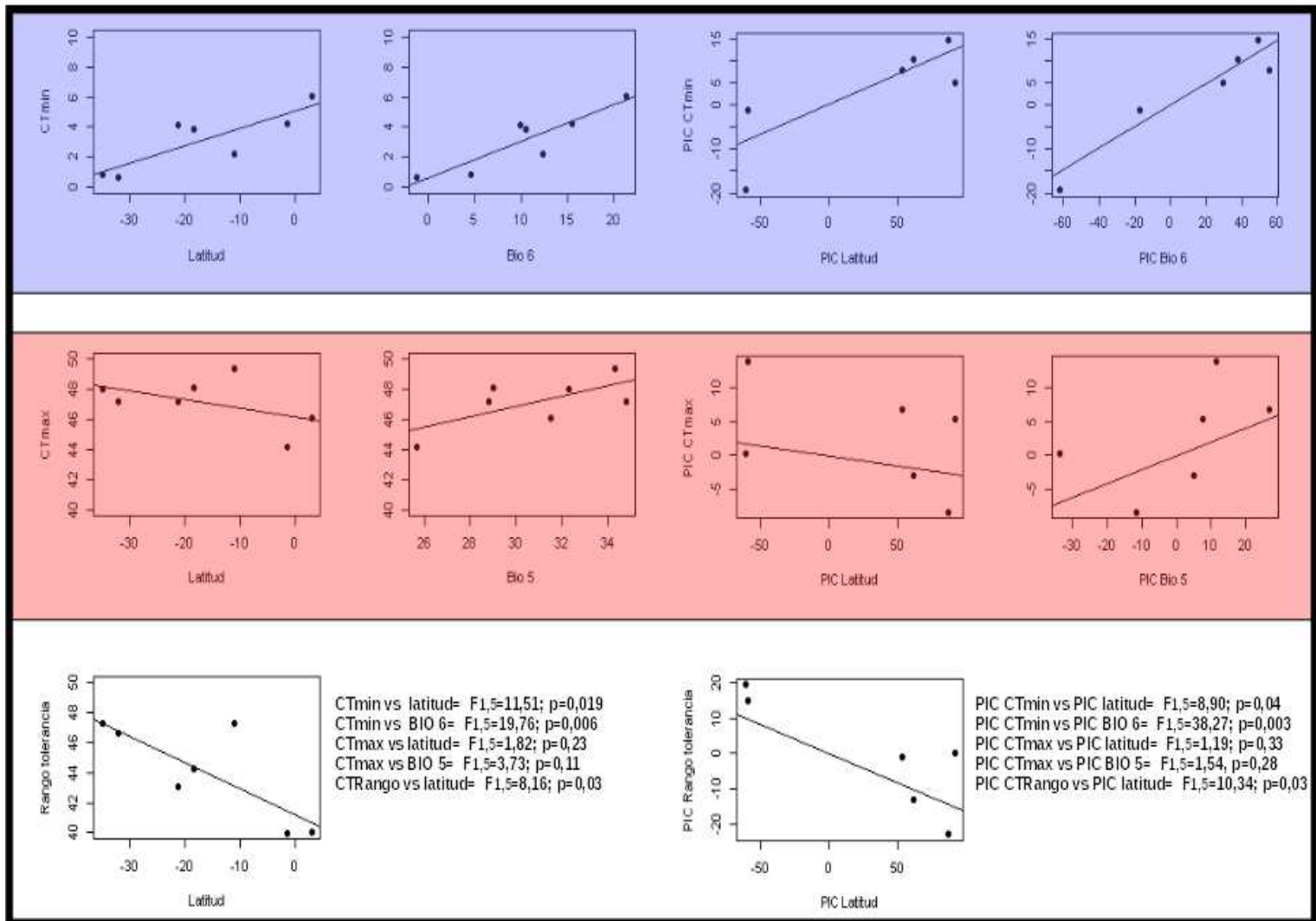


Figura 6. Temperaturas críticas y su relación con la latitud y las temperaturas extremas ambientales y los respectivos contrastes filogenéticamente independientes. En el panel superior (fondo azul), se observan las relaciones de la temperatura crítica mínima (CTmin) y la latitud; la CTmin y la temperatura mínima del mes más frío (Bio 6). Además se muestran las relaciones de los contrastes filogenéticamente independiente de la temperatura crítica mínima (PIC CTmin) y las variables de latitud (PIC Latitud) y temperatura mínima del mes más frío (PIC Bio 6). En el panel del medio (fondo rojo), se observan las relaciones de la temperatura crítica máxima (CTmax) y la latitud; la CTmax y la temperatura máxima del mes más cálido (Bio 5). Además se muestran las relaciones de los contrastes filogenéticamente independiente de la temperatura crítica máxima (PIC CTmax) y las variables de latitud (PIC Latitud) y temperatura máxima del mes más cálido (PIC Bio 5). En panel inferior (fondo blanco) se muestra la relación lineal del rango de tolerancia (CTmax-CTmin) y la latitud y además se muestra la relación de los contraste filogenéticamente independientes del rango de tolerancia (PIC Rango Tolerancia) y la latitud (PIC Latitud). También se informan los valores de significancia de todas las regresiones lineales anteriormente mencionadas.



## ***Discusión***

En este capítulo se han determinado por primera vez los límites fisiológicos de respuesta a la temperatura y se ha modelado la distribución de siete especies de triatominos de importancia vectorial. El enfoque macrofisiológico utilizado combinando modelos de distribución y experimentos sobre la fisiología de estos insectos, a la vez que fueron incluidas las relaciones filogenéticas, nos permiten evaluar hipótesis macroecológicas como la Hipótesis de Variabilidad Climática.

*Nota: En el artículo publicado con parte de este trabajo (Geographical distribution, climatic variability and thermo-tolerance of Chagas disease vectors. Ecography, 38, 851–860) se obtuvieron valores de temperaturas críticas máximas más elevadas para R. prolixus y T. infestans sin embargo se desconocen las causas de las diferencia. Se repitieron ensayos y se obtuvieron los resultados que este capítulo muestra.*

### ***Implicancias Fisiológicas:***

Los perfiles de emisión de CO<sub>2</sub> de los triatominos analizados muestran las mismas siete fases que se han encontrado en otros insectos donde se estudiaron los límites térmicos por respirometría (Klok et al., 2004, Lighton y Turner 2004). Esto sugeriría que los mecanismos responsables de los cambios en la liberación de CO<sub>2</sub> podrían ser comunes en los insectos. Como se observa en la Tabla 1 hemos diferenciado etapas para las curvas de liberación de CO<sub>2</sub> de las especies, Equilibrio - Sensibilidad - Resistencia – Letalidad. Al tomar los valores promedios de cada etapa y graficarlos podemos observar las curvas que describen dichos puntos para cada especie (Figura 8). Así se observa gráficamente que todas las especies tienen valores relativamente similares para sus SMR a 35°C y que una vez que empieza a ascender la temperatura, se empiezan a mostrar diferencias más claras de la tasa metabólica entre las especies. En esta segunda etapa, que se denominó “Sensibilidad”, podemos ver en *R. prolixus* una clara diferencia del resto de los triatominos en la tasa ascenso y en *T. dimidiata* en la duración de la rampa. Una tasa metabólica alta implicaría una elevada tasa de alimentación para estos insectos (Rolandi y Schilman 2012) por lo que, en términos de la importancia vectorial, resulta interesante observar la sensibilidad de la tasa metabólica a la temperatura de *R. prolixus* y *T. infestans*. Estas dos especies son los vectores de la enfermedad más importantes de continente. La distribución geográfica, el grado de domiciliación, la antropofilia y el tiempo entre la alimentación y la defecación son factores que determinan la capacidad vectorial de estas especies (Lent y Wygodzinsky 1979). Por lo que esta sensibilidad de *R. prolixus* y *T. infestans* podría ser responsable, al menos en parte, del “éxito” de estos insectos como vectores de la enfermedad de Chagas.

Nuestros resultados, luego de controlar temperatura, masa y filogenia, sugieren que especies de triatominos de zonas tropicales poseen tasas metabólicas de reposo mayores que aquellos de latitudes mayores ( $\text{picSMR} \sim \text{picTemperatura media} = \text{pendiente} = 0,12$ ,  $F_{1,5} = 13,31$ ,  $p = 0,01$ ,  $r^2 = 0,67$ ), pero que la

sensibilidad metabólica a la temperatura no posee un patrón latitudinal ( $\text{picTasa de ascenso} \sim \text{picTemperatura media} = \text{pendiente} = 0,0008$ ,  $F_{1,5} = 0,004$ ,  $p = 0,95$ ,  $r^2 = 0,0008$ ). Addo-Bediako y colaboradores (2002) encontraron que, después de controlar la temperatura de distintos ensayos y la masa corporal de los insectos utilizados, las tasas metabólicas de insectos de ambientes más fríos serían mayores que aquellos de zonas más cálidas. Los resultados de este trabajo no apoyan esta hipótesis de “Adaptación metabólica al frío” (MCA por “*Metabolic Cold Adaptation*”) en insectos, que predice que las poblaciones o especies de los ambientes más fríos (de gran altitud o latitud) tendrán una tasa metabólica más alta y una menor sensibilidad metabólica a la temperatura (Clarke 1993, Addo-Bediako et al., 2002). Esto podría explicarse al menos en parte a que no existe una relación entre la sensibilidad de la tasa metabólica y la temperatura para los insectos del hemisferio sur lo que generaría una asimetría a gran escala (Addo-Bediako et al., 2002).

Por otro lado la relación entre la “sensibilidad” (tasa de ascenso y duración de la rampa) y la “resistencia” (el tiempo dentro de la meseta) de cada especie van a determinar la temperatura a la cual llegan a su CTmax. La etapa de “Letalidad” muestra que *R. prolixus*, *T. delpontei* y *T. infestans* duplican los valores de *T. dimidiata*, *T. patagonica*, *T. sordida* y *T. vitticeps*. En todas las especies se observa que una vez que se alcanza la tasa de liberación máxima (fase 3, meseta) la tasa metabólica decae, a excepción de los valores extremos de *T. delpontei* en donde los valores son superiores a la tasa de liberación máxima.

Los resultados de CTmax muestran que existe una variación intraespecífica muy baja y que no se observan diferencias significativas entre la CTmax de respirometría y la de actividad, a su vez en la variación interespecífica se observa que los valores son próximos a los 47°C con una variación de 1,7°C. Además, las diferencias entre los valores de CTmax y las temperaturas letales también resultaron muy pequeñas (Tabla 1), por lo que la vulnerabilidad de las especies para tolerar fenómenos térmicos extremos van a estar dados por un aspecto crítico como la plasticidad de comportamiento en el uso del hábitat (Sunday 2014). Por su parte los desvíos intra-específicos de las CTmin fueron mayores a los de las CTmax y la variación entre las especies es de casi dos grados alrededor de una media próxima a los 3°C. Estas diferencias en la variación de las temperaturas críticas son consistentes con otros trabajos donde se propone que en insectos, los límites térmicos superiores tienen menor plasticidad fenotípica, menor variación y se encuentran desacoplados de las respuestas de los límites térmicos inferiores (Chown 2001, Chown y Nicolson 2004, Terblanche et al 2005). Esta asimetría podría explicarse en que la variación de las tolerancias al frío por los insectos se debería a la capacidad específica de mantener la homeostasis iónica (MacMillan et al 2012). En contraste la menor variación en las tolerancias al calor se explicaría por la incapacidad de los organismos de contrarrestar los efectos de las altas temperaturas sobre la estabilidad de las proteínas y membranas (Angilletta 2009). Si bien los experimentos se plantearon con una aclimatación general para todos igual (28°C) podría existir un efecto por

aclimatación sobre los valores de temperaturas críticas en estos triatominos. Podrían existir diferencias inter-específicas e intra-específicas distintas como se ha probado para poblaciones de la mosca tse-tsé *pallidipes Glossina* (Terblanche et al. 2006) y para *R. prolixus* (Belliard 2015), donde se muestra que hay un mayor efecto de la aclimatación sobre las CTmin que sobre las CTmax. Por otro lado el efecto de una aclimatación natural también podría generar variaciones en los resultados, sin embargo en otros insectos hematófagos se ha probado que es razonable esperar resultados similares si se comparan las tolerancias térmicas de poblaciones silvestres con poblaciones de laboratorio (Lyons et al 2012). Además resultados preliminares de CTmin para *T. infestans* en poblaciones naturales dentro de su distribución austral y experimentos de aclimatación con individuos de laboratorio (Belliard *com. pers.* 2015) mostrarían que los resultados obtenidos aquí proveerían información relevante para generar inferencias sobre las poblaciones silvestres.

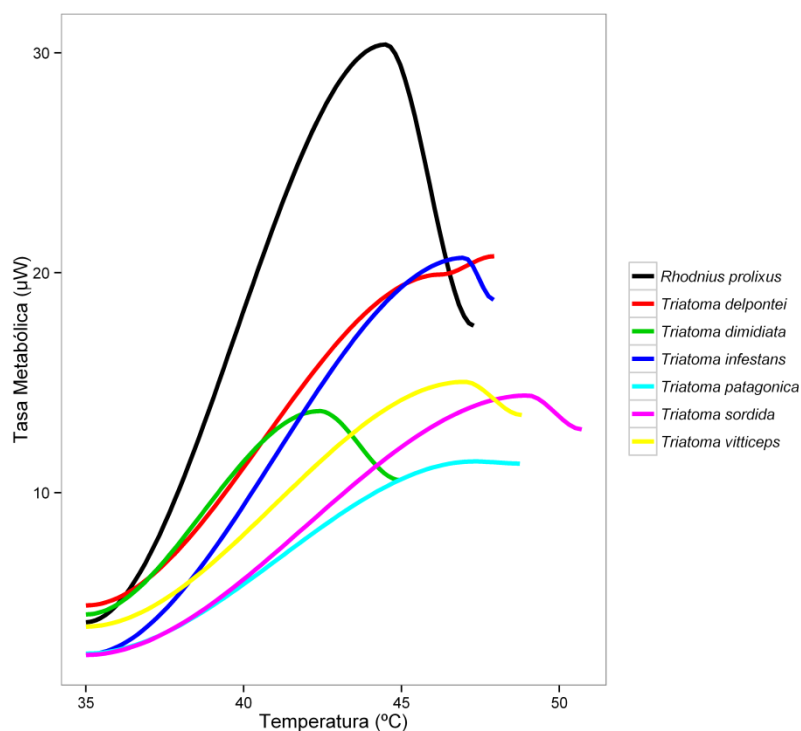


Figura 8.- Curva promedio de la tasa metabólica en función de la temperatura para las siete especies de triatominos. La Tasa Metabólica está expresada en micro-watts.

### ***Implicancias Ecológicas:***

Los resultados de los modelos de la distribución de los triatominos indican que existen zonas con condiciones ambientales propicias para más de una especie y a la vez zonas donde el modelo predice la ausencia de las especies utilizadas en este trabajo (*i.e.*, los Andes y algunos ambientes del centro-norte de Brasil). Si solapamos los modelos dentro de un solo mapa podemos distinguir que la zona con mayor

riqueza específica de los vectores de importancia epidemiológica aquí estudiados es la región que pertenece al centro-norte de Argentina y parte del centro sur de Brasil (Figura 5 del apéndice). Esta riqueza de vectores en dichas zonas puede ser explicada por los mapas de riqueza propuestos para 91 triatominos por Fergnani y colaboradores (2013) donde la mayor riqueza específica se da en el norte de Argentina, el Sur de Bolivia, el sureste de Brasil y se observa otro foco de riqueza en la zona de Venezuela. Por otro lado, Rodriguero y Gorla (2004) establecen que la mayor riqueza de triatominos responde a un patrón latitudinal pero con su pico máximo entre los 5 y 10 grados de latitud sur (ca. 20 especies) y valores de riqueza cercanos a 10 para las zonas de mayor riqueza en nuestro trabajo (figura 5 del apéndice).

Para las regiones que los modelos predicen la ausencia de ambientes propicios para los triatominos utilizados, como la región andina, una posible causa de la ausencia podría ser la baja temperatura debido a la altitud, lo cual es consistente con el hecho de que la mayoría de las especies de triatominos y poblaciones se encuentran entre el nivel del mar y los 1.500 msnm (Carcavallo et al 1999). Para la parte central de Brasil, las ausencias se pueden entender a partir de los mapas de factores limitantes (figura 4B). En la mayoría de los modelos de la distribución de las especies el factor más limitante fue la temperatura mínima del mes más frío (Bio 6) a excepción del modelo de distribución de *T. patagonica* y *T. vitticeps* en las fue que el rango anual de temperaturas (Bio 7= Bio 5 – Bio 6). Estos sugieren que las especies de zonas tropicales están limitadas en dicha zona por la temperatura mínima del mes más frío (Bio 6) y las especies de zonas templadas donde su distribución alcanza el centro-este del continente, como *T. infestans* y *T. sordida* están limitadas en su distribución norte por la Bio 6 y la precipitación media (Bio 12). Por otro lado se debe tener en cuenta que las interacciones bióticas entre los triatominos podrían estar afectando la distribución, ya que una gran riqueza de triatominos en América del Sur se encuentran en esta región (Rodriguero y Gorla 2004, Diniz-Filho et al 2013, Fergnani et al 2013). Nuestros resultados confirman la importancia de la temperatura en la distribución de los triatominos. Gorla (2002) determinó por un análisis discriminante para *T. infestans* una función con seis variables descriptivas (cuatro de ellas asociadas con la temperatura del aire, una asociada con la radiación infrarroja media y una con el índice de vegetación) que identificaron correctamente el 90% de “presencias” y “ausencias” para la especie. También en nuestro trabajo se observa que la precipitación tiene un efecto sobre los modelos, aunque secundario; por ejemplo para *T. vitticeps* la variación estacional de la precipitación (Bio 15) explica un gran porcentaje de la distribución (25,8%). En esta línea de Souza y colaboradores (2010) demostraron que la precipitación anual y la precipitación del trimestre más húmedo está asociada con la distribución espacial de *T. vitticeps* en Brasil y estaría asociada a los biomas de “selva atlántica” y “cerrado” (Gurgel-Gonçalves et al 2011). Los resultados de los modelos de distribución con maxent, sobre los factores abióticos más importantes para la distribución (Tabla 1), mostraron la importancia de las bajas temperaturas de igual manera en que se vió en otros insectos. Por ejemplo, se determinó que la temperatura del invierno es el factor clave que limita

la expansión al noroeste de la hormiga cortadora de hojas, *Atta texana*, en América del Norte (Mueller et al 2011) y, para dos especies de avispas, *Ceratosolen galili* y *C. arabicus*, la temperatura mínima del mes más frío es una variable importantes para predecir sus distribuciones (Warren et al 2010).

### ***Relación entre las tolerancias fisiológicas y la distribución geográfica:***

En este trabajo se observa que todas las especies de triatomíneos se distribuyen geográficamente en zonas donde las temperaturas máximas del mes más cálido (Bio 5) son considerablemente inferiores a sus respectivas CT<sub>max</sub> (Figura 5, elipse). Esto se podría considerar como una estrategia adaptativa para evitar la exposición a temperaturas cercanas a su CT<sub>max</sub> y por ende a sus ULT (ca. 1 grado) lo que proporciona un margen de seguridad térmica para condiciones extremas. La CT<sub>max</sub> de *T. dimidiata* es la que se encuentra más cercana a los valores más extremos de la Bio 5 (Figura 5), por lo que es la especie que tendría más comprometida su límite de seguridad térmica, por ejemplo frente a un escenario de calentamiento global. Con respecto a las temperaturas mínimas del mes más frío (Bio 6), las especies tropicales, *R. prolixus*, *T. dimidiata* y *T. vitticeps*, habitan zonas donde esta variable es mayor que las CT<sub>min</sub>. Mientras que las especies que tienen una distribución en las zonas templadas o subtropicales (*T. delpontei*, *T. infestans* y *T. patagonica*) habitan en áreas donde los Bio 6 es, en algunos puntos, incluso más baja que los valores de CT<sub>min</sub> de cada especie (Figura 5, elipse). *T. sordida* se encuentra en una zona intermedia ya que posee una distribución que puede alcanzar zonas subtropicales dentro de Argentina pero una probabilidad de máxima presencia cercana a los 10 grados de latitud sur. El modelado de su distribución dentro de Brasil asocia a esta especie a las regiones que componen el bioma “cerrado” en el centro del país (Gurgel-Gonçalves et al 2011). La relación entre la temperatura mínima del mes más frío y la CT<sub>min</sub> en las especies subtropicales implica que estos triatomíneos puede habitar regiones más frías que su valores críticos, por lo que el efecto de las condiciones microclimáticas sobre la distribución geográfica de éstas especies necesita ser profundizado, sobre todo para las especies con alto grado de domiciliación como *T. infestans* (Carcavallo 1999). Por otra parte, éstas temperaturas son “críticas” y no “letales”. La temperatura letal inferior (LLT, por “*Lower Lethal Temperature*”) para *T. infestans* es ca. 12°C por debajo de CT<sub>min</sub> (estimada entre -10 y -12°C por Blaksley y Carcavallo 1968), que es inferior a la temperatura mínima de la mes más frío en su distribución geográfica (Figura 5). Para *T. patagonica* la temperatura letal estimada también estaría a unos 12 grados de su CT<sub>min</sub> (estimada en -12°C, aunque con una baja cantidad de individuos analizados), en tanto que para *T. delpontei* estaría a 10°C de distancia, estimada en -6°C (Blaksley y Carcavallo 1968). En concordancia con nuestros resultados de tiempo de recuperación frío (Figura 5 y Figura 6 del apéndice), la temperatura de ca. 0°C es ecológicamente relevante para las especies tropicales ya que se distribuirían en zonas con inviernos donde prácticamente no se alcance a dicha temperatura. Para *T. delpontei*, *T. infestans* y *T. patagonica* esta temperatura no tendría consecuencias ecológicas importantes ya que exciten probabilidades de que las temperaturas alcancen los cero grados en los inviernos para sus distribuciones.

Incluso, para *T. patagonica*, quien tiene menor tiempo de recuperación, los valores cercanos a cero grados son los que tienen mayor probabilidad de ocurrencia (Figura 6 del apéndice).

Existe una variación estacional en las poblaciones de triatomíneos, tanto las que habitan ambientes antropizados como las de ambientes silvestres, con una marcada disminución de presencia asociada a las temperaturas del invierno para estos vectores subtropicales (Gorla y Schofield 1989, Wisnivesky-Colli et al 2003). Además, existe una variación relacionada a las estaciones húmedas para los vectores de zonas tropicales como *T. dimidiata* (Dumonteil et al 2002). Esto implica una reducción de las tasas de encuentro entre vectores y huéspedes durante la temporada fría, por lo que la transmisión de *T. cruzi* podría estar en su nivel más bajo durante los meses fríos.

Nuestros resultados se ajustan bien al principio macroecológico que establece que a mayores latitudes (o altitudes) las especies experimentan temperaturas más bajas y una mayor variación estacional, y por lo tanto mayores temperaturas extremas (Gaston y Chown 1999). Existe gran consistencia entre nuestros resultados y las predicciones que se desprenden de la CVH. Se ha propuesto que las especies que habitan gradientes climáticos más amplios tendrían rangos de tolerancia térmica mayores (Stevens 1989, Addo-Bediako et al 2000). Sunday y colaboradores (2011) probaron la relación que existe para el rango de tolerancia térmica en animales ectotérmicos y el incremento en la latitud para distintas especies y distintos hábitats. En nuestro trabajo observamos también un rango de tolerancia térmica mayor para las especies que se encuentran a mayores latitudes (Figura 6). Debido a que la CT<sub>max</sub> no mostró una variación latitudinal significativa, la relación entre el rango de tolerancia y la latitud, estaría dada por la regresión lineal de las temperaturas críticas mínimas y la latitud. Además no se observa una relación entre las temperaturas máximas de cada zona y la latitud como se observa para las temperaturas mínimas en la distribución de cada especie (Figura 4 del apéndice). En otras especies de ectotermos (como reptiles) también se encontraron que las especies que viven a mayores latitudes tienen valores CT<sub>min</sub> más bajos que las especies que viven en zonas tropicales (Cruz et al 2005). Los resultados de la CT<sub>max</sub> y los de ULT, sumados con los de CT<sub>min</sub> y los datos de temperaturas letales inferiores para algunos de los triatomíneos, coinciden con lo propuesto por Addo-Bediako y colaboradores (2000) para los insectos: los límites letales superiores muestran una variación menor que la que poseen los límites letales inferiores (Addo-Bediako et al 2000, Sunday et al 2011).

Teniendo en cuenta la relación filogenética en los análisis, los resultados muestran que las tolerancias a las bajas temperaturas dependerían de adaptaciones térmicas de las especies en lugar de estar más asociadas a la inercia ancestral. Para las tolerancias a las temperaturas máximas se observa que no existe una relación fuerte entre las temperaturas ambientales máximas y la variación de las CT<sub>max</sub>. Este resultado coincide con lo hallado para *Drosophila* donde se encontró que la inercia filogenética sería responsable de la resistencia al calor por lo que las especies de éste género tendrían una limitada capacidad evolutiva para mostrar variaciones en el límite térmico superior (Kellerman et al 2012). Especies de ectotermos (y endotérmicos) poseen límites inferiores de tolerancias que tienden a co-variarse

con la temperatura ambiente, sin embargo los límites térmicos superiores no muestra tal relación. En otras palabras, la selección natural parece modular las respuestas fisiológicas a temperaturas más bajas pero no se observa que tenga un efecto sobre las temperaturas superiores (Araújo et al 2013). El efecto que poseen las temperaturas mínimas del mes frío para la distribución de cada especie según los modelos (y la determinación del factor limitante) junto con la relación entre las tolerancias fisiológicas y la latitud para estos triatomíneos muestra que solamente los límites australes de las especies podrían ser en parte explicados por el nicho térmico fundamental. Es decir, el límite de termo-tolerancia inferior podría estar limitando la distribución latitudinal de estas especies de triatomíneos. Este patrón es mucho más claro para las especies tropicales ya que las especies que alcanzan zonas templadas podrían habitar en regiones donde la temperatura mínima es incluso menor que su CT<sub>min</sub>. Las especies con bajo CT<sub>min</sub> y LLT son capaces de ocupar mayores latitudes, relativamente más frías, así como latitudes más cálidas, mientras que las especies con valores elevados de CT<sub>min</sub> podrían ocupar sólo lugares más cálidos (Araújo et al 2013).

En relación al rango de tolerancia térmica, observamos que se mantiene la regresión lineal una vez tomada en cuenta la filogenia de las especies. Lo mismo sucede en especies de escarabajos del género *Deronectes* (Calosi et al 2009) donde el nicho térmico fundamental es un factor clave para explicar la variación en el rango geográfico y su disposición latitudinal. Sin embargo, la regla de Rapoport sobre el rango geográfico y la posición latitudinal no se aplica para estas siete especies de triatomíneos estudiadas. En parte, esto puede ser explicado ya que *a priori* se han elegido las especies por su relevancia epidemiológica y no se ha tomado la totalidad de la riqueza de especies de triatomíneos para estudiarlas.

## ***Conclusiones***

En este capítulo se han determinado por primera vez los límites fisiológicos de respuesta a la temperatura para los parámetros de temperatura críticas, temperatura letal superior y el tiempo de recuperación al frío (*ca.* 0°C) para triatomíneos de importancia vectorial de la enfermedad de Chagas. El enfoque macrofisiológico utilizado concuerda con la Hipótesis de Variabilidad Climática. Observamos un rango de tolerancia térmica mayor para las especies de triatomíneos que se encuentran a mayores latitudes y experimentan temperaturas más bajas. Es decir, las especies que tienen distribuciones que llegan a zonas más australes y experimentan temperaturas más bajas son aquellas que poseen valores más bajos de CT<sub>min</sub> y tiempos de recuperación al frío menores. Las especies subtropicales pueden alcanzar algunas zonas con temperaturas menores a sus CT<sub>min</sub>, en tanto que las especies tropicales estarían limitando su distribución a zonas donde las temperaturas mínimas sean superiores a su CT<sub>min</sub>. La gran importancia de las temperaturas mínimas del mes más fríos que muestran los modelos de distribución de los triatomíneos y los resultados de los análisis fisiológicos en este trabajo nos permite entender con mayor claridad el límite austral y la distribución de estos vectores.

La distribución de los insectos depende de factores bióticos y abióticos entre los cuales la tolerancia al

frío es un factor importante. La temperatura crítica mínima (o el tiempo de recuperación al frío en menor medida) es un parámetro que describe considerablemente la variación latitudinal, la distribución y la exposición ambiental a bajas temperaturas (Andersen et al 2015). Combinar los modelos de distribución de especies con las tolerancias fisiológicas o enfoques mecanísticos permite entender el nicho ecológico de las especies (Warren et al 2010), predecir dónde se producirán temperaturas limitantes en las próximas décadas, y pueden guiar esfuerzos de conservación en poblaciones de diferentes especies (Gerick et al 2014). Además, en el caso de los vectores de enfermedades, entender el alcance latitudinal, conocer el nicho térmico fundamental y los límites fisiológicos de las diferentes especies puede servir para mejorar estrategias y la eficiencia del control vectorial a nivel local y regional.



# Capítulo IV

## *Mecanismos involucrados en las Tolerancias térmicas superiores (Temperaturas Críticas máximas) en triatomínos ¿Pérdida de calor por evaporación?*

### **Introducción**

En ambientes secos y con temperaturas elevadas los organismos que poseen una relación superficie:volumen baja son menos propensos a la evaporación del agua por la superficie, además su tamaño les provee un mayor contenido de agua y una inercia térmica que puede reducir los riesgos por el sobrecalentamiento. Este no es el caso de los insectos y la mayoría de los artrópodos, sin embargo son los grupos más diversos y exitosos en estos ambientes (Gibbs 2002). Los insectos no son receptores pasivos de las variaciones ambientales y muestran desde cambios comportamentales hasta fisiológicos para mantener sus valores de homeostasis (Chown y Nicolson 2004). La termorregulación, en estos organismos generalmente se realiza en forma comportamental (Prange 1996), por ejemplo, *Rhodnius prolixus*, un triatomino modelo clásico del estudio de la fisiología en insectos, realiza una búsqueda activa de temperaturas adecuadas cambiando de ambiente (Schilman y Lazzari 2004, Heger et al 2006). Este y otros triatomínos modulan sus preferencias térmicas en función de sus requerimientos fisiológicos (Lazzari 1991, Schilman y Lazzari 2004, Pires et al 2002, Catalá et al 2015). Además, en ambientes con temperaturas cálidas se han observado respuestas fisiológicas como mecanismos de enfriamiento. Una forma de perder el calor es a través de la evaporación de agua por los espiráculos abiertos durante la respiración, como en saltamontes, o por transpiración a través de la cutícula, como en cigarras, o por excreción con secreciones en las piezas bucales como en abejas (Edney 1977, Prange 1996, Chown y Nicolson 2004). Otra forma de enfriamiento puede ser por medio de las heces, en insectos hematófagos como los mosquitos, este mecanismo se describió como forma enfriamiento por evaporación para evitar el sobrecalentamiento luego de la ingesta de grandes cantidades de sangre mucho más calientes que el ambiente (Lahondère y Lazzari 2012).

