

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

“Comparación de poblaciones silvestres y domésticas de *Triatoma dimidiata*  
(Latreille, 1811) de México y Centroamérica por medio de la técnica de  
amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR) ”



Guatemala, Octubre del 2004.

**JUNTA DIRECTIVA**

MSc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
DECANO

Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona  
SECRETARIA

Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo  
VOCAL I

Lic. Juan Francisco Pérez Sabino  
VOCAL II

Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez  
VOCAL III

Br. Roberto José Garnica Marroquín  
VOCAL IV

Br. Rodrigo José Vargas Rosales  
VOCAL V

**DEDICATORIA.**

A DIOS.

La clara luz que rige el universo y nuestras vidas.

A MI MADRE: GREGORIA GONZALEZ

que ha sido un ejemplo de trabajo y perseverancia para mi  
y que siempre ha estado conmigo.

A MIS HERMANOS:

JUAN LUIS Y ROBIN EMILIO

por ayudarme con mis trabajos y compartir mi alegría.

A JUAN ANTONIO LANDAVERDE SURIANO

mi padre por darme la vida aunque no esté conmigo.

A CARLOS GUILLERMO FLORES (WILLI)

Por compartir nuestras penas y sufrimientos como una familia.

A MIS TIOS Y PRIMOS:

RITA GONZALEZ, EDDIE SANTIAGO GONZALEZ, ROGELIO ESQUIVEL, HEILI,  
RUTH, KELITA, DANIEL Y OMAR ESQUIVEL.

A MI PAIS GUATEMALA

Y A ESTA HERMOSA REGION DONDE NACI:

MESOAMERICA

cuna del maíz y de la cultura Maya.

---

## AGRADECIMIENTOS.

### INSTITUCIONES COLABORADORAS:

A Paz María Salazar Schettino y Gloria Rojas del Laboratorio de **Biología de Parásitos** de la **Universidad Autónoma de México (LBP-UNAM)** Gracias por la información proporcionada.

Al Laboratorio de **Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP)**

Al Ph.D. Rodrigo Zeledón del **Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBio)**

A la Dr. Francisca Marín y al Personal **Ministerio de Salud de Nicaragua (MINSA)** Gracias por la información proporcionada.

A todos Gracias por proveer los especímenes para este trabajo de investigación, sin los cuales no se hubiera podido ejecutar el presente trabajo

### AMIGOS.

A la Ph. D. Carlota Monroy, por brindarme la oportunidad de aprender sobre genética y ser un miembro del laboratorio. Por motivarme a continuar trabajando, por sus consejos, revisiones y por ser un ejemplo a seguir en cuanto al trabajo y el desarrollo de nuestra gente y nuestro país.

A Antonieta Rodas. Por el tiempo duro compartido en el laboratorio, por su revisión y su compañía.

A Sergio Melgar y María Eugenia Morales Betoulle por ser mis formadores en el área de genética de poblaciones y biología molecular, pero sobre todo por la humildad que han mostrado con lo cual me han dado un gran ejemplo a seguir y me han regalado su amistad. Sheshe, gracias por brindarme todas las oportunidades que me has dado. Gracias por toda tu ayuda y por estar siempre disponible cuando te necesito.

A Sergio Melgar y Claudia Calderón García. Mis asesores y grandes amigos.

Sergio, gracias por los años de convivencia en el trabajo, por tus consejos, gracias por que siempre he contado con tu apoyo, gracias por ser mi maestro, mi luz.

Claudia, gracias por que de ti he aprendido mucho sobre disciplina y esfuerzo. Gracias por tu apoyo y porque juntas soñamos con que el grupo de PCR sea un gran equipo en el que reine la confianza y la amistad. Gracias por enseñarme a redactar y por tu amistad.

A Juan José Chavéz., por ser mi primer jefe en investigación por enseñarme el trabajo práctico por su apoyo y sus consejos. Ojalá le llegue esto, aunque este lejos, “jefecito”.

A Patricia Dorn. (Universidad de Loyola en Louisiana) “Nuestro Ángel de la Guarda” que también es un ángel en la vida real y siempre nos ha apoyado y ayudado en lo que hemos necesitado sin ningún egoísmo. Thank you very much Patricia.

A mis compañeros de promoción y siempre amigos solidarios, Pedro Pardo, Gabriela Fernández, Marleny Rosales, José Octavio Cajas, Ingrid Ventura y Amparo Ordóñez.

---

A mis compañeras y amigas que siempre me acompañaron en las largas horas de trabajo, a altas horas de la noche y feriados en la Universidad María Hermes y Sindy Hernández.

A mis compañeras de EPS y Tesis con quienes he compartido penas, sufrimiento y apoyo Sayra Chanquín y Marianela Menes.

A mis compañeras de trabajo en LENAP por su comprensión y apoyo; María José Dardón, mi compañera de proyecto y muy buena amiga. Del equipo de Genética molecular; Bárbara Moguel, Sandy Pineda, Elizabeth Solórzano, Mauricio García, Franklin Herrera y Claudia Calderón García. El resto de mis compañeros Carmen Lucía Yurrita, Gaby Armas, Eunice Enríquez, Dulce Bustamante, Ligia Díaz y Ricardo Marroquín.

A Regina Guadalupe Rosales, gran amiga y compañera que Dios la tenga a su lado.

A Claudio Méndez, por la orientación e información proporcionada.

A Roberto Garnica por su colaboración en la elaboración de los mapas y por ser un amigo y compañero también.

A Gabriela Rodríguez, por su apoyo, su positivismo y su información constante.

A mis colegas y amigos de trabajo que siempre me han auxiliado y ayudado:

- Luis Montes, Daisuke, Akio y especialmente Amilcar Sánchez del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía. Por siempre ayudarnos en nuestros problemas técnicos.
- Pamela Pennington, María Eugenia Morales Betoulle y Sandra Rosales de la Universidad del Valle de Guatemala. Por compartir nuevas técnicas y auxiliarnos en nuestros problemas.
- A Jhoni Álvarez. Por el préstamo de equipo y la ayuda.

Gracias y como dicen: “Arrieros somos y en el camino andamos”

A mis alumnos del curso de Fisiología en el año 2003 y 2004 por su paciencia y comprensión.

A mi Jefe del curso de Fisiología; Jorge Erwin López por su comprensión, paciencia y consejos.

Al Lic. Fernando Díaz, por su continuo auxilio, colaboración y compañía en el trabajo.

A las Secretarías de la Escuela de biología que siempre han sido como familia para nosotros, Alma de García, Mirla Urizar pero especialmente Sandra de Chávez y Norma Chamalé.

A German Peña por el servicio prestado.

A Pedrito Ajú y familia. Por su compañía y buen trabajo.

A todos los que de una u otra forma han colaborado con la elaboración de este trabajo o me han apoyado moralmente muchas Gracias.

---

## ÍNDICE.

<b>1 RESUMEN.....</b>	<b>4</b>
<b>2 INTRODUCCION.....</b>	<b>6</b>
<b>3 ANTECEDENTES.</b>	
<b>3.1. Planteamiento del Problema.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. Información General sobre Familia Triatominae.....</b>	<b>9</b>
<b>3.3. El Vector Triatoma dimidiata.....</b>	<b>10</b>
3.3.1. Ubicación Sistemática.....	10
3.3.2. Características Morfológicas.....	10
3.3.3. Biología.....	11
3.3.4. Ecotopos.....	13
<b>3.4. Distribución de Triatoma dimidiata.....</b>	<b>13</b>
<b>3.5. Condición de Triatoma dimidiata en México y Centroamérica y</b>	
<b>Caracterización de los países.....</b>	<b>14</b>
3.5.1. México.....	15
3.5.2. Guatemala.....	16
3.5.3. El Salvador.....	18
3.5.4. Honduras.....	19
3.5.5. Nicaragua.....	20
3.5.6. Costa Rica.....	22
<b>3.6. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7. Técnica de RAPD-PCR. (Random Amplification Polymorphism DNA.....</b>	<b>25</b>
<b>3.8. Genética de Poblaciones.....</b>	<b>26</b>
<b>3.9. Flujo Genético.....</b>	<b>28</b>
<b>3.10. Técnicas de análisis molecular utilizadas para el estudio de Triatomineos.....</b>	<b>30</b>
<b>3.11. Trabajos realizados con la Técnica de RAPD-PCR.....</b>	<b>32</b>
<b>3.12. Otras técnicas fenéticas.....</b>	<b>33</b>
<b>4 JUSTIFICACION.....</b>	<b>35</b>
<b>5 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>6 HIPOTESIS.....</b>	<b>38</b>
<b>7 MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>39</b>
7.1. Materiales.....	39
7.2. Procedimiento.....	40

---

<b>8 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
8.1. Loci Amplificados.....	47
8.2. Índice de Nei (I’N), Distancia Genética (D’N) .....	47
8.3. Análisis de agrupamiento.....	50
8.4. Coeficientes de Fijación ( $F_{ST}$ ) y Número efectivo de Migrantes( $N_m$ ).....	53
8.5. Reproducibilidad de la técnica.....	53
<b>9 DISCUSION DE RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
9.1. Loci Amplificados.....	55
9.2. Análisis realizados.....	55
9.3. Índice de Nei (I’N), Distancia Genética (D’N) y El complejo de especie de <i>Triatoma dimidiata</i> .....	57
9.4. Análisis de dendrogramas y de agrupamiento.....	60
9.5. Coeficientes de Fijación ( $F_{ST}$ ) y Numero efectivo de Migrantes( $N_m$ ).....	70
9.6. Reloj molecular de las poblaciones de <i>T. dimidiata</i> y sus implicaciones.....	72
9.7. Reproducibilidad de la Técnica.....	76
9.8. Retos en la Caracterización Genética de <i>T. dimidiata</i> .....	77
<b>10 CONCLUSIONES</b> .....	<b>78</b>
<b>11 RECOMENDACIONES</b> .....	<b>82</b>
<b>12 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>84</b>
<b>13 ANEXOS</b> .....	<b>92</b>
Glosario.....	92
Preparación de Reactivos.....	96
Ubicación de las poblaciones de estudio .....	97
Tabla de Valores de $F_{ST}$ .....	98
Mapas de Altitud en Centroamérica.....	101
Cuadro con datos climáticos y geológicos.....	103
Esquemas sobre Formación de Centroamérica.....	104
Esquema de coevolución entre hospedero y vector.....	105
Mapas mostrando accidente geográficos.....	106
Análisis de morfometría.....	107
Mapa de Masaya en Nicaragua.....	108

---

## 1. RESUMEN.

Palabras clave: RAPD PCR, estructura poblacional, flujo genético, diferenciación genética, frecuencias génicas, *Triatoma dimidiata*, poblaciones silvestres.