El balance hídrico de los insectos está íntimamente ligado a la temperatura, el agua es altamente

conservada y se libera a una tasa relativamente baja en un amplio rango de temperaturas (Gibbs 2002). La transpiración por medio de la cutícula está relacionada al efecto de la temperatura sobre la organización molecular de los lípidos cuticulares y tiene grandes implicancias en el mantenimiento de este balance hídrico (Gibbs y Rajpurohit 2010). Se ha propuesto que un cambio en la conformación de la barrera de lípidos epi-cuticulares, producto de la temperatura, sería responsable de un aumento en la liberación de agua por transpiración (Gibbs 2002). Otro gran aumento en la liberación de agua se produce durante la respiración, el agua contenida en el interior de las tráqueas y traqueolas que se evapora cuando los espiráculos se abren para el intercambio gaseoso. Al ascender la temperatura aumenta la actividad de los insectos y con ello se produce una mayor tasa de liberación de agua por la pérdida a través de los espiráculos (Salin et al 1999). Una situación extrema se da cuando un insecto llega a su temperatura crítica máxima (CT<sub>max</sub>) sin poder escapar a un microhábitat de menor estrés térmico. Ese instante es de gran importancia en el estudio de la ecología de los insectos. Como se observó en el capítulo anterior las temperaturas críticas máximas (CT<sub>max</sub>) y las temperaturas letales superiores son cercanas y determinan el límite térmico superior del nicho fisiológico. Para algunos insectos se han observado respuestas fisiológicas frente al stress térmico o a condiciones extremas como el enfriamiento por evaporación de agua (Toolson 1987; Prange 1996). Se ha propuesto que este mecanismo cumple un rol menor debido a la pequeña cantidad de agua que poseen los insectos, sin embargo es el único medio por el cual pueden reducir la temperatura corporal de la temperatura ambiente. En las cigarras del desierto de sonora (*Diceroprocta apache*) se midió la tasa de liberación de agua y el intercambio gaseoso y se probó que es capaz de reducir al menos cinco grados la temperatura corporal con respecto a la temperatura ambiente (42°C) usando el agua del xilema de las plantas de las que se alimenta para reubicarlo por medio de poros en la superficie del abdomen y el tórax (Hadley 1991). Este aumento en la liberación de agua es el mecanismo responsable del enfriamiento por evaporación que les permite mantenerse activas durante horas de máxima exposición al calor que sus predadores no pueden tolerar (Hadley 1991, Chown y Nicolson 2004). Una elevada liberación de agua también se observó en otros insectos coleópteros, sin embargo, la gran cantidad de agua perdida sería expulsada del sistema traqueal y no estaría relacionada con un cambio en la conformación de la barrera de lípidos epicuticulares (Hadley 1994, Salin et al. 1999). Tal vez, la apertura de los espiráculos esté relacionada con la demanda de oxígeno, como plantea la hipótesis de la tolerancia térmica limitada por el oxígeno (Pörter 2001). Esta plantea, sintéticamente, que frente a un estrés térmico por altas temperaturas, resulta inadecuada la conducción y distribución del O<sub>2</sub> para la demanda de las mitocondrias (Lighton 2007). Lighton (2007) probó para *Drosophila melanogaster* que la concentración de O<sub>2</sub> puede limitar la CT<sub>max</sub>, pero sólo a presiones parciales menores a la mitad de los niveles atmosféricos normales (<10%). Sin embargo, Klok y colaboradores (2004) probaron para *Gonocephalus simplex* (un tenebrionido) que la CT<sub>max</sub> es independiente de la concentración de oxígeno. Esto sugiere que la limitación de la CT<sub>max</sub> sugerida por el O<sub>2</sub> ocurre en algunos artrópodos y bajo determinadas

condiciones (Stevens et al 2010). Por lo tanto, resulta interesante indagar si una característica fisiológica tan importante para la ecología de los organismos, como la CTmax puede ser modulada por enfriamiento por evaporación. En especial en insectos hematófagos como las vinchucas, donde luego de la alimentación el agua no es una limitante, ya que existe en exceso y podría ser utilizada como método de enfriamiento. Sin embargo, cuando el número de hospedadores o fuentes de recursos son insuficientes la regulación del balance hídrico es fundamental para poder permanecer varios días sin alimentarse (Heger et al 2006, Rolandi et al 2014). La hipótesis ecológica aquí detrás se basa en que si una especie es capaz de perder calor por la evaporación de agua que libera, la CTmax dependerá de la capacidad y cantidad del contenido de agua liberado, ya sea por transpiración, evaporación y/o excreción. Para poner a prueba esta hipótesis este capítulo tuvo como objetivo tratar de entender los mecanismos por los cuales se podrían modular los valores de temperaturas críticas máximas (CTmax) y evaluar si es posible un mecanismo de enfriamiento por evaporación a partir de analizar la liberación de agua en la vinchuca *R. prolixus*.

### ***Materiales y Métodos***

El objetivo planteado para este capítulo intenta entender si la CTmax de un insecto puede ser modulada por el contenido y la liberación de agua, ya que este tipo de mecanismo de enfriamiento por evaporación es posible en aquellos insectos que su fuente de alimentación posee una gran cantidad de agua (insectos fitófagos, nectívoros, hematófagos, etc). Al igual que en capítulo anterior se trabajó con el V estadio larval una semana después de su ecdisis y sin alimentar (*para más detalles ver capítulo II, los insectos experimentales*).

Se evaluó las CTmax de individuos de *R. prolixus* bajo dos tratamientos y un control. Por un lado se trataron individuos con distinto grado o estado de hidratación y por otro lado se ocluyó la proboscis de los insectos para evitar que salivaran. El tratamiento “ayuno” consistió en no alimentar los insectos por un lapso de 28 días. *R. prolixus* puede permanecer varias semanas sin alimentarse, Feliciangeli y colaboradores (1980) observaron que para el estadio V, en promedio, *R. prolixus* puede sobrevivir hasta cinco meses sin alimentarse. Sin embargo se observa una reducción significativa en la tasa metabólica y en la tasa de liberación de agua a partir de dos semanas de ayuno luego de una alimentación para machos de esta especie (Rolandi et al 2014). Por lo tanto poner a prueba el CTmax en función del ayuno, nos permite determinar si la cantidad de agua que posee el insecto podría de alguna manera modificar su CTmax. Para el segundo tratamiento se decidió ocluir la proboscis debido a que en ensayos preliminares para determinar la CTmax de los insectos se observó que liberaban saliva a temperaturas elevadas (ver imagen 1 y video 1 en anexo). Por lo tanto el tratamiento de oclusión de la proboscis nos permite evaluar si el insecto por medio de la liberación de saliva puede extender el tiempo y la temperatura a la cual llega a su CTmax. Además, otros ensayos preliminares con una termocámara realizados en colaboración con el Dr. Claudio del Instituto de Investigación sobre la Biología de los Insectos (Institut de Recherche

sur la Biologie de l'Insecte) de la Universidad François Rabelais en Tours, Francia y llevados a cabo por el Dr. José Crespo, mostraron que las gotas de la salivación poseían una temperatura menor que el cuerpo del insecto (ver imagen 2 y video 2 en anexo). Consideramos a estos ensayos preliminares debido a la cantidad de individuos (cinco) y que no se pudo respetar el mismo protocolo utilizado en los ensayos de termotolerancia por respirometría, en particular en relación a la tasa de ascenso de la rampa de temperatura y las condiciones de flujo de humedad del aire (*para mas detalles ver capítulo II, mediciones con respirometría de flujo abierto*). Para los ensayos de oclusión de la proboscis se utilizó como pegamento, luego de distintas pruebas con otros materiales (ver tabla 5 del anexo), el material utilizado en odontología para impresiones dentales (base y catalizador, Cutter dental, Alemania), que tiene un punto de fusión superior a los valores de CTmax y es de rápido secado, lo cual evita problemas para la manipulación de los insectos. El protocolo consistió en tomar suavemente con pinzas cada individuo y extenderle su proboscis para poder aplicar el pegamento evitando que el insecto toque con sus patas el pegamento. Luego de unos minutos el insecto se liberó quedando con la proboscis extendida y cubierta con pegamento.

Para el control, se analizaron las mediciones de la liberación de agua de los mismos individuos donde se determinó la CTmax (capítulo III). La liberación de agua se midió con el sistema de respirometría de flujo abierto que, sintéticamente, consta de una corriente de flujo controlado de aire libre de agua que pasa por una cámara respirométrica donde se encuentra el insecto y posteriormente por un analizador de agua (SSI RH-300); conociendo el flujo de aire y la concentración del vapor de agua, se calcula la tasa de liberación de H<sub>2</sub>O. Este método posee una enorme resolución temporal lo que permite no solo tener promedios de liberación de vapor de agua, sino una medida cuantitativa en tiempo real (*para mas detalles ver capítulo II, mediciones con respirometría de flujo abierto*).

Para los ensayos del tratamiento “ayuno” cada individuo se pesó previo a realizar la medición, en una balanza analítica (Mettler AJ100, precisión de 0,1 mg), y se lo comparó con el peso del grupo control. No se pesaron los individuos del tratamiento de oclusión debido a la presencia del material de sellado, de todos modos fueron insectos tomados al azar del estadio V con una semana postecdisis y sin alimentar.

Se determinó el valor de la temperatura crítica con tres criterios. Como se analizó en el capítulo anterior, se utilizó la suma de la diferencia absoluta (o simplemente el ADS, por “*Absolute Difference Sum*”) para la curva de producción de CO<sub>2</sub> y también para la actividad. A su vez, se realizó la determinación de la CTmax mediante el estudio del ADS de la curva de liberación de agua. Ya que se ha demostrado que este tipo de análisis es de gran utilidad como una medida de la variabilidad en la dinámica del perfil de liberación de CO<sub>2</sub> y de la actividad, se utilizó también para evaluar la determinación del CTmax mediante la curva de liberación de agua. Al igual que con los otros dos parámetros (actividad y CO<sub>2</sub>) para determinar la CTmax más objetivamente, de la curva de los residuos del ADS de la liberación de agua (vs el tiempo) se tomaron 5 segundos antes y 5 segundos después del punto de inflexión y se

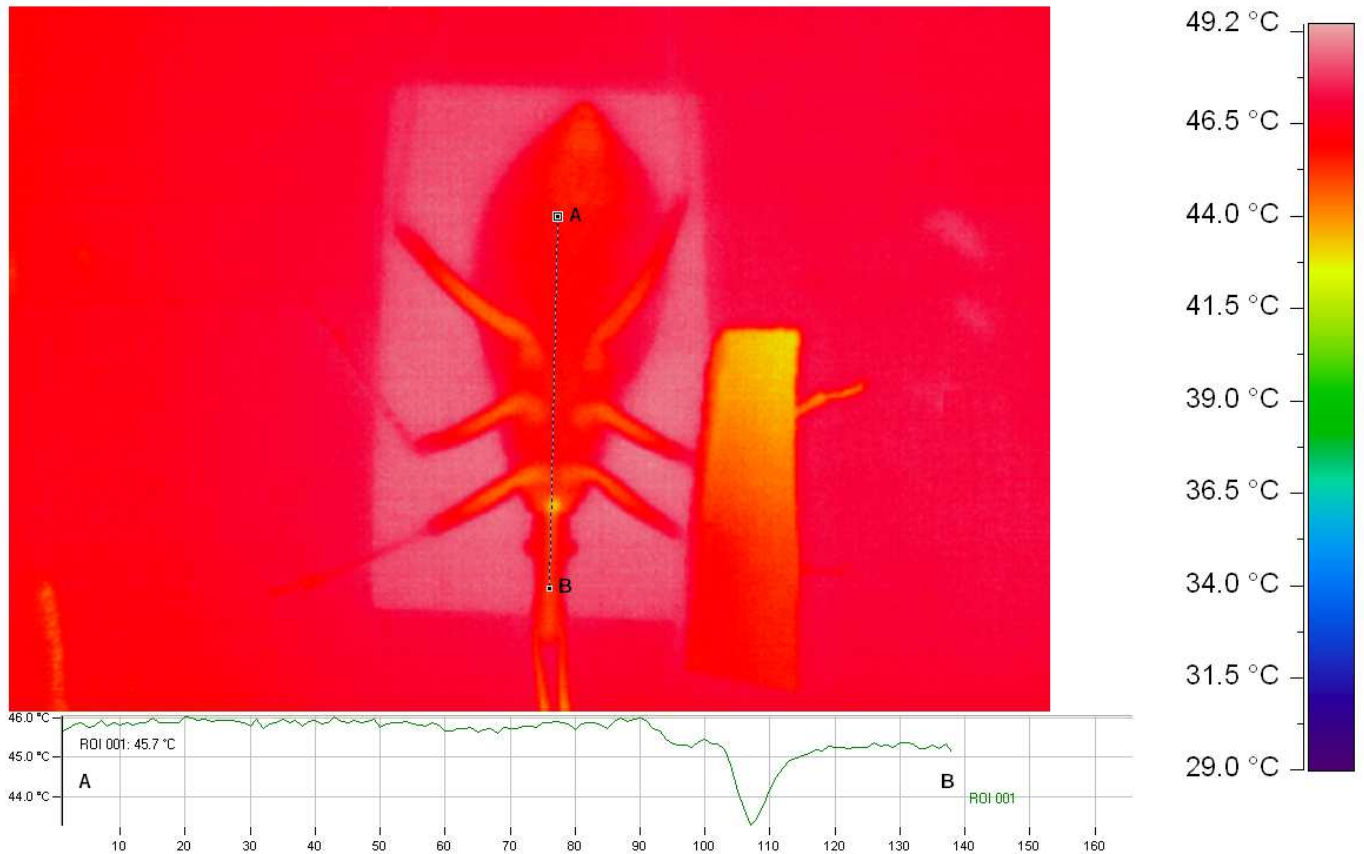
determinó la temperatura media para ese intervalo de tiempo (10 segundos). Este punto de inflexión ayuda a determinar de manera más objetiva el punto de la CTmax respiratoria (Lighton y Turner 2004) por lo que se espera que funcione de igual manera para la determinación en la liberación de agua.

### ***Análisis estadísticos***

Se realizaron análisis de las características de la tasa de liberación y sobre las diferencias entre los valores medios de las TCmax de cada tratamiento bajo los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza inspeccionando gráficamente y con los test de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Cuando no se cumplieron estos supuestos, las variables fueron transformadas o se utilizaron modelos generalizados (GLS) con la función *varIdent* del paquete “nlme” de R (Team R Core 2013) para incluir la heterocedasticidad en el modelo estadístico según las especies. En las tablas se muestran las medias junto al desvío estándar que se compararon mediante la prueba de ANOVA. El error global se corrigió por corrección de Bonferroni (diez variables de análisis para la liberación de agua:  $p < 0,005$ ).



*Imagen 1. Fotografía tomada del video 1 donde se observa la liberación de saliva por la proboscis de un individuo del estadio V de R. prolixus bajo lupa (10x), en tres planos diferentes A, B y C.*



*Imagen 2. Imagen tomada del programa Pyrosoft (DIAS Infrared GmbH, [www.dias-infrared.de](http://www.dias-infrared.de)) donde se observa la etapa final de un ascenso de temperatura para un individuo del estadio V de *R. prolixus*. Se determinó una sección lineal desde el punto A al punto B donde se observa la oscilación de la temperatura. El punto más bajo corresponde a la liberación de saliva por la proboscis.*

## **Resultados**

La curva de liberación de agua mostró una dinámica particular y similar entre los tratamientos, como se observa en la figura 1 existe una abrupta liberación de agua en el momento en el que la tasa de liberación de CO<sub>2</sub> es máxima. Se determinaron dos etapas, una de inicio de la liberación de agua (S1) y otra al finalizar la gran liberación (S2). Las curvas de liberación de agua para el tratamiento “ayuno” y para el control tienen gran similitud (Figura 1A, B, D y E). Sólo en dos individuos del tratamiento de oclusión de la proboscis no se observaron las etapas características del control (Figura 1C). Las etapas analizadas de la curva de liberación de agua se resumen en la Tabla 1. No se encontraron diferencias entre el peso de los insectos ayunados y el control (Tabla 1,  $T_{16,26}=2,74$ ,  $p<0,01$ - error global corregido a  $p<0,005$ ) y tampoco se observaron diferencias significativas para los valores de temperatura de la etapa S1 entre ninguno de los tratamientos (Tabla 1,  $F_{2,33}=1,95$ ,  $p=0,159$ ). Para la tasa de liberación de H<sub>2</sub>O en dicho punto sí existen diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 1,  $F_{2,33}=12,07$ ,  $p<0001$ ) con una mayor tasa observada en el tratamiento de oclusión ( $798,56 \mu\text{g hs}^{-1} \pm 140,04$ ). Para la etapa S2 donde finaliza la gran liberación de agua, la temperatura fue significativamente diferente según los tratamientos

(Tabla 1,  $F_{2,33}=5,39$ ,  $p<0,001$ ). La temperatura de la etapa S2 del tratamiento de oclusión tuvo el valor más bajo ( $46,38^{\circ}\text{C} \pm 0,72$ ). Para la tasa de liberación de agua en ésta etapa se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 1,  $F_{2,33}=11,10$ ,  $p<0,002$ ), además se observó que la mayor tasa de liberación también corresponde al tratamiento de oclusión ( $1482,79 \mu\text{g hs}^{-1} \pm 377,03$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre los tres criterios usados en determinar la CTmax, la liberación de  $\text{CO}_2$ , la actividad y la liberación de agua para cada tratamiento (control:  $F_{2,45}=0,33$ ,  $p=0,72$ ; ayuno:  $F_{2,30}=0,08$ ,  $p=0,91$ ; oclusión:  $F_{2,24}=0,56$ ,  $p=0,57$ ). Se evaluaron las CTmax entre los tratamientos y se encontró que para el criterio usando la curva de liberación de  $\text{CO}_2$  existen diferencias significativas entre los tratamientos en las que el test *a posteriori* muestra diferencias entre los insectos ayunados y los de proboscis ocluida pero no con el control (Tabla 1,  $F_{2,33}=47,9$ ,  $p<0,0001$ ). Además, tanto para la CTmax determinada de la actividad como para la determinación a partir de la curva de liberación de agua se observan diferencias significativas entre los tratamientos. Los tests *a posteriori* muestran que las diferencias existen entre los insectos ayunados y el control (Tabla 1,  $F_{2,33}=6,14$ ,  $p=0,0046$  para la actividad;  $F_{2,33}=7,18$ ,  $p=0,002$  para la liberación de agua). Si bien el contraste entre los insectos ayunados y el control para el análisis del CTmax según la curva de liberación de agua posee un p-valor de 0,009 (mayor al valor ajustado por el método de Bonferroni (0,005)) se decidió tomar este contraste como significativo debido a que el ANOVA establece que existen diferencias significativas entre al menos uno de los contrastes de los tratamientos. En esta decisión se asume que el riesgo de cometer un error de tipo II es menor al de cometer un error de tipo I.

Otro criterio analizado fue el área bajo la curva de liberación de agua entre la etapa S1 y S2, es decir la cantidad de agua liberada. Además, se analizó el área desde S1 hasta la CTmax y el área posterior al CTmax hasta la etapa S2. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control para el área total liberada (desde S1 hasta S2) (Tabla 1,  $F_{2,33}=13,51$ ,  $p=0,0001$ ). La cantidad de agua liberada en la sección desde la etapa S1 hasta la CTmax, mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 1,  $F_{2,33}=13,34$ ,  $p<0,0004$ ). Los individuos del control fueron los insectos que mayor cantidad de agua liberaron para dicha sección ( $366,75 \mu\text{g} \pm 38,68$ ). Sin embargo, para la sección siguiente desde el CTmax hasta la etapa S2, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos pero sí se observó un mayor valor promedio y un desvío muy alto para el tratamiento de oclusión (Tabla 1,  $F_{2,33}=4,18$ ,  $p=0,026$ ).

Para la figura 1D, E y F se tomó la liberación de cada variable de cada tratamiento para mostrar la relación entre la liberación de agua y la liberación de  $\text{CO}_2$ . Como se observa en la figura para los tratamientos control y el ayuno inicialmente hay un relación donde la tasa de liberación de  $\text{CO}_2$  crece aunque manteniéndose una baja tasa de liberación de agua hasta que se llega a la liberación de  $\text{CO}_2$  máxima (ca.  $50 \mu\text{l h}^{-1}$ ) (S1). Continúa incrementándose la liberación de agua hasta aproximadamente los  $1000 \mu\text{g h}^{-1}$  sin un incremento marcado en el  $\text{CO}_2$ . A partir de este punto (S2) se observa una relación más lineal entre las dos variables (Figura 1D y E). Esta relación característica que se observa en el

control y los insectos ayunados, no se observa en los insectos con la proboscis ocluida donde se observa una relación de crecimiento constante pero sin un patrón aparente (Figura 1F).

*Tabla 1. Se muestran las etapas analizadas para la liberación de agua de R. prolixus según los tratamientos de Ayuno (28 días), con oclusión de proboscis y el control. Las letras distintas indican diferencias significativas (p-valor < 0,005). Las siglas S1 y S2 indican las etapas analizadas, ver gráfico 1.*

	Control	Ayunados	Con oclusión
Total de insectos analizados	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>9</b>
masa de los insectos (vivos) (mg)	<b>29.43±</b> 5.48 a	<b>21.93±</b> 7.8 a	- -
<b>Inicio de liberación: etapa S1</b>			
Temperatura (°C)	<b>42.29±</b> 0.54 a	<b>42.85±</b> 0.33 a	<b>42.46±</b> 1.24 a
Tasa de liberación de H <sub>2</sub> O (µg h <sup>-1</sup> )	<b>449.49±</b> 68.68 a	<b>402.15±</b> 72.33 a	<b>798.56±</b> 140.04 b
<b>Fin de liberación: etapa S2</b>			
Temperatura (°C)	<b>46.88±</b> 0.61 ab	<b>47.42±</b> 0.36 a	<b>46.38±</b> 0.72 b
Tasa de liberación de H <sub>2</sub> O (µg h <sup>-1</sup> )	<b>926.09±</b> 81.02 a	<b>865.26±</b> 155.54 a	<b>1482.79±</b> 377.03 b
<b>LÍMITES TÉRMICOS</b>			
CTmax VCO <sub>2</sub> (°C)	<b>45.9±</b> 0.68 a	<b>46.51±</b> 0.34 a	<b>44.97±</b> 0.35 b
CTmax Actividad (°C)	<b>45.81±</b> 0.71 a	<b>46.5±</b> 0.38 b	<b>45.53±</b> 1.46 ab
CTmax VH <sub>2</sub> O (°C)	<b>45.92±</b> 0.72 a	<b>46.56±</b> 0.71 b	<b>45.17±</b> 1.41 ab
Area total (S1 – S2) (µg)	<b>431.43±</b> 43.26 a	<b>321.92±</b> 101.14 b	<b>284.52±</b> 97.68 b
Area previa al CTmax (S1-CTmax) (µg)	<b>366.75±</b> 38.68 a	<b>270.65±</b> 98.96 ab	<b>192.65±</b> 115.69 b
Area posterior al CTmax (CTmax-S2) (µg)	<b>26.71±</b> 8.44 a	<b>18.1±</b> 8.82 a	<b>42.74±</b> 41.35 a



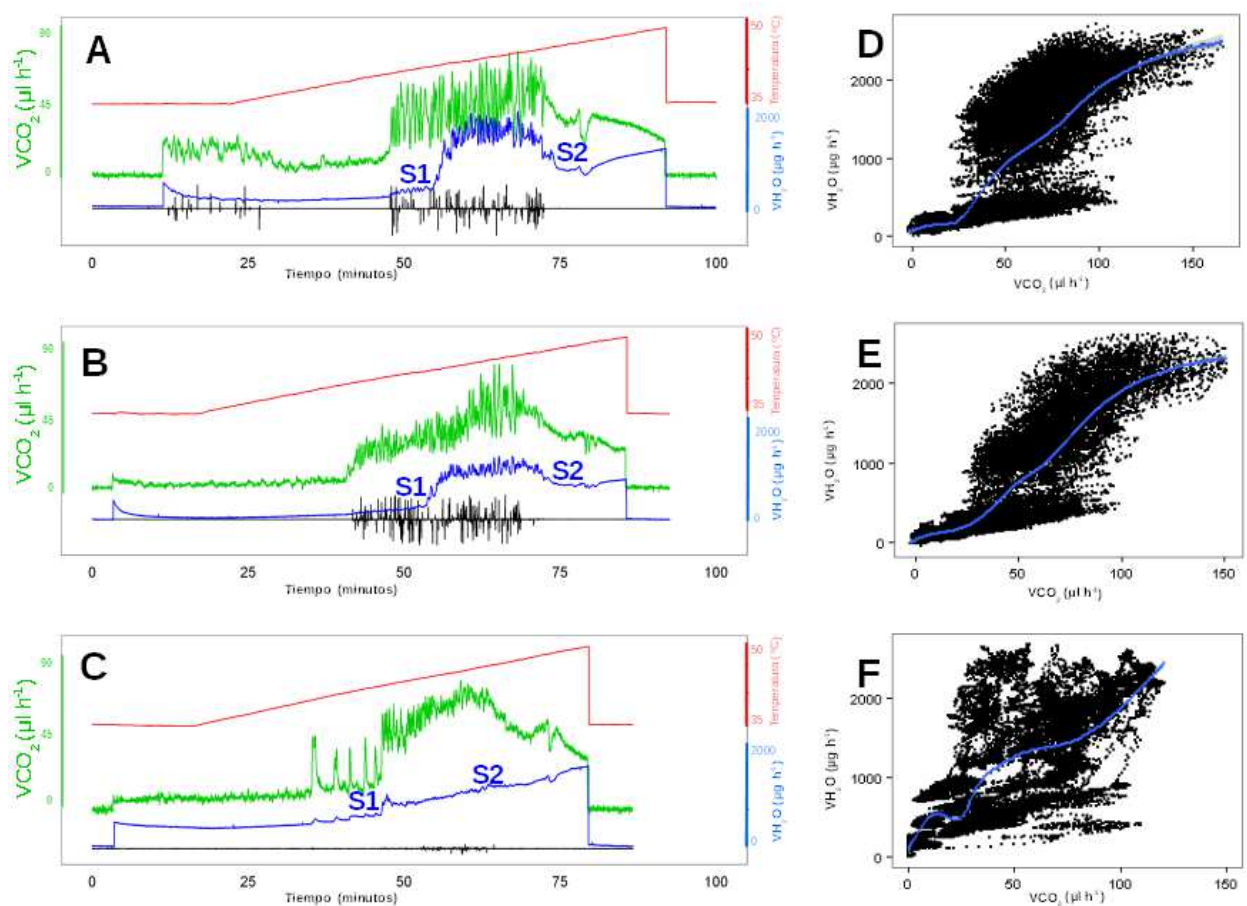


Figura 1. Dinámica de la liberación de agua y su relación con la liberación de  $\text{CO}_2$ . Los gráficos A, B y C muestran la dinámica de la curva de liberación de agua ( $\text{VH}_2\text{O}$ -en trazo azul) junto con la actividad (en trazo negro y sin escala), la temperatura (en trazo rojo) y la liberación de  $\text{CO}_2$  ( $\text{VCO}_2$  en trazo verde) en el tiempo para tres ejemplos de los tratamientos, Control (A), ayuno (28 días) (B) y oclusión de proboscis (C). Los gráficos D, E y F muestran la curva resultante para cada tratamiento (Control (D), ayuno (28 días) (E) y oclusión de proboscis (F)) de la relación de la liberación de agua y de  $\text{CO}_2$ . Los puntos corresponden a los valores de cada variable para cada segundo comprendido entre la temperatura de  $35^\circ\text{C}$  y  $48^\circ\text{C}$  del experimento en todos los insectos de cada tratamiento. En los gráficos A, B y C se muestran las etapas S1 y S2 que muestran la etapa de inicio de la gran liberación de agua y la etapa de finalización de la misma.

## Discusión

Los insectos en general utilizan respuestas comportamentales para evitar temperaturas extremas, sin embargo cuando no pueden escapar a un microhábitat de menor estrés térmico llegan, en el caso de altas temperaturas, a lo que se denomina su Temperatura Crítica máxima (CTmax). Sin embargo, algunos insectos, para los cuales el agua no es una limitante ya que su alimento la posee en exceso, como ejemplo insectos nectívoros, fitófagos o hematófagos, son capaces de liberar agua como mecanismo de

enfriamiento por evaporación para, por ejemplo, mantenerse activos durante las horas de máxima exposición al calor (Hadley 1991, Chown y Nicolson 2004). Entonces, si una especie es capaz de enfriarse por la evaporación del agua que libera, la CTmax podría depender del contenido total de agua liberado. Este capítulo estuvo centrado en tratar de dilucidar los mecanismos fisiológicos subyacentes que explican los valores de temperaturas críticas máximas (CTmax), y en particular evaluar si existe un mecanismo de enfriamiento por evaporación en la vinchuca *R. prolixus*.

En todos los insectos del grupo control y el ayuno, así como en la mayoría de los insectos del tratamiento de oclusión de la proboscis se observa el mismo perfil en la curva de liberación de agua. Esta se inicia con una etapa de estabilidad y liberación relativamente constante hasta los 42 grados centígrados aproximadamente, punto en el cual se inicia la etapa que denominamos S1 donde se produce una liberación abrupta y muy elevada de agua. Esta etapa concluye con la etapa S2 ca. de los 46°C donde esta curva de agua disminuye hasta un pequeño valle que posteriormente vuelve a incrementarse (Tabla 1 y Figura 1A y B). Observando la relación entre las tasas de liberación de agua y CO<sub>2</sub> se puede ver que previo a la etapa S1 se produce un control de la liberación de agua que se detiene y genera una marcada liberación de agua (Figura 1 D y E). Se ha propuesto para una especie de tenebrionido (*Alphitobius diaperinus*) y tres especies de coleópteros (*Gnorimus nobilis*, *Osmoderma eremita* (Trichiinae) y *Cetonischema aeruginosa* (Cetoniinae)) que a medida que se incrementa la temperatura la tasa de pérdida de agua aumenta gradualmente hasta un punto crítico donde se produce un marcado cambio en la curva de liberación de agua total. En dicho punto se observa un incremento elevado de la liberación de agua, asociado a la pérdida de agua respiratoria, que coincide con una gran actividad de los insectos y que finaliza unos grados centígrados después, cuando el vapor de agua del sistema traqueal es expulsado en su totalidad (Salin et al. 1999, Renault et al. 2005). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la curva de liberación de agua mantiene un ascenso relativamente constante y paralelo a la tasa de liberación de CO<sub>2</sub> hasta el inicio de la fase 3 de meseta en la tasa de liberación de CO<sub>2</sub> (*para detalles de la fase 3 ver resultados de los análisis fisiológicos del capítulo III*). En dicho punto se ha producido un incremento exponencial en la liberación de agua. Es decir, existe una excesiva liberación de agua en el momento en el que la tasa de intercambio gaseoso es máxima (Figura 1D y E). Sin embargo, la liberación abrupta del agua y la liberación del CO<sub>2</sub> no irían pareadas, indicando que la excesiva liberación de agua se realiza por una vía diferente a la de los espiráculos. Tampoco sería la vía cuticular, ya que la temperatura crítica (temperatura a la cual se derriten las ceras cuticulares, dejando pasar más agua y aumentando en forma abrupta la permeabilidad cuticular) de *R. prolixus* es igual o mayor a 50°C (Wigglesworth, 1945).