El objetivo de este trabajo era obtener información sobre la variabilidad en la estructura genética de diversas poblaciones del vector *Triatoma dimidiata* en el ámbito de México y Centroamérica, por medio de una comparación de las frecuencias génicas de las mismas. Esto con el fin de generar conocimiento que permita entender la biología de dicho insecto y la posterior formulación de estrategias de control efectivas que contribuyan a evitar la transmisión de la enfermedad de Chagas.

Se seleccionaron 30 individuos por población en el estudio, (doce poblaciones de México a Costa Rica) con excepción de la población silvestre de Costa Rica que contaba únicamente con 21 individuos. Las áreas de estudio fueron las siguientes: Guatemala: tres poblaciones domésticas (Quiché, Alta Verapaz y Jutiapa) y dos silvestres (Petén y Lanquín). Honduras: una población doméstica (Yoro). Nicaragua: dos poblaciones domésticas (Masaya y Matagalpa) y una silvestre (Volcán Masaya en Nindiri). La pregunta que se buscaba responder era si existe diferencia entre las poblaciones anteriormente mencionadas que nos permitan separarlas y deducir la estructura poblacional y los posibles factores que afectan a las poblaciones.

La técnica utilizada fue la Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico por la Reacción en Cadena de la Polimerasa – RAPD-PCR - (por sus siglas en inglés **R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**N-A-Polimerase **C**hain **R**eaction). De los loci generados por esta técnica con tres pares de iniciadores, (L1, L4, L5) se seleccionaron 30 que se encontraban entre el intervalo de frecuencias génicas de 0.1 y 0.6. Se obtuvieron valores para los índices de Nei ( $I'N$ ) y distancia genética ( $D'N$ ), así como una estimación de los valores de pérdida de heterocigosidad ( $F$ ) entre las poblaciones y número efectivo de migrantes. De forma particular se observan dos agrupaciones, la primera formada por las poblaciones de La Brea, Jutiapa en Guatemala y San Ramón, Matagalpa en Nicaragua. La segunda agrupación formada por Tukurú, Alta Verapaz en Guatemala y Tuxpan, Veracruz en México. Los resultados observados para ambas agrupaciones en donde existe muy poca diferenciación genética sugiere que estas pudieron haberse formado a partir del transporte accidental pasivo reciente del vector o por dispersión hacia y desde refugios ecológicos de hospederos o del mismo vector, que puede haber sido influenciada

---

por factores geológicos como las glaciaciones durante el Pleistoceno o la deforestación masiva durante el Holoceno, hace 2,800 años por parte de los Mayas y la actividad comercial de ellos que favorecería las migraciones, manteniendo durante todo este tiempo flujo genético entre las diferentes poblaciones. De manera general se observó una tendencia de las poblaciones de Centroamérica a asociarse especialmente para dos poblaciones del norte de México y Centroamérica y las poblaciones en la cuenca del pacífico, sugiriendo la posible existencia de flujo migratorio a través del istmo centroamericano, lo cual es un factor importante a considerar al plantear estrategias para el control de la enfermedad.

Puede observarse que la población de El Carrizal, Jutiapa posee loci particulares que provocan que esta población se asocie con las poblaciones silvestres de Nicaragua y que se separe de todas las poblaciones, mostrándose como grupos externos, lo cual sugiere que la población de El Carrizal Jutiapa es una población diferenciada con mucho movimiento. También Las poblaciones Silvestres de Nicaragua tendieron a asociarse con poblaciones silvestres de Guatemala, separándose de esta forma del grupo donde se encuentra la mayoría de las poblaciones domésticas, aunque de esto lo más interesante es la asociación del grupo de Petén con Lanquín lo que nos indica que debe reconsiderarse la posición taxonómica de ambas. El conjunto de poblaciones de Quiché se asocia con la población de Honduras, sugiriéndonos un posible trayecto de migración para el vector, en la parte centro-norte de Centroamérica entre las sierras que conformaron en algún tiempo América Nuclear. Por lo mencionado anteriormente, es recomendable que se mantenga una vigilancia constante de las poblaciones tanto silvestres como domésticas del vector, que existen en cada país debido al posible flujo migratorio del mismo, así como también que se considere el estudio de poblaciones dispersas en áreas reconocidas como refugios ecológicos, para conocer mejor los factores que pueden estar influenciando la estructura poblacional del vector.

---

## 2. **INTRODUCCION.**

La enfermedad de Chagas, es la cuarta causa de mortalidad por enfermedades infecciosas en América Latina, provoca 43,000 muertes por año (Ayau, 1998; Universidad Simón Bolívar, 1999). Esta se encuentra asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda, que proporcionan el ambiente favorable para que el vector, habite entre las grietas, el polvo, hojas de palmeras y las piedras que conforman las casas en el área rural. Cuando el insecto se alimenta de la sangre de su hospedero, libera heces y orina sobre la piel del mismo. La mayoría de veces la enfermedad es transmitida cuando el hospedero al sentir la picadura del vector se rasca, introduciendo de esta manera las heces que contienen al parásito. En América, el género del vector más importante es *Triatoma*, siendo *Triatoma dimidiata* la especie más importante en Centroamérica (Lent & Wygodzinsky, 1979; Zeledón, 1981; OPS, 2002).

En Marzo del 2002, se realizó un taller en El Salvador que tuvo como fin plantear estrategias para el control de *T. dimidiata*. En éste se propuso la realización de investigaciones integrales que involucraran factores complejos como los sociales y el uso de marcadores genéticos y fenéticos (Schofield, 2002). En la actualidad existen algunos trabajos de investigación donde se ha estudiado la estructura poblacional de los triatomos, con énfasis en *T. dimidiata*, por medio de técnicas genéticas como el de Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en Inglés PCR) y la Morfometría.

Hasta ahora, la técnica más utilizada en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), para el estudio molecular de las poblaciones de triatomos, ha sido el PCR, mediante su variante Amplificación Aleatoria del ADN Polimorfo (por sus siglas en ingles, RAPD-PCR). Sin embargo en la actualidad existen otros recursos genéticos los cuales han sido utilizados con eficiencia para otros vectores (*Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, etc.) así como análisis citogenéticos, estudios del ADN mitocondrial, del ADN ribosomal, entre otros (Panzera *et. al.*, 1996; Solis-Mena, 2000; Marcilla *et. al.*, 2001; Harris *et al.*, 2002). Se han desarrollado, marcadores para microsatélites para regiones específicas en el genoma de *T. dimidiata*, lo cual permitirá en el futuro la realización de investigaciones más sensibles sobre la estructura poblacional de la misma.

---

Entre las ventajas que presenta la técnica de RAPD-PCR pueden mencionarse: es altamente informativo, muy sensible para revelar polimorfismo alélico, requiere un mínimo de equipo, es más barata que otras técnicas, no requiere el conocimiento previo del genoma del organismo y el proceso es relativamente rápido comparado con otras técnicas clásicas (Beard & Lyman, 1998). Los estudios de genética de poblaciones de *T. dimidiata* por medio de estas técnicas tienen como fin la comparación entre poblaciones, para poder deducir sobre la base de ello, la semejanza genética. Trabajos que incluyan escalas mayores donde se consideren países desde México hasta Costa Rica son necesarios para generar el conocimiento sobre la estructura poblacional del vector a nivel regional.

En el presente trabajo se realizó una comparación y análisis genético de diversas poblaciones del vector *T. dimidiata* entre ellas México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica por medio de la técnica de RAPD-PCR. Esto con el fin de conocer mejor la estructura poblacional del vector.

---

### **3. ANTECEDENTES.**

#### **3.1. Planteamiento del Problema.**

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, es una de las parasitosis más importantes en América Latina y está distribuida desde México hasta Argentina. La enfermedad es transmitida por insectos de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius* al depositar sus deyecciones infectadas con *Trypanosoma cruzi* sobre mucosas y áreas sensibles y expuestas de la piel (Lent & Wygodzinsky, 1979; Ayau, 1998). Está afecta principalmente el corazón, causando miocardiopatía y destrucción del tejido muscular, aunque en menor proporción también puede afectar el aparato digestivo y ganglios nerviosos (Berkow, 1989; Ayau, 1998; Universidad Simón Bolívar, 1999).

La enfermedad de Chagas es un importante problema de salud pública en la región, comprendida desde el istmo de Tehuantepec en México hasta Colombia y Ecuador en América del Sur, debido a las condiciones de pobreza y desconocimiento de la enfermedad. El principal vector de la enfermedad en la región centroamericana es *T. dimidiata*, especialmente en los países de El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua, donde este vector se encuentra ampliamente distribuido. Este insecto encuentra un ambiente favorable en las grietas de las paredes de adobe y bajareque en sectores pobres del área rural, sin embargo también se le ha encontrado en áreas urbanas en grandes ciudades como Tegucigalpa y Guayaquil (Lyman et. al., 1999; Universidad Simón Bolívar, 1999; Solís-Mena, 2000).

El control del vector ha presentado algunos problemas, ya que se le ha encontrado de nuevo varios meses después del rociamiento con piretroides de efecto residual. La razón por la cual vuelve a encontrarse, no se conoce con exactitud, se tienen dos hipótesis: una es que los vectores reaparezcan debido a la sobrevivencia de las mismas al rociamiento (mala aplicación del insecticida) o bien a la reinfestación de las viviendas por individuos de poblaciones del peridomicilio, de viviendas vecinas no rociadas o del ambiente silvestre.

El vector presenta una gran capacidad para adaptarse a diferentes ecotopos, por lo cual puede presentarse en diversos hábitat como domésticos, peridomésticos y silvestres. Es precisamente esta abundancia y diversidad en las poblaciones de *T. dimidiata* la que ha provocado que los diversos países afectados, tomen el control del vector como un reto (Schofield, 2000).

---

Por ello, en el último taller para el establecimiento de Pautas Técnicas en el Control de *T. dimidiata* en El Salvador, en marzo del 2002, se propuso una serie de estrategias integrales, encaminadas al control de dicha especie. Las mismas van dirigidas a lograr desde metas sociales como la participación comunitaria en la vigilancia entomológica, educación, mejoramiento de vivienda, hasta las técnicas más sencillas como rociamiento selectivo, todo ésto basado en el conocimiento de la especie, que se puede obtener por medio de investigaciones acerca de su estructura poblacional, su biología, entre otros temas, para lograr propuestas más eficientes para el control de esta especie (OPS, 2002).

Sin embargo, debido a la amplia distribución tanto del vector como del parásito, estas estrategias deben ser enfocadas no sólo a nivel local de los países involucrados sino a regiones más amplias. Para lograr ésto, los trabajos de investigación deben buscar la obtención de información sobre el grado de estructuración poblacional de *T. dimidiata*, tanto a nivel comunitario como a nivel de poblaciones vecinas o aisladas, en cada uno de los países involucrados. Para ello, deben considerarse los diversos ecotopos de *T. dimidiata* (silvestres y domésticos) en cada una de las regiones del istmo centroamericano, México y América del Sur por medio de marcadores genéticos y fenéticos. El fin de utilizar estas técnicas es, poder contar con herramientas más sensibles para la diferenciación de las poblaciones y variedades de *T. dimidiata* (Lyman et. al., 1999; Schofield, 2000).

### **3.2. Información General sobre Familia *Triatominae*.**

Los triatominos son una subfamilia de hemípteros (chinchas verdaderas) caracterizados por su hábito hematófago. Están distribuidos en América donde se conocen más de 100 especies y algunos son vectores del parásito que transmite la enfermedad de Chagas. Por su comportamiento y fisiología similares, todas las especies tienen la capacidad de ser portadoras del protozoo *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo condiciones como, la capacidad de adaptación del vector al hábitat humano y el alto grado de antropofilia que este posee, lo pueden convertir en un vector efectivo de la enfermedad de Chagas en humanos (Lent & Wygodzinsky, 1979). Las especies de mayor importancia epidemiológica son las que colonizan fácilmente las viviendas de los humanos y viven en grietas de las paredes de casas rurales, de donde salen para alimentarse de los ocupantes en reposo, principalmente durante la noche (Schofield, 1994).

---

Se caracterizan por presentar un aparato bucal que consiste en un labio segmentado en forma de canoa, que en los fitófagos es largo y recto mientras que en los hematófagos no alcanza el primer par de coxas. El labio de los hematófagos se diferencia del que poseen los depredadores, en que en los primeros es recto mientras en los últimos es curvo. Son considerados insectos hemimetabolos es decir, de metamorfosis incompleta en base a transformaciones graduales de forma que las larvas no se diferencian mucho de las formas adultas. (Zeledón, 1981; Beaty & Marquardt, 1996).

Los estadios ninfales son morfológicamente similares al adulto y comparten los mismos hábitos alimenticios y nichos ecológicos, por lo que todos poseen el mismo potencial en la transmisión de la enfermedad (Beaty & Marquardt, 1996).

### **3.3. Vector *Triatoma dimidiata*.**

#### **3.3.1. Ubicación Sistemática:**

Reino: Animalia

Phylum: Artropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemíptera

Familia: Reduviidae

Sub Familia: Triatominae

Género: *Triatoma*

Especie: *T. dimidiata* (Ayau, 1998)

#### **3.3.2. Características Morfológicas.**

El macho mide de 24.5 a 32.0 mm y la hembra de 24.5 a 35.0 mm de color oscuro de alquitrán o negro con el conexivo y el corion que varía de un amarillo pálido a anaranjado, con una pilosidad corta y poco notoria (Zeledón, 1981).

*T. dimidiata* es una especie altamente variable, en cuanto a su talla, la extensión de las manchas oscuras presentes en el corión, el grado de oscurecimiento de la membrana y especialmente el tamaño de la cabeza y los ojos, ésto hace difícil la clasificación de la especie (Zeledón, 1981).

Lent y Wygodzinsky (1979) midieron varios especímenes empleando los mismos caracteres morfológicos utilizados por Usinger (1941-1944) para tratar de diferenciar las variedades establecidas de *T. dimidiata maculipennis* Stal (1859) y *T. dimidiata capitata* Usinger (1941) como especies o subespecies. No pudiendo lograr una clara diferenciación, encontraron que los especímenes mexicanos (*maculipennis*) poseen una cabeza más ancha en comparación con los especímenes de Colombia (*capitata*). A la vista de estos resultados Lent y Wygodzinsky (1979) no aceptaron ninguna clasificación que separara a las variedades de *T. dimidiata*, aduciendo que en realidad existen diversas formas debido a la gran variabilidad que presenta la especie. También se ha encontrado que el tamaño de individuos criados en el laboratorio es menor que el de los encontrados en las viviendas humanas, sus alrededores y en ecotopos silvestres (Zeledón, 1981).

Cabe mencionar que en los triatominos se da una diferenciación morfológica más rápida que el establecimiento de barreras reproductivas o genéticas. Esto hace suponer que la morfología revela cambios ocasionados más ante nichos ecológicos específicos que por ancestros comunes, por lo cual se debe tomar con cuidado los criterios de análisis filogenéticos en Triatominae (Dujardin et. al., 1999).

### 3.3.3. Biología.

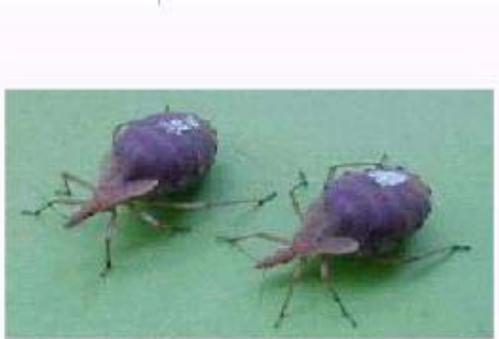


Figura 1. Ejemplar Adulto. Figura 2. Ninfas de chinche del 5to estadio.

Estos organismos son atraídos por la luz, (especialmente los machos) hacia ámbitos domésticos y peridomésticos. Son malos voladores por lo que la dispersión de ellos se puede llevar a cabo por medio de transporte pasivo, llevados en mercancía o madera por parte del hombre (Schofield, 2001). Son organismos ovíparos, la oviposición comienza de 10 a 30 días después de la copulación, y puede continuar por varios meses. El número total de huevos puestos durante el ciclo de vida de la hembra varía de acuerdo a los factores externos, como disponibilidad de alimento, temperatura y humedad. Se ha encontrado un rango de oviposición entre 500 (el más usual) hasta más de 1,000 huevos. Las hembras vírgenes pueden ovipositar, aunque en menor cantidad y sus huevos son infértiles (Lent & Wygodzinsky, 1979).

*T. dimidiata* es menos agresivo para alimentarse, ya que dura menos tiempo en comparación con *Triatoma infestans*. El período para atacar a su víctima varía según el estadio y es más prolongado en las primeras ninfas. El tiempo que demora alimentándose está relacionado con el tamaño del insecto, y suelen ocurrir varias interrupciones durante el proceso, que puede durar alrededor de 10 minutos, a excepción de la hembra, que puede durar hasta 20 ó 30 minutos. Las hembras se alimentan más fácilmente y son más voraces que los machos. Las cantidades de ingestión de sangre pueden variar desde los 290 mg en machos hasta 425.2 mg en hembras. La víctima puede no sentir dolor, ya que la saliva de la chinche posee un anestésico y después de alimentarse pueden pasar varios meses sin alimentarse reduciendo únicamente sus actividades durante las épocas frías del año (Lent & Wygodzinsky, 1979; Zeledón, 1981).

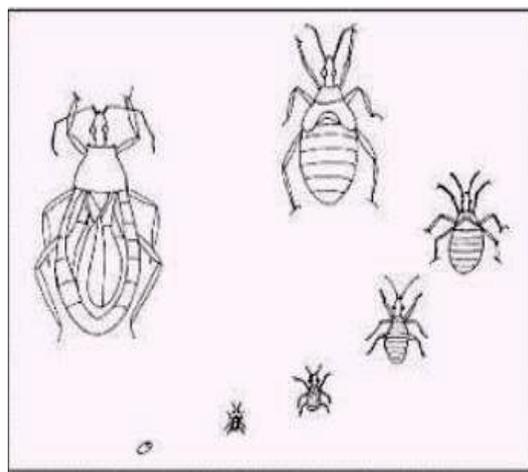


Figura 3. Estadios de *Triatoma dimidiata*.

---

### 3.3.4. Ecotopos.

Se refieren al tipo de hábitat de *T. dimidiata*, que puede ser dentro de la casa, en las cercanías de la casa o en remanentes de bosques o bosque no intervenidos.

#### Silvestre.

Los vectores se encuentran frecuentemente en ambientes naturales como bosques y selvas. Se alimentan de sangre de mamíferos, especialmente Zari güeyas (*Didelphys marsupialis*). Suelen encontrarse en refugios de armadillos (*edentados*), en palmeras, árboles viejos y huecos, cuevas de murciélagos, montículos de piedra, etc (Zeledón, 1981; Carcavallo, 2000; Schofield, 2000).

#### Peridoméstico.

Son los que se encuentran cerca o alrededor de casas rurales en gallineros, perreras, cochiqueras entre otras. Se alimentan de animales domésticos (perros, gatos, gallinas) (Lent & Wygodzinsky, 1979).