La tasa de liberación de agua para las etapas S1 y S2 no mostró diferencias entre el control y los insectos ayunados pero sí con el tratamiento de oclusión. Como se observa en la Tabla 1 y en las figuras 1D y 1E la tasa de liberación de agua para el control y para el ayuno de 28 días muestran el mismo patrón pero con valores levemente diferentes. Esto pone de manifiesto la gran tolerancia que posee la especie para

los ayunos prolongados como estrategia de supervivencia ya que tampoco se observaron diferencias significativas en el peso del insecto. En la misma especie con la que se trabajó aquí, pero el estadio posterior, se demostró que la tasa de liberación de agua decae con el ayuno. Esta caída se debería a un descenso marcado en la pérdida de agua cuticular en los primeros días luego de una alimentación, posteriormente la tasa de pérdida de agua respiratoria sería la responsable de la disminución con el ayuno (Rolandi et al 2014). Existen reportes de una gran liberación de agua para distintos insectos a partir de la pérdida de agua cuticular según las temperaturas, se mostró una gran liberación de agua sucede a los 46-48°C para *Locusta* (Loverdige 1968) y en temperaturas de 50°C para ninfas de *R. prolixus* (Wigglesworth, 1944). Por su parte los insectos con la proboscis ocluida mostraron una tasa de liberación de agua muy elevada comparada con el control, casi dos veces su valor para la etapa S1 y 1,5 veces para la etapa S2. Esto podría deberse a que la mayoría de los insectos con la proboscis ocluida se encontrarían estresados ya que se encontraban con el pegamento sobre sus piezas bucales. En la figura 1F se observa que los insectos con este tratamiento inician los ensayos con valores de pérdida de agua mayores al control y al tratamiento de insectos ayunados. Se observa que cuando la tasa de liberación de CO<sub>2</sub> se mantiene sobre sus valores máximos, lo que implicaría la total apertura de los espiráculos y por ende la pérdida del control de la liberación de agua, la tasa de liberación de agua continúa creciendo. Para Renault y colaboradores (2005) en sus experimentos observan que la tasa de pérdida de agua se debe en mayor medida a la transpiración por la superficie de los insectos (coleópteros) y el agua contenida en el tracto respiratorio, descartando el aporte de la liberación por excreción. En nuestro trabajo observamos en los ensayos preliminares una liberación de agua por la proboscis en los insectos bajo estrés térmico (imagen 1 y video 1 del anexo). Por lo tanto creemos que también es posible explicar la gran liberación de agua por un aporte de la saliva expulsada de la proboscis.

Por otro lado las CTmax muestran diferencias significativas entre los tratamientos pero con valores muy cercanos y no se observaron las mismas diferencias significativas entre los criterios de determinación (liberación de CO<sub>2</sub>, actividad y liberación de agua). Sin embargo en todos los criterios se observa que el tratamiento de oclusión de la proboscis es el que posee menor valor medio (Tabla 1). Se observa, además, que el área bajo la curva de la liberación de agua entre la etapa S1 y S2 y el tiempo, es decir la cantidad de agua liberada entre dichas etapas, fue menor para el tratamiento de oclusión (aunque con un gran desvío estándar) con diferencias significativas con el control pero no con los insectos ayunados (Tabla 1). Tanto la cantidad total de agua liberada como la cantidad previa o posterior al CTmax y los valores de CTmax no mostraron una relación lineal (S1-S2:  $F_{1,34}=0,07$ ,  $p=0,78$ ; S1-CTmax:  $F_{1,34}=0,23$ ,  $p=0,63$ ; CTmax-S2:  $F_{1,34}=0,001$ ,  $p=0,97$ ). Se ha propuesto que la CTmax sería independiente del tamaño del individuo, el estadio, la masa y el contenido de agua (Vannier 1994, Renault et al 2005). Además las CTmax serían independiente del ayuno o estado de repleción (Salin et al 1999) por lo que serían causadas por sobrecalentamiento y no por deshidratación y estarían relacionadas con una inactivación del sistema nervioso (Cloudsley-Thomson 1962, Renault et al 2005). Sin embargo, teniendo en cuenta

los valores y las curvas de liberación de agua y CO<sub>2</sub> de los insectos ayunados, el tratamiento de proboscis ocluida y el control podrían existir diferencias en las temperaturas críticas relacionadas a la cantidad de agua disponible y la capacidad de liberarla. Si bien no se pudo observar en los tratamientos un cambio muy marcado de las CT<sub>max</sub>, se observó en los ensayos realizados con la termocámara que la liberación de saliva por la proboscis genera una menor temperatura en la zona de liberación comparada con el entorno (imagen 1 y 2 y video 1 y 2 del anexo). Teniendo en cuenta la cercanía de la temperatura letal con la CT<sub>max</sub> (ca. 1°C, capítulo III), si la liberación de agua por la proboscis podría hacer descender la temperatura de la cabeza de la vinchuca, la inactivación del sistema nervioso debido a las altas temperaturas podría ser postergada.

### ***Conclusiones***

En este capítulo se ha intentado entender si los mecanismos que explican los valores de temperaturas críticas máximas (CT<sub>max</sub>) responden a la cantidad de agua basada en el estado de ayuno y a la cantidad de agua liberada en la vinchuca *R. prolixus*. Además se evaluó si es posible un mecanismo de enfriamiento por evaporación. Por un lado se observó que la vinchuca libera saliva durante el stress térmico y que ésta genera en la zona de liberación una menor temperatura que el resto de su cuerpo. Se observó además menores valores de agua liberada total en insectos con la proboscis ocluida y en los insectos ayunados. Sin embargo no se pudo probar que la cantidad de agua liberada pueda generar un cambio de la CT<sub>max</sub>, por lo que el mecanismo responsable de generar un valor de temperatura crítica máxima sería independiente del estado nutricional y la cantidad de agua de los insectos. Esto pone de manifiesto que *R. prolixus* no solo puede soportar gran cantidad de tiempo sin alimentarse si no que además, su tolerancia para las temperaturas críticas máximas no se ve afectada por el grado de ayuno (al menos el ayuno probado de aproximadamente un mes). De todos modos, no se debería descartar totalmente que la liberación de agua por la proboscis esté relacionada con un mecanismo de enfriamiento del sistema nervioso. Por otro lado, los valores de CT<sub>max</sub> según los criterios de la liberación de CO<sub>2</sub>, la actividad y la curva de liberación de agua, mantienen valores similares, con lo que podemos decir que la determinación del CT<sub>max</sub> a partir de la curva de liberación de agua es también un método válido y sencillo.

# Capítulo V

## *Tolerancias de los triatominos a la desecación y su relación con la distribución*

### *Introducción*

La temperatura y la humedad son consideradas los factores abióticos más importantes para la vida debido a su efecto en la fisiología de los organismos. En los insectos la gran superficie corporal en relación a su volumen, provoca que sean altamente susceptibles a la deshidratación (Edney 1977). Estos efectos, en términos evolutivos resultan en adaptaciones que aparentemente reflejan la necesidad ya sea para la conservación del agua o la resistencia a la desecación (Gibbs et al 1997, Gibbs 2003). Por ejemplo, se observó para clinas de *Drosophila melanogaster* que existe una correlación entre la resistencia a la desecación y la humedad de la latitud y de la longitud (Parkash et al 2008). En ambientes áridos, los insectos tienen una economía del agua altamente restrictiva como para permitirle la supervivencia (Zachariassen 1996), con mecanismos fisiológicos para reducir la pérdida de agua reduciendo la permeabilidad cuticular y/o la pérdida de agua por respiración además de poseer un contenido de agua corporal elevado (Hadley 1994, Benoit y Denlinger, 2010). La resistencia a la desecación en un insecto va a depender de la cantidad de agua sea capaz de perder sin tener efectos adversos y la tasa a la cual se pierde agua (Edney 1977, Hadley 1984, Chown y Nicholson 2004). Esta resistencia posee un costo fisiológico que por medio de patrones comportamentales los insectos podrán reducirlo (Chown y Nicholson 2004). Sin embargo, en uno de los pocos trabajos de meta-análisis que considera la relación entre la tasa de liberación de agua y los factores ambientales, se vio que la tasa de pérdida de agua está relacionada positivamente con la precipitación y por ende negativamente con la aridez ambiental (Addo-bediako et al 2001). Este patrón que si bien no ha sido evaluado teniendo en cuenta la relación filogenética es realmente importante debido a que la regulación fisiológica se mantiene presente más allá de la presencia de los patrones comportamentales (Addo-bediako et al 2001). El efecto de la desecación en los insectos influye a lo largo del ciclo de vida, en la elección de refugios, la alimentación y/o en la supervivencia (Tee y Lee 2015). El efecto de la humedad se puede observar

también en una segregación espacial y/o temporal (Pittendrigh 1950, Barrozo et al 2004). Por ejemplo, existe mayor abundancia de mosquitos del género *Anopheles* en la estación lluviosa en comparación con la estación seca (Li et al 2013). Este efecto en la abundancia se ha incorporado en modelos mecanísticos de dinámica poblacional para los mosquitos transmisores de la malaria (Yamana y Eltahir 2013). En los triatomíneos, vectores de la enfermedad de Chagas, una de las parasitemias más importantes del continente (WHO 2002), se han realizado varios estudios en *R. prolixus* y *T. infestans*, por ser los vectores más importantes de la enfermedad y *R. prolixus* además es un modelo en la fisiología de insectos. Se ha evaluado en gradientes de humedad relativa la preferencia de *T. infestans* y se obtuvo que tiene preferencias a humedades cercanas al cero por ciento (Roca y Lazzari 1994). En ensayos con refugios se observó que prefieren humedades relativas cercanas al 20% (Lorenzo y Lazzari 1999). Además, se observó que prefieren una baja humedad durante los períodos de ecdisis, oviposición y una alta tasa de eclosión ocurre tanto en humedades bajas como altas del 75% (Roca y Lazzari 1994). Debido a la baja tasa de pérdida de agua que posee, *R. prolixus* sería una especie adaptada a los ambientes xéricos (Benoit y Denlinger, 2010). Sin embargo, se ha probado que la eclosión de los huevos de esta especie sucede en los momentos del día en que la humedad es máxima (Schilman et al 2009). Este resultado también se ha visto en otras especies de triatomíneos como *Pastrongylus megistus* y *T. vitticeps* con valores bajos de eclosión para humedades bajas (Pires 2002, de Souza et al 2010). En este último trabajo citado, realizado por de Souza y colaboradores (2010), se muestra un enfoque ecofisiológico de su distribución en el que se observa que la eclosión de huevos de *T. vitticeps* aumenta a medida que aumenta la humedad relativa. Además mostraron que su distribución geográfica puede ser explicada principalmente por la precipitación y la precipitación del trimestre más húmedo. Por otro lado, el efecto de la humedad sobre los triatomíneos también se observa en las etapas de control vectorial, ya que se ha sugerido que una mayor humedad relativa favorece al control por entomopatógenos (Luz et al 2004). Se ha propuesto, que estrategias de control en las que se alternen la aplicación de entomopatógenos en la estación húmeda e insecticidas sintéticos en la estación seca o una aplicación combinada podrían promover una reducción eficaz y permanente de vectores triatomíneos del peridomicilio en zonas de América Latina con una marcada estación húmeda (Luz y Fargues 1999, Luz et al 2004). Sin embargo, no todos los ambientes donde se encuentran los triatomíneos poseen una marcada estación de lluvias.

La segregación espacial puede ser observada en la distribución geográfica de los organismos, entre ellos los vectores de enfermedades, por lo que para comprender sus distribuciones por lo general se realiza un modelado de la misma. Se puede modelar la distribución de una especie ya sea utilizando modelos correlativos o enfoques más mecanísticos o una combinación de ambos (como el visto en el capítulo III, o en Martin y Lefevre (1995) para los vectores de malaria). La utilización de la fisiología de una especie y sus límites de tolerancia en los modelos mecanísticos y las correlaciones entre la presencia de la especie y las variables ambientales pueden generar un modelo híbrido con mejores predicciones (Buckley et al

2010). Por lo que para este capítulo se tuvo como objetivo entender las limitantes fisiológicas de los triatomos en relación a la tolerancia a la desecación y sus distribuciones. De esta manera se pretende explorar las posibles relaciones entre la tolerancia a la desecación y la distribución geográfica de siete especies de triatomos con las que se ha trabajado según su relevancia epidemiológica, distribución y relación filogenética. Estos son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. delpontei* y *T. patagonica*. Como se ha expresado anteriormente estas especies tienen distinto grado de relevancia epidemiológica en el continente americano desde el norte de México hasta la Patagonia Argentina con importancia primaria y secundaria. Además, tienen una relación en su filogenia que incluye dos géneros y distintos complejos y clados (*ver capítulo II para información de la elección de las especies*). Se tomó también un enfoque ecofisiológico, es decir se modeló la distribución de especie (SDM, por sus siglas en inglés de “*Species Distribution Model*”) y se relacionó con las resistencias fisiológicas a la deshidratación. Modelamos el nicho ecológico de cada especie utilizando variables climáticas que estén relacionadas con la humedad y se identificó el factor más importante en su distribución. Además, analizamos la relación entre estos factores limitantes más importantes y las resistencias a la deshidratación para caracterizar y evaluar los ambientes en los que se encuentran los triatomos en el continente. Conocer las respuestas fisiológicas a los factores abióticos como la humedad relativa puede favorecer el entendimiento de procesos ecológicos de escala jerárquica mayor y en el caso del control de los vectores de la enfermedad de Chagas puede ayudar a evaluar las prácticas de control vectorial (Lorenzo y Lazzari 1999).

## ***Materiales y Métodos***

### ***Análisis fisiológicos***

Al igual que en capítulo III, para todos los experimentos se utilizaron ninfas del estadio V sin alimentar de las siete especies: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. delpontei* y *T. patagonica*, las cuales habían mudado una semana antes del comienzo de los experimentos. Los insectos fueron criados a 28°C con un fotoperíodo 12:12 luz / oscuridad (con inicio de luz a las 08:00 hs.) (*para más detalles ver capítulo II, los insectos experimentales*). La variación en el contenido de agua de los insectos hematófagos también depende de la capacidad reproductiva del estadio, es decir si son estadios maduros o inmaduros. Los insectos hematófagos como las vinchucas que no ingieren agua por fuera de su dieta, tienen aumento del contenido de agua al ingerir sangre; luego poseen dos etapas de diuresis, con una pérdida de agua rápida y otra más lenta. A partir de este último punto los estadios inmaduros poseen un mayor contenido de agua neto (Benoit y Denlinger 2010). Por lo tanto, utilizando insectos sin alimentar con una semana post-ecdysis, consideramos que se trabajó sobre una etapa estable de la dinámica de la cantidad de agua de estos insectos hematófagos.

Se determinó en forma gravimétrica el contenido de agua total y crítico, la tasa de pérdida de agua

(WLR por “*Water-Loss Rate*”) equivalente a la pérdida por cutícula más la pérdida por respiración, el tiempo de supervivencia y se calculó la permeabilidad cuticular para las siete especies de triatominos. Para determinar el contenido de agua total y crítico de cada especie se utilizó un protocolo similar al utilizado en Schilman et al (2007). Se generó un sistema de circulación de aire (ca. 50 ml/min) en el que se hizo pasar una flujo de aire a través de tubos conteniendo Drierite para deshidratarlo hasta entrar a una cámara experimental y luego salir de la misma por el extremo opuesto. Se logró generar humedad relativa baja en interior de la cámara de deshidratación (valores menores al 15%). La cámara de deshidratación se introdujo en una cámara de temperatura controlada a 35°C. Cada individuo se pesó en una balanza analítica de precisión 0,1 mg (Mettler AJ100) previamente a ser introducido en recipientes experimentales de 5 cm de alto por 2,5 cm de diámetro con un extremo tapado con una malla plástica y con la base perforada para permitir la circulación de aire. Cada recipiente experimental fue introducido en la cámara de deshidratación donde se hizo circular el aire por extremos opuestos. Se revisaron diariamente los individuos y se determinó como “crítico” a los individuos que permanecían inmóviles y eran incapaces de responder a perturbaciones mecánicas o incapaces de darse vuelta al invertir los recipientes experimentales. Este estado “crítico” incluyó a individuos que se encontraban moribundos o recientemente muertos. Se tomó la masa de cada individuo vivo (pesados previamente a ser ubicados en los recipientes), luego como “crítico” y la masa seca luego de estar muertos en una cámara de secado a 60°C entre tres y cinco días y llegar a peso constante. Se calculó la pérdida de masa (en mg) restando el peso vivo (en mg) del peso “crítico” (en mg). Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular el contenido total y crítico de agua como un porcentaje del individuo vivo.

$$CTA (\%) = ((Mv - Ms) \times 100) / Mv$$

donde CTA (%) es el contenido total de agua expresado como un porcentaje de la masa corporal del insecto vivo, Mv es la masa del insecto vivo (en mg) y Ms es la masa seca (en mg).

$$CCA (\%) = ((Mc - Ms) \times 100) / Mv$$

donde CCA (%) es el contenido de agua crítico expresado como un porcentaje de la masa corporal de insecto vivo, Mc es la masa del insecto al llegar al estado crítico (en mg) y Ms es la masa seca (en mg).

La Permeabilidad cuticular (PC) se calculó dividiendo la WLR (en mg h<sup>-1</sup>) por la superficie estimada de especie de cada triatomino (en cm<sup>2</sup>) y el déficit de saturación de presión de agua, que corresponde a un valor de 42,18 Torr (1 Torr aprox. 133 Pa) para 35°C y 0% de humedad relativa (RH del inglés “*relative humidity*”). La WLR se midió de dos maneras, primero a partir de los registros de respirometría del capítulo III, se tomó la tasa de liberación de agua de los primeros 15 minutos donde la temperatura se encontraba a 35°C y ca. 0% de RH (ver capítulo II, mediciones con respirometría de flujo abierto). En segundo lugar se midió la WLR en forma gravimétrica, es decir, a partir de la resta aritmética de la masa del insecto en el estado crítico a la masa viva, dividido el tiempo que tardó el ensayo (WLR=Mv-Mc / tiempo del ensayo). Por otra lado la superficie de cada triatomino se estimó utilizando una ecuación



propuesta para *R. prolixus* (Rolandi et al 2014).

$$S=146,36 + 3,01 \times 10^{-3} \times Mv^2$$

donde S es la superficie del triatomo en  $\text{cm}^2$ , y Mv es la masa del insecto vivo (mg).

Las unidades finales de la PC quedaron expresadas en  $\mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{Torr}^{-1}$ . Además se midió el tiempo de tolerancia crítico considerado el tiempo en días que tardan las distintas especies bajo esas condiciones de humedad y temperatura hasta llegar al estado “crítico” (TCT).

### **Análisis Geográfico**

Se modeló la distribución geográfica de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. delpontei* y *T. patagonica* utilizando los mismos puntos de presencia de triatominos que en el capítulo III (ver capítulo II, puntos de presencia de triatominos y capítulo III sobre los puntos de presencia de cada especie). Se seleccionaron las variables bioclimáticas relacionadas con la temperatura y la precipitación en 10 arco-minutos de resolución ( $\sim 344\text{km}^2$ ) disponible en WorldClim (www.worldclim.org, Hijmans et al 2005) y además se crearon variables de déficit de presión de vapor a partir de variables de humedad relativa tomadas de Climond (www.climond.org, Kriticos et al 2012) bajo la misma resolución y con escala temporal centrada en 1975 (entre 1950-2000 para las variables de Worldclim y entre 1961-1990 para las de Climond). A partir de las variables de humedad relativa (RH (%)) se determinaron los valores de presión de vapor de saturación ( $e_s$  en hPa) y la presión de vapor actual o real ( $e_a$  en hPa) con los cuales se puede determinar el déficit de presión de vapor (dpv). El dpv se define como la diferencia entre la presión de vapor saturado ( $e_s$ ) y la presión de vapor real ( $e_a$ ) a una temperatura determinada, es decir la cantidad de vapor de agua que falta en el ambiente para que el aire saturate. Se utilizaron las fórmulas de Mitchell et al (2004) modificadas para la generación de las variables a partir de los valores de temperatura máxima (Tmax):

$$\text{RH (\%)} = e_a \times 100 / e_s$$
$$e_s = 6,107 \exp^{((17,38 \times \text{Tmax})/239 + \text{Tmax})}$$
$$\text{dpv} = e_s - e_a$$

Debido a que las variables de Climond están separadas en humedad relativa a las 9:00 y 15:00 horas se tomó el promedio de cada mes entre estos dos valores. Con dichas fórmulas se crearon las siguientes variables:

BIO 20 = Déficit de presión de vapor máximo (en Torr)

BIO 21 = Déficit de presión de vapor mínimo (en Torr)

Las variables ambientales utilizadas para modelar el nicho ecológico de las especies e identificar los factores limitantes de la distribución finalmente fueron las 19 variables bioclimáticas (más la altitud) definidas por WorldClim y las 3 variables de humedad relativa además de las creadas:

BIO 1 = Temperatura media anual  
 BIO 2 = Rango diurno medio (Media mensual \* (temp. máx. - temp mín.))  
 BIO 3 = Isotermalidad (BIO2 / BIO7) (\* 100)  
 BIO 4 = Temperatura Estacional (desviación estándar \* 100)  
 BIO 5 = Temperatura Máxima del mes más cálido  
 BIO 6 = Temperatura Mínima del mes más frío  
 BIO 7 = Rango Anual de Temperatura (BIO5-BIO6)  
 BIO 8 = Temperatura Media del trimestre más húmedo  
 BIO 9 = Temperatura Media del trimestre más seco  
 BIO 10 = Temperatura Media del trimestre más cálido  
 BIO 11 = Temperatura Media del trimestre más frío  
 BIO 12 = Precipitación anual  
 BIO 13 = Precipitación del mes más húmedo  
 BIO 14 = Precipitación del mes más seco  
 BIO 15 = Precipitación Estacional (coeficiente de variación)  
 BIO 16 = Precipitación del trimestre más húmedo  
 BIO 17 = Precipitación del trimestre más seco  
 BIO 18 = Precipitación del trimestre más cálido  
 BIO 19 = Precipitación del trimestre más frío  
 BIO 20 = Déficit de presión de vapor máximo (en Torr)  
 BIO 21 = Déficit de presión de vapor mínimo (en Torr)  
 BIO 22 = Humedad relativa media anual  
 BIO 23 = Humedad relativa del mes más seco  
 BIO 24 = Humedad relativa del mes más húmedo

Al igual que en el capítulo III para evitar colinealidad y multicolinealidad entre las variables, se realizó un análisis de correlación (matriz de Pearson con  $r < 0,7$ ) y un análisis de Inflación de la Varianza (VIF por sus siglas en inglés “*Variance Inflation Factor*”), pero con referencia a nuestras dos nuevas variables BIO 20 y BIO 21 (ver metodología del capítulo III sobre correlación y Factor de Inflación de la Varianza). Con el grupo de variables de resultantes se realizó el SDM (del inglés “*Species Distribution Model*”) en el programa MaxEnt. Este programa utiliza un método de modelado que no requiere puntos de “ausencias” si no que puede generar probabilidades de hábitat propicios para el establecimiento de una especie solamente con puntos de presencia (Graham y Hijmans 2006, Phillips et al. 2006). Se utilizó la configuración default de los argumentos de la función *maxent* del paquete “*dismo*” en el software R (Hijmans y Elith 2013). También se realizaron los análisis correspondientes para determinar los factores limitantes para la distribución geográfica de las especies dentro de MaxEnt a partir de los métodos de

Elith y colaboradores (2010) y Hill y colaboradores (2012). Este método genera un mapa donde en cada celda de resolución (cada pixel) se reemplaza cada variable predictora por su valor medio en los sitios de presencia, si un cambio resulta en una mayor probabilidad de hábitat propicios para el establecimiento de la especie, por lo tanto, la variable cambiada es considerada como un factor limitante (ver Elith et al. 2010 y Hill et al. 2012 para más detalles).

Como en el capítulo III, el modelo final de cada especie se corrió con validación cruzada de 10 iteraciones y el resultado de las predicciones fueron evaluados por el valor promedio de AUC (área bajo la curva de la Característica Operativa del Receptor -ROC-). El AUC varía entre 0 a 1, donde un valor de 0,5 no es mejor que al azar y 1 indicaría que el modelo tiene perfecta capacidad para identificar las presencias frente a las ausencias. Las predicciones finales de MaxEnt se visualizaron y mapearon con el programa Quantum GIS 2.0 ([www.qgis.org](http://www.qgis.org)).

### ***Macrofisiología***

La obtención de las variables BIO 20 y BIO 21 (relacionadas al “vpd”) nos permiten evaluar la distribución de cada especie en términos de la permeabilidad cuticular y el tiempo crítico de tolerancia. La hipótesis ecológica de fondo aquí es que las especies que poseen un mayor porcentaje de contenido de agua crítico y permeabilidad cuticular tienen una distribución limitada por ambientes con valores elevados de déficit de presión de vapor (por ejemplo, secos y calurosos). Es decir, sólo las especies que tienen mayor resistencia a la desecación (tasas de pérdida de agua bajas) y una mayor tolerancia a la desecación (porcentajes de contenidos críticos de agua menores) podrán habitar zonas donde el déficit de presión de vapor sea alto. Se seleccionaron las variables BIO 20 y BIO 21 para comparar y evaluar los análisis fisiológicos. De manera similar al capítulo III se tomó un área donde la probabilidad de presencia de cada especie supere el valor crítico de cada modelo de distribución. Para ello se tomó un área con los valores de probabilidad de presencia mayores a un valor crítico determinado por el valor de probabilidad máximo de la suma de sensibilidad (porcentaje de verdaderos positivos) y especificidad (porcentaje de verdaderos negativos) (Svenning et al 2008) (*i.e.*, probabilidad de presencia > 0,35). Se tomaron los valores de las BIO 20 y BIO 21 para 1000 coordenadas al azar en dicha área y se relacionaron con el tiempo hasta llegar al estado crítico.

Puesto que las biovariables BIO 20 y BIO 21 tienen sus unidades en Torr y el TCT en días, se realizó el siguiente procedimiento y manejo de variables con el paquete “raster” del software R (Team R Core 2013):

$$\begin{aligned}WLR_{ij} &= dpv_{ij} \times PC_s \times S_s \\TCT_{ij} &= (Mv_s - Mc_s) / WLR_{ij}\end{aligned}$$

A partir de la fórmula de permeabilidad cuticular, primero se obtuvo un valor de “tasa de pérdida de agua” de cada celda  $ij$  ( $WLR_{ij}$ ) en el que la biovariable ( $dpv_{ij}$ ) se multiplicó por el área ( $S$ ) y la

permeabilidad cuticular (PC) de la especie (s). Luego se determinó el tiempo crítico de cada celda  $_{ij}$  a partir de la pérdida de agua de la especie s (peso vivo ( $Mv_s$ ) – peso “crítico” ( $Mc_s$ )) dividido la tasa de pérdida de agua de la celda  $_{ij}$  ( $WLR_{ij}$ ). Este valor de  $TCT_{ij}$  nos determina zonas relativas a cada especie con distintos tiempos hasta llegar al peso “crítico”. Según la hipótesis ecológica de esta sección, para dos especies que tienen un mismo peso crítico se espera que los valores del TCT teórico en la distribución de la especie sean bajos si las especies habitan zonas donde el déficit de presión es alto y TCT altos si habitan zonas más frías y húmedas.

También se determinó si existe un patrón geográfico (latitudinal o longitudinal) para los parámetros relacionados a la desecación (WLR, PC y el CCA). A su vez se realizó una regresión entre las variables de tolerancia y los gradientes ambientales relacionados a la humedad del ambiente, RH y déficit de presión de vapor. Estas regresiones tanto ecológicas como geográficas nos permiten un aporte novedoso a los patrones macroecológicos y también sirven para entender cómo son las distribuciones y los límites de los vectores en el continente, así como su relación con el ambiente.

### ***Análisis estadísticos***

Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se tomaron para todos los análisis y se inspeccionaron gráficamente y con los test de Shapiro-Wilk y Levene. Cuando no se cumplieron los supuestos se utilizaron modelos generalizados (GLS) con la función *varIdent* del paquete “nlme” de R (Team R Core 2013), para incluir la heterocedasticidad en el modelo estadístico. En las tablas se muestran las medias junto al desvío estándar que se compararon mediante la prueba de ANOVA. El error global se corrigió por corrección de Bonferroni (siete variables de análisis:  $p < 0,007$ ). Al igual que en capítulo III, debido a que las comparaciones inter-específicas implican tener en cuenta la relación filogenética de las especies (Felsenstein 1985), se evaluó la relación entre las tolerancias fisiológicas y el gradiente geográfico o ecológico con dos tipos de análisis. Se realizó un análisis (no realista) que asume una filogenia de tipo “estrella” donde todas las especies divergen al mismo tiempo y otro análisis que incluyó la relación filogenética de las especies utilizadas. Para ello se realizaron contrastes filogenéticamente independientes (PIC por su siglas en inglés “*Phylogenetically Independent Contrasts*”) usando la topología del árbol filogenético y la longitud de sus ramas (*ver Capítulo II, elección de las especies*).

## ***Resultados***

### ***Análisis fisiológicos***

Los individuos se pesaron previo al inicio de los experimentos y esta masa del insecto vivo mostró diferencias significativas entre las especies ( $F_{6, 140} = 148,09$ ;  $p < 0,0001$ , Tabla 1). En el contenido total de agua (CTA), también se encontraron diferencias significativas entre las especies ( $F_{6, 140} = 13,81$ ;  $p < 0,0001$ ), el análisis *a posteriori* muestra que no existen diferencias entre *R. prolixus*, *T. infestans* y *T. delpontei* y entre *T. dimidiata*, *T. sordida* y *T. vitticeps* (Tabla 1). Sin embargo para el contenido de agua

crítico (CCA), si bien se observan diferencias significativas entre las especies ( $F_{6, 140} = 16,84$ ;  $p < 0,0001$ ), el test *a posteriori* muestra que sólo *T. dimidiata* posee un CCA significativamente mayor que las demás especies con un valor levemente menor al 50% (Tabla 1), lo que se ve reflejado en su menor tiempo en llegar al estado moribundo o crítico (Tabla 1). Por su parte, en las WLR medidas por respirometría de flujo abierto también se observaron diferencias significativas entre las especies ( $F_{6,89} = 65,06$ ;  $p < 0,0001$ ) y el test *a posteriori* arrojó que *T. vitticeps* y *T. dimidiata* se diferencian significativamente del resto pero no entre sí y poseen las tasas de pérdida de agua más elevadas (ca. 0,4 - 0,5  $\text{mg h}^{-1}$ , a 35°C y 0% RH; figura 1). Al considerar la WLR medida de manera gravimétrica, es decir la cantidad de agua perdida dividida el tiempo en que duró el experimento para cada individuo, observamos valores menores pero con tendencias similares ( $F_{6,140} = 40,80$ ,  $p < 0,0001$ ) (figura 1).

Al analizar la permeabilidad cuticular de los insectos calculada a partir de los datos de WLR medidos por respirometría de flujo abierto encontramos que existe la misma relación que en el análisis de WLR. Es decir, existen diferencias significativas entre las especies a excepción de *T. vitticeps* y *T. dimidiata* ( $F_{6,140} = 10409,3$ ;  $p < 0,0001$ ) que no se diferencian estadísticamente entre sí. A pesar que existen diferencias en la masa de las especies, la permeabilidad cuticular tiene valores parecidos entre los triatomos estudiados. Sin embargo, el tiempo crítico de tolerancia es distinto entre las especies, se observó que el tiempo de tolerancia hasta llegar al estado crítico fue significativamente menor en *T. dimidiata* ( $F_{6,140} = 58,55$ ;  $p < 0,0001$ ; Tabla 1).