#### Doméstico.

Se le llama así a los organismos que se encuentran dentro de las viviendas, cerca de los lugares donde duermen las personas que habitan la casa o animales domésticos que viven en el interior de la misma, y que finalmente llegan a alimentarse de humanos. Las ninfas tienden a cubrirse con partículas de polvo (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Generalmente *T. dimidiata* se encuentra en áreas rurales, en donde predominan las condiciones de pobreza, que se encuentran siempre relacionadas con la enfermedad. Sin embargo, también se le ha encontrado en ambientes peri-urbanos e incluso urbanos como en Tegucigalpa, San José y Guayaquil (Schofield, 2000).

### 3.4. Distribución de *T. dimidiata*.

*T. dimidiata* posee un amplio ámbito de distribución geográfica, desde el centro de México (Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán) pasando por Belice, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, en algunas provincias de Venezuela, Colombia y Ecuador, extendiéndose hasta el norte de Perú. La altitud varía del nivel del mar hasta a 1,700

metros sobre el nivel del mar (Lent & Wygodzinsky, 1979; Schofield, 1994; Carvallo et. al., 2000; Harris et al., 2002;).



Figura 4. Distribución de *Triatoma dimidiata*.

Fuente: Casa de la Cultura Ecuatoriana, 1993.

### **3.5. Condición de *T. dimidiata* en México y Centroamérica y Caracterización de los Países.**

Centroamérica es definida por su geografía física como el área terrestre y de plataforma continental que se extiende desde el istmo de Tehuantepec, en México, hacia el este y sureste, hasta las tierras bajas de Atrato en Colombia. Sin embargo, por razones geográficas políticas, se ha llamado últimamente a los países comprendidos en la clasificación anterior como “Mesoamérica” y se ha tomado como Centroamérica a la región comprendida entre los países desde Guatemala hasta Panamá. Se le puede dividir en dos grandes provincias, debido a su estructura geológica: Una septentrional, llamada “América Nuclear” constituida por la parte más vieja de la misma formada por parte del continente norteamericano hasta el límite central de Nicaragua. La otra es la América Central Meridional, que abarca desde la porción sur de Nicaragua, latitud 12° 30' N, hasta las tierras bajas de Atrato en Colombia (Dengo, 1973). A continuación se indica la información existente sobre *Triatoma dimidiata* en cada país, así como



### 3.5.2. Guatemala.

*T. dimidiata* es el vector más importante debido a que presenta una amplia distribución en el territorio. Se encuentra en 21 de los 22 departamentos del país. Se le encuentra en condiciones domésticas, peridomésticas y silvestres. La zona oriental del país, es el área de mayor endemicidad, presentando índices de infestación domiciliar entre 12 y 45 %.. Se ha trabajado con rociamiento selectivo, educación, promoción para mejoramiento de viviendas y vigilancia entomológica con participación de la comunidad (OPS, 2002).

Clima: En casi todo el país domina el tipo de clima cálido tropical, aunque las temperaturas varían con la altitud. La temperatura tiene un promedio anual de 20 °C. El clima de las regiones costeras es de características más tropicales; la costa atlántica es más húmeda que la del Pacífico, con una temperatura cuya media anual es de 28.3 °C. La estación de lluvias se presenta entre mayo y noviembre, las precipitaciones anuales de la zona norte oscilan entre los 1,525 mm y los 2,540 mm; la ciudad de Guatemala, en las montañas del sur, recibe cerca de 1,320 mm de promedio anual (González, 2000; Jackson, 2001).



Figura 6. Mapa de Guatemala.

Jutiapa.

Localizado en el extremo suroriental de Guatemala, fronterizo con El Salvador (Encarta, 2002).

Quezada, La Brea: Zona de vida: Bosque húmedo subtropical.

Coordenadas: Latitud: 14° 16'12" N

Longitud: 90°02'12" O

Altura: 980 msnm.

---

El Carrizal, Jutiapa: Zona de Vida: Bosque húmedo subtropical.

Latitud: 14° 24' 50" N

Longitud: 89° 53' 15" O

Altura: 900 msnm

### Quiché.

Departamento situado al noroeste de Guatemala, fronterizo con el estado mexicano de Chiapas, en las tierras altas de los Cuchumatanes y la sierra de Chuacús. El clima es templado en el fondo de los valles, en tanto que en las partes elevadas es más fresco.

San Andrés Sajcabajá: Zona de Vida: Bosque muy húmedo subtropical.

Coordenadas: Latitud: 15° 11.4' 1.3" N - 15° 11.4' 2.2" N

Longitud: 90° 32.4' 17.3" O - 90° 31.8' 30.44" O

Altura: 1,500 msnm

Diversas Aldeas: Zona de Vida: Bosque muy húmedo subtropical.

Coordenadas: Latitud: 15° 05' 39" N

Longitud: 91° 09' 06" O

Altura: 2,139.49msnm

### Petén.

Departamento enclavado al norte de Guatemala. Limita con México, y con Belice por el este. Recibe una cantidad de 1,324 mm de lluvia anual. Temperatura entre 20° a 30.7° C (Asociación forestal Integral, 2001; Encarta, 2002).

Yaxhá, Sayaxché:

Zona de Vida: Bosque Húmedo Subtropical Cálido.

---

Coordenadas:	Latitud:	16° 11' 8" N - 16° 8' 36" N
	Longitud:	90° 15' 55" O - 90° 14' 15" O
	Altura:	150 a 175 msnm (AFISAP, 2001).

### Alta Verapaz.

Alta Verapaz, es un departamento localizado en el centro geográfico de Guatemala, en parte sobre las tierras altas sedimentarias y en parte sobre la baja planicie interior del Petén. Su orografía es variada, con llanuras calcáreas al norte y sierras alternando con profundos cañones hacia el sur.

### Tucurú:

Coordenadas:	Latitud:	15 ° 34' N
	Longitud:	89 ° 58' O
	Altura:	600 msnm

### Cuevas de Lanquín:

Coordenadas:	Latitud:	15° 32' 38" N
	Longitud:	90° 1' 8" O
	Altura:	352 msnm (Encarta,2002).

### 3.5.3. El Salvador.

*T. dimidiata* es el vector más importante debido a que presenta una amplia distribución en el territorio. Presenta una condición principalmente domiciliar en todos los departamentos del país. Posee un índice de colonización intradomiciliar del



Figura 7. Mapa de El Salvador.

47.1% y un índice de dispersión del 64.8%. Se realizan intervenciones de control químico con piretroides residuales, promoción de mejoramiento de vivienda y la educación para la salud.

Clima: Caluroso y húmedo en las costas y tierras bajas, templado en la zona media y frío en las regiones altas. Las temperaturas en la capital oscilan entre 17° y 23° C. La estación de lluvias va de mayo a octubre. Precipitación anual de 2,540 mm (González, 2000; Jackson, 2001).

#### La Primavera, Santa Ana:

Santa Ana es un departamento de la zona occidental del Salvador, que posee al municipio de La Primavera. Este municipio tiene una temperatura de 24° C a 32° C y una precipitación promedio de 1,200mm de lluvia.

Zona de vida: Bosque húmedo subtropical.

Coordenadas: Latitud: 13° 50' N- 14° 00' N

Longitud: 89° 30' – 89° 40' O

Altura: 700 msnm.

(González, 2000; Jackson, 2001).

### 3.5.4. Honduras.

Aunque los esfuerzos están concentrados en la eliminación de *Rhodnius prolixus*, *T. dimidiata* es el vector más importante debido a que presenta una distribución amplia y continua donde llega incluso a traslaparse con la primera. Se encuentra en 16 de los 18 departamentos. Presenta un índice de infestación del 25% y uno de dispersión en áreas centrales del 56%. El control se basa únicamente en la intervención de rociado con insecticidas de acción residual.



Figura 8. Mapa de Honduras.

Clima: La cordillera centroamericana que lo atraviesa lo divide en dos grandes regiones, la oriental y la occidental, con alturas que sobrepasan los 2,000 metros. El clima es cálido y húmedo en la costa (temperatura media: 31°C ) más templado en la zona montañosa. Pueden distinguirse dos estaciones una lluviosa, de junio a octubre y una seca de noviembre a mayo (González, 2000; Jackson, 2001).

Yoro.

Departamento de Honduras localizado al norte del país, capital es la ciudad de Yoro. Su topografía es muy accidentada con sierras como las de Sulaco y Pijol, junto a hebrascosteros cerca del golfo de Honduras. El clima es subtropical con lluvias abundantes distribuidas a lo largo del año.

Zona de Vida: Bosque muy húmedo subtropical.

Coordenadas: Latitud: 15° 04 ' N

Longitud: 87° 17' O

Altura: 780 msnm (Cadena, 2000).

### 3.5.5. Nicaragua.



Figura 9. Mapa de Nicaragua.

*T. dimidiata* presenta una amplia distribución geográfica. Presenta situación doméstica y peridoméstica en áreas rurales y urbanas. En algunos departamentos es el único vector y presenta altos índices de infestación y colonización. *T. dimidiata* es el vector más importante debido a que presenta una amplia distribución con relación a *Rhodnius prolixus*.... Se ha realizado la intervención con insecticidas con énfasis en *R. prolixus*.

Clima: es cálido y húmedo en la costa oriental y más seco en la occidental. En las tierras altas el clima es más suave (González,2000; Jackson,2001).

---

### Masatepe, Masaya.

La aldea Masatepe del departamento de Masaya se encuentra situada en la meseta de los pueblos comprendida en la llanura Adriana. Posee un clima semi-húmedo (Sabana Tropical). La precipitación varía en los 1,200 y 1,400 mm. de agua. Caracterizada por una buena distribución de las lluvias durante el año. La temperatura oscila entre los 26° y 27°C. Provincia de la depresión (INIFOM, 2001).

Zona de vida: Sabanas tropicales.

Coordenadas: Latitud: 11° 55' N

Longitud: 86° 08' O

Altura: 455 msnm (INETER, 1995)

### Volcán Nindiri, Masaya.

Volcán que se localiza en el municipio de Nindiri en el Departamento de Masaya, rodea a la laguna de Masaya, cerca del municipio de Masatepe, Masaya. Temperatura en más o menos 22° C. Provincia de la depresión. Grupo geológico, volcánico Cuaternario.

Zona de Vida: Sabana Tropical.

Coordenadas: Latitud: 11° 56' 47" N

Longitud: 86° 8' 53" O

Altitud en más de 1,500 msnm (INETER, 1995)

### San Ramón Matagalpa.

Clima tipo Sabana Tropical. Temperatura entre los 20°C y 26°C lluvia de 2,000 a 2,400 mm. Se encuentra a 641 msnm.

Zona de Vida: Bosque húmedo Tropical.

Coordenadas: Latitud: 12° 55' N.

Longitud: 85° 50' O.

Altura: 641 msnm (INIFOM, 2001)

### 3.5.6. Costa Rica.



Figura 10. Mapa de Costa Rica.

*T. dimidiata* es el único vector de importancia epidemiológica. Posee una amplia distribución. No se realiza ningún tipo de vigilancia epidemiológica ni entomológica, ni actividades de control químico sólo se recomiendan las medidas sanitarias en las viviendas. Presenta un índice de infestación domiciliar entre 26.0 y 44.0 % (OPS/HCP/HCT, 2002).

Clima: Tropical, caliente y húmedo y con abundantes lluvias en las costas Caribeñas y tierras bajas, pero frío en las regiones montañosas. Posee sólo dos estaciones una seca “verano” y una lluviosa “invierno”. Estación seca de diciembre a abril. Precipitación anual media 1,793 mm (González, 2000; Jackson, 2001).

Provincia de Guanacaste.

Es una de las provincias más extensas y menos populosas de Costa Rica. Se destaca por sus grandes extensiones de llanuras (sabanas) así como extensa vegetación y sus playas algunas de ellas de blanca arena que bordean el litoral del Océano Pacífico.

Clima: Cálido. Promedio de temperatura: 28°C

Zona de Vida: Tropical seco, Premontano lluvioso.

Coordenadas: Latitud: 8° 15' N - 11° 00' N

Longitud: 83° 30' O - 86° 00' O

---

### 3.6. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. (PCR)

#### (Polymerase Chain Reaction)

El desarrollo de las aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a finales de 1980, ha abierto nuevas alternativas a los métodos de investigación biomédica, brindando una herramienta altamente sensible y específica para la discriminación de grupos de animales. La PCR permite un acceso directo y simple al genoma, hasta proveer una sensibilidad inigualable para la observación de características genotípicas y biomédicas en el diagnóstico de enfermedades (Black & DuTeau, 1997).

El PCR, se basa en la copia de un simple segmento de ADN, que es multiplicado varias veces por una ADN polimerasa que puede crear copias a partir de hebras simples de ADN provistos con un primer o cebador. Para que la producción de ADN sea más efectiva, y que la polimerasa permanezca activa se utiliza una polimerasa resistente a altas temperaturas, específicamente a temperaturas de desnaturalización del ADN (95 °C), ésta enzima se obtiene a partir de una bacteria termófila, *Thermus aquaticus* por lo cual la polimerasa es llamada *Taq* polimerasa. El cebador consiste en un segmento de ADN generalmente de 20 pb (pares de bases) para microsatélites o variantes de PCR específicas y de 10 pb para RAPD-PCR. Estos cebadores poseen secuencias complementarias a la secuencia de ADN que se desea amplificar, y su función es la iniciación de la síntesis de ADN. Mediante la repetición de los ciclos de síntesis se puede generar un número virtualmente ilimitado de copias de una secuencia particular de ADN (Hartl & Clark, 1989; Brown, 1995).

#### Ventajas.

- El PCR elimina la necesidad de clonar separadamente cada alelo secuenciado.
- Permite amplificar millones de veces en poco tiempo una muestra diminuta de ADN.

#### Desventajas:

- El ADN amplificado para cada locus genera ambigüedad, ya que no se puede saber si la banda resultante proviene de un individuo heterocigoto u homocigoto dominante.
- La inserción y la delección causan ambigüedad, ya que pueden provocar presencia de bandas de distintos tamaños (Hartl & Clark, 1989; Solomon Et. al, 1996).

El "Proceso General" del PCR se resume en tres importantes pasos:

- Desnaturalización del ADN por calentamiento del mismo a 95° C.
- Enlace de los cebadores a las hebras simples de ADN, por enfriamiento entre el rango de 37°-50°C.
- Síntesis de ADN. Los cebadores flanquean segmentos de ADN lo cual ocurre a una temperatura de 72° C mediante el uso de ADN polimerasa (*Taq* polimerasa)

Luego el ciclo se repite una serie de veces por unas 3 ó 4 horas dependiendo del tamaño del ADN a amplificar y el programa que se utilice. Al finalizar la temperatura baja a - 4° C para evitar que el ADN sufra el efecto de algunas enzimas que lo destruyan o desnaturalicen.

Dependiendo del tipo de amplificación y de las características propias del ADN y de los cebadores se dará una serie de leves modificaciones a las temperaturas anteriores (Hartl & Clark, 1989).

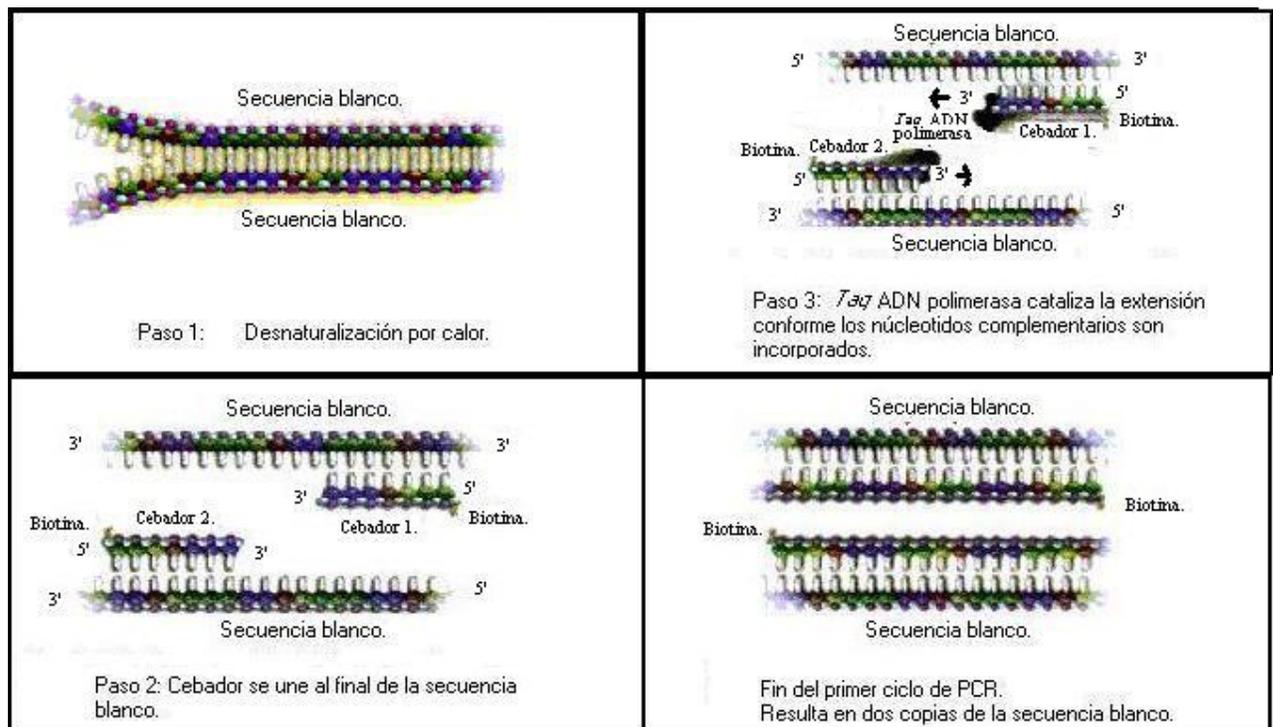


Figura 11. Ciclo de PCR.

Fuente: Roche, 2003.

---

### 3.7. Técnica de RAPD-PCR.

La técnica de Amplificación al azar de ADN polimórfico (en inglés **R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**N.A -RAPD-PCR-) se basa en el uso de pequeños cebadores oligonucleótidos de ADN al azar de un tamaño de 8 a 12 pb, sin embargo en organismos eucarióticos los cebadores son frecuentemente de 10pb (Brown, 2001), característica que permite a los cebadores unirse simultáneamente en muchos sitios del genoma. El tamaño pequeño de este “cebador” aumenta considerablemente las probabilidades para que se una en distintos puntos del genoma. Si se unen suficientemente cerca dos “cebadores” en una y otra hebra de la doble hélice de ADN, la *Taq* polimerasa podrá amplificar esa región, dando lugar a un fragmento con un peso molecular determinado. Como las probabilidades para que se una en distintos sitios son elevadas, la *Taq* polimerasa podrá amplificar fragmentos con pesos moleculares distintos.

Siguiendo una amplificación, los amplicones resultantes pueden ser analizados por electroforesis en gel. El conjunto de fragmentos amplificados es lo suficientemente variable para poder detectar polimorfismo entre individuos de una misma especie con esta técnica. Se supone que éstos fragmentos amplificados son loci dominantes que se segregan independientemente, o sea que pueden ser considerados como loci individuales.

Entre las ventajas y desventajas de este método pueden mencionarse:

#### Ventajas.

1. Los cebadores quedan inmediatamente disponibles y adaptables para el uso.
2. Altamente informativo.
3. Muy sensible para revelar polimorfismo alélico.
4. Requiere un mínimo de equipo y técnicas de laboratorio.
5. Relativamente barato.
6. Representativo del genoma completo.
7. No requiere el conocimiento previo del genoma del organismo.
8. La detección de los amplicones (fragmentos amplificados) no es radiactiva.

- 
9. Es un proceso relativamente rápido comparado con otras técnicas clásicas

Desventajas.

1. Confiabilidad y reproducibilidad pueden ser muy pobres.
2. Debido a su carácter al azar es muy fácilmente contaminable (Beard & Lyman, 1998).