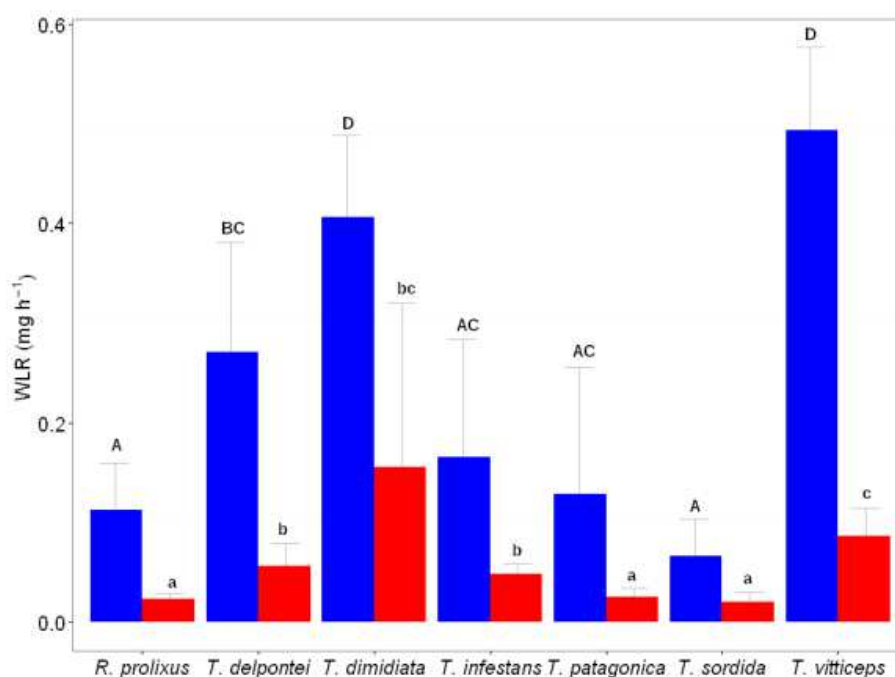


Figura 1. Se muestran las tasas de liberación de agua (WLR) determinadas por dos metodologías. En barras azules se muestra la WLR medida por respirometría de flujo abierto (35°C, ca. 0% RH, 100 ml/min de flujo de aire) y en rojo las WLR medidas gravimétricamente (35°C, ca. 15% RH).

Tabla 1. Se muestran las medidas de resumen de los análisis fisiológicos en relación a la pérdida de agua y tolerancia a la desecación: porcentaje del contenido total de agua (CTA), porcentaje del contenido crítico de agua (CCA), tiempo crítico de tolerancia (TCT) y permeabilidad cuticular (PC).

	<i>R. pro.</i>	<i>T. vit.</i>	<i>T. del.</i>	<i>T. dim.</i>	<i>T. pat.</i>	<i>T. sor.</i>	<i>T. inf.</i>
Masa vivo (mg)	26,48 ± 6,04 a	149,18 ± 36,59 c	101,19 ± 17,42 b	126,37 ± 28,40 bc	42,51 ± 9,64 e	28,04 ± 7,73 a	77,41 ± 15,63 d
Masa crítica (mg)	12,82 ± 3,58	87,73 ± 25,23	53,69 ± 9,59	100,34 ± 21,81	20,78 ± 5,79	16,37 ± 7,71	41,55 ± 10,42
Masa seca (mg)	6,4 ± 1,5	47,43 ± 16,39	24,49 ± 5,54	42,04 ± 13,72	12,3 ± 3,16	8,65 ± 2,79	18,87 ± 6,04
CTA (%)	75,62 ± 3,64 a	68,72 ± 5,69 b	75,84 ± 3,11 a	67,26 ± 5,73 b	70,94 ± 5,10 ab	69,15 ± 3,78 b	76,01 ± 3,76 a
CCA (%)	24,58 ± 9,51 a	27,99 ± 9,78 a	29,33 ± 8,03 a	47,15 ± 7,27 b	20,73 ± 11,94 a	26,41 ± 9,28 a	29,92 ± 7,18 a
TCT (días)	25,18 ± 8,55 a	31,71 ± 14,02 ab	38,62 ± 12,84 b	8,65 ± 3,34 c	37,19 ± 14,68 ab	25,37 ± 7,35 ad	31,31 ± 7,14 bd
PC (µg h <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> Torr <sup>-1</sup> )	1,80 ± 0,01 b	5,50 ± 0,80 a	3,61 ± 0,22 c	4,95 ± 0,53 a	2,00 ± 0,03 e	1,06 ± 0,01 f	2,39 ± 0,10 d

Letras distintas muestran diferencias significativas bajo corrección de Bonferroni ( $p < 0,007$ ). Se muestran los valores medios y el desvío estándar.

### Análisis Geográficos

La primera etapa del análisis geográfico de la distribución consistió en la extracción de las variables que tengan un alto grado de correlación ( $r < 0,7$ ) y valores para el factor de inflación de la varianza (VIF) superiores a 10. En dicho proceso los modelos de las especies *T. sordida*, *T. delpontei*, *T. dimidiata* y *T. patagonica* mostraron una única variable con VIF superior a 10, pero que una vez excluida todas las variables mostraron valores de VIF menores a 10. El resultado del efecto de cada variable que finalmente se utilizó sobre el modelo final se muestra en la Tabla 3, junto a la contribución relativa y el

valor de AUC promedio de cada modelo.

Tabla 3.- Variables bioclimáticas utilizadas para realizar los modelos de distribución para cada una de las especies y sus contribuciones relativas.

<b>Variables</b>	<i>R. prolixus</i>	<i>T. vitticeps</i>	<i>T. delpontei</i>	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. patagonica</i>	<i>T. sordida</i>	<i>T. infestans</i>
<b>BIO 3</b>	3,5	8,0	62,8	-	64,3	7,6	14,3
<b>BIO 6</b>	10,4	30,6	3,8	14,6	11,0	27,8	48,2
<b>BIO 7</b>	72,7	-	-	30,0	-	-	-
<b>BIO 12</b>	7,9	19,2	-	8,3	-	-	-
<b>BIO 15</b>	1,4	24,3	-	12,3	0,3	3,2	-
<b>BIO 16</b>	-	-	-	-	-	13,3	16,0
<b>BIO 17</b>	-	-	-	-	6,8	-	1,3
<b>BIO 18</b>	-	-	-	12,7	-	8,6	-
<b>BIO 19</b>	-	-	-	-	-	5,6	-
<b>BIO 20</b>	1,9	16,2	28,3	5,7	11,2	17,0	6,9
<b>BIO 21</b>	2,2	1,8	5,0	16,4	5,9	17,1	13,4
<b>AUC</b> (media±DS)	0,820±0,02	0,954±0,02	0,828±0,05	0,812±0,02	0,951±0,01	0,844±0,02	0,982±0,007

AUC= Área bajo la curva Característica Operativa del Receptor (ROC).

Una de las variables que más contribuye a los modelos distribución de las especies fue la Bio 6, la temperatura mínima del mes más frío y la Bio 3, la isothermalidad, una cuantificación de la oscilación de la temperatura día-noche en comparación con la oscilación de verano-invierno. Un valor de 100 representaría un sitio donde la oscilación de temperatura diurna es igual a la a la oscilación de la temperatura media anual, es decir a su rango (Bio 7). Por ejemplo, las zonas tropicales tendrán una relación más estrecha entre el rango diurno y el rango anual. La Bio 7 (rango anual de temperatura) fue otra variable importante para los modelos. En particular, la Bio 6 fue la variable que más aportó a los modelos de *T. vitticeps*, *T. sordida* y *T. infestans*; la Bio 3 fue para los modelos de *T. delpontei* y *T. patagonica* en tanto que la Bio 7 fue la que más contribuyó a los modelos de *T. dimidiata* y *R. prolixus*. En *T. delpontei* se observó un aporte importante (ca. 30%) de la variable del déficit de presión de vapor máxima (Bio 20) y para *T. sordida* y *T. vitticeps* se observó valores cercanos al 17% para la misma variable. En tanto que el aporte del déficit de presión de vapor mínima (Bio 21) se observó en los

modelos de distribución de *T. dimidiata*, *T. sordida* y *T. infestans* con valores cercanos al 17% y 13%. Los análisis de importancia relativa por permutaciones (tabla 7 del anexo) y el análisis de jackknife para las variables sobre el AUC del modelo (figuras 7. 1-7 del anexo) muestran que las variables de déficit de presión de vapor máxima y mínima poseen efecto sobre los modelos de *T. vitticeps*, *T. dimidiata*, *T. sordida* y *T. patagonica* pero no de manera marcada en las restantes especies analizadas. Los mapas resultantes de los modelos de distribución de las especies se muestran en la figura 2 (2A). Como se puede observar en los mapas y al igual que en los resultados del capítulo III existen zonas con características ambientales propicias para que se establezca más de una especie. Se observa que las especies *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *T. vitticeps* y *T. sordida* comparten requerimientos de nicho ecológico. Por su parte *T. patagonica*, *T. delpontei*, *T. infestans* y *T. sordida* también comparten zonas con características ambientales para su establecimiento. Estos dos grupos comparten bastas regiones incluyendo a más de un país en su rango. Sin embargo, también se observan zonas inapropiadas para el desarrollo de las especies de triatominos analizados, como gran parte de la cordillera de los Andes y el centro de Brasil. Una vez modelada la distribución de las especies el siguiente análisis fue determinar la variable limitante de la distribución espacial, es decir el factor con principal influencia en las zonas donde la probabilidad de presencia es baja (figura 2B). Por ejemplo, por un lado en *R. prolixus* se observa que la variable Bio 7 tiene un efecto muy importante limitando la distribución hacia el sur en tanto que en *T. dimidiata* también se observa un efecto de la Bio 21 además de la Bio 7 para su extremo austral. Para *T. vitticeps*, *T. delpontei*, *T. infestans* y *T. patagonica* la Bio 20 se muestra como una variable que limita o enmarca parte de la distribución sobre todo hacia el oeste y el sur de sus distribuciones. También se observa que la Bio 6 tiene un efecto limitante tanto en estas especies como en *T. sordida*.



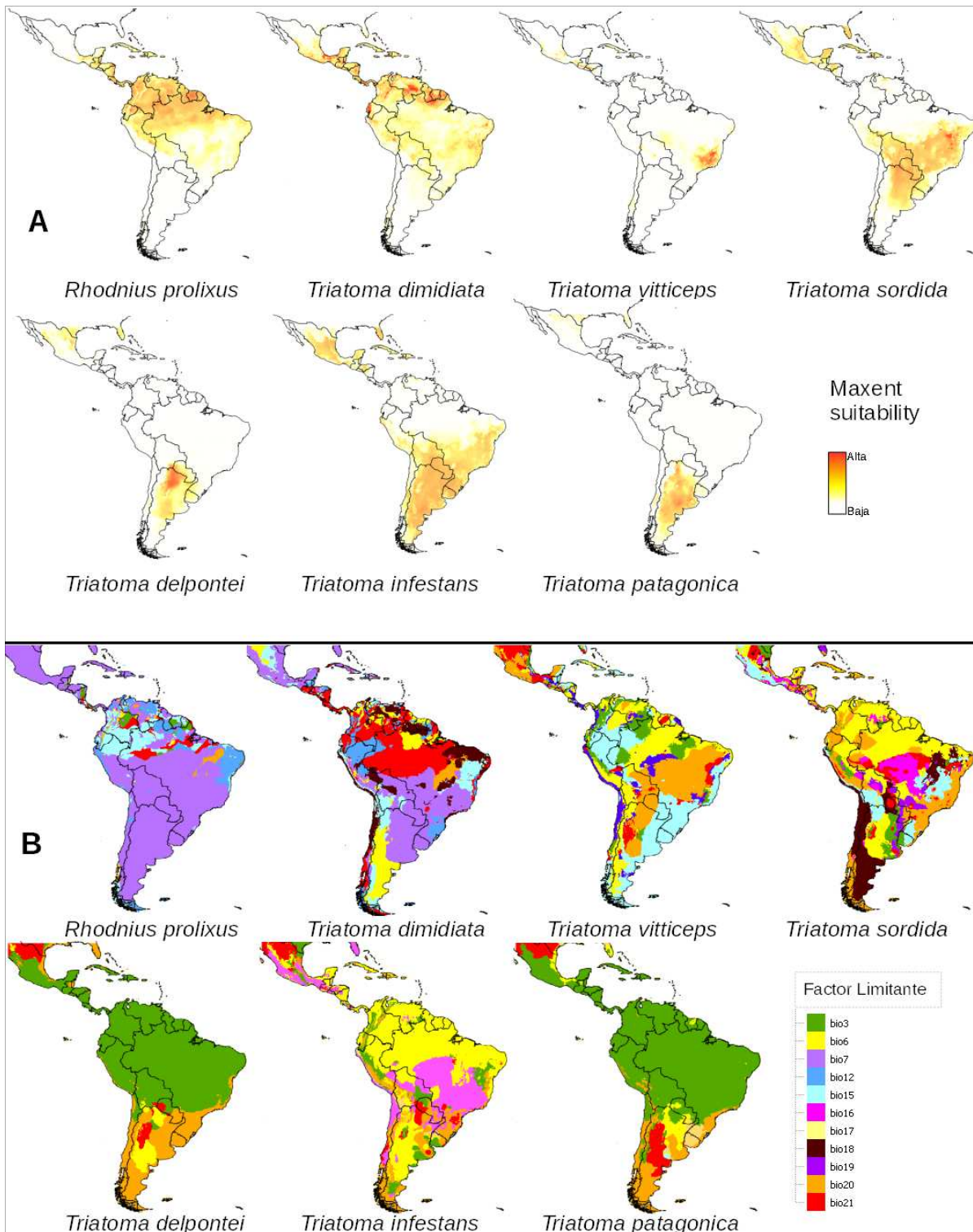


Figura 2.- Índice de condiciones ambientales propicias para la distribución de siete especies de triatominos y mapas de variables ambientales limitantes para la distribución. En la figura A se muestran los mapas resultantes del modelado de la distribución para las siete especies de triatominos con maxent y el índice de condiciones ambientales propicias (o simplemente “Maxent suitability”). En la figura B se muestran los factores limitantes de la distribución para las especies en cada pixel del mapa.

### ***Macrofisiología***

En la figura 3 se muestra el tiempo crítico de tolerancia teórico para 1000 puntos al azar sobre la extensión del mapa. Como se explicó en la sección de materiales y métodos este mapa fue construido a partir del contenido de agua crítico, de la permeabilidad cuticular de cada especie y el déficit de presión de vapor máximo y mínimo del ambiente (Bio 20 y Bio 21). Se generó un valor de tasa de pérdida de agua teórica para cada punto del mapa, a partir de allí se determinó el tiempo hasta llegar al estado crítico en cada especie. La permeabilidad cuticular de la especie y el déficit de presión de vapor de cada celda del mapa, generarán una tasa de pérdida de agua que haga que el tiempo crítico de tolerancia sea menor donde hay mayor déficit de presión de vapor y un tiempo mayor cuando el déficit es menor. Además, cada punto de la figura 3 se encuentra coloreado según la probabilidad de presencia de cada especie. También se encuentra graficada la elipse de confianza para el 95% de los puntos de TCT de cada eje para las probabilidades de “presencia” mayores al valor crítico dependiente de cada modelo. Los valores críticos del modelo de distribución de cada especie se encuentran en la tabla 8 del anexo. En el eje de las ordenadas de la figura 3 se encuentran los tiempos teóricos hasta alcanzar el estado crítico para cada punto del ambiente cuando el déficit de presión de vapor es mínimo (Bio 21), en tanto que en abscisas, la cantidad de días hasta llegar a un estado crítico por el efecto del déficit de presión de vapor máximo (Bio 20). En estos gráficos se observa que las especies pueden habitar zonas con tiempos muy bajos de TCT (extremo izquierdo de la elipse cercano a cero). Para este resultado se debe mencionar que la especie *T. dimidiata* es quien puede habitar zonas donde el TCT sería menor, zonas donde llegaría en *ca.* de cinco días al peso crítico. En relación a la probabilidad de presencia, se observa que en las especies *T. sordida*, *T. infestans* y *T. delpontei* la probabilidad aumenta a medida que el tiempo hasta alcanzar el estado crítico disminuye. Es decir, existen probabilidades de presencia altas en zonas donde el TCT es mínimo. Sin embargo para la distribución de la especie *T. vitticeps* se observa que hay probabilidades de presencia baja, en zonas donde el tiempo TCT es mínimo.

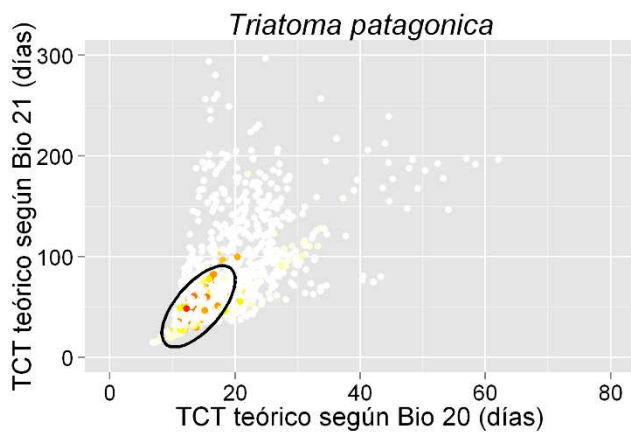
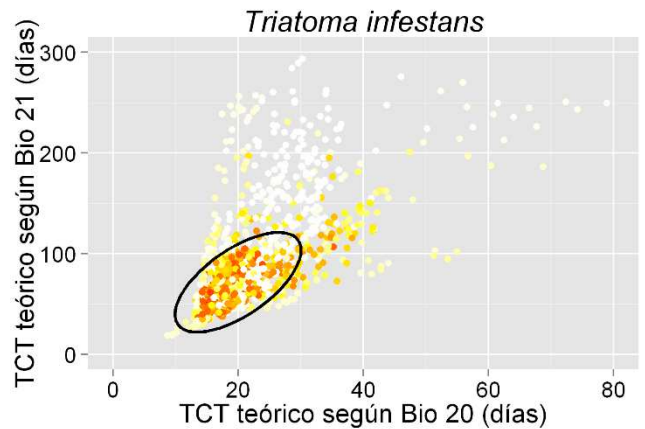
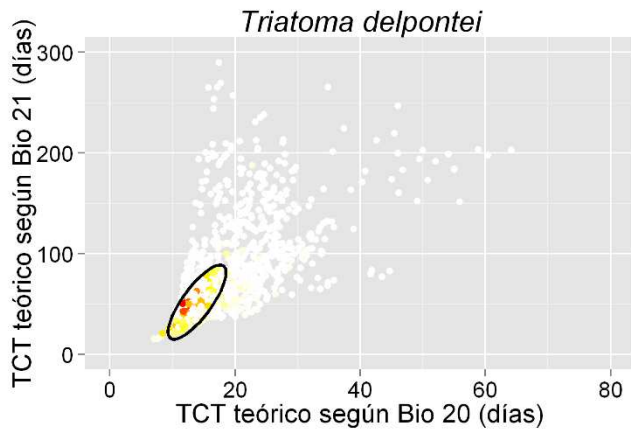
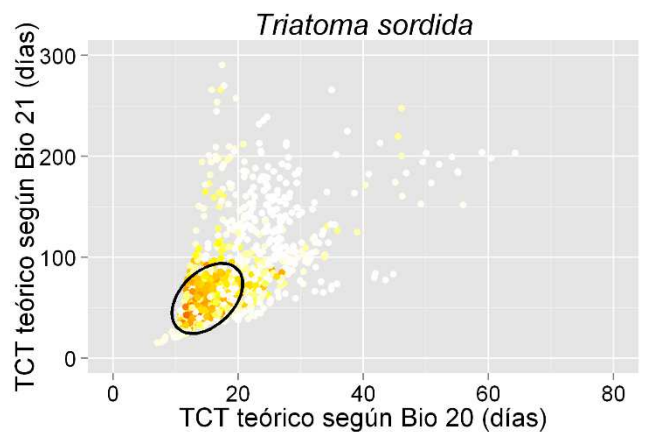
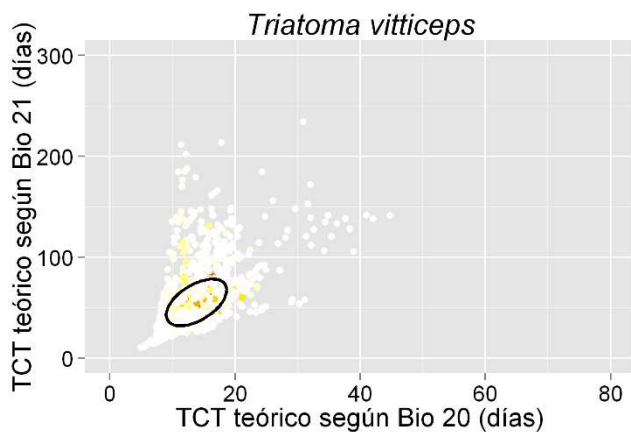
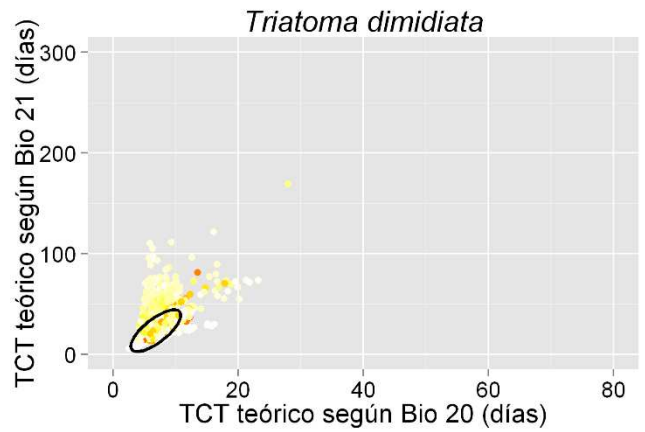
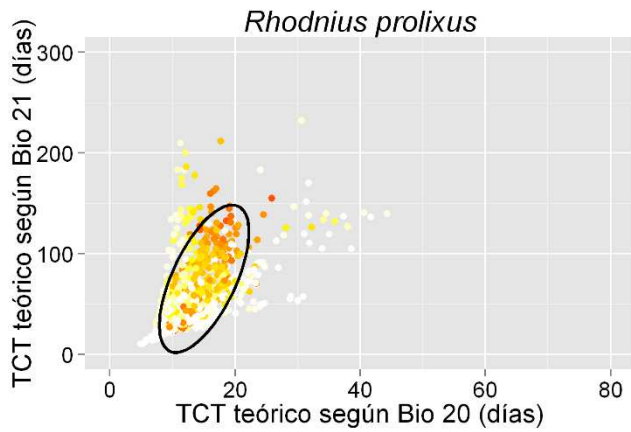


Figura 3.- Relación del tiempo teórico crítico de tolerancia (TCT) de las especies para 1000 coordenadas al azar según la probabilidad de presencia (“maxent suitability”) de cada especie. Se muestra la elipse de confianza (95%) para valores de probabilidad de “presencia” mayores al valor máximo de la suma de sensibilidad (porcentaje de verdaderos positivos) y especificidad (porcentaje de verdaderos negativos). En los ejes se muestran los TCT en días para cada punto del ambiente cuando el déficit de presión de vapor es mínimo (Bio 21) (eje Y) y cuando el déficit de presión de vapor es máximo (Bio 20) (eje X).

Para las relaciones entre los patrones geográficos y las tolerancias a la desecación, se realizó un análisis de regresión tanto para la latitud como para la longitud con las variables de permeabilidad cuticular, la pérdida de agua y el contenido crítico. Se tomó como el punto medio de la distribución de las especies a la posición geográfica de la máxima probabilidad de presencia de cada especie y para las especies subtropicales como *T. patagonica*, *T. infestans*, *T. delpontei* y *T. sordida* se tomaron los valores de probabilidad del hemisferio sur. Como resultado, no se observa un patrón en los parámetros medidos para estos triatomos con la latitud o longitud (Tabla 3).

Como se observa en la figura 4, la humedad relativa no exhibe un patrón latitudinal claro como la temperatura. Como resultado el mapa del déficit de presión de vapor muestra zonas repartidas por el continente donde el déficit es mayor, correspondientes al centro-este de Brasil, la diagonal semi-árida de Argentina, parte de Venezuela y una zona con un gran déficit en el centro-norte de México (figura 4). Por lo tanto, se evaluó la presencia de patrones ambientales en la distribución de las especies y su relación con la tolerancia a la desecación.

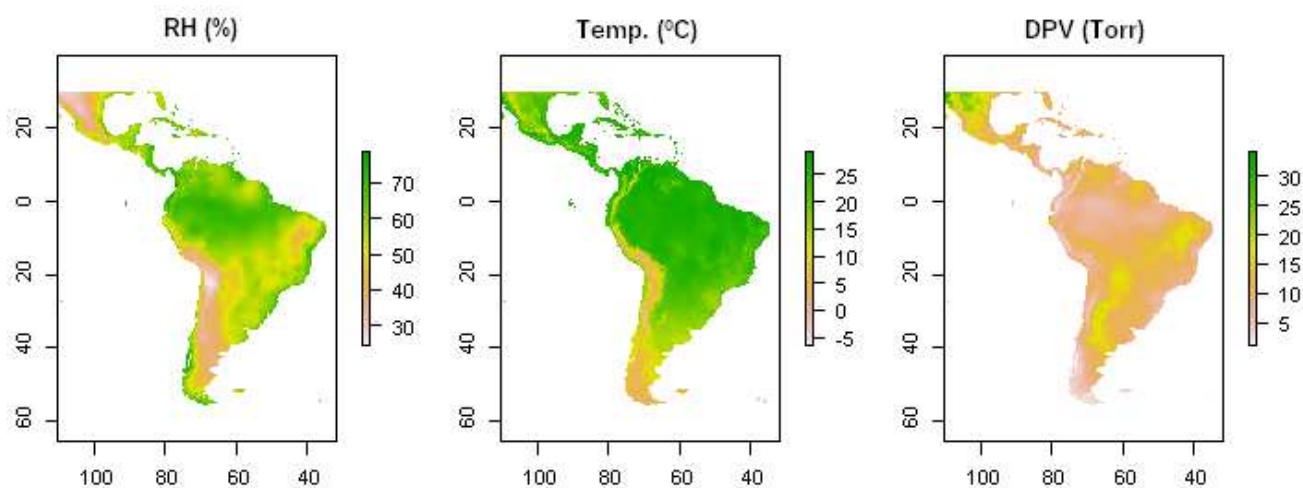


Figura 4. Mapas de variables ambientales. De izquierda a derecha se observa el mapa de Humedad Relativa media anual (RH en porcentaje), la Temperatura media anual (Temp. en grados centígrados) y el mapa del déficit de presión de vapor medio (DPV en Torr).

Este nuevo análisis de regresión, mostró el mismo resultado que la relación geográfica y la distribución. No se observó una relación lineal entre los valores de las variables ambientales de humedad relativa (media) y el déficit de presión de vapor (mínimo y máximo) para el centro de máxima probabilidad y las tolerancias fisiológicas relacionadas a la desecación (PC, WLR y CCA) (tabla 3). En el enfoque realista, incluyendo la relación filogenética entre las especies, los resultados de los Contrastes Filogenéticamente Independientes (PIC) entre los rasgos fisiológicos relacionadas a la desecación (PC, WLR y CCA) y las

variables ambientales en la distribución de las especies tampoco mostraron la existencia de patrones de variación (tabla 3).

*Tabla 3. Se muestran los resultados de los análisis de las regresiones entre las tolerancias fisiológicas y la latitud, longitud y los valores de las variables ambientales (Déficit de presión de vapor máximo, (Bio 20), Déficit de presión de vapor mínimo (Bio 21) y la humedad relativa anual (Bio 22)). También se muestra el resultado de los contrastes independientes de la filogenia (PIC).*

Contraste	Pendiente	Test	R <sup>2</sup>	p-valor	PIC test	p-valor
PC~ latitud	0,02	F <sub>1,5</sub> = 0,48	0,08	0,51	F <sub>1,5</sub> =0,69	0,44
WLR~latitud	2,37	F <sub>1,5</sub> = 0,51	0,09	0,50	F <sub>1,5</sub> =0,58	0,41
CCA~latitud	0,27	F <sub>1,5</sub> =4,03	0,44	0,10	F <sub>1,5</sub> =1,21	0,32
PC~longitud	-0,01	F <sub>1,5</sub> =0,12	0,02	0,73	F <sub>1,5</sub> =0,02	0,87
WLR~longitud	-0,72	F <sub>1,5</sub> =0,03	0,006	0,86	F <sub>1,5</sub> =0,002	0,95
CCa~longitud	-0,29	F <sub>1,5</sub> =3,35	0,40	0,12	F <sub>1,5</sub> =2,71	0,16
PC~bio20	-0,09	F <sub>1,5</sub> = 1,19	0,19	0,32	F <sub>1,5</sub> = 2,58	0,16
PC~bio21	-0,24	F <sub>1,5</sub> = 0,66	0,11	0,45	F <sub>1,5</sub> = 3,42	0,12
PC~bio22	0,05	F <sub>1,5</sub> = 1,02	0,16	0,35	F <sub>1,5</sub> = 3,90	0,10
WLR~bio20	-9,04	F <sub>1,5</sub> = 1,21	0,19	0,32	F <sub>1,5</sub> = 2,48	0,33
WLR~bio21	-23,29	F <sub>1,5</sub> = 0,63	0,11	0,46	F <sub>1,5</sub> = 2,93	0,14
WLR~bio22	5,69	F <sub>1,5</sub> = 1,02	0,17	0,35	F <sub>1,5</sub> = 3,67	0,11
CCA~bio20	-0,35	F <sub>1,5</sub> = 0,61	0,19	0,46	F <sub>1,5</sub> = 1,06	0,34
CCA~bio21	-0,53	F <sub>1,5</sub> = 0,11	0,02	0,75	F <sub>1,5</sub> = 0,07	0,78
CCA~bio22	0,30	F <sub>1,5</sub> = 1,12	0,18	0,33	F <sub>1,5</sub> = 1,21	0,32

## **Discusión**

### **Implicancias Fisiológicas:**

Los resultados de este capítulo muestran que si bien las especies tienen valores de masa muy distintos entre sí, en un rango de 25 a 150mg, el contenido de agua total en porcentaje es aproximadamente entre el 70 y 75% del peso de todas las especies de triatominos analizados (Tabla 1). Este resultado concuerda con lo establecido por Hadley (1994) en donde se propone que el contenido de agua total de los artrópodos se encuentra entre el 65 y 75% de la masa. En nuestro trabajo, tanto la variación de la masa

de los insectos como el contenido de agua total inter-específico siempre es mayor que la variación entre los individuos de una misma especie en cada análisis. La inclusión del peso o del tamaño del insecto en los análisis de tolerancia a la desecación pueden incluir diferencias a niveles jerárquicos distintos. Por ejemplo, la exclusión del efecto de la masa de los escarabajos de la familia Trogidae en la tolerancia a la desecación genera que la variación inter-específica del contenido de agua sea menor que la variación intra-específica (Chown 2001). Existe una relación exponencial positiva entre la superficie y la masa de los insectos vivos, y una relación lineal positiva significativa entre los valores de masa seca, masa crítica y la masa del insecto vivo, que muestran que los insectos de mayor tamaño podrían tener mayor tolerancia a la desecación por su relación superficie volumen (Figura 5). Además, al excluir el efecto de la filogenia sobre estas dos regresiones sus relaciones se mantienen (pic masa seca vs. pic masa vivo=  $F_{1,5}= 31,25$ ,  $p<0,0003$ ,  $R^2= 0,86$ ; pic masa crítica vs. pic masa vivo=  $F_{1,5}= 100,4$ ,  $p<0,0002$ ,  $R^2= 0,95$ ). Este punto es muy importante debido a que, por ejemplo, las diferencias en la tolerancia a la deshidratación de moscas del género *Drosophila* de ambientes desérticos vs. especies de ambientes más húmedos podrían desaparecer al considerar la relación filogenética (Gibbs 2002). Esta relación en la tolerancia también se vería amplificadas en el hecho que estas especies poseen porcentajes de contenido de agua total similares (entre el 70 y 75%, pero con algunas diferencias significativas). Se ha comprobado en otros hematófagos, como los mosquitos *Culex pipiens*, que el mayor tamaño refleja solo el aumento de la masa seca y esto conlleva a una disminución en la relación superficie-volumen (Benoit y Denlinger 2010). Por lo que se considera que el aumento del tamaño es un mecanismo simple para aumentar la resistencia a la deshidratación (Benoit y Denlinger 2010).