### **3.7.1. Utilidades de RAPD PCR.**

Además de lo ya mencionado en cuanto a su utilidad cuando no se conoce el genoma a estudiar, debe mencionarse también que puede utilizarse para el diagnóstico de enfermedades y para la caracterización de especies. Revela la presencia de polimorfismo en el genotipo lo que le permite la separación de poblaciones así como también la creación de nuevos métodos de marcadores moleculares. Esta técnica conocida también como “huellas dactilares” genéticas han sido utilizadas ampliamente para estudiar la organización social de numerosas especies (Apóstol, *et al*, 1994).

## **3.8. Genética de Poblaciones.**

La genética de poblaciones es el estudio del comportamiento de los genotipos y alelos en una población, los cuales son la base de la estructura poblacional de las comunidades animales que conforman los ecosistemas y su biodiversidad. Los cambios que puedan darse en las frecuencias génicas de las poblaciones, a causa de diversos factores ecológicos, son los causantes a través del tiempo de “la evolución” (Hartl & Clark, 1989; Hedrick, 1983; Falconer, 1981).

Para el estudio, definición y comprensión de los cambios en las frecuencias génicas es necesario la utilización de un principio que describe una situación hipotética en la cual no existe cambio en el acervo genético (Frecuencias de alelos) ya que ésta sigue las condiciones de una población ideal, el equilibrio Hardy-Weinberg. Las condiciones de una población ideal en dicho principio son las siguientes:

- Población de tamaño infinito.
- Apareamiento al azar.

- 
- Que no exista mutación.
  - Que no exista migración.
  - Que no exista selección natural.

Para el conocimiento de las frecuencias en este principio, se basa en el hecho de que las frecuencias génicas observadas en la población son exactamente las mismas que las frecuencias génicas de los padres, debido a que;  $p$  (alelo dominante), y  $q$  (alelo recesivo) se mantienen constantes a través de las generaciones, (Hartl & Clark, 1989) siendo únicamente las frecuencias genotípicas las que varían;

- $AA = p^2$
- $Aa = 2pq$
- $aa = q^2$

Estos cambios pueden deberse a excepciones en el cumplimiento de las condiciones de una población ideal, provocando la estructuración de las poblaciones y a muy largo plazo “la separación de dos poblaciones en especies diferentes” es decir evolución (Apostol *et. al.*, 1993).

### **3.8.1. Frecuencias Génicas y RAPD PCR.**

El proceso utilizado para este estudio genético de poblaciones consistió en cuantificar cada uno de los loci replicados, (por medio de la detección de cada una de las bandas) después de amplificar las muestras y correrlas en los geles de agarosa. Para ello se usa el programa de análisis de imágenes RFLPscan, que traduce la fotografía que se toma a cada uno de los geles a una matriz binaria de “0” y “1”, siendo el “0” la ausencia de banda y el “1” la presencia. Posteriormente, en base a la matriz binaria es posible calcular las frecuencias génicas para la realización de cálculos de distancia genética y migración de las poblaciones por medio de el Índice de Nei y el Índice de Fijación  $F_{ST}$ , respectivamente.

### 3.9. Flujo Genético.

#### 3.9.1. Coeficientes de Fijación: (F)

Son coeficientes de correlación diferentes al estadístico F. Se utiliza para conocer la variabilidad genética de una población (T) subpoblación (S) e individuos (I).

De ahí se deriva que;

$F_{ST}$  sea la medida de la diferenciación genética de una subpoblación y siempre es positiva.

$F_{IS}$  es una medida de la desviación de las proporciones Hardy Weinberg dentro de la subpoblación, cuando éstas son positivas indican una deficiencia de heterocigotos y por lo tanto muestran una población cerrada sin migración.

$F_{IT}$  es la desviación del equilibrio Hardy Weinberg del individuo con relación a la población (Hartl & Clark, 1989; Tabachnick & Black, 1996).

Existen dos formas de calcularse, una es según Cockerham y Weir que se basa en valores de varianza, así:

$$F_{ST} = \frac{V(q)}{q(1-q)} \quad (\text{Hartl \& Clark, 1989})$$

La otra formula según Lynch se basa en diferencias entre los heterocigotos esperados y los encontrados dentro de subpoblaciones y en la población total, así:

$$F_{ST} = \frac{H_s - H_o}{H_s} \quad (\text{Hartl \& Clark, 1989})$$

Donde;  $H_s$  son los heterocigotos esperados dentro de las subpoblaciones.

$H_o$  son los heterocigotos observados dentro de las subpoblaciones.

$H_T$  son los heterocigotos esperados en la población total en todos los loci.

$$F_{IS} = \frac{H_T - H_o}{H_T}$$

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_S}{H_T} \quad (\text{Hedrick, 1983; Hartl \& Clark, 1989})$$

### 3.9.2. Índice de Nei.

Es la medida de distancia genética más ampliamente utilizada, que sirve para medir la cantidad de variabilidad genética compartida entre grupos, lo cual al ser analizado puede decirnos si éstos poseen algún tipo de conexión la cual podría ser causada por migración. Para un locus simple con  $n$  alelos, la identidad genética de Nei es;

$$I_N = \frac{J_{XY}}{(J_X \cdot J_Y)^{1/2}}$$

DONDE

$$J_{XY} = \sum_{i=1}^n p_{ix} \cdot p_{iy}$$

$$J_X = \sum_{i=1}^n p^{i2x}$$

$$J_Y = \sum_{i=1}^n p^{i2y}$$

donde  $x$  y  $y$  representan a las dos poblaciones que se comparan.

A partir del estadístico  $F_{ST}$ , se puede estimar el número efectivo de migrantes. (Nm). Finalmente puede concluirse que las frecuencias génicas de las poblaciones a estudiar dependen de la cantidad de migrantes ( $m$ ) y del tamaño de la población ( $N$ ) (Hedrick, 1983; Hartl & Clark, 1989; Tabachnick & Black, 1996; Calderón *et al*, 2004).

---

### 3.9.3. Técnicas de análisis molecular utilizadas para el estudio de triatomíneos.

#### ADN Mitocondrial.

Permite estudiar la relación familiar de los organismos por vía materna. En trabajos anteriores se han realizado estudios con poblaciones de *T. dimidiata* procedentes de México Guatemala y Honduras por medio de variación de la secuencia de ADN mitocondrial, utilizando tres fragmentos de genes; la gran subunidad ribosomal de ARN (16S rRNA), NADH deshidrogenasa subunidad 4 (ND4) y la citocromo oxidasa subunidad b *Cytb*. En este trabajo se encontró información que indicaba la presencia de grupos geográficamente definidos, sugiriendo que *T. dimidiata* es un complejo de especies.

La divergencia genética fue mayor para la población de *T. dimidiata* de Yucatán, México, lo cual puede deberse a sucesos de cambios climáticos particularmente durante los períodos del pleistoceno y holoceno. Aunque la información es interesante el estudio debe realizarse con más poblaciones de Centroamérica (Harris *et al.*, 2002).

En otro estudio donde se compararon poblaciones de *T. dimidiata* procedentes de diez países desde México hasta Ecuador, se utilizaron los marcadores de ADN mitocondrial, NADH deshidrogenasa subunidad 5 (ND5). Se encontró una asociación de las poblaciones de Honduras y Ecuador, lo cual reforzaría la teoría de una posible introducción artificial de individuos de *T. dimidiata* procedentes de Honduras a través del comercio marítimo en ambas poblaciones. Los análisis genéticos en combinación con análisis morfométricos ayudaron a apoyar la idea de un ancestro de *T. dimidiata* mesoamericano y no sudamericano (Solís-Mena, 1999).

#### Citogenética.

Se han realizado algunos estudios con técnicas citogenéticas para *T. dimidiata* y otras especies de triatomíneos como *Triatoma infestans*. Los triatomíneos presentan una gran homogeneidad cromosómica, lo que se observa por sus cromosomas holocéntricos, que no presentan morfológicamente una diferenciación del centrómero. Este factor unido a su pequeño tamaño, impide el progreso en el estudio de su citogenética. Esta técnica ha sido útil en el estudio de diferenciación de especies, variación intraespecífica

---

y relaciones evolutivas. Los estudios citogenéticos se basan en la extracción, tinción y fijación de las gónadas sexuales en triatomíneos y un posterior estudio de los patrones de bandedo C en cada cromosoma en la prometáfase mitótica. En estos estudios se ha podido encontrar que tres especies de triatomíneos, *T. sordida*, *T. guasayana* y *T. patagonica* presentaban relaciones cercanas lo cual está de acuerdo a sus características etológicas, ecológicas y morfológicas (Panzera *et. al.*, 1996; Panzera *et. al.*, 1997).

#### ADN Ribosómico.

Este se caracteriza por poseer numerosas unidades de transcripción cada una separada de la siguiente por un espaciador no transcrito interno ITS –espaciador de transcripción interno, por sus siglas en inglés-. Los ITS presentan usualmente secuencias repetidas en tandem, llamadas microsatélites. Estas unidades de repetición tienen una longitud que varía entre unos 5 pb y son muy buenos marcadores moleculares, para la diferenciación de poblaciones. Estos tienden a tener el mismo tamaño en diferentes especies del mismo género. Sin embargo se han encontrado diferencias en el tamaño de ITS relacionado a la presencia de secuencias de microsatélites. En un estudio donde se comparaban las diversas especies de la familia de triatomíneos, se utilizó el ITS-2, debido a su utilidad como marcador para resolver relaciones supraespecífica, específica y subespecífica y al nivel de poblaciones pudiendo señalar que se logró una diferenciación de las dos tribus de triatomíneos; triatomíni y rhodniini. *T. dimidiata* pudo ser claramente diferenciada como especie, presentando una variación clinal a través del eje de norte a sur.

*T. dimidiata* de Yucatán presentó diferenciación del resto de poblaciones de México, Guatemala y Honduras (Marcilla *et. al.*, 2001).