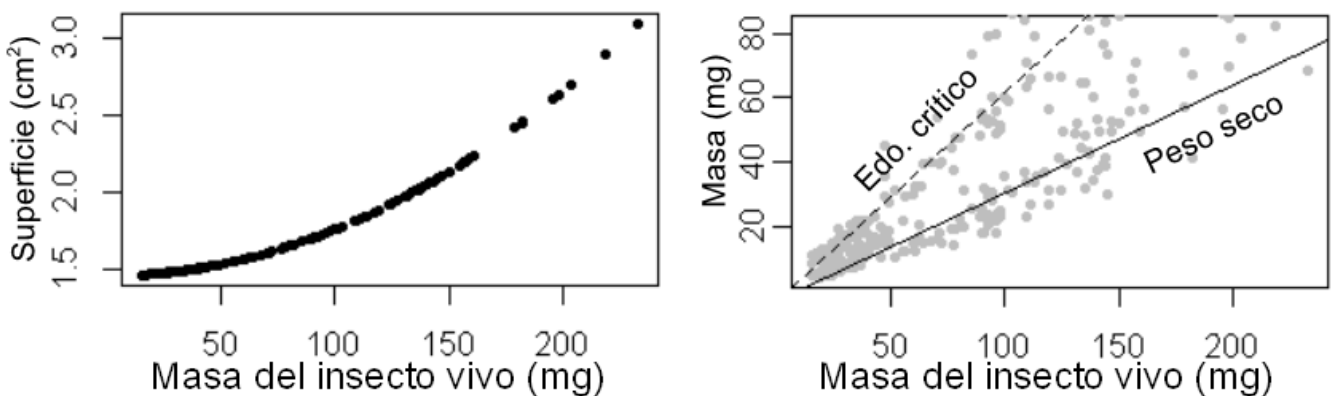


Figura 5. Relación superficie-masa y relación masa de los insectos en estado crítico y masa seca con la masa del insecto vivo. En el gráfico de la izquierda se muestra la variación de la superficie ( $cm^2$ ) y la masa (mg) de los individuos de las siete especies de triatomíneos analizados. En el gráfico de la derecha se muestra en línea punteada la relación de la masa (mg) de los insectos al momento de llegar al estado crítico y la masa (mg) de los insectos vivos ( $F_{1,140}= 960$ ,  $p<0,0001$ ,  $R^2= 0,86$ ). En línea continua se muestra la relación de la masa seca (mg) de los insectos y la masa (mg) de los insectos vivos ( $F_{1,140}= 1507$ ,  $p<0,0001$ ,  $R^2= 0,91$ ).

Algunos rasgos fisiológicos pueden ser modificados por las condiciones de laboratorio, sin embargo se sugiere que la tolerancia a la pérdida de agua no sería influenciada por las condiciones de cría como sí le sucedería al peso de los insectos (Chown et al 2011, Lyons et al 2014). El contenido crítico de agua de las especies mostró que no existen diferencias entre las especies con valores de CCA entre el 25 y 30%, excepto para *T. dimidiata* que puede llegar a un contenido crítico de agua de ca. del 50% de su masa. La tolerancia a la desecación se observa en la cantidad de agua perdida, en términos del porcentaje del agua total, estos triatominos pueden perder entre el 60 y el 70% del contenido de agua. Por lo que se observa una gran tolerancia a la desecación, a excepción de *T. dimidiata* que pierde ca. del 30% de su contenido de agua antes de llegar al estado crítico, lo que se ve reflejado en el tiempo crítico o hasta llegar al estado moribundo. En el caso de la tasa a la cuál se pierde el agua, es decir la resistencia a la desecación, Benoit y Delinger (2010) comparan la tasa de pérdida de agua (expresada en porcentaje de pérdida de peso por hora) para hembras de especies hematófagas y establecen que los hemípteros poseen valores menores a 0,8%/hs. Para este trabajo llevando nuestros valores a las mismas unidades, los triatominos analizados obtienen valores menores a 0,3%/hs (entre 0,03 y 0,26%/hs), es decir muestran una gran resistencia comparados con otros insectos de ambientes más húmedos.

El valor de CCA de las especies se ve reflejado también en la cantidad de días que los insectos sobrevivieron en los experimentos (TCT), ya que existe una relación lineal negativa significativa entre los días y el CCA de cada individuo ( $F_{1,140} = 126,7$ ,  $p < 0,0001$ ,  $R^2 = 0,46$ ). Es decir, mientras mayor sea el valor de porcentaje de contenido crítico, menor será el tiempo hasta alcanzar el estado crítico. Sin embargo, si bien el mayor tamaño se considera como una estrategia de tolerancia a la desecación, en las siete especies de triatominos analizadas no existe una relación lineal entre la masa de los insectos y el tiempo crítico de tolerancia ( $F_{1,140} = 0,17$ ,  $p = 0,68$ ,  $R^2 = 0,001$ ). Estas relaciones también son independiente de la filogenia (pic TCT vs. pic CCA=  $F_{1,5} = 17,13$ ,  $p < 0,009$ ,  $R^2 = 0,77$ ; pic días vs. pic masa vivo=  $F_{1,5} = 0,76$ ,  $p = 0,42$ ,  $R^2 = 0,13$ ). Si en lugar del peso inicial consideramos el porcentaje de contenido total de agua, la relación lineal positiva significativa ( $F_{1,14} = 18,24$ ,  $p < 0,00001$ ,  $R^2 = 0,11$ ) desaparece al excluir el efecto de la filogenia ( $F_{1,5} = 0,76$ ,  $p = 0,42$ ,  $R^2 = 0,13$ ). Esto pone de manifiesto que el efecto del tamaño en la tolerancia a la desecación tiene implicancias sólo en el porcentaje del contenido crítico de agua y el tiempo en que llega al estado crítico. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, existen otras estrategias en la tolerancia a la desecación además de poseer un contenido crítico de agua bajo, se puede tener una pequeña tasa de pérdida de agua y permeabilidad cuticular (Hadley 1994).

La relación entre las especies en términos de la tasa de pérdida de agua, muestra que si bien existen grandes diferencias entre la metodología aplicada (la medición por respirometría de flujo abierto genera resultados más elevados que la realizada en forma gravimétrica) ambas muestran las mismas tendencias (figura 1). Un resultado similar se muestra en Schilman y colaboradores (2007) en mediciones de tasa de pérdida de agua de seis especies de hormigas. Existen diferencias entre las mediciones de flujo abierto y

aquellos experimentos evaluados con un flujo muy bajo o nulo que podrían deberse a la mayor actividad de los insectos bajo corriente de aire y una baja o nula humedad circundante debido al flujo. Al igual que en los experimentos de este capítulo los insectos observados diariamente se encontraban inmóviles (Schilman et al 2007, observación personal del autor de esta tesis). Además, a pesar que la temperatura a la cual se midieron las tasa de pérdida de agua eran iguales para ambas metodologías (35°C), las RH del aire eran distintas. Estas fueron *ca.* de 0% para las medidas por respirometría y *ca.* 15% para las medidas gravimétricas, lo que genera distintas presiones de vapor con el consiguiente cambio en la WLR. Esto último sumado al hecho que las mediciones de respirometría de flujo abierto fueron en la cámara respirométrica donde se introdujo un solo insecto. En tanto que, si bien los insectos se encontraban en recipientes experimentales individuales, la cámara de desecación tiene una capacidad para treinta recipientes. En ambientes de desecación el efecto “grupo” genera mayor presión de vapor debido a la liberación de agua o excreciones lo que genera mediciones con menores tasas de pérdida de agua que mediciones individualizadas (Chown y Nicholson 2004).

Al analizar la permeabilidad cuticular de los insectos encontramos que existe la misma relación que en el análisis de WLR. *T. vitticeps* y *T. dimidiata* fueron las especies que mostraron mayor valor de PC (alrededor de  $5 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{Torr}^{-1}$ ). Este valor es mayor al de otros insectos de zonas áridas (Edney 1977, Hadley 1994). En triatominos hasta el momento solo se había medido en *R. prolixus* obteniendo valores en adultos (Rolandi et al 2014) y en el mismo estadio que en este trabajo (Wigglesworth, 1945). Si bien estos estudios citados se realizaron con otras metodologías, nuestros resultados coinciden en gran medida para esta especie (PC de *R. prolixus* fue de  $1,80 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{Torr}^{-1}$ ;  $1,68 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{Torr}^{-1}$  (Wigglesworth, 1945); entre  $1,76$  y  $4,11 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{Torr}^{-1}$  (Rolandi et al 2014)). Si bien la WLR no muestra una relación lineal negativa significativa con el TCT ( $F_{1,140} = 2,23$ ,  $p = 0,13$ ,  $R^2 = 0,01$ ), al incluir la relación con la superficie del insecto para determinar la permeabilidad cuticular, sí se observa una regresión significativa ( $F_{1,140} = 4,37$ ,  $p = 0,031$ ,  $R^2 = 0,03$ ). Sin embargo, al excluir el efecto de las relaciones filogenéticas entre estas especies la relación desaparece (pic PC vs. pic TCT=  $F_{1,5} = 0,01$ ,  $p = 0,9$ ,  $R^2 = 0,002$ ). Estas regresiones enmascaradas por las relaciones filogenéticas muestran que la resistencia a la desecación sería un rasgo maleable que puede variar considerablemente entre las especies dentro de taxones monofiléticos (Addo-bediako et al 2001, Chown 2003). Además esta variabilidad también se puede ver afectada por otros factores como la aclimatación (Gibbs 2002), el ayuno (Rolandi et al 2014), la temperatura y la humedad (Kleyhans y Terblanche 2011) o la madurez sexual del insecto (Benoit y Delinger 2010).

### ***Implicancias Ecológicas:***

Para el modelado de la distribución de las siete especies de triatominos se utilizaron variables distintas a las utilizadas en el capítulo III, sin embargo se encontraron resultados similares. Zonas propicias para más de una especie y a la vez ambientes donde el modelo predice que ninguna de las especies utilizadas



habitaría (*i.e.*, los Andes y algunos ambientes del centro-norte de Brasil). Sólo *T. patagonica* y *T. vitticeps* parecen estar circunscriptas a un solo país (Argentina y Brasil, respectivamente), sobre las demás especies existen regiones comunes donde el modelo reconoce ambientes propicios para su establecimiento. La mayor riqueza específica se encuentra en la región que pertenece al centro-norte de Argentina y parte del centro sur de Brasil (Figura 8 del apéndice). Como fue discutido en el capítulo III, esta riqueza de vectores en las zonas nombradas puede ser explicada por los mapas de riqueza propuestos para 91 triatominos por Fernani y colaboradores (2013) donde la mayor riqueza específica se da en el norte de Argentina, el Sur de Bolivia, el suroeste de Brasil y norte de América del sur en Venezuela.

Las regiones que los modelos predicen una probabilidad de presencia cercana a cero se pueden explicar a partir de los mapas de factores limitantes (figura 2B). En la región andina se puede ver el efecto de dos variables con mayor intensidad, la Bio 6 y la Bio 20 (mínima temperatura del mes más frío y déficit de presión máximo respectivamente). El efecto de la baja temperatura debido a la altitud sería consistente con el efecto expuesto de las temperaturas críticas de los insectos en el capítulo III y con el hecho que la mayoría de las poblaciones de triatominos se encuentran entre el nivel del mar y los 1.500 msnm (Carcavallo et al. 1999). El efecto del déficit de presión de vapor máximo se puede observar claramente en *T. vitticeps*, *T. delpontei* y *T. patagonica* hacia el oeste y el sur de sus distribuciones. Si bien esta variable no tiene el mayor efecto sobre el modelo de distribución, sí lo tiene para sus límites. En *T. infestans*, se observó un leve efecto hacia el oeste de su distribución, sin embargo en un trabajo realizado por Gorla (2002) sobre la misma especie, ésta variable no mostró influencias en la distribución de dicha especie. Para las especies de zonas tropicales (*R. prolixus*, *T. dimidiata*, *T. vitticeps* y *T. sordida*) se observa un gran efecto del rango anual (Bio 7), la Bio 6 y la Bio 20 sobre la parte central de Brasil. Este resultado concuerda con el capítulo III acerca del efecto de las temperaturas mínimas sobre estas especies. Además el efecto de la Bio 20 se puede entender para *T. vitticeps* como un factor limitante hacia el norte de su distribución donde inicia la Catinga brasilera. La distribución geográfica de ésta especie puede ser explicada principalmente por la precipitación y la precipitación del trimestre más húmedo (de Souza et al 2010) y estaría sobre los biomas de Selva Atlántica y el Cerrado (Gurgel-Gonçalves et al., 2011).

### ***Relación entre las tolerancias fisiológicas y la distribución geográfica:***

Según la hipótesis ecológica en este capítulo se espera que los tiempos teóricos en los que se alcanza el estado crítico estén relacionados con la temperatura y humedad del ambiente. Los modelos de distribución mostrarán que una especie tiene probabilidades altas de presencia en zonas donde el TCT es bajo si tiene una distribución en zonas secas y TCT más alto si es de zonas más húmedas. Una especie con una mayor tolerancia a la desecación (porcentajes de contenidos críticos de agua menores) podrá habitar zonas donde el déficit de presión de vapor sea alto. Para estos triatominos se obtuvieron

porcentajes de CCA muy similares entre sí (a excepción de *T. dimidiata*) que serían menores a otras especies de ambientes más húmedos (46% de su peso vivo) (Klok y Chown 1997). Además, las zonas con mayor riqueza específica de triatomíneos, coinciden también con las zonas de mayor déficit de presión de vapor (figura 8 del anexo y figura 4). En nuestros resultados, se observó que la mayoría de las especies se comportan de manera similar, con probabilidades de presencia altas en las zonas donde alcanzarían el CCA en un menor tiempo. Para el caso *T. dimidiata*, quien posee un CCA del 47%, la permeabilidad cuticular y el efecto del déficit de presión de vapor generan que esta especie tenga los TCT teóricos más bajos incluso en zonas con probabilidad de presencia alta comparado con las demás especies. Sólo *T. vitticeps* muestra claramente que su elipse de confianza se encuentra en zonas con mayores TCT a los mínimos posibles (figura 3). Es decir, para estas dos especies que no muestran valores de permeabilidad cuticular distintos, el mayor contenido crítico de agua de *T. dimidiata* explica porque en su distribución se observan valores de tiempo hasta el estado crítico menores. Paradójicamente, para las distribuciones de estos insectos se observan probabilidades altas a menores valores de TCT. Sin embargo, se ha probado en experimentos de laboratorio y condiciones semi naturales la gran preferencia de *T. infestans* por humedad relativa baja (Roca y Lazzari 1994, Lorenzo y Lazzari 1999). Por lo que la probabilidad de presencia alta en zonas donde los TCT teóricos son bajos implica también una tasa de pérdida de agua alta debido al efecto del déficit de presión de vapor. Por ende, la mayor probabilidad de presencia en zonas con alto déficit de presión de vapor podría estar explicada debido al desafío que conlleva el exceso de agua luego de una ingesta para estos insectos hematófagos. Al ingerir grandes cantidades de agua la pérdida de agua cuticular aumenta rápidamente al igual que los procesos de diuresis (Benoit y Denlinger 2010). Además, las humedades relativas bajas aceleran los ciclos biológicos para estas especies (Carcavallo 1999) y existen variaciones relacionadas a las estaciones del año para los triatomíneos. Por ejemplo, en *T. dimidiata* se encontró que tiene una mayor dispersión en la temporada seca y una permanencia en los refugios para la época de lluvias (Dumonteil et al., 2002).

Nuestros resultados en relación a los patrones latitudinales o longitudinales no mostraron ninguna relación con los parámetros de tolerancia a la desecación medidos (WLR, PC, CCA). Además tampoco se observa una relación entre los rasgos fisiológicos y las variables ambientales relacionadas a la humedad como la Bio 20, Bio 21, Bio 22. Debido a que la mayoría de los estudios comparativos de las tolerancias fisiológicas se ha realizado a nivel de especies, el control de la dependencia filogenética debe ser tenido en cuenta para los análisis (Chown et al 2002). La tolerancia a la pérdida de grandes cantidades de agua estaría relacionada a la historia filogenética y no representaría una adaptación específica a los ambientes desérticos (Gibbs 2002). Sin embargo como mostraron los resultados, estas especies tienen características de zonas xéricas, por lo que para mostrar relaciones adaptativas con la desecación habría que analizar una mayor diversidad de triatomíneos o comparar niveles jerárquicos mayores con distribuciones netamente en zonas húmedas.

## ***Conclusiones***

En este capítulo se han determinado por primera vez la tolerancia a la desecación para siete triatominos de importancia vectorial de América Latina y a partir de un enfoque macrofisiológico se combinaron modelos de distribución y análisis fisiológicos. En primer lugar de las variables tenidas en cuenta para evaluar la tolerancia a la desecación, se observa que el contenido de agua crítico (CCA) sería el parámetro que mejor explica la tolerancia de los triatominos. Además, estos insectos serían capaces de perder una gran cantidad de agua hasta llegar a su estado crítico. En segundo lugar, los modelos de distribución muestran que existen una probabilidad de presencia alta en ambientes que maximizan la pérdida agua con tiempos menores hasta llegar al estado crítico en varias de las especies de triatominos y muestran a la variable déficit de presión de vapor como una de las que explicaría los límites de la distribución. Estas especies de insectos estudiados muestran no solo una gran tolerancia a la desecación sino también una distribución muy relacionada con ambientes de baja humedad. Lo que explicaría en parte, por que no se observa una relación adaptativa entre las tolerancias a la desecación y la humedad ambiente. Estas nuevas características del nicho fisiológico encontradas para estas especies pueden aportar no sólo información para entender con mayor profundidad el nicho ecológico, si no que también puede ayudar a evaluar y diseñar nuevas prácticas de control vectorial.

# Capítulo VI

## *Discusión General y conclusiones finales*

Los triatomíneos son los vectores de una problemática que afecta la mayoría de los países de América Latina, la enfermedad de Chagas. En esta tesis se ha trabajado sobre la determinación de las bases fisiológicas y su relación con la distribución geográfica en siete especies de triatomíneos de relevancia epidemiológica, con una distribución en gran parte del continente y una relación filogenética que incluye dos géneros, clados y complejos. Se estudió la tolerancia y la distribución de *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *T. infestans*, *T. vitticeps*, *T. sordida*, *T. delpontei* y *T. patagonica*. Para ello se combinaron dos enfoques metodológicos, el modelado de la distribución de especies y el análisis de las tolerancias fisiológicas. Se evaluaron los límites de tolerancia térmica y las características de la tolerancia a la desecación como componentes del nicho fundamental. Luego, se modeló la distribución utilizando puntos de presencia y variables climáticas e identificando los factores más importantes y limitantes para su distribución para caracterizar el nicho ecológico de cada especie. Por último, se analizó la relación entre estos factores ambientales y las tolerancias fisiológicas para evaluar hipótesis y patrones macroecológicos.

### **Síntesis de los principales resultados:**

#### ***Tolerancias fisiológicas:***

Una de las metodologías que se utilizaron en todos los capítulos fue la medición por respirometría de flujo abierto. Esta metodología nos permitió la obtención de datos de actividad, liberación de CO<sub>2</sub> y agua de cada insecto con gran precisión y resolución temporal que fue utilizada para determinar el límite térmico superior del nicho fisiológico: la temperatura crítica máxima (CT<sub>max</sub>) en el capítulo III y IV y la temperatura letal superior (ULT) en capítulo III. También se utilizó para determinar la tasa de liberación de agua (WLR) como parámetro de tolerancia a la desecación utilizada en el capítulo V. El perfil de la curva de liberación de CO<sub>2</sub>, obtenida en una rampa ascendente de temperatura mostró similitudes entre las especies (capítulo III) y en el estado nutricional o ayuno (capítulo IV). Estos perfiles también coinciden con los obtenidos por otros autores en diferentes especies de insectos (Klok et al 2004, Lighton y Turner 2004), por lo que se podría suponer que los mecanismos de liberación de CO<sub>2</sub>

serían comunes entre los insectos. Otro punto importante que arrojó esta metodología y se expresa en el capítulo IV, fue que al ascender la temperatura, la liberación de agua se mantiene relativamente constante hasta los 42°C, luego se observa que existe una gran liberación de agua. Esta abrupta liberación de agua estaría explicada por dos puntos; en primer lugar, la tasa de liberación de CO<sub>2</sub> alcanza un valor máximo y se mantiene, sin embargo la tasa de liberación de agua continúa creciendo. Esto implicaría que al mantener la tasa de intercambio gaseoso en su máximo valor, lo que explicaría el aumento en la tasa de liberación de agua. El otro punto que explica la excesiva liberación de agua, fue una salivación observada en los insectos frente al estrés térmico (capítulo IV). Si bien no logramos demostrar fehacientemente que la liberación de agua implique un corrimiento del CT<sub>max</sub>, sí observamos que está relacionada con una menor temperatura para la zona donde se libera. Resulta interesante no descartar por completo el efecto que pueda tener la salivación sobre la temperatura del insecto porque podría hacer descender la temperatura de sitios vitales como la cabeza y evitar la inactivación del sistema nervioso debido a las altas temperaturas (capítulo IV). Este punto tiene gran relevancia ya que también se observó que la ULT se encuentra muy cercana a la CT<sub>max</sub>, con lo que cualquier corrimiento del límite superior de termotolerancia que genere la liberación de agua tiene grandes implicancias para la supervivencia a situaciones extremas de temperatura (capítulo III). Además, una vez que la gran liberación de agua se detiene, se puede observar que los insectos llegan a su CT<sub>max</sub> (capítulo IV). Por lo tanto la inspección del perfil de liberación de agua también puede ser un método sencillo para determinar el límite térmico superior del nicho fisiológico.

Por otro lado, observamos que existe una gran conservación de la CT<sub>max</sub> con valores próximos a los 47°C independientemente del criterio analizado (ya sea por la actividad, el CO<sub>2</sub> o la liberación de agua) con poca variación intra e inter-específica (capítulo III y capítulo IV) y un bajo efecto del ayuno (capítulo IV). Se ha observado en insectos que existe una gran flexibilidad entre los valores de tasa de pérdida de agua y los límites térmicos inferiores, pero una menor variación en los límites térmico superiores (Terblanche et al 2006). La menor variación de estos límites térmicos superiores con respecto al inferior (la temperatura crítica mínima (CT<sub>min</sub>)), muestra que existirían mecanismos que funcionarían de forma desacoplada en respuestas a las temperaturas extremas (Chown 2001, Terblanche et al 2005, esta tesis). La mayor o menor variación de un parámetro se considera una pieza clave que subyace a los cambios fisiológicos de la adaptación, y por lo tanto a la diferenciación entre las poblaciones y especies (Terblanche 2006). Otra de las características que se observó en los triatominos estudiados, fue que existe una variación inter-específica de la masa, pero el contenido de agua total (CTA) expresado como porcentaje de la misma, fue similar entre las especies y el esperado para los artrópodos (entre el 65 y el 75%; Hadley 1994). Además, se observó una relación lineal positiva significativa entre la masa del insecto vivo y la masa del insecto al llegar a un estado crítico de pérdida de agua (CCA) (capítulo V). Este punto sugiere que el mayor tamaño puede ser considerado un mecanismo simple para aumentar la tolerancia a la deshidratación (Benoit y Delinger 2010). Es importante resaltar sobre estos resultados que

las relaciones entre los parámetros se realizaron bajo dos enfoques, uno que incluía la relación filogenética y otro que no. Este punto es clave ya que una comparación sobre la tolerancia a la desecación entre especies puede llevar a conclusiones distintas si no se tiene en cuenta la relación filogenética entre las especies (Gibbs 2002). Por ejemplo, cuando analizamos la permeabilidad cuticular (PC) y el tiempo de supervivencia hasta llegar al estado crítico, se observa que aquellas especies con mayor valor de PC (*T. vitticeps* y *T. dimidiata*) llegan en menor tiempo al estado crítico. Sin embargo cuando excluimos el efecto del parentesco, observamos que esta relación desaparece (capítulo V).

### ***Modelos de distribución en triatominos:***

En los capítulos III y V se modeló la distribución de las especies de triatominos con los que se trabajó. En ambos capítulos no se utilizaron las mismas variables, pero sin embargo los resultados de los modelos coinciden en gran medida. Se establecen regiones donde los nichos ecológicos de las especies se solapan y otras zonas donde se predice que existe muy baja probabilidad de “presencia” de cualquiera de los triatominos estudiados. El solapamiento de los nichos ecológicos coincide con las propuestas de riqueza específica para el centro-norte de Argentina, el sur de Bolivia y el sureste de Brasil por otros autores (Diniz-Filho et al 2013, Fergnani et al 2013). Por otro lado, a lo largo de la cordillera de los Andes y en la zona centro-norte de Brasil, según los modelos las condiciones ambientales no serían propicias para el establecimiento de las especies con las que se trabajó (capítulos III y V). La zona andina se puede explicar por factores abióticos como la temperatura y la humedad. El efecto de la baja temperatura (debido a la altitud de la zona) sería consistente con el efecto de las temperaturas críticas mínimas en los insectos en el capítulo III. Además, la mayoría de las poblaciones de triatominos se encuentran entre el nivel del mar y los 1.500 msnm (Carcavallo et al. 1999). El efecto de la humedad, reflejado en el déficit de presión de vapor máximo, se puede observar en los mapas de los factores limitantes de *T. vitticeps*, *T. delpontei*, *T. patagonica* y *T. infestans* hacia los límites de sus distribuciones. Para estas especies dicha variable no tiene el mayor efecto sobre el modelo de distribución, pero sí tiene grandes implicancias hacia los límites (capítulo V). La temperatura mínima del mes más frío (Bio 6) y el rango de temperatura anual (Bio 7) fueron dos variables comunes en los capítulos III y V y siempre tuvieron gran relevancia para los modelos de distribución. Si bien no se puede descartar el efecto de las interacciones bióticas sobre la distribución de las especies, es claro que el efecto de las bajas temperaturas es un factor que influye considerablemente sobre la distribución de estos triatominos (capítulos III y V).

### ***Enfoque ecofisiológico de la distribución:***

La distribución y la abundancia de los insectos se ven determinadas por las diferencias que poseen las especies entre parámetros como las tolerancias térmicas y la tolerancia a la desecación (Warren et al 2010). Los valores de los límites térmicos superiores de los triatominos estudiados, muestran que las temperaturas máximas en sus distribuciones no suponen un riesgo para la supervivencia debido a que se

encuentran muy alejados de sus temperaturas críticas y letales superiores. Teniendo en cuenta la poca distancia que existe entre la CTmax y la ULT (ca. 1°C) se genera un margen de seguridad térmica para las temperaturas máximas en estas especies de ca. 10°C. Sin embargo, en relación al límite térmico inferior del nicho fisiológico, se observa que las especies subtropicales pueden habitar áreas donde la temperatura mínima del mes más frío (Bio 6) puede ser incluso más baja que los valores de CTmin para cada especie. En tanto que las especies tropicales (*R. prolixus*, *T. dimidiata* y *T. vitticeps*) habitan zonas donde esta variable es siempre mayor que las CTmin, con valores de temperaturas donde prácticamente no se alcancen los 0°C. Este punto mostró también su explicación en un nivel jerárquico menor, ya que en los ensayos de recuperación al shock por frío (ca. 0°C) estas especies no se recuperaron en el tiempo que duró el experimento, como sí lo hicieron las especies subtropicales (capítulo III).

Como se ha visto en los capítulos III y V, el solapamiento de los nichos ecológicos coincide con la riqueza específica de triatomíneos para el centro-norte de Argentina, el sur de Bolivia, el sureste de Brasil. Estas zonas son justamente los ambientes con mayor déficit de presión de vapor (capítulo V) de América del Sur y que corresponden a la Catinga y el Cerrado en Brasil pasando por Paraguay y Bolivia con el bioma chaqueño y en Argentina con lo que corresponde al Chaco y la región fitogeográfica del Monte (Gorla 2010). Esta relación observada a nivel de la distribución de la especie, se determinaría niveles jerárquicos más abajo. Por ejemplo, a nivel comportamental, se observa al menos para algunos triatomíneos, que poseen preferencias hacia las zonas con menor humedad (Roca y Lazzari 1994, Lorenzo y Lazzari 1999), y en un nivel que tiene que ver con la fisiología del organismo, estos triatomíneos poseen tasas de pérdida de agua muy bajas comparadas con otros insectos de zonas más húmedas (Benoit y Delinger 2010, capítulo V).

En los momentos que se realiza el intercambio gaseoso con el ambiente, los insectos están expuestos a la pérdida de agua a través de la vía respiratoria. Al abrir los espiráculos, el déficit de presión de vapor en las zonas secas, hará que un insecto pierda una mayor cantidad de agua que uno de zonas más húmedas. Por lo que la pérdida de agua respiratoria y cómo pueda ser modificada, será muy importante para los insectos de ambiente con alto déficit de presión de vapor (Zachariassen 1996, Addo-Bediako et al 2001). El otro componente de la tasa de pérdida de agua, la pérdida por la vía cuticular, también muestra diferencias entre los insectos y sus ambientes. Los insectos de zonas áridas tienen menor pérdida a través de la cutícula que los de zonas más húmedas (Zachariassen 1996). Por lo tanto, la relación entre la tasa metabólica y la pérdida de agua difieren entre las especies de zonas secas y las de zonas más húmedas (Zachariassen 1996). En el capítulo V se observó que *T. vitticeps* y *T. dimidiata* tienen una mayor tasa de liberación de agua y una mayor permeabilidad cuticular. En contraposición, *T. sordida*, mostró tanto una tasa de pérdida de agua como una permeabilidad cuticular muy baja. Para estas especies con las que se trabajó, no se encontró una relación lineal entre los parámetros fisiológicos y las características ambientales, con lo que probablemente habría que comparar una mayor cantidad de especies de insectos hematófagos de distintos ambientes para poder contrastar los análisis de tolerancia a la desecación. Estas

especies son altamente tolerantes (porcentaje de contenido crítico de agua bajo) y muy resistentes a la desecación (tienen tasas de pérdida de agua muy bajas), lo que explicaría por qué la mayor probabilidad de presencia de algunas especies de los triatominos analizados se encuentra en zonas con alto déficit de presión de vapor. Como se observó en el capítulo V la existencia de patrones latitudinales o longitudinales no se aplican, al menos con las especies estudiadas, para las tolerancias a la desecación. Sin embargo, la temperatura se ajusta bien al principio macroecológico que establece que en latitudes más altas las especies experimentan temperaturas más bajas y una mayor variación estacional, y por lo tanto mayores temperaturas extremas (Gaston y Chown 1999). Nuestros resultados apoyan la Hipótesis de Variabilidad Climática, que establece que las especies que habitan gradientes climáticos más amplios tendrán rangos de tolerancia térmica mayores (Stevens 1989, Addo-Bediako et al 2000). Estos triatominos poseen un rango de tolerancia térmica mayor cuanto mayor es la latitud de su máxima probabilidad de presencia. Sin embargo, la CTmax no mostró una variación latitudinal significativa, por lo que la relación entre el rango de tolerancia térmica y la latitud, estaría dada por la relación entre las temperaturas críticas mínimas y la latitud. Estas regresiones toman mayor fuerza al mantenerse luego de excluir el efecto de la relación filogenética, por lo que las tolerancias a las bajas temperaturas dependerían de adaptaciones térmicas de las especies en lugar de estar asociadas a la inercia ancestral. De esta manera el límite de termo-tolerancia inferior estaría limitando la distribución latitudinal (y/o altitudinal) de estas especies de triatominos. Debido al descenso de la temperatura hacia las zonas australes, las especies con bajo CTmin son capaces de ocupar latitudes (y/o altitudes) más altas. Por lo que una especie con un CTmin alto sólo podrá ocupar lugares más cálidos (Araújo et al 2013, capítulo III).