#### Microsatélites.

Es una técnica que consiste en secuencias muy cortas y repetitivas dentro del genoma, situadas en regiones no codificantes del genoma, con un tamaño menor de 10 pb para microsatélites y de 10-50 pb para minisatélites, el número de unidades repetitivas es usualmente de 5 a 50. Existe una alta variación en el número de repeticiones entre los genomas de diferentes individuos. Se han realizado trabajos de secuenciación de

---

organismos procedentes de México, Guatemala y Honduras, con el fin de obtener cebadores adecuados para esta técnica en *T. dimidiata*. (Lewin, 2000; Anderson et. al. 2002) Actualmente este trabajo ha dado fruto sin embargo se han encontrado algunos problemas al aplicar los cebadores de microsátélites a las poblaciones de *T. dimidiata* lo cual parece ser a causa de la diversidad que este organismo presenta (Pennington, *com pers*).

#### RAPD-PCR.

Esta técnica que se basa en la utilización de cebadores decámeros, es la más utilizada para el análisis de poblaciones de triatomíneos, especialmente para *T. dimidiata* especie mesoamericana.

### **3.10. Trabajos realizados con la Técnica de RAPD-PCR.**

En el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –Lenap- se han realizado diversos estudios sobre la estructuración poblacional de *T. dimidiata* tanto en el área molecular como morfométrico. En el área molecular, Lenap ha trabajado en colaboración con la Universidad de Loyola en Nueva Orleans, utilizando la técnica de RAPD-PCR. Los análisis para esta técnica se basan en trabajos de Apostol y colaboradores (Apostol *et. al.*, 1993; Apostol *et. al.*, 1994; Apostol *et. al.*, 1996).

En estos trabajos se ha logrado establecer el número de familias de *T. dimidiata* en una casa, pudiendo indicar la existencia de una endogamia moderada en las mismas ante la panmixia que la población presenta por la entrada de migrantes en una cantidad considerable, lo cual es un dato importante para la elaboración de estrategias de control del vector (Monroy *et. al.*, 2002).

También se han realizado trabajos de comparación entre diversas poblaciones de Guatemala. Uno de los primeros fue la comparación de la diversidad genética de especímenes de tres localidades en el departamento de Santa Rosa, en el que se encontró distancias genéticas muy pequeñas entre las casas muestreadas ( $D = 0.013 - 0.022$ ) y entre las localidades ( $D = 0.0199$ ), tuvo un índice de fijación bajo también ( $F_{ST} = 0.019 \pm 0.033$ ) y un número de migrantes  $N_m = 9.7$  a 12 entre casas y entre localidades, respectivamente. Esto sugiere que las casas entre pueblos no constituyen una población aislada sino una población panmíctica (Dorn *et al.*, 2003).

---

De igual manera se han hecho trabajos, comparando poblaciones de *T. dimidiata* en diferentes departamentos del país localizados en las vertientes del Atlántico y del Pacífico y se ha encontrado que no hay una asociación clara de las mismas, influenciadas por factores geográficos o por pertenecer a determinadas vertientes. Se observó que las poblaciones tienden a agruparse de acuerdo a las condiciones ambientales existentes y al ecotopo al cual pertenecen, sea éste doméstico o silvestre. Los valores de  $D = 0.04 - 0.254$  y de  $F_{ST} = 0.246$  con Lanquín y  $F_{ST} = 0.171$  sin Lanquín indican que la presencia de Lanquín aleja genéticamente a las otras poblaciones y al comparar el Número efectivo de migrantes  $N_m = 0.8$  con Lanquín y  $N_m = 1.2$  sin Lanquín, se deduce que Lanquín es una población que se encuentra aislada genéticamente del resto (Calderón *et al.*, 2004).

También se han elaborado otros trabajos de comparación de diversas especies de triatomíneos, donde se han encontrado distintos patrones para cada especie. Sin embargo existen otros estudios como los elaborados para la diferenciación genética de *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius colombiensis* por medio de ADNr y RAPD-PCR, que han permitido establecer que existe un índice de fijación de 0.24 y una migración efectiva de 0.6 individuos por generación, lo cual indica que no existe un flujo genético entre ambas especies para mantener una homogeneidad genética (Jaramillo *et. al.*, 2001).

### **3.11. Otras técnicas fenéticas.**

#### Morfometría.

La morfometría es una rama de la biometría, que agrupa un conjunto de métodos para la descripción cuantitativa, análisis e interpretación de la **forma** biológica y su variación (Rohlf, 1990). La comparación de la forma es de interés en estudios de variación morfológica intraespecie, efectos ambientales, los cambios a lo largo del desarrollo de un organismo y taxonomía.

Primero debe representarse la forma biológica de interés por medio de cantidades matemáticas que son asignadas basándose en localizaciones geométricas, existen dos formas: Conjuntos de distancias entre puntos sobre el organismo (largo de un ala, distancia entre los ojos, etc) o las coordenadas cartesianas de estos puntos (coordenadas cartesianas de las intersecciones de la venación alar en insectos) (Bookstein, 1982).

---

Existen dos tipos de morfometría; la tradicional, que consiste en la aplicación de métodos estadísticos multivariados y la geométrica, que utilizan métodos que toman en cuenta las relaciones geométricas de las variables. La morfometría ha sido ampliamente utilizada para el estudio de triatominos, y se considera como una herramienta sumamente efectiva para la comparación de poblaciones triatominos. En Lenap se han realizado estudios de poblaciones dentro del país, encontrando que existe diferenciación de población silvestre de Petén de poblaciones domésticas. También Lanquín se diferencia de las demás poblaciones así como de Jutiapa, lo cual debe estar relacionado a su tipo de hábitat. Se ha encontrado poca diferenciación entre macho y hembra lo cual se atribuye a procesos de domesticación (Bustamante, 2001).

#### Isoenzimas.

Se basa en la utilización de diversos sistemas de enzimas para la comparación de poblaciones de chinches, después de extraídas estos sistemas proteicos son corridos por electroforesis, las bandas resultantes son comparadas y a partir de ellas puede elaborarse análisis de distancias genéticas para la diferenciación de las poblaciones. Un trabajo donde se ha utilizado esta técnica es la estructuración genética de *Triatoma sordida* en Bolivia. Donde se utilizaron 12 sistemas proteicos. En este trabajo se encontró una tasa de polimorfismo baja de 0.20, y una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas (Noireau *et. al.*, 1999).

---

#### 4. **JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de Chagas representa una amenaza para Latinoamérica ya que 100 millones de personas viven en áreas endémicas y de ellas entre 16 y 18 millones ya están infectadas, además debe señalarse que la enfermedad se encuentra fuertemente correlacionada con factores de pobreza y subdesarrollo, condiciones que predominan en las áreas afectadas (Ayau, 1998).

La enfermedad no tiene cura en la fase crónica y el tratamiento de la fase aguda es costoso y tiene muchos efectos secundarios. La enfermedad tiene serias consecuencias que afectan considerablemente la economía de los países porque reduce los años potenciales de trabajo de los individuos que la padecen. Por lo que puede considerarse como una de las enfermedades tropicales más importantes.

En Centroamérica, la prevalencia de infección estimada para El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua es de 7.0%, lo cual representa aproximadamente a dos millones de personas infectadas. Este es un número elevado si se considera que es un valor estimado para únicamente cuatro países de toda Latinoamérica (Universidad Simón Bolívar, 1999). Se estima que en Guatemala 4,000,000 de personas están en riesgo de contraer la enfermedad y 730,000 se encuentran actualmente infectadas y 30,000 se infectan anualmente (Nakagawa, 2003).

El control de la enfermedad ha llegado a ser una prioridad de la salud pública en muchos países latinoamericanos, no sólo por su significado social y epidemiológico sino también debido a su fuerte impacto económico.

Existen dos estrategias que han tenido gran éxito en el control de la enfermedad: el control en los bancos de sangre, para evitar el contagio por transfusión o transplante de órganos y la erradicación de los vectores principalmente por medio del rociamiento con químicos de las casas infestadas.

En esta última se ha podido observar que después del rociamiento existe reinfestación, especialmente de *T. dimidiata* (Com. Pers. con Licda. Rodas; Nakagawa *et. al.*, 2003). Esto puede atribuirse en parte a la presencia de poblaciones silvestres y peridomésticas o a la falta de efectividad de los métodos de control.

---

A nivel centroamericano, las poblaciones de *T. dimidiata* muestran una importante variación morfológica y conductual. Debido a ésto se han propuesto diferentes estrategias de control del vector, que van desde la vigilancia de poblaciones silvestres en Costa Rica, hasta el control químico de las localidades en Guatemala, Honduras y Nicaragua (Schofield, 2002).

Sin embargo es necesaria la realización de investigaciones básicas que permitan identificar el origen de los focos de reinfestación y la capacidad de dispersión, a través del conocimiento de la estructura poblacional de la especie que se obtenga por medio del uso de marcadores genéticos y fenéticos (Schofield, 2000).

Se ha discutido la posibilidad de que exista migración por parte del vector, por transporte pasivo, al ser introducido éste a las viviendas humanas por medio de animales domésticos o silvestres; por transporte accidental pasivo, en donde los vectores son transportados en pertenencias de personas que se trasladan de un lugar a otro o transporte activo, uno de los más observados donde el insecto migra por si mismo de un lugar a otro (Schofield, 2002). Es aquí donde puede observarse la importancia del presente trabajo, ya que con el mismo se pretendía realizar un análisis de la estructura genética de poblaciones aisladas del vector para deducir la dinámica poblacional que pueda existir en el ámbito regional, es decir entre países del istmo centroamericano y México.

Con los datos obtenidos en el presente estudio se posee información sobre la estructura poblacional de *T. dimidiata* que ayudará a identificar eventos de migración a través de México y Centroamérica. Esta información puede permitir el desarrollo de mejores estrategias de control de la especie y disminuir en el grado de transmisión de la enfermedad de Chagas.

Asimismo, con la información obtenida se abre la posibilidad realizar en el futuro un estudio que relacione los resultados del análisis genético de cada una de las poblaciones y la información existente sobre índices naturales de infección con *Trypanosoma cruzi*. Esta información permitiría comprender si las diferencias genéticas entre las poblaciones se relacionan con su capacidad de transmisión de la enfermedad.

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL.**

- 5.1.1. Comparar el polimorfismo genético de cuatro poblaciones silvestres y ocho poblaciones domésticas de *T. dimidiata* de Centroamérica y México obtenido mediante la técnica de RAPD-PCR.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 5.2.1. Obtener los patrones de bandas de los individuos de cada una de las poblaciones silvestres y domésticas de *T. dimidiata* provenientes de la región de México y Centroamérica.
- 5.2.2. Analizar y comparar el acervo genético de las poblaciones de México y Centroamérica por medio del índice de distancia genética de Nei.
- 5.2.3. Determinar la presencia o ausencia de flujo genético entre las poblaciones silvestres y domésticas de *T. dimidiata* de México y Centroamérica por medio de análisis de los coeficientes de fijación ( $F_{ST}$ ) y el cálculo del número efectivo de migrantes ( $N_m$ )

## 6. HIPÓTESIS.

Las poblaciones silvestres y domésticas de *T. dimidiata* procedentes de México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, y Costa Rica se diferencian genéticamente entre ellas debido a efectos de aislamiento.

---

## **7. MATERIALES Y METODOS.**

### **7.1. Materiales.**

#### **7.1.1. Universo de Trabajo.**

Se trabajó con 351 chinches domiciliars y silvestres (30 individuos por población a excepción de Costa Rica con 21 individuos) procedentes de la Región Mesoamericana de México, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica.

#### **7.1.2. Recursos Humanos.**

**Investigadora:** Patricia Landaverde González.

**Asesores:** Licda. Claudia Irene Calderón García.

MSc. Sergio Alejandro Melgar Valladares.

**Revisor:** Licda. Antonieta Guadalupe Rodas Retana.

#### **Colaboradores:**

- Laboratorio de Investigación en Entomología y Parasitología, Escuela de Biología, Facultad de ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- Personal de colecta de los diferentes países que forman parte del estudio.

### **7.2. Recursos Materiales:**

Extracción de ADN.

<b>Equipo.</b>		<b>Reactivos.</b>	
Tubos eppendorf de 1.5 mL	Micropipeta	NaCl libre de ADN	Ácido Clorhídrico
Microcentrifugadora	Mechero	Tris-HCl libre de ADN	Tris-EDTA
Hieleras con hielo picado	Recipientes plásticos	Agua destilada	EDTA libre de ADN
Congelador a -20°C	Baño María (65°C)	Etanol al 95-100%	Agua destilada estéril
Papel mayordomo	Gradillas para tubos	ARN asa	Etanol al 70 %
Pistilos	Puntas	Sacarosa libre de ADN	Agua jabonosa
Duroport	Fósforos	SDS libre de ADN	Cloro
		K-Acetato	

### Amplificación.

<b>Equipo.</b>		<b>Reactivos.</b>	
Micropipetas		Thermo Buffer 10x	MgCl <sub>2</sub>
Congelador 20°C.		Primers;	H <sub>2</sub> O para PCR
Tubos eppendorf de 200 ul		L1; 5' CGG CCC CTG G 3'	Taq polimerasa
Termociclador.		L4; 5' GTG GAT GCG A 3'	dNTP's
Hieleras		L5; 5' AAG AGC CCG T 3'	ADN
Campana de Flujo Laminar.			

### Corrimiento de Geles.

<b>Equipo.</b>		<b>Reactivos.</b>	
Cámaras de Electroforesis		Colorante de carga (loading dye)	Bromuro de Etidio
Micropipeta.		Marcadores de peso molecular.	Agarosa.
Transiluminador UV		Agua destilada	TBE 0.5X
Cámaras Digital.			

#### 7.2.1 Análisis de Datos.

Programa de manejo de fotografías digitales Olympus Camedia. Programa de análisis de geles Geneprofiler 4.03, paquetes estadísticos (PHYLIP, RAPDFST) (Tabachnick & Black, 1996; Black, 1997).

### 7.3 Procedimiento.

#### 7.3.1 Colecta de Material Biológico.

---

El material biológico (las chinches), fue colectado en diferentes años antes de la elaboración de este trabajo, por diferentes instituciones, de la siguiente manera<sup>1</sup>:

➤ MEXICO: Colectadas por el personal del Laboratorio de Biología de Parásitos de la Universidad Autónoma de México (LBP-UNAM)

•Domésticas:

+ Tuxpan, Veracruz, México, 2001 (30 individuos)

➤ GUATEMALA: Colectadas por el personal del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP)

•Domésticas:

+ Jutiapa, La Brea, 2000-2002. (30 individuos)

+ Quiché, San Andrés Sajcabajá, 1999-2002 (30 individuos)

+ Alta Verapaz, Tucurú, 2001-2002 (30 individuos)

Silvestres:

+ Petén, Melchor de Mencos (Reserva Natural y Arqueológica Yaxhá), 2001-2002 (30 individuos)

+ Alta Verapaz, Lanquín, 1997-2000 (30 individuos)

➤ HONDURAS: (Médicos sin fronteras)

•Domésticas:

+ Yoro, Yorito, 1998 (30 individuos)

➤ EL SALVADOR: (Ministerio de Salud, Curso sobre colecta de Vectores de la Enfermedad de Chagas.)

•Domésticas:

+ Santa Ana, La Primavera, 2003 (30 individuos)

---

<sup>1</sup> Ver mapa de distribución de poblaciones en Anexo en la Figura 15 y 16. Pág. 97

➤ NICARAGUA: Personal **Ministerio de Salud** de Nicaragua (MINSa)

Pertenecientes a los **Sistemas Locales de Atención Integral de Salud (SILAIS)**.

•Domésticas:

+ Masaya, Masatepe, 2002 (30 individuos)

+ San Ramon, Matagalpa, 2002 (30 individuos)

•Silvestres:

+ Masaya, Nindiri (Parque del Volcán Masaya), 2002 (30 individuos)

➤ COSTA RICA: Colectadas por el **Instituto de Biología** de Costa Rica.  
(**INBio**)

•Silvestres:

+ Provincia de Guanacaste y alrededores, 2001 (21 individuos)

### 7.3.2 Material biológico. (Chinches Muertas)

Los ejemplares previamente colectados son introducidos a una base de datos, de la colección de referencia. Esta base de datos se encuentra clasificada según país, y especie de insecto triatomineo.

Esta se elabora de la siguiente manera: los organismos recientemente muertos (máximo tres días) son disectados en busca de seropositividad para el parásito *Trypanosoma cruzi*, como paso siguiente se le asigna un número de identificación, en el cuaderno correspondiente. (Según especie de triatomineo o país). Se procede a identificar con el mismo número un frasco de plástico y se introduce al individuo con alcohol glicerina al 5%. Para el procesamiento de muestras se procede a cortar las patas de donde se extrae el ADN.

### 7.3.3 Extracción de ADN.

•Se toman las muestras de las chinches a estudiar, de la siguiente manera:

Adultos y 5° Estadío: 2 ó 3 patas.
------------------------------------

4 y 3° estadio: 3 patas.

2° estadio: 4 patas.

1° estadio: el individuo entero

- Lavar primero con 500 µl etanol y luego con agua.
- Agregar 100µl del buffer de extracción (Ver anexos, en Pág. 96).
- Macerar las muestras con pistilos estériles.
- Centrifugar momentaneamente para homogenizar todo al fondo del tubo.
- Incubar las muestras a 65°C durante 15 -30 minutos.
- Agregar 14µl de K-Acetato 8M para una concentración final de 1M. Mezclar e incubar en hielo durante 15 minutos.
- Centrifugar en frío 10 minutos a máxima velocidad (a 14,000rpm).
- Alicuotar 200µl de etanol frío al 95% . Transferir el sobrenadante para cada muestra al tubo con etanol frío al 95%. Agitar (Se pueden guardar las muestras a este nivel por tiempo indefinido).
- Incubar en hielo 10 min, luego centrifugar 20 min en frío a máxima velocidad. (14,000 rpm) Descartar el sobrenadante.
- Disolver el precipitado (hebras de ADN) en 100 µl etanol al 70 % y después en etanol al 95 %. No agitar para no disolver el precipitado de ADN.
- Disolver el precipitado en 50 µl de TE estéril con 1U ARNasa.
- Guardar las muestras a -70°C si no se van a usar inmediatamente (Coen *et. al.*, 1982).

#### **7.3.4 Amplificación por medio de RAPD PCR.**

##### Preparación de Master Mix. (MMX)

- En un eppendorf estéril hacer la mezcla para cada reacción de 41µl totales (37µl MMx + 2µl de ADN + 2µl Taq.) (Ver anexos, en Pág. 96).
- Conservar en frío después de agregar los dNTP's (nucleótidos) y el primer (cebador)
- Se usaran los siguientes cebadores de Operon;

L1; 5' CGG CCC CTG G 3' L4; 5' GTG GAT GCG A 3'

---

L5; 5`AAG AGC CCGT 3`

- Agregar a los tubos la cantidad de Master Mix (MMx) estandarizada. (37  $\mu$ l de MMx para cada uno) Alicuotar la *Taq* polimerasa para la amplificación (*García et. al.*, 1998).

#### Adición del ADN.

- Agregar la cantidad de ADN estandarizada (2  $\mu$ l).
- Colocar en el termociclador los tubos con ADN y su MMx. Iniciar amplificación y esperar a que la temperatura ascienda a 80° C. Cuando llega se coloca la *Taq* (2  $\mu$ l)
- El ciclo del programa de amplificación es el siguiente:

Cebadores L1, L4 y L5:

- a. Inicio; 15 min. a 80° C.
- b. Primeros ciclos, 1 minuto a 94° C. 2 minutos a 30°C y 1 minuto 72° C.
- c. 32 ciclos; 30 segundos a 94° C, 2 minutos a 40°C y 1 minuto a 72° C.
- d. Ultimo ciclo; 30 segundos a 95° C, 2 minutos a 40° C, y 5 minutos a 72° C.
- e. Finalmente la temperatura baja a los 4° C.

### **7.3.5 Montaje y Corrimiento de Geles.**

#### Preparación de los geles.

- Mezclar 2.7 g. de agarosa y 180 ml de TBE (Ver anexos, en Pág. 