Existe además una variación estacional en la presencia de estos vectores, tanto los que habitan ambientes antropizados (con menor variación de temperatura y humedad) como los de ambientes silvestres (Vazquez-Prokopec et al 2002). Por lo que existe una menor probabilidad de presencia en los inviernos para los vectores subtropicales (Gorla y Schofield 1989, Wisnivesky-Colli et al 2003) y una mayor dispersión en la época seca para los vectores de zonas tropicales como *T. dimidiata* (Dumonteil et al 2002). Esto implicaría también una variación en las tasas de encuentro entre vectores y huéspedes a lo largo del año, donde la transmisión de *T. cruzi* podría estar en su nivel más alto durante los meses cálidos y secos.

Las características del nicho fundamental de estas especies de triatominos muestran que los parámetros fisiológicos más importantes en relación a la temperatura y la humedad del ambiente, fueron la CTmin y el contenido crítico de agua (CCA). A su vez, los resultados de los modelos correlativos utilizados muestran una gran influencia de la temperatura mínima del mes más frío (Bio 6) y un efecto del déficit de presión de vapor máximo (Bio 20) sobre los límites de distribución de algunas especies. Estos dos puntos reflejan la relación entre el nicho fundamental y el ecológico. Existe un solapamiento del nicho ecológico de estos triatominos en las zonas con un déficit de presión de vapor elevado, zona para la cual



muestran una gran tolerancia a la desecación. Los triatominos que pueden alcanzar una distribución más austral y por ende hacia zonas más frías, son aquellos que poseen una mayor tolerancia a las temperaturas mínimas.

### ***Enfoque ecofisiológico del control vectorial:***

#### ***Ejemplo aplicado a *Triatoma infestans****

Los vectores que habitan zonas subtropicales están expuestos a una gran variación estacional que implica una menor probabilidad de presencia o disminución en la densidad de las poblaciones durante los inviernos (Gorla y Schofield 1989, Wisnivesky-Colli et al 2003). Una variación en las tasas de encuentro entre vectores y huéspedes a lo largo del año, implica también que la transmisión de *T. cruzi* podría estar en su nivel más alto durante los meses cálidos y secos. Sin embargo, la Organización Panamericana de la Salud ha otorgado la “certificación de la ausencia de transmisión de la enfermedad de Chagas por vectores nativos” a varias provincias y países de América latina con éstas características ambientales (Abad-Franch et al 2013). Los programas de control vectorial se han basado en la búsqueda de la eliminación del vector implicado y la supresión completa de una región geográfica definida, en ausencia de medidas de control de la re-introducción por fuentes externas. Además, se han caracterizado por realizar poco énfasis en la vigilancia de manera continua una vez que el objetivo se alcanza (Abad-Franch et al 2013). Por lo que algunos autores proponen el término de “certificación de buenas prácticas”, el cual sería de mayor utilidad ya que la “interrupción de la transmisión” puede carecer de fundamentos científicos y podría debilitar sistemas y estructuras de control y vigilancia a largo plazo, con un efecto muy fuerte en las personas que viven en condiciones de riesgo (Abad-Franch et al 2013). En este marco, conocer las características fisiológicas y los límites de tolerancias de los vectores puede servir a las estrategias del control vectorial y ser una herramienta para evaluar las “buenas prácticas”. Las zonas donde las temperaturas de los inviernos sean menores a las temperaturas críticas mínimas de las especies que allí habitan podrían potenciar los resultados del control vectorial y/o prever las reintroducciones o la llegada de nuevas especies. El efecto de los inviernos se ha estudiado en poblaciones de *T. infestans* en condiciones semi-naturales y se observó que puede generar una tasa de crecimiento poblacional nula (Gorla y Schofield 1989). Por lo que se ha propuesto como estrategia de control vectorial activo, el uso de insecticidas en la temporada donde las densidades poblacionales son bajas y donde la supervivencia de las poblaciones producto de las bajas temperaturas son menores (Gorla y Schofield 1989, Gorla 1992). Esto pone de manifiesto que existe una sinergia entre las temperaturas bajas y la aplicación de insecticidas cuando las tasa de crecimiento poblacional se mantienen en valores bajos (Gorla 1991). Sin embargo, en las zonas donde se produce re-infestación no es sencillo establecer si se debe a las prácticas de control vectorial o a la inmigración de nuevos individuos (Gorla 1991, Cecere et al 2006). Se ha postulado que prácticamente un simple parámetro

fisiológico, especialmente referido a las tolerancias térmicas, combinado con rasgos comportamentales, puede ser un predictor importante del nicho climático de las especies (Arnan y Blüthgen 2015). Por lo tanto, bajo una hipótesis ecofisiológica, cuanto menor sea la diferencia entre el nicho fundamental y el nicho ecológico, las prácticas de control vectorial que establezcan estrategias relacionadas a la susceptibilidad de las especies por los efectos del ambiente, podrían ser beneficiadas. Por ejemplo, si la probabilidad de presencia de una especie está en función de las tolerancias térmicas, los lugares donde la temperatura sea más baja que la CT<sub>min</sub>, serán zonas donde las distintas especies pueden ser más susceptibles al control. A partir de una función sigmoidea de probabilidad de presencia en función de las tolerancias, se puede plantear un modelo mecanístico sencillo que determine las zonas donde la probabilidad de presencia sea mayor en torno a las tolerancias. En relación con el control vectorial, las buenas prácticas serían beneficiadas cuando el valor de probabilidad de presencia del modelo ecofisiológico de una celda dada sea mayor a la probabilidad de presencia establecida por el modelo correlativo. Para mostrar ello, se tomó como ejemplo la distribución de *T. infestans*. Creamos un simple modelo mecanístico únicamente a partir de la CT<sub>min</sub> donde la probabilidad de presencia de la especie está en función de la hipótesis ecofisiológica:

$$P(\text{presencia}) = 1 / (1 + \exp(0,5 \times (\text{tolerancia} - \text{biovariable})))$$

Esta simple función senoide muestra la probabilidad de presencia en función de la biovariable y la tolerancia. El valor de 0,5 es la pendiente de la curva y puede ser negativa o positiva, la tolerancia corresponde al valor que toma la biovariable cuando la probabilidad es 0,5. Estos parámetros pueden modificarse en torno al conocimiento de la susceptibilidad del insecto vector. Para este caso la tolerancia es la CT<sub>min</sub> y la biovariable la temperatura mínima del mes más frío. Como resultado de este simple modelo, se puede observar el mapa resultante de la tolerancia fisiológica que se muestra en el figura 1, correspondiente al modelo mecanístico (derecha). En blanco y tonos verdes claros se observan zonas donde la probabilidad de presencia debido al efecto de la CT<sub>min</sub> y la temperatura mínima del mes más frío es más baja. En la figura 1, también se muestra el mapa resultante obtenido para esta especie en el capítulo III. Nuestro modelo mecanístico muestra que existe coincidencia en la zona austral del mapa propuesto por Schofield y colaboradores (2006) basado en los “éxitos” del control vectorial realizado para esta especie para dicha zona. Además, coincide en algunas regiones con el propuesto por la Organización Panamericana de la Salud sobre la certificación de la interrupción vectorial del vector principal (PAHO, 2012) (figura 1 del capítulo I).

Este enfoque ecofisiológico mostrado como ejemplo en *T. infestans* es tan sólo un modelo incipiente que podrá ser mejorado con el mayor conocimiento de las tolerancias de los insectos vectores, el desarrollo de curvas de respuestas según los estadios, la búsqueda de estadios con mayor sensibilidad térmica, la conjunción con otras tolerancias como la desecación, los estudios sobre la dinámica

poblacional, avances en los modelos correlativos, la generación de bases de datos sobre las coordenadas a nivel regional en las que se pueda contrastar los resultados y poner a prueba las hipótesis para las estrategias de control vectorial. Sin lugar a dudas consideramos que un enfoque que integre los modelos

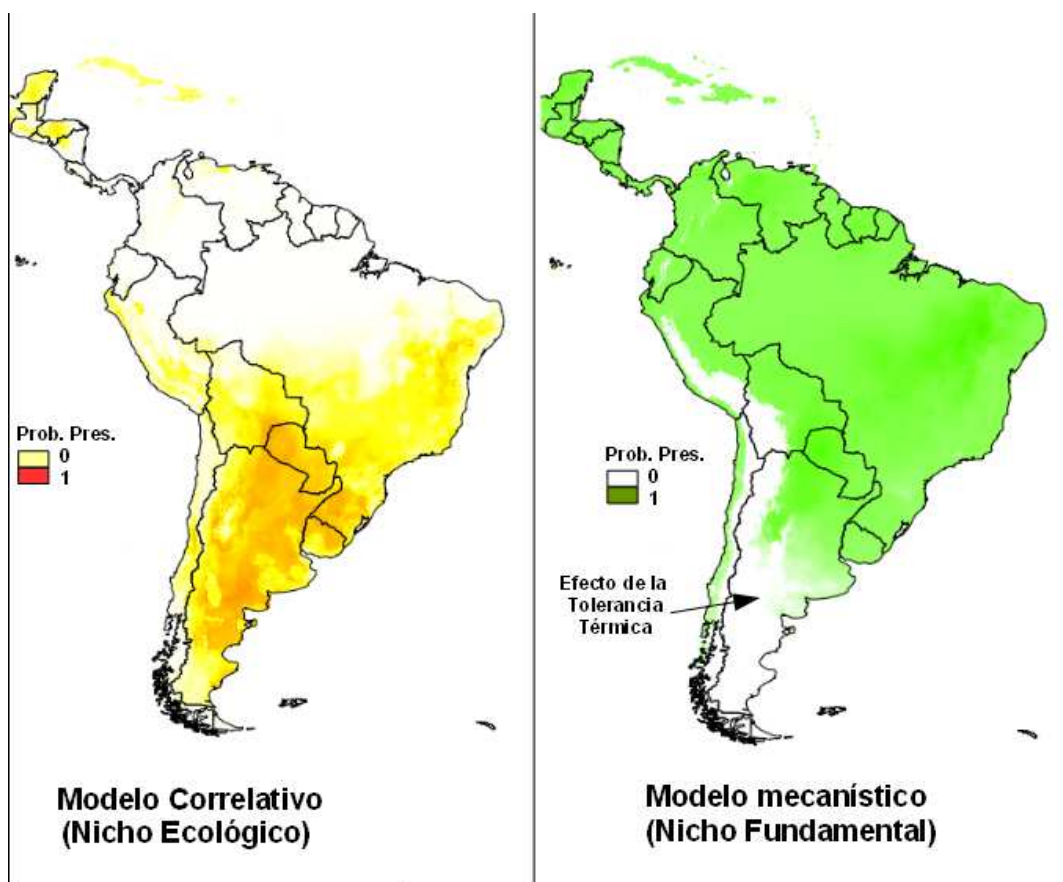


Figura 1. Mapas para *T. infestans* del modelo correlativo a la izquierda (capítulo III) y el resultante del modelo mecanístico teniendo en cuenta la temperatura crítica mínima bajo la hipótesis ecofisiológica.

correlativos para el nicho ecológico y mecanísticos para el nicho fundamental puede generar herramientas para la toma de decisiones. Este enfoque integrado podría permitir predicciones racionales y prácticas de la dinámica y el rango de distribución de las especies en entornos cambiantes (Buckley et al 2010, Arnan y Blüthgen 2015). Además, teniendo en cuenta las particularidades de las especies de triatomíneos, la población afectada y la distribución por el continente es necesario apuntar a un enfoque integral de la problemática del Chagas (Sanmartino 2009). Por lo que esta tesis ha intentado aportar su pequeño grano de arena al conocimiento de las tolerancias fisiológicas como mecanismo de explicación de los patrones de la distribución de los triatomíneos y aportar información y contribuir de forma positiva a los programas de control vectorial.

# Referencias

- Abad-Franch, F., Diotaiuti, L., Gurgel-Gonçalves, R., y Gürtler, R. E. (2013). Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(2), 251–4.
- Addo-Bediako, A., Chown, S. y Gaston, K. (2000). Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proceeding of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 267(1445), 739–745.
- Andersen, J., Manenti, T., Sørensen, J., MacMillan, H., Loeschcke, V. y Overgaard, J. (2015). How to assess *Drosophila* cold tolerance: chill coma temperature and lower lethal temperature are the best predictors of cold distribution limits. *Functional Ecology*. 29(1), 55–65.
- Angilletta M. (2009). *Thermal adaptation: A theoretical and empirical synthesis*. Oxford University Press. New York.
- Araújo, M., Ferri-Yáñez, F., Bozinovic, F., Marquet, P., Valladares, F. y Chown S. (2013). Heat freezes niche evolution. *Ecology Letters*. 16, 1206–1219.
- Arnan, X., y Blüthgen, N. (2015). Using ecophysiological traits to predict climatic and activity niches: lethal temperature and water loss in Mediterranean ants. *Global Ecology and Biogeography*. 24(12), 1454–1464.
- Barbet-Massin, M., Jiguet, F., Albert, C. y Thuiller, W. (2012). Selecting pseudo-absences for species distribution models: how, where and how many? *Methods in Ecology and Evolution*. 3(2), 327–338.
- Barrozo, R., Schilman, P., Minoli, S. y Lazzari C. (2004). Daily Rhythms in Disease-Vector Insects. *Biological Rhythm Research*. 35, 79–92.
- Belliard, S. (2015). Plasticidad de la tolerancia térmica por aclimatación en la vinchuca *Rhodnius prolixus*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.
- Benoit, J. y Denlinger, D. (2010). Meeting the challenges of on-host and off-host water balance in blood-feeding arthropods. *Journal of Insect Physiology*. 56(10), 1366–1376.
- Blaksley, J. y Carcavallo, R. (1968). La enfermedad de Chagas-Mazza en la Argentina. Ministerio de Bienestar Social. Secretaria de Estado de Salud Pública, Argentina. pp 142.
- Bozinovic, F., Calosi, P., y Spicer, J. (2011). Physiological Correlates of Geographic Range in Animals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 42(1), 155–179.
- Brown, J. (1999). The Legacy of Robert Macarthur: From Geographical Ecology to Macroecology. *Journal of mammalogy*. 80(2), 333–344.
- Brown, J., Stevens, G. y Kaufman, D. (1996). The geographic range: Size, Shape, Boundaries, and Internal Structure. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 27, 597–623.
- Buckley, L., Urban, M., Angilletta, M., Crozier, L., Rissler, L. y Sears, M. (2010). Can mechanism inform species' distribution models? *Ecology Letters*. 13(8), 1041–1054.

- Bustamante, D., Monroy, M., Rodas, A., Juarez, J., Malone, J., (2007). Environmental determinants of the distribution of Chagas disease vectors in south-eastern Guatemala. *Geospatial Health*. 2,, 199-211.
- Byrne J., Coetzee J., McConnachie A., Parasram W. y Hill M. (2004). Predicting climate compatibility of biological control agents in their region of introduction. En: Cullen J., Briese D., Kriticos D., Lonsdale W., Morin L, Scott J., editors. *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds*. CSIRO Entomology, Canberra, Australia. pp. 351–352.
- Calosi, P., Bilton, D., Spicer, J. y Atfield, A. (2008) Thermal tolerance and geographical range size in the *Agabus brunneus* group of European diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae). *Journal of Biogeography*. 35, 295–305.
- Calosi, P., Bilton, D., Spicer, J., Votier, S., y Atfield, A. (2010). What determines a species' geographical range? Thermal biology and latitudinal range size relationships in European diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae). *Journal of Animal Ecology*. 79(1), 194–204.
- Canals, M., Solis, R., Valderas, J., Ehrenfeld, M., y Cattán, P. (1997). Preliminary studies on temperature selection and activity cycles of *Triatoma infestans* and *T. spinolai*, Chilean vectors of Chagas disease. *Journal Medical Entomology*. 34, 11–17.
- Carcavallo R., Curto de Casas S., Galíndez Girón I., Jurberg J. y Mena Segura C. (1995). Geographical distribution and altitudinal dispersion of genera and species of the tribes Alberproseniini, Bolboderini and Cavernicolini (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores*. 2, 127-144.
- Carcavallo, R. (1999). Climatic factors related to Chagas disease transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94(1), 367–369.
- Carcavallo, R., Curto de Casas, S., Sherlock, I., Galíndez Girón, I., Jurberg, J., Galvao, C., Mena Segura, C.A. y Noireau, F. (1999). Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. En: *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas*. Ed: R.U. Carcavallo, I.G. Galíndez Girón, J. Jurberg y H. Lent). FioCruz, Rio de Janeiro. (3), 747–792.
- Catalá, S., Mendonça Bezerra, C. y Diotauti, L. (2015). Thermal preferences and limits of *Triatoma brasiliensis* in its natural environment-Field observations while host searching. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 110(6), 793–796.
- Cecere, MC., Vasquez-Prokopec, G., Gürtler, R. y Kitron, U. (2006). Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. 12(7), 1096–102.
- Chagas, C. (1911). Nova entidade morbida do homem: Rezumo geral de estudos etiolojicos e clinicos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 3,219-75
- Chown, S. (2001). Physiological variation in insects: hierarchical levels and implications hardiness. *Journal of Insect Physiology*. 47, 649–660.
- Chown, S. y Nicolson, S. (2004). *Insect Physiological Ecology*. Oxford University Press. NY. pp.244.
- Chown, S. y Terblanche, J. (2009). *Physiological Diversity in Insects: Ecological and*

Evolutionary Contexts. *Advances in Insect Physiology*. 33, 50–152.

Chown, S., Addo-Bediako, A., Gaston, K. (2002). Physiological variation in insects: large-scale patterns and their implication. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 131, 587–602.

Chown, S., Addo-Bediako, A., y Gaston, K. (2002). Physiological variation in insects: large-scale patterns and their. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 131, 587–602.

Chown, S., Gaston, K. y Robinson, S. (2004). Macrophysiology: large-scale patterns in physiological. *Functional Ecology*. 18,159–167.

Chown, S., Sørensen, J. y Terblanche, J. (2011). Water loss in insects: An environmental change perspective. *Journal of Insect Physiology*. 57(8), 1070–1084.

Clark, N. (1935). The effect of temperature and humidity upon the eggs of the bug, *Rhodnius prolixus* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of Animal Ecology*. 4, 82-87.

Clarke, A. (1993). Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? *Functional Ecology*. 7, 139–149.

Cloudsley-Thompson, J. (1962). Lethal temperatures of some desert arthropods and the mechanism of heat death. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 5, 270–280.

Compton, T., Rijkenberg, M., Drent, J. y Piersma, T. (2007). Thermal tolerance ranges and climate variability: a comparison between bivalves from differing climates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 352, 200–211.

Cruz, F., Fitzgerald, L., Espinoza, R. y Schulte, J. (2005). The importance of phylogenetic scale in tests of Bergmann's and Rapoport's rules: lessons from a clade of South American lizards. *Journal of Evolutionary Biology*. 18(6), 1559–74.

de Araujo-Jorge, T., Telleria, J. y Rios-Dalenz J. (2010). History of the Discovery of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). En: Telleria, J., y Tibayrenc, M. *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. Elsevier. 1:3-23.

de Souza, R., Diotaiuti, L., Lorenzo, M., y Gorla, D. E. (2010). Analysis of the geographical distribution of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) based on data of species occurrence in Minas Gerais, Brazil. *Journal of Infection, Genetics and Evolution*. 10(6), 720–760.

Diniz-Filho, J., Ceccarelli, S., Hasperué, W., y Rabinovich, J. (2013). Geographical patterns of Triatominae (Heteroptera: Reduviidae) richness and distribution in the Western Hemisphere. *Insect Conservation and Diversity*. 2013: 2–11.

Dumonteil, E., Gourbière, S., Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Félix, E., Ruiz-Piña, H., Baños-Lopez, O. y Rabinovich, J. E. (2002). Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan peninsula of Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 67(2), 176–83.

Edney, E. (1977) *Water Balance in Land Arthropods*. Springer, Germany.

Elith, J., Kearney, M. y Phillips, S. (2010). The art of modelling range-shifting species. *Methods in Ecology and Evolution*. 1(4), 330–342.

- Emerson, B. y Kolm, N. (2005). Species diversity can drive speciation. *Nature*. 434, 1015–1017.
- Ezcurra, C., Premoli, A. C., Souto, C. P., y Aizen, M. A. (2014). La vegetación de la región Andino Patagónica tiene su historia. En: Raffaele, E., Torres Curth, M., Morales, C. Kitzberger, T. *Ecología e historia natural de la Patagonia Andina: un cuarto de siglo de investigación en biogeografía, ecología y conservación*. Fundación de Historia Natural Félix de Azara. Bs As. (1),1-37.
- Feliciangeli, M., Rabinovich, J. y Fernandez, E. (1980). Resistencia al ayuno en triatominos (Hemiptera, Reduviidae) venezolanos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 22, 53–61.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and Comparative Method. *The American Naturalist*. 125(1), 1–15.
- Fergnani, P., Ruggiero, A., Ceccarelli, S., Menu, F., y Rabinovich, J. (2013). Large-scale patterns in morphological diversity and species assemblages in Neotropical Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(8), 997–1008.
- Ferreira, R., Lazzari, C., Lorenzo, M. y Pereira, M. (2007). Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? *PloS one*, 2(9), e932.
- Fresquet, N., & Lazzari, C. R. (2011). Response to heat in *Rhodnius prolixus*: the role of the thermal background. *Journal of Insect Physiology*. 57(10), 1446–1449.
- Gaston, K. (2000). Global patterns in biodiversity. *Nature* 405, 220–227.
- Gaston, K., y Blackburn, T. (2000). *Pattern and Process in Macroecology*. Malden, EEUU. Blackwell Science. (1),1-23.
- Gaston, K. y Chown, S. (1999). Elevation and climatic tolerance: a test using dung beetles. *Oikos*. 86(3), 584–590.
- Gerick, A., Munshaw, R., Palen, W., Combes, S. y O'Regan, S. (2014). Thermal physiology and species distribution models reveal climate vulnerability of temperate amphibians. *Journal of Biogeography*. 41(4), 713–723.
- Gibbs, A. (2002). Water balance in desert *Drosophila*: lessons from non-charismatic. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 133, 781–789.
- Gibbs, A. y Rajpurohit, S. (2010). Cuticular lipids and water balance. En: *Insect Hydrocarbons*. Ed: G. J. Blomquist and A. G. Bagnères. Cambridge University Press. pp. 100-120.
- Gibbs, A., Chippindale, A. y Rose, M. (1997). Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*. 200, 1821–1832.
- Gibbs, A., Fukuzato, F. y Matzkin, L. (2003). Evolution of water conservation mechanisms in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*. 206(7), 1183–1192.
- Gorla, D. (1991). Recovery of *Triatoma infestans* populations after insecticide application: an experimental field study. *Medical and Veterinary Entomology*. 5, 311–324.

- Gorla, D. (1992). Population dynamics and control of *Triatoma infestans*. Medical and Veterinary Entomology. 6, 91–97.
- Gorla, D. (2002). Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). Ecología Austral. 12, 117-127.
- Gorla, D. y Schofield, C. (1989). Population dynamic of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine Chaco. Medical and Veterinary Entomology. 4, 179–194.
- Gorla, D., y Noireau, F. (2010). 9 Geographic Distribution of Triatominae Vectors in America. En: Telleria, J., y Tibayrenc, M. American Trypanosomiasis Chagas Disease. Elsevier. 9: 210–231.
- Gouveia, S., Hortal, J., Tejedo, M., Duarte, H., Cassemiro, F., Navas, C. y Diniz-filho, J. (2014). Climatic niche at physiological and macroecological scales: the thermal tolerance – geographical range interface and niche dimensionality. Global Ecology and Biogeography. 23, 446–456.
- Graham, C. y Hijmans, R. (2006). A comparison of methods for mapping species ranges and species richness. Global Ecology and Biogeography. 15, 578–587.
- Graham, C., Elith, J., Hijmans, R., Guisan, A., Townsend Peterson, A. y Loiselle, B. (2008). The influence of spatial errors in species occurrence data used in distribution models. Journal of Applied Ecology. 45(1), 239–247.
- Graham, C., Elith, J., Hijmans, R., Guisan, A., Townsend Peterson, A. y Loiselle, B. A. (2008). The influence of spatial errors in species occurrence data used in distribution models. Journal of Applied Ecology. 45(1), 239–247.
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. Revista Biomédica. 20(3), 228–234.
- Guisan, A., y Thuiller, W. (2005). Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. Ecology Letters. 8, 993–1009.
- Guisan, A., y Zimmermann, N. E. (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. Ecological Modelling. 135(2-3), 147–186.
- Gurgel-Gonçalves, R., Abad-Franch, F., Ferreira, J., Santana, D. y Cuba, C. (2008). Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? Acta Tropica. 107(2), 90–8.
- Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J., y Peterson, a T. (2012). Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. Journal of Tropical Medicine. 2012, 1-15.
- Gürtler, R. (2011). Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 104(Suppl 1), 52–59.
- Hadley, B., Quinlan, M. y Kennedy, M (1991). Evaporative cooling in the desert cicada: Thermal efficiency and water/metabolic cost. Journal of Experimental Biology. 283, 269–283.



- Heger, T., Guerin, P. y Eugster, W. (2006). Microclimatic factors influencing refugium suitability for *Rhodnius prolixus*. *Physiological Entomology*. 31(3), 248–256.
- Hijmans, R. y Elith, J. (2013). Species distribution modeling with R Introduction. CRAN. <https://cran.r-project.org/web/packages/dismo/vignettes/sdm.pdf>
- Hijmans, R., Cameron, S., Parra, J., Jones, P. y Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 25(15), 1965–1978.
- Hill, M., Hoffmann, A., Macfadyen, S., Umina, P. y Elith, J. (2012). Understanding niche shifts: using current and historical data to model the invasive redlegged earth mite, *Halotydeus destructor*. *Diversity and Distributions*. 18(2), 191–203.
- Hoffmann, A y Blows M. (1994). Species borders: ecological and evolutionary perspectives. *Trends in Ecology and Evolution*. 9(6), 223–227.
- Huey, R., Kearney, M., Krockenberger, A., Holtum, J., Jess, M. y Williams, S. (2012). Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behaviour, physiology and adaptation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 367, 1665–1679.
- Hurlbert A. y Jetz W. (2007) Species richness, hotspots, and the scale dependence of range maps in ecology and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104: 13384–13389.
- Hypsa, V., Tietz, D., Zrzavý, J., Rego, R., Galvao, C. y Jurberg, J. (2002). Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 23(3), 447–57.
- Jetz, W., Sekercioglu, C. y Watson, J. (2008). Ecological Correlates and Conservation Implications of Overestimating Species Geographic Ranges. *Conservation Biology*. 22(1), 110–119.
- Kearney, M. (2006). Habitat, environment and niche: what are we modelling? *Oikos*. 115(1), 186–191.
- Kearney, M., y Porter, W. (2009). Mechanistic niche modelling: combining physiological and spatial data to predict species' ranges. *Ecology Letters*. 12(4), 334–50.
- Kellermann, V., Overgaard, J., Hoffmann, A., Flojgaard, C., Svenning, J y Loeschke, V. (2012). Upper thermal limits of *Drosophila* are linked to species distributions and strongly constrained phylogenetically. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(40), 16228–16233.
- Kleynhans, E. y Terblanche, J. (2011). Complex interactions between temperature and relative humidity on water balance of adult tsetse (Glossinidae, Diptera): implications for climate change. *Frontiers in Physiology*. 2(74), 1–10.
- Klok, C, Sinclair, B. y Chown, S. (2004). Upper thermal tolerance and oxygen limitation in terrestrial arthropods. *Journal of Experimental Biology*. 207, 2361–2370.

- Klok, J. y Chown, S. (1997). Critical Thermal Limits, Temperature Tolerance and Water Balance of a Sub-Antarctic Caterpillar, *Pringleophaga marioni* (Lepidoptera: Tineidae). *Journal of Insect Physiology*. 43(7), 685–694.
- Kriticos, D., Webber, B., Leriche, A., Ota, N., Macadam, I., Bathols, J. y Scott, J. (2012). CliMond: global high-resolution historical and future scenario climate surfaces for bioclimatic modelling. *Methods in Ecology and Evolution*. 3(1), 53–64.
- Kropf, S. (2009). Carlos Chagas y la ciencia en Brasil: entre el laboratorio y el debate público. *Revista Biomédica de la Universidad Autónoma de Yucatán*. 20,(3), 246–263.
- Kropf, S., Azevedo, N., Ferreira, L. (2003). Biomedical research and public health in Brazil: the case of Chagas' disease (1909-1950). *Social History of Medicine*. 16 (1), 111:129.
- Lahondère, C. y Lazzari, C. (2012). Mosquitoes cool down during blood feeding to avoid overheating. *Current Biology*. 22(1), 40–5.
- Lazzari, C. (1991). Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research*. 81(03), 273–276.
- Lazzari, C. y Núñez, J. (1989)a. The response to radiant heat and the estimation of the temperature of distant sources in *Triatoma infestans*. *Journal of Insect Physiology*. 35, 525-529.
- Lazzari, C. y Núñez, J. (1989)b. Blood temperature and feeding behavior in *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). - *Entomologia Generalis*. 14, 183-188.
- Lent, H. y Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 163, 127–520.
- Lighton, J. (2007). Hot hypoxic flies: Whole-organism interactions between hypoxic and thermal stressors in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Thermal Biology* 32(3), 134–143.
- Lighton, J. y Turner, R. (2004). Thermolimit respirometry: an objective assessment of critical thermal maxima in two sympatric desert harvester ants, *Pogonomyrmex rugosus* and *P. californicus*. *Journal of Experimental Biology*. 207, 1903–1913.
- Lighton, J., Brownell, P., Joos, B. y Turner, R. (2001). Low metabolic rate in scorpions: implications for population biomass and cannibalism. *Journal of Experimental Biology*. 204(3), 607–613.
- Lighton, J., Weier, J. y Feener, D. (1993). The energetic of locomotion and load carriage in the desert harvester ant *Pogonomyrmex rugosus*. *Journal of Experimental Biology*. 61, 49–61.
- Lobo, J., Jiménez-Valverde, A y Real, R. (2008). AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Global Ecology and Biogeography*. 17(2), 145–151.
- Lorenzo, M. y Lazzari, C. (1999). Temperature and relative humidity affect the selection of shelters by *Triatoma infestans*, vector of Chagas disease. *Acta Tropica*. 72, 241–249.
- Losos, J. B. (2008). Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*. 11,

995–1007.

Loveridge, J. (1968). The control of water loss in *Locusta migratoria migratoioides* (R & F). *Journal of Evolutionary Biology*. 49, 15–29.

Luz, C., Fargues, J. y Grunewald, J. (1999). Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) under constant and cyclic conditions of temperature and humidity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 94(3), 403–409.

Luz, C., Rocha, L., Nery, G., Magalhães, B. y Tigano, M. (2004). Activity of Oil-formulated *Beauveria bassiana* against *Triatoma sordida* in Peridomestic Areas in Central Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99,211–218.

Lyons, C., Coetzee, M., Terblanche, J. y Chown, S. (2012). Thermal limits of wild and laboratory strains of two African malaria vector species, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *Malaria Journal*. 11, 226-240.

Lyons, C., Coetzee, M., Terblanche, J. y Chown, S. (2014). Desiccation tolerance as a function of age, sex, humidity and temperature in adults of the African malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *Journal of Experimental Biology*. 217, 3823–3833.

Mac Arthur, R. (1972). *Geographical Ecology: Patterns in the Distribution of Species*. Harper & Row, New York.

Mackenzie, D. y Royle, J. (2005). Designing occupancy studies: general advice and allocating survey effort. *Journal of Applied Ecology*. 42(6), 1105–1114.

Macmillan, H., Williams, C., Staples, J. y Sinclair, B. (2012). Reestablishment of ion homeostasis during chill-coma recovery in the cricket *Gryllus pennsylvanicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(50), 20750–20755.

Markgraf, V., Mcglone, M. y Hope, G. (1995). Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems - a southern perspective. *Trends in Ecology & Evolution*. 10(4), 143-147.

Martin, P. y Lefebvre, M. (1995). Malaria Malaria Climate and Climate: Sensitivity of Potential Transmission to Climate. *Ambio*. 24(4), 200–207.

Mellanby, K. (1939). Low temperature and insect activity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 127(849), 473-487.

Mitchell, J., Hewitt, P. y van der Linde, T. (1993). Critical thermal limits and temperature tolerance in the harvester termite *Hodotermes mossambicus* (Hagen). *Journal of Insect Physiology*. 39, 523-528.

Mitchell, T., Carter, T., Jones, P, Hulme, M. y New, M. (2004). A comprehensive set of climate scenarios for Europe and the globe: the observed record (1900-2000) and 16 scenarios (2000-2100). University of East Anglia, Norwich, UK, pp. 30.

Moncayo, A. (1992). Chagas disease: Epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health Statistics Quarterly*. 45, 276–279.

Mueller, U., Mikheyev, A., Hong, E., Sen, R., Warren, D., Solomon, S. y Juenger, T. (2011).

Evolution of cold-tolerant fungal symbionts permits winter fungiculture by leafcutter ants at the northern frontier of a tropical ant-fungus symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(10), 4053–4056.

Okasha, A. (1964). Effects of high temperature in *Rhodnius prolixus* (Stål). *Nature* 204: 1221-1222.

Okasha, A. (1968)a. Effects of sub-lethal high temperature on an insect, *Rhodnius prolixus* (Stål). *Journal of Experimental Biology*. 48, 455–463.

Okasha, A. (1968)b. Changes in the respiratory metabolism of *Rhodnius prolixus* as induced by temperature. *Journal of Insect Physiology*. 14, 1621-1634.

PAHO - Pan American Health Organization (2012). Reunión Sudamericana de Iniciativa Subregionales de Prevención, Control y Atención de la Enfermedad de Chagas, Buenos Aires, Argentina, 27-29 de Agosto del 2012. Disponible en: <http://www.paho.org/>

Parkash, R., Rajpurohit, S. y Ramniwas, S. (2008). Changes in body melanisation and desiccation resistance in highland vs. lowland populations of *D. melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 54(6), 1050–1056.

Patterson, J. y Guhl, F. (2010). Geographical Distribution of Chagas Disease. En: Telleria, J., y Tibayrenc, M. *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. Elsevier. 5:84-114.

Pearson, R., y Dawson, T. (2003). Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography*, 12(5), 361–371.

Phillips, S., Anderson, R. y Schapire, R. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 190(3-4), 231–259.

Pires, H., Lazzari, C., Schilman, P. y Diotaiuti, L. (2002). Dynamics of Thermopreference in the Chagas Disease Vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. 39(5), 716–719.

Pittendrigh, S. (1950). The Ecotopic Specialization of *Anopheles homunculus*; and Its Relation to Competition with *A. bellator*. *Evolution*. 4(1), 64–78.

Pörtner, H. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*. 88(4), 137–146.

Prange, H. (1996). Evaporative cooling in insects. *Journal of Insect Physiology*. 42(5), 493–499.

R - Development Core Team. (2013). A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.

Rabinovich, J. (2013). Large-scale patterns in morphological diversity, and species assembly in Neotropical Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). [dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.653959.v6](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.653959.v6)

Rapoport, E. (1982). *Areography. Geographical Strategies of Species*. Trad. B. Drausal, Pergamon Press, Oxford.

Renault, D., Vernon, P. y Vannier, G. (2005). Critical thermal maximum and body water loss in first instar larvae of three Cetoniidae species (Coleoptera). *Journal of Thermal Biology*. 30(8),

611–617.

Richmond, O., McEntee, J., Hijmans, R. y Brashares, J. (2010). Is the climate right for pleistocene rewilding? Using species distribution models to extrapolate climatic suitability for mammals across continents. *PloS one*. 5(9), e12899.

Roca, M. y Lazzari, C. (1994). Effects of the relative humidity on the haematophagous bug *Triatoma infestans*. Higr preference and eclosion success. *Journal of Insect Physiology*. 40, 901–907.

Rodriguero, M., y Gorla, D. (2004). Latitudinal gradient in species richness of the New World Triatominae (Reduviidae). *Global Ecology and Biogeography*. 13(1), 75–84.

Rolandi C. y Schilman P. (2012) Linking global warming, metabolic rate of hematophagous vectors, and the transmission of infectious diseases. *Frontiers Physiology* 3(75), 1-3.

Rolandi, C., Iglesias, M. y Schilman, P. (2014). Metabolism and water loss rate of the haematophagous insect *Rhodnius prolixus*: effect of starvation and temperature. *Journal of Experimental Biology*. 217, 4414–4422.

Romana, C. (1961). Epidemiología y distribución geográfica de la enfermedad de chagas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 11,390–403.

Salin, C., Vernon, P. y Vannier, G. (1999). Effects of temperature and humidity on transpiration in adults of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Insect Physiology*. 45, 907–914.

Sanmartino, M. (2009). 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva. *Revista Sociedad Entomológica Argentina*, 68(3-4), 243–252.

Schilman, P., Lighton, J. y Holway, D. (2007). Water balance in the Argentine ant (*Linepithema humile*) compared with five common native ant species from southern California. *Physiological Entomology*. 32(1), 1–7.

Schilman, P., Minoli, S. y Lazzari, C. (2009). The adaptive value of hatching towards the end of the night: lessons from eggs of the haematophagous bug *Rhodnius prolixus*. *Physiological Entomology*. 34(3), 231–237.

Schilman, P., y Lazzari, C. (2004). Temperature preference in *Rhodnius prolixus*, effects and possible consequences. *Acta Tropica*. 90(1), 115–122.

Schofield, C. y Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*. 110, 88–100.

Schofield, C., Jannin, J. y Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, 22(12), 583–8.

Sexton, J., McIntyre, P., Angert, A. y Rice, K. J. (2009). Evolution and Ecology of Species Range Limits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 40(1), 415–436.

Spicer J, Gaston K. (1999). *Physiological diversity and its ecological implications*. Blackwell Science, Oxford. 235 pp.

Stevens, F., Dorn, P., Schmidt, J., Klotz, J. y Klotz, S. (2011). *Kissing Bugs. The Vectors of*

Chagas. Chagas Disease. Elsevier 75,169–192.

Stevens, G. (1989). The Latitudinal Gradient in Geographical Range. How so Many Species Coexist in the Tropics. *The American Naturalist*. 133(2), 240–256.

Stevens, M., Jackson, S., Bester, S., Terblanche, J. y Chown, S. (2010). Oxygen limitation and thermal tolerance in two terrestrial arthropod species. *Journal of Experimental Biology*. 213, 2209–2218.

Sunday, J., Bates, A. y Dulvy, N. (2011). Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceeding of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 278(1713), 1823–1830.

Sunday, J., Bates, A., Kearney, M., Colwell, R., Dulvy, N., Longino, J. y Huey, R. (2014). Thermal-safety margins and the necessity of thermoregulatory behavior across latitude and elevation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111(15), 5610–5615.

Svenning, J., Normand, S. y Kageyama, M. (2008). Glacial refugia of temperate trees in Europe: insights from species distribution modelling. *Journal of Ecology*. 96(6), 1117–1127.

Taylor, P. y Gaines, S. (1999). Can Rapoport's rule be rescued? Modeling causes of the latitudinal gradient in species richness. *Ecology*. 80, 2474–2482.

Tee, H. y Lee, C. (2015). Water balance profiles, humidity preference and survival of two sympatric cockroach egg parasitoids *Evania appendigaster* and *Aprostocetus hagenowii* (Hymenoptera: Evaniidae; Eulophidae). *Journal of Insect Physiology*. 77, 45–54.

Terblanche, J., Klok, J., Krafur, E. y Chown, S. (2006). Phenotypic plasticity and geographical variation in thermal tolerance and water loss of the Tsetse *Glossina pallidipes* (Diptera: Glossinidae): Implication for distribution modelling. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 74(5), 786–794.

Terblanche, J., Sinclair, B., Klok, J., McFarlane, M. y Chown, S. (2005). The effects of acclimation on thermal tolerance, desiccation resistance and metabolic rate in *Chirodica chalconota* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Physiology*. 51(9), 1013–1023.

Terribile, L., Diniz-Filho, J. y De Marco jr, P. (2010). How many studies are necessary to compare niche-based models for geographic distributions? Inductive reasoning may fail at the end. *Brazilian Journal of Biology*. 70(2), 263–269.

Toolson, E. (1987). Water Profligacy as an Adaptation to Hot Deserts: Water Loss Rates and Evaporative Cooling in the Sonoran Desert Cicada, *Diceroprocta apache* (Homoptera: Cicadidae). *Physiological Zoology*. 60(4), 379–385.

VanDerWal, J., Shoo, L., Graham, C. y Williams, S. (2009). Selecting pseudo-absence data for presence-only distribution modeling: How far should you stray from what you know? *Ecological Modelling*. 220(4), 589–594.

Vannier, G., (1994). The thermobiological limits of some freezing intolerant insects: the supercooling and thermostupor points. *Acta Oecologica*. 15, 31–42.

Warren, M., Robertson, M. y Greeff, J. (2010). A comparative approach to understanding

- factors limiting abundance patterns and distributions in a fig tree-fig wasp mutualism. *Ecography*. 33(1), 148–158.
- WHO- Expert Committee World Health Organization. (2002). CONTROL OF CHAGAS DISEASE Second report of the WHO. Technical Report Series. 905.
- Wigglesworth, B. (1944). Transpiration through the cuticle of insects. *Journal of Experimental Biology*. 21, 97–118.
- Wisnivesky-Colli, C., Vezzani, D., Pietrokovsky, S., Scurti, H. y Iriarte, J. (2003). Ecological characteristics of *Triatoma patagonica* at the southern limit of its distribution (Chubut, Argentina). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98(8), 1077–1081.
- Yamana, T. y Eltahir, E. (2013). Incorporating the effects of humidity in a mechanistic model of *Anopheles gambiae* mosquito population dynamics in the Sahel region of Africa. *Parasites & Vectors*. 6(1), 235-245.
- Zachariassen, K. (1996). the water conserving physiological compromise of desert insects. *European Journal of Entomology*. 3, 359–367.
- Zeledón, R., Guardia, V., Zúñiga, M. y Swartzwelder J. (1970). Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) adults. *Journal of Medical Entomology*. 7,313–319.
- Zuur, A., Ieno, E. y Elphick, C. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*. 1(1), 3–14.

***de Triatoma infestans.***

Para esta sección se muestra los resultados para la elección de la metodología de “*chill-coma recovery time*”. Se trabajó con *T. infestans* y se eligió exponer durante 4 horas a *ca.* de cero grados ya que se observa menor variación del tiempo de recuperación que en tiempos menores y similares valores promedios que a tiempos mayores (fig.1). Por otro lado, en adultos no se observaron diferencias significativas entre sexos ( $T_{7,72}=0,27$ ,  $p=0,79$ ) por lo que se utilizaron los datos de hembras y machos en un sólo nivel, “adultos”. Se observaron diferencias significativas entre adultos y los demás estadios, y entre el estadio N4 y N5 contra los demás estadios inferiores

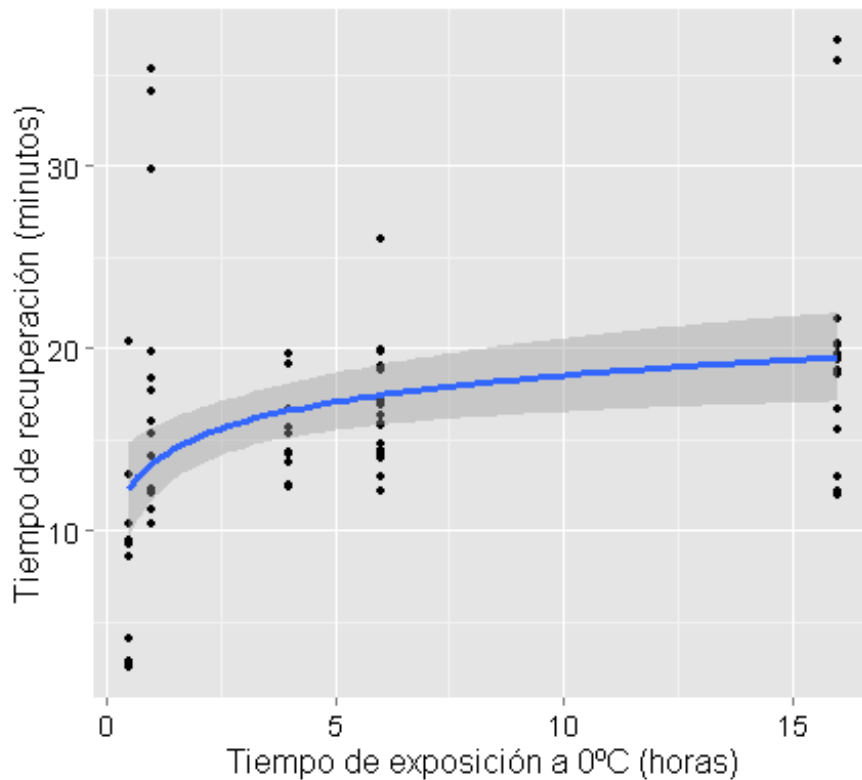


Figura 1.- Tiempo de Recuperación según tiempo de exposición cercana a cero grados para *T.infestans* (N5).



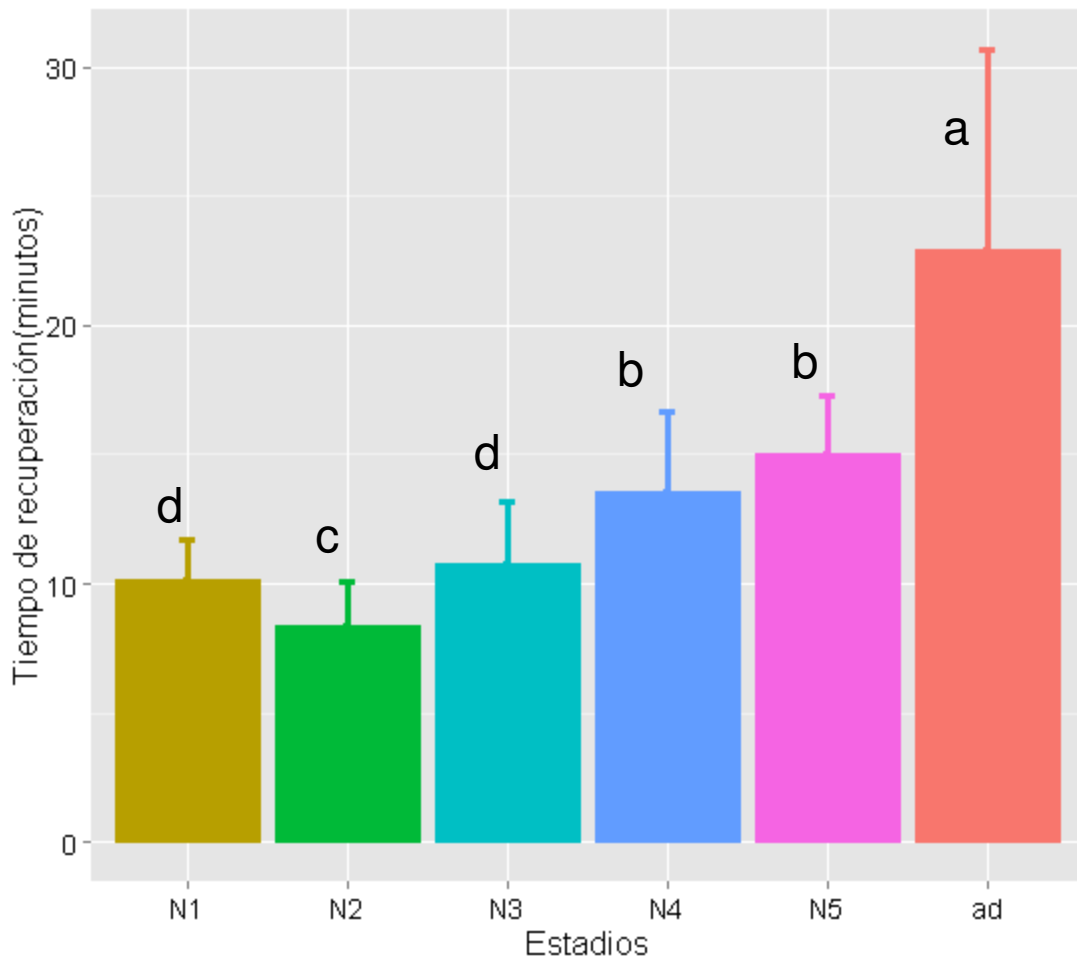


Figura 2.- Tiempo de recuperación según los estadios de *T. infestans*.

Figura 3. Análisis del efecto de las variables sobre el AUC (“area under the curve”) mediante jackknife para los modelos de distribución realizados con maxent para el capítulo III.

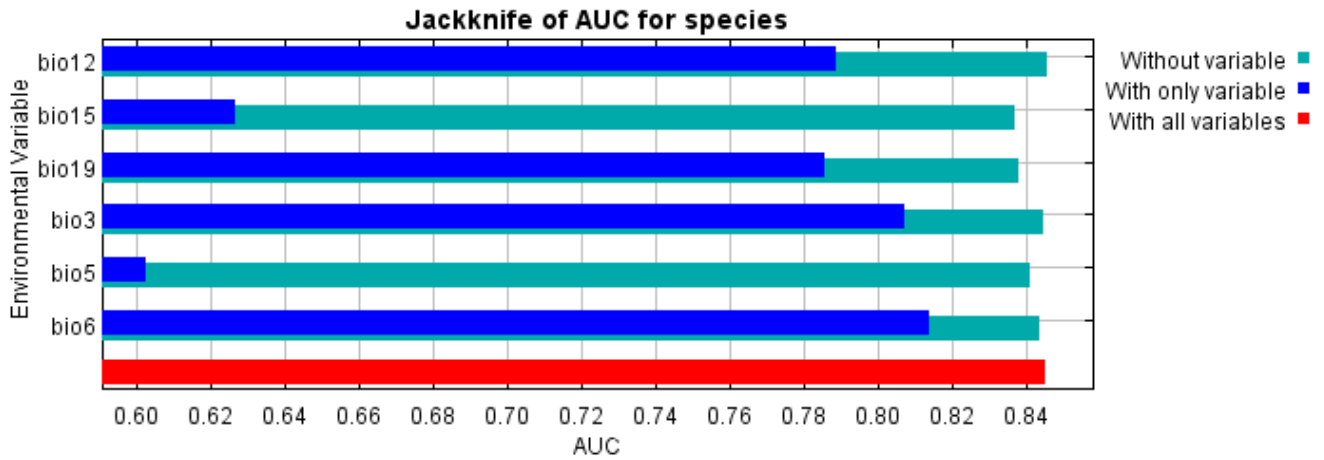


Figura 3.1: *Rhodnius prolixus*

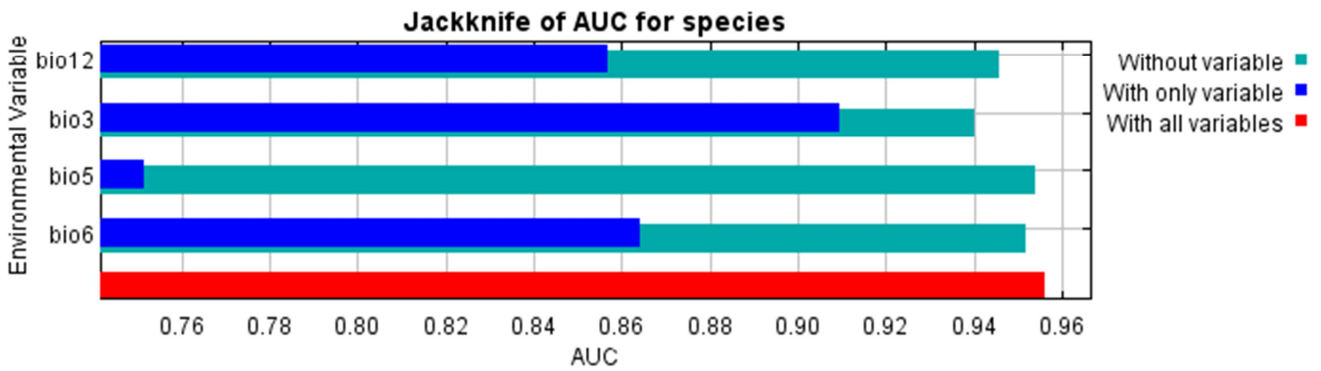


Figura 3.2: *T. delpontei*

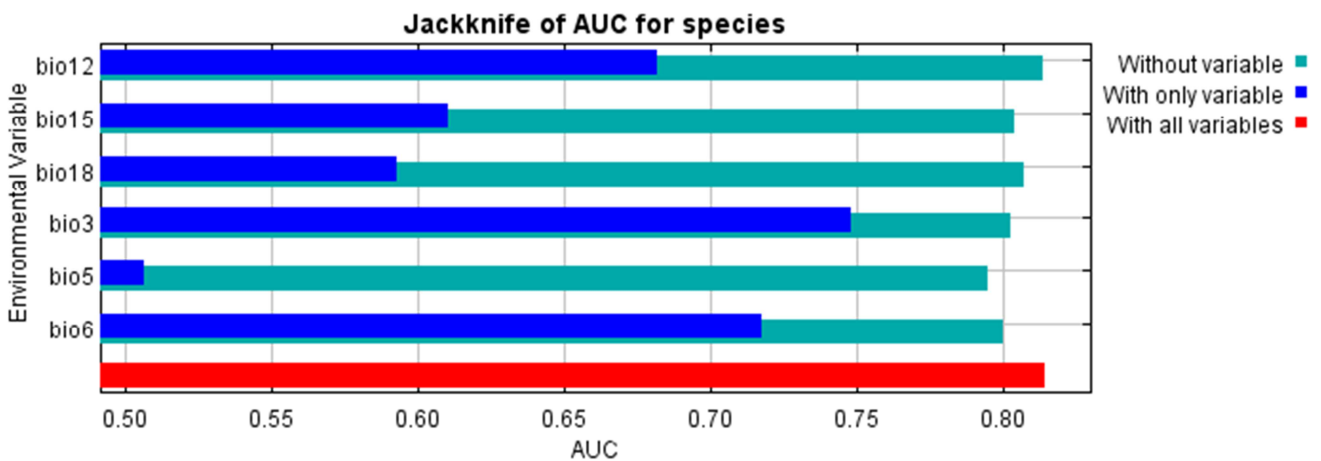


Figura 3.3: *T. dimidiata*

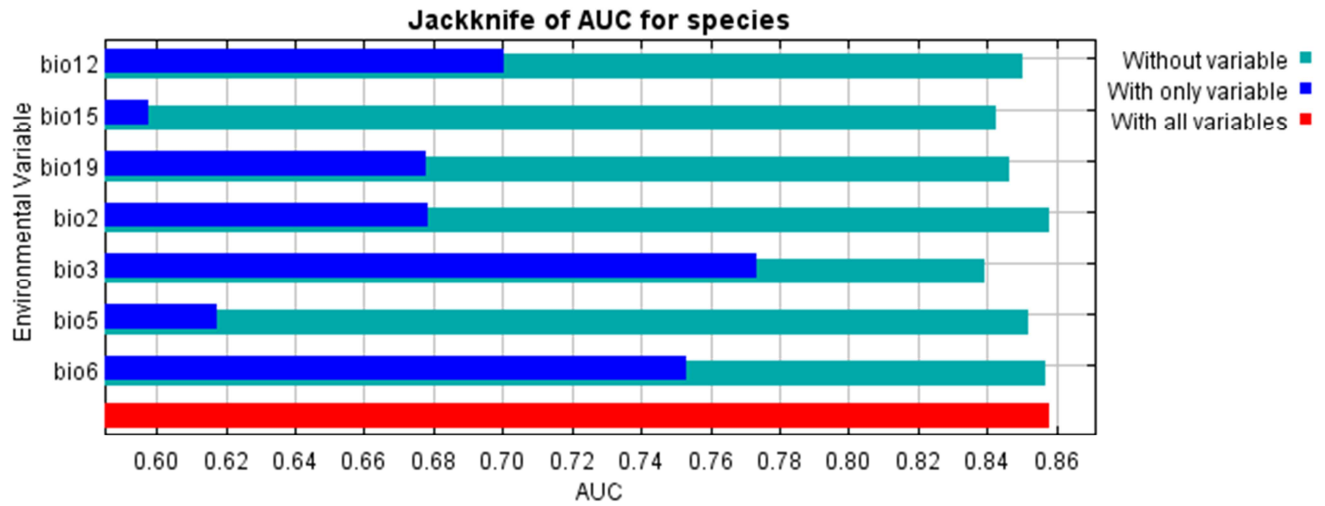


Figura 3.4: *T. infestans*

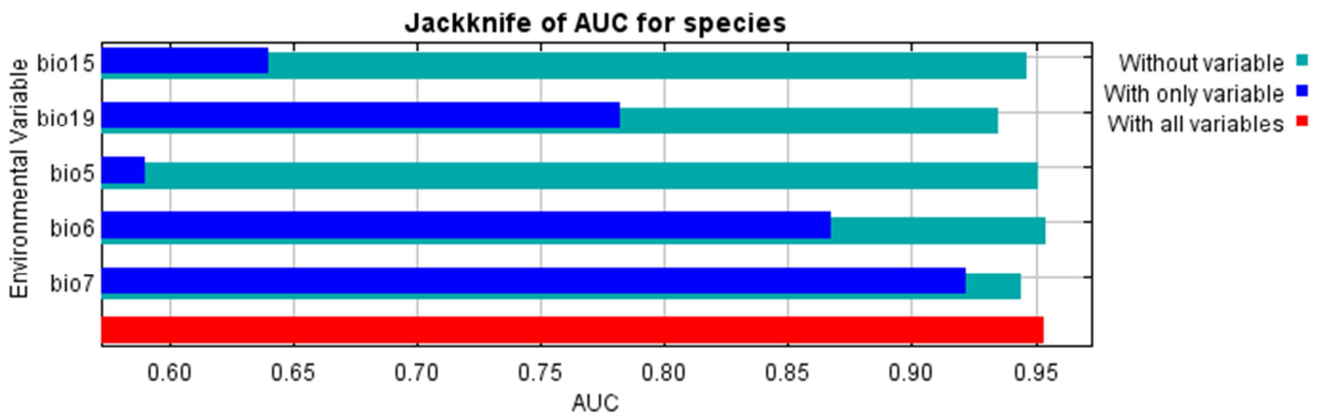


Figura 3.5: *T. patagonica*

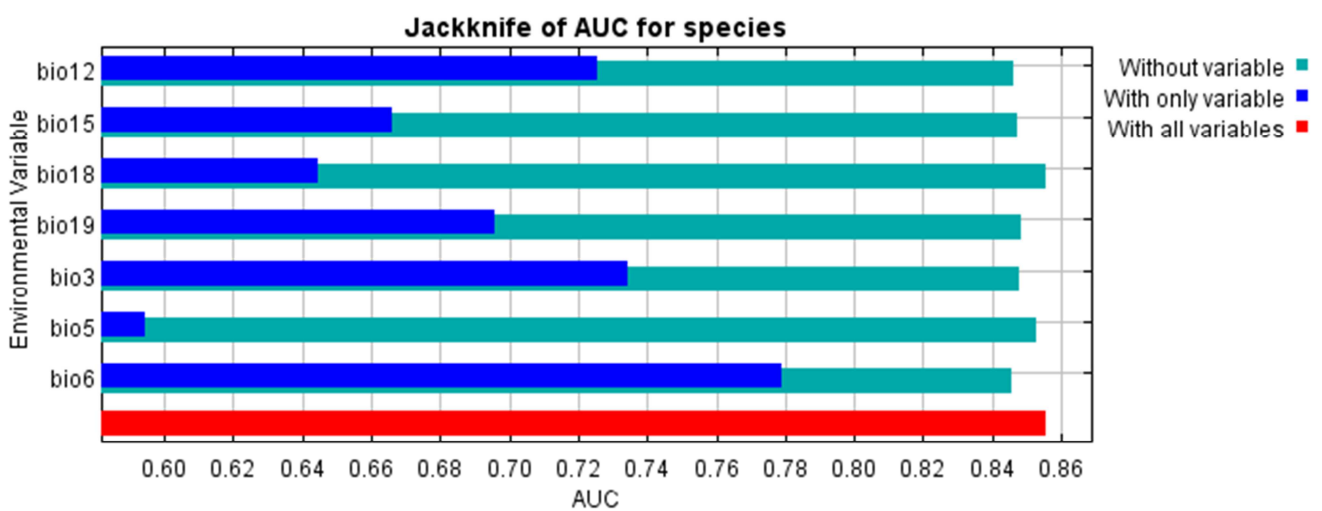


Figura 3.6: *T. sordida*

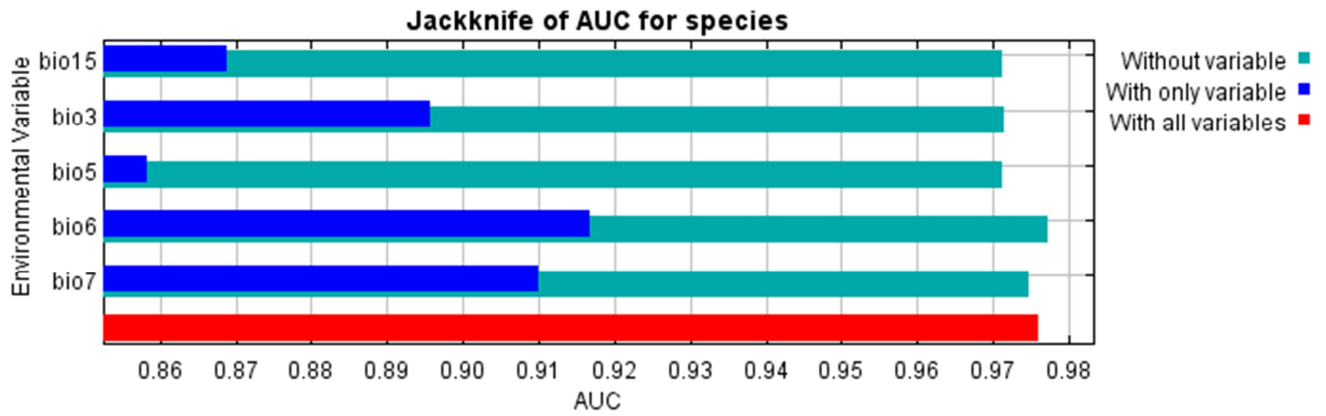


Figura 3.7: *T. vitticeps*

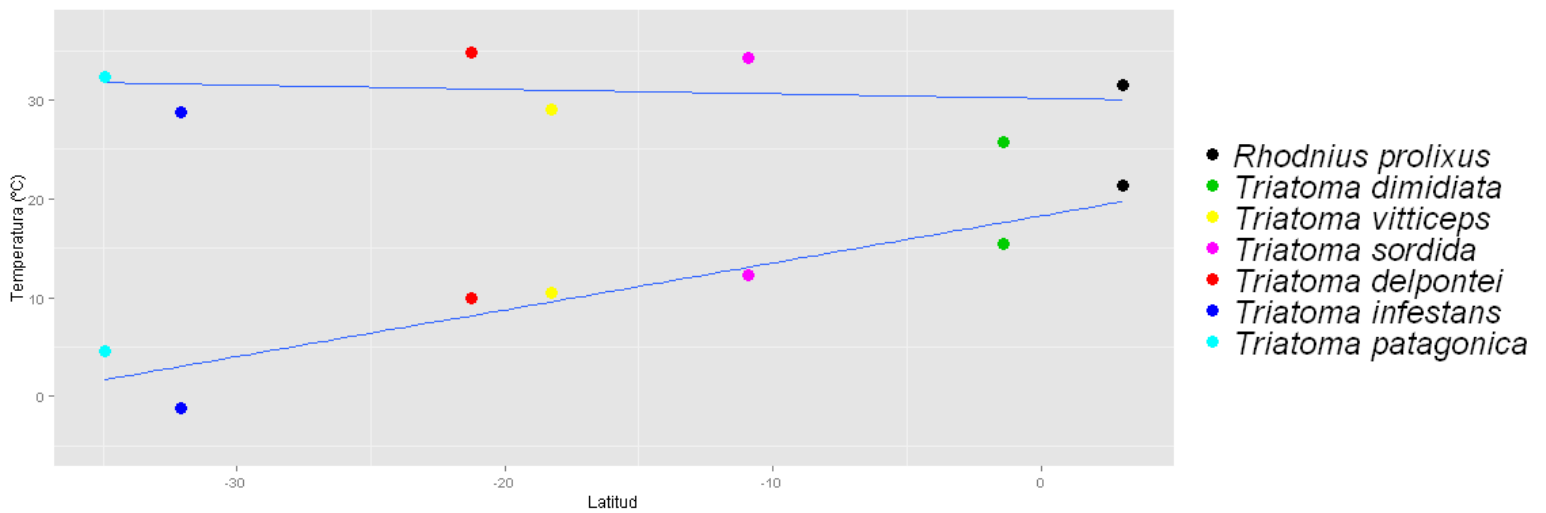


Figura 4. Relación entre las temperaturas extremas máximas y mínimas para el centro de máxima probabilidad de cada especie y la latitud.

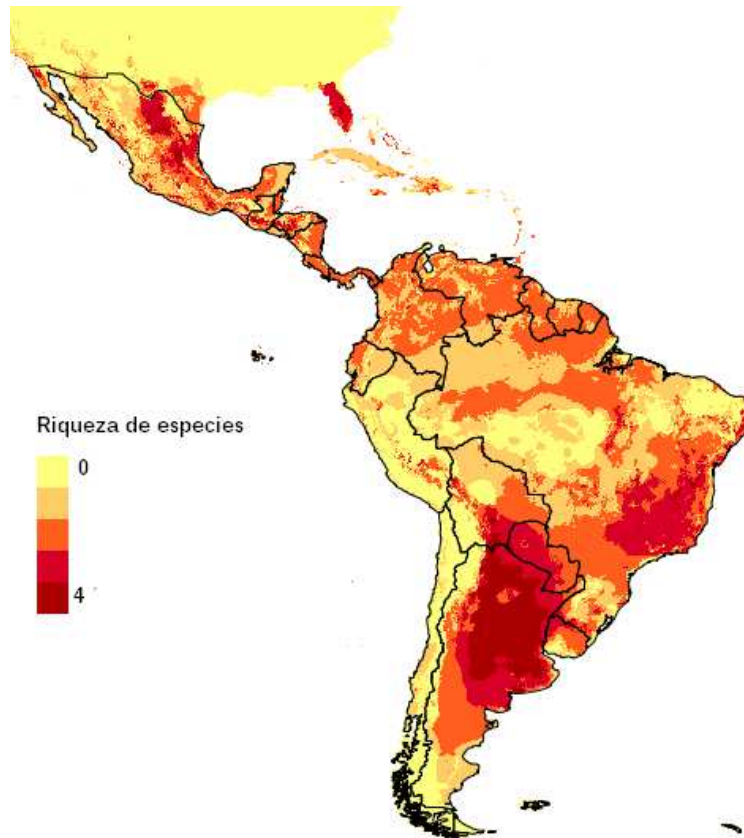


Figura 5. Riqueza específica para los triatomines estudiados en este trabajo para el capítulo III.

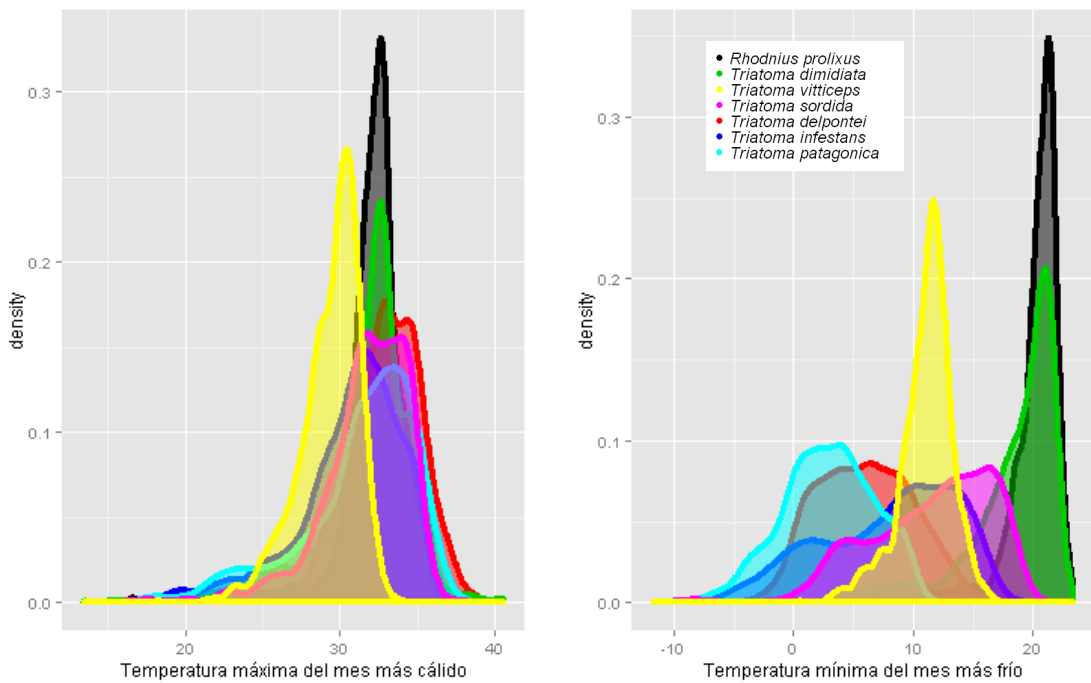


Figura 6. Relación entre las temperaturas extremas máximas y mínimas para la distribución de cada especie.

Figura 7. Análisis del efecto de las variables sobre el AUC (“area under the curve”) mediante jackknife para los modelos de distribución realizados con maxent para el capítulo V.

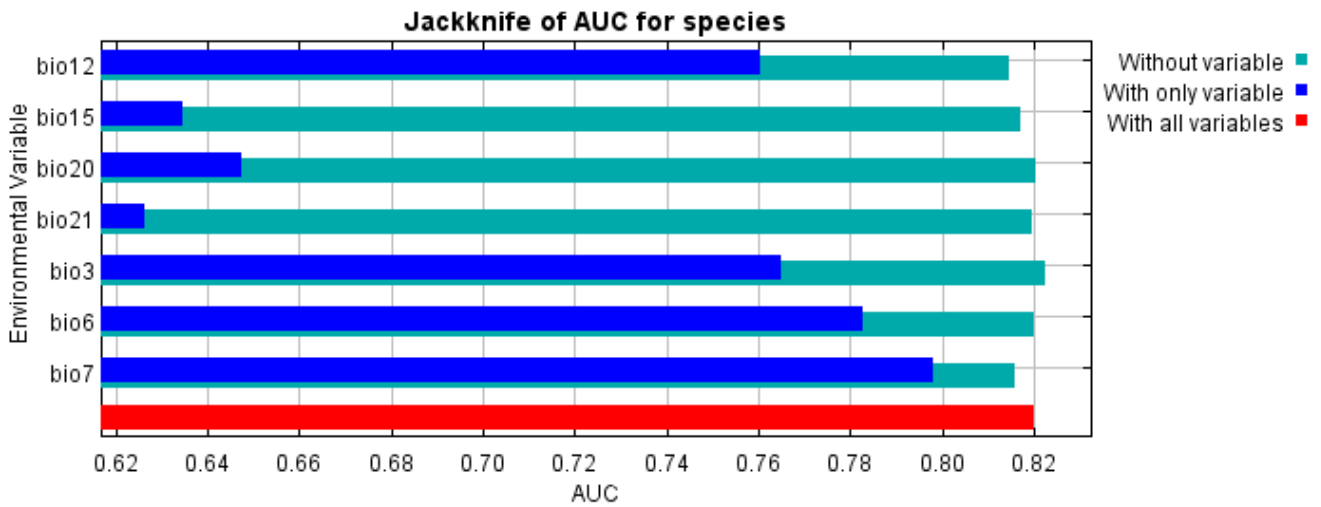


Figura 7.1: *Rhodnius prolixus*

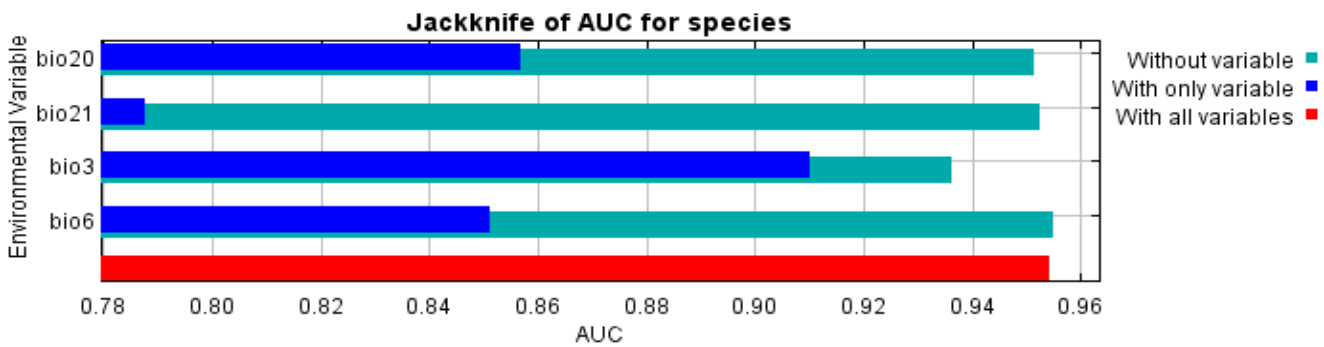


Figura 7.2: *T. delpontei*

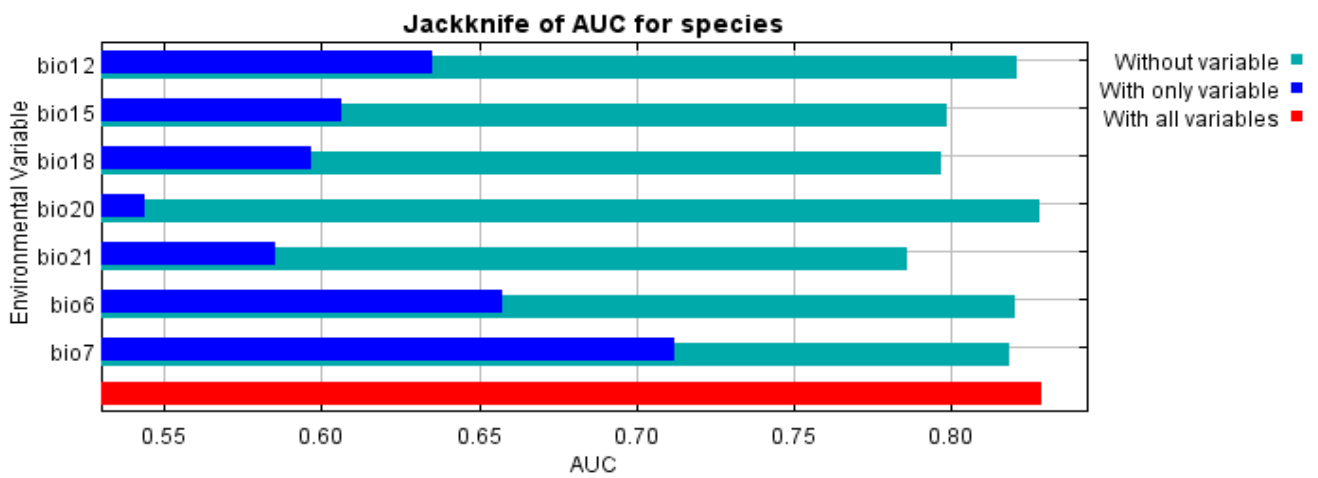


Figura 7.3: *T. dimidiata*

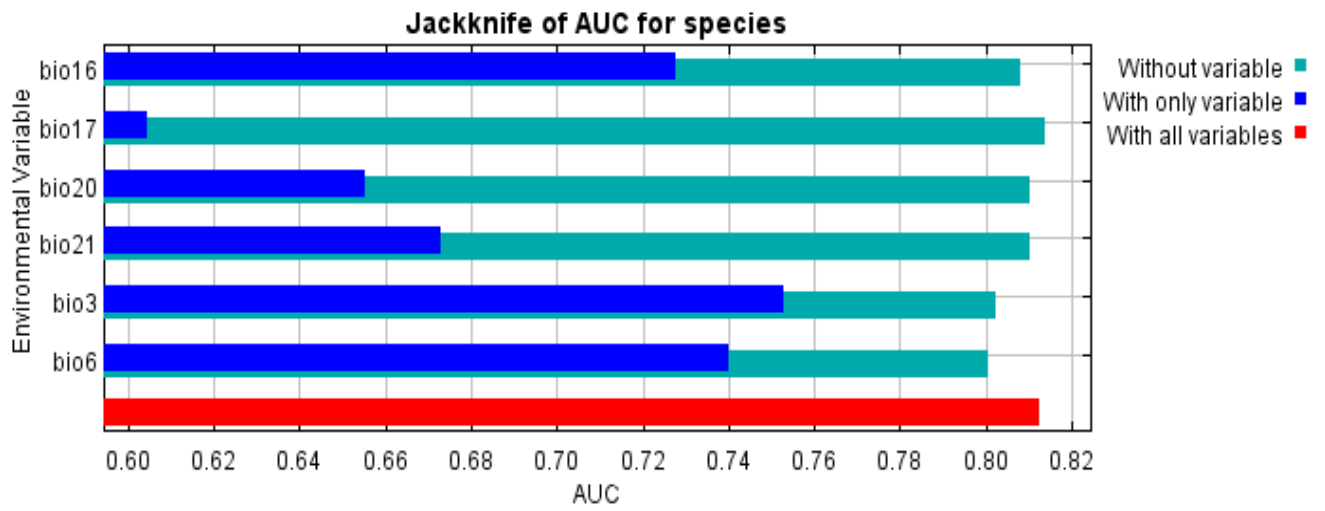


Figura 7.4: *T. infestans*

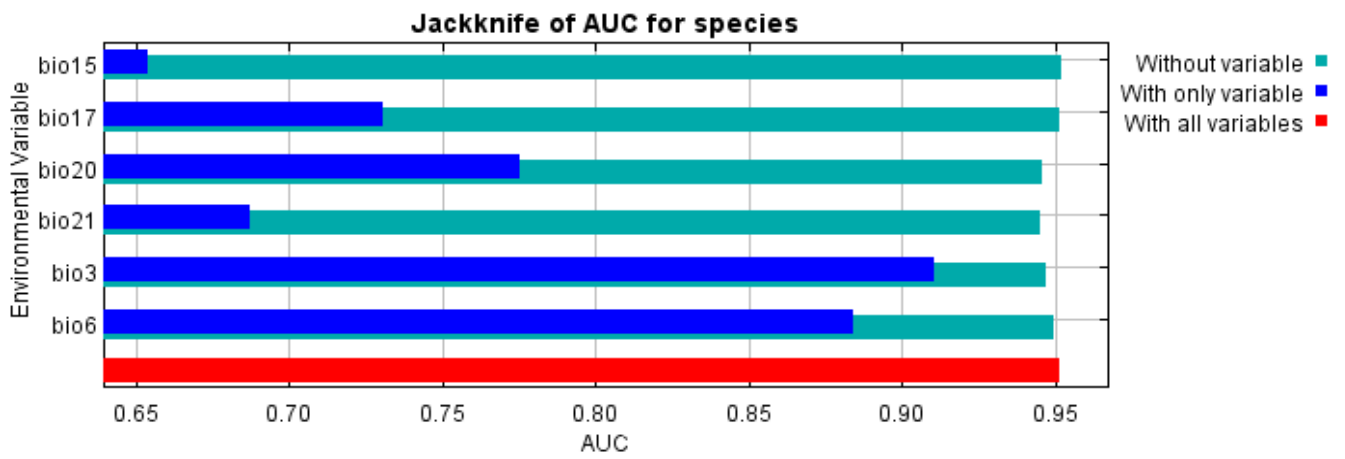


Figura 7.5: *T. patagonica*

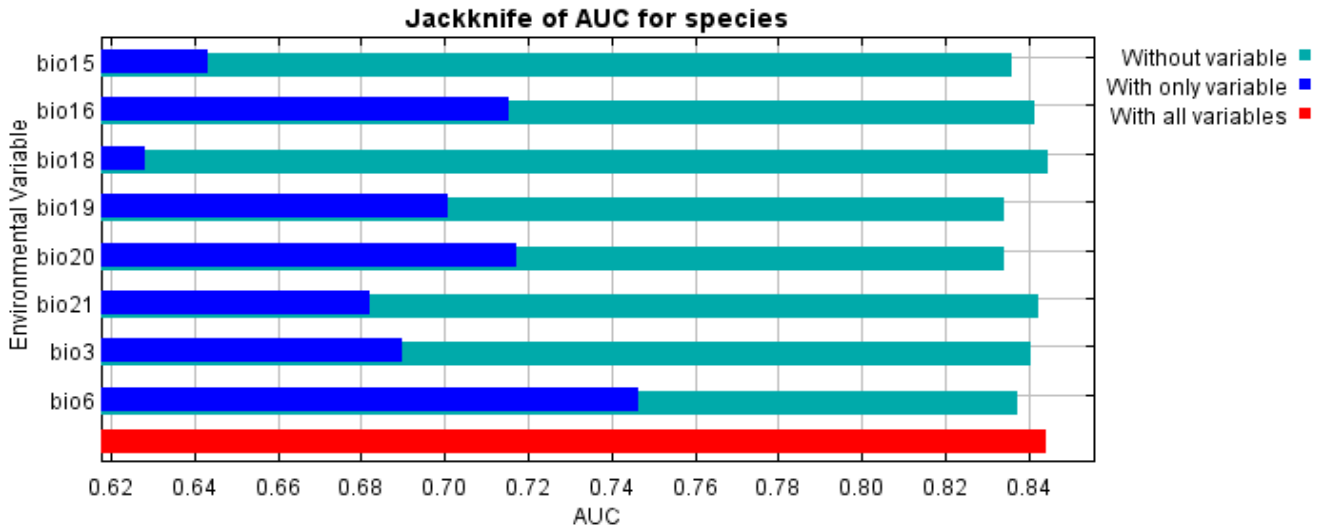


Figura 7.6: *T. sordida*

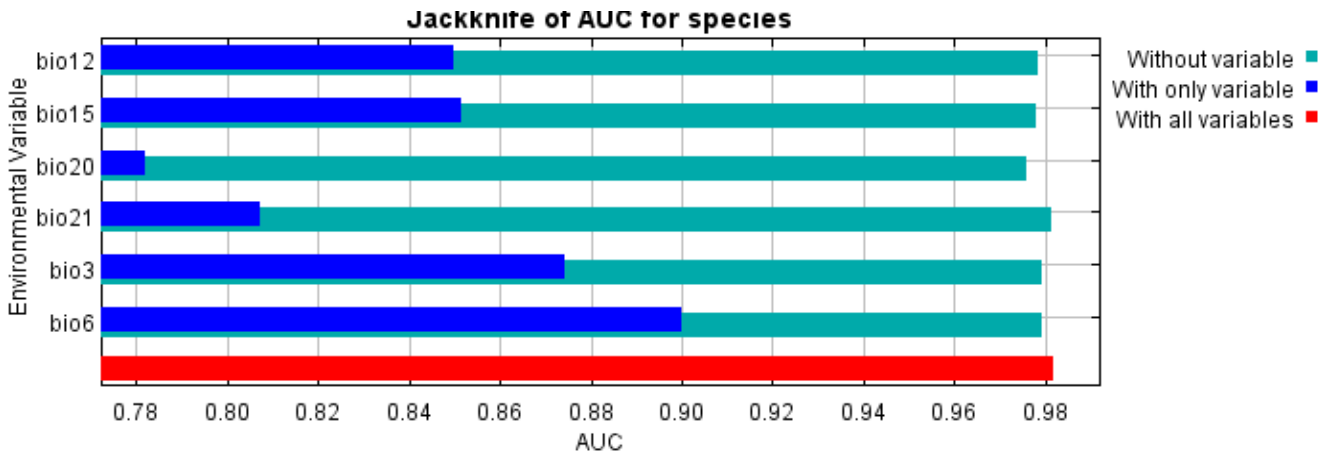


Figura 7.7: *T. vitticeps*



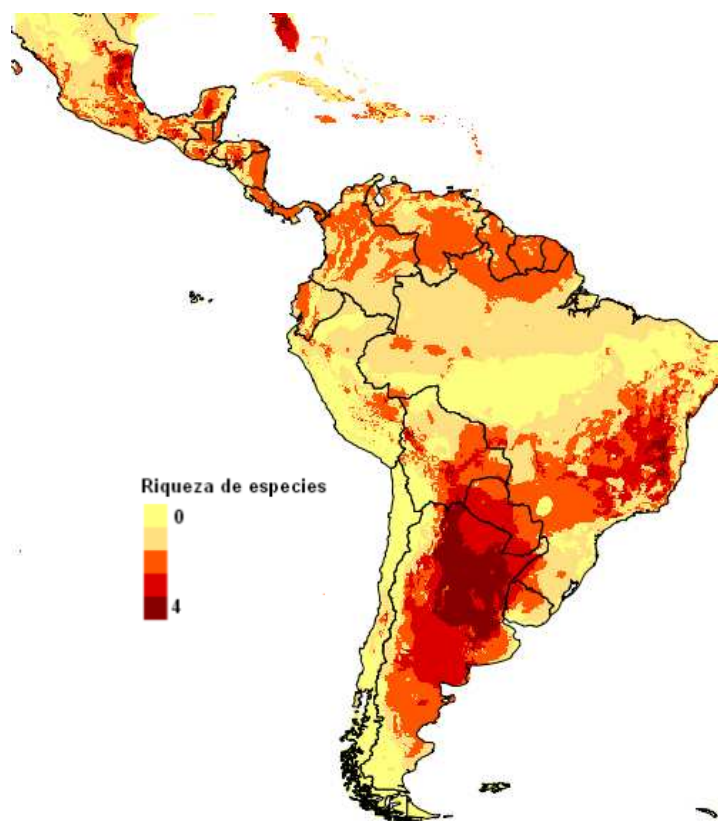


Figura 8. Riqueza específica para los triatomíneos estudiados en este trabajo para el capítulo V.

Tabla 1. Comparación de la liberación de CO<sub>2</sub> y de la temperatura para los valores de entrada y salida de la meseta (fase 3) en cada especie.

Especies	VCO <sub>2</sub>	TEMPERATURA
<i>Rhodnius prolixus</i>	t = -1.8902, df = 14, p-value = 0.07962	T = -10.5417, df = 14, p-value <0.00001
<i>Triatoma delpontei</i>	t = -4.2727, df = 17, p-value = 0.0005144	t = -12.5829, df = 17, p-value <0.00001
<i>Triatoma dimidiata</i>	t = -0.4682, df = 10, p-value = 0.6497	t = -5.5318, df = 10, p-value = 0.0002504
<i>Triatoma infestans</i>	t = 0.3955, df = 13, p-value = 0.6989	t = -9.0141, df = 13, p-value <0.00001
<i>Triatoma patagonica</i>	t = -2.1665, df = 12, p-value = 0.05111	t = -10.5557, df = 12, p-value <0.00001
<i>Triatoma sordida</i>	t = -1.5688, df = 15, p-value = 0.1376	t = -11.9567, df = 15, p-value <0.00001
<i>Triatoma vitticeps</i>	t = -0.0059, df = 9, p-value = 0.9954	t = -6.5778, df = 9, p-value = 0.0001018

Tabla 2. Comparación entre los criterios de determinación de la temperatura crítica máxima, a partir de la liberación de CO<sub>2</sub> (CTmax CO<sub>2</sub>) y mediante la actividad (CTmax ACT).

Especies	CTmax CO <sub>2</sub> VS CTmax ACT
<i>Rhodnius prolixus</i>	t = -1.4496, df = 15, p-value = 0.1678
<i>Triatoma delpontei</i>	t = 2.3245, df = 17, p-value = 0.03274
<i>Triatoma dimidiata</i>	t = 1.4409, df = 10, p-value = 0.1802
<i>Triatoma infestans</i>	t = -0.2672, df = 14, p-value = 0.7932
<i>Triatoma patagonica</i>	t = -0.6426, df = 12, p-value = 0.5326
<i>Triatoma sordida</i>	t = 0.0905, df = 15, p-value = 0.9291
<i>Triatoma vitticeps</i>	t = -0.7788, df = 9, p-value = 0.4561

Tabla 3. Comparación entre la temperatura crítica máxima (CTmax) y la temperatura letal superior (ULT) de cada especie.

CTmax VS ULT
t = 6.0113, df = 28.8, p-value <0.0001
t = 2.0035, df = 33.337, p-value = 0.05331
t = 1.5696, df = 18.581, p-value = 0.1334
t = 4.9006, df = 26.563, p-value <0.0001
t = 1.991, df = 22.321, p-value = 0.05886
t = 2.4809, df = 29.66, p-value = 0.01901
t = 1.5344, df = 13.93, p-value = 0.1473

Tabla 4. Importancias relativas de las variables según el análisis de permutación.

Variables	<i>T. infestans</i>	<i>T. vitticeps</i>	<i>T. delpontei</i>	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. patagonica</i>	<i>T. sordida</i>	<i>R. prolixus</i>
BIO 1	-	-	-	-	-	-	-
BIO 2	2.6	-	-	-	-	-	-
BIO 3	36.2	7.8	55.1	7.1	-	31.0	11.0
BIO 5	4.0	6.8	3.3	18.1	2.9	3.6	9.8
BIO 6	17.0	15.3	13.3	44.2	1.7	16.1	59.8
BIO 7	-	43.6	-	-	56.0	-	-
BIO 12	9.2	-	28.2	7.2	-	19.1	3.5
BIO 15	13.6	26.4	-	13.9	7.2	7.2	5.6
BIO 18	-	-	-	9.6	-	11.6	-
BIO 19	17.4	-	-	-	32.3	11.3	10.3

Tabla 5. Valores crítico utilizado sobre los mapas de probabilidades: máximo de la suma de sensibilidad (porcentaje de verdadero positivos) y especificidad (porcentaje de verdaderos negativos)

Especie	valor crítico de probabilidad
<i>Rhodnius prolixus</i>	0.35019951
<i>Triatoma delpontei</i>	0.14445917
<i>Triatoma dimidiata</i>	0.44318883
<i>Triatoma infestans</i>	0.33941446
<i>Triatoma patagonica</i>	0.13031596
<i>Triatoma sordida</i>	0.30948289
<i>Triatoma vitticeps</i>	0.36729889

Tabla 6. Elementos probados para oclusión de la proboscis de *R. prolixus*. Se realizaron varias pruebas con los materiales aquí citados encontrando distintos problemas sintetizados en las observaciones de la tabla.

Material	Observaciones
<i>Cera de abeja</i>	Orgánica, difícil manipulación para tapar proboscis riesgo de fusión a temperaturas del CTmax
<i>Pintura Latex</i>	Inorgánica, difícil manipulación para tapar proboscis riesgo de fusión a temperaturas del Ctmax
<i>Pegamento de alta temperatura</i>	Inorgánica, difícil manipulación para tapar proboscis
<i>Parafina</i>	Orgánica, difícil manipulación para tapar proboscis riesgo de fusión a temperaturas del CTmax
<i>Adhesivo instantáneo</i>	Inorgánica, difícil manipulación para tapar proboscis

Video 1: [https://youtu.be/0miT1Kjo6\\_A](https://youtu.be/0miT1Kjo6_A)

Video 2: [https://youtu.be/M\\_bvnKfun5Y](https://youtu.be/M_bvnKfun5Y)

Tabla 7. Importancia relativa de las variables según análisis por permutaciones.

<b>VARIABLES</b>	<i>R. prolixus</i>	<i>T. vitticeps</i>	<i>T. delpontei</i>	<i>T. dimidiata</i>	<i>T. patagonica</i>	<i>T. sordida</i>	<i>T. infestans</i>
<b>BIO 3</b>	4,4	12,3	82,6	-	43,3	9,5	16
<b>BIO 6</b>	11,1	21,8	2,2	9,6	16,8	23,2	44,4
<b>BIO 7</b>	50,2	-	-	15,2	-	-	-
<b>BIO 12</b>	15,2	5,2	-	15,6	-	-	-
<b>BIO 15</b>	4,2	24,2	-	11,8	1,1	6,7	-
<b>BIO 16</b>	-	-	-	-	-	14,6	20,6
<b>BIO 17</b>	-	-	-	-	8	-	1,1
<b>BIO 18</b>	-	-	-	13,8	-	6,8	-
<b>BIO 19</b>	-	-	-	-	-	10,5	-
<b>BIO 20</b>	8,1	25,4	11,1	11,4	20,6	20,2	6,8
<b>BIO 21</b>	4,1	11,1	3,7	22,5	10,2	8,3	11,1

Tabla 8. Valores crítico utilizado sobre los mapas de probabilidades: máximo de la suma de sensibilidad (porcentaje de verdadero positivos) y especificidad (porcentaje de verdaderos negativos)

Especie	Valor crítico de probabilidad
<i>Rhodnius prolixus</i>	0.37532728
<i>Triatoma delpontei</i>	0.20615512
<i>Triatoma dimidiata</i>	0.35500424
<i>Triatoma infestans</i>	0.39375033
<i>Triatoma patagonica</i>	0.16707303
<i>Triatoma sordida</i>	0.39044784
<i>Triatoma vitticeps</i>	0.27072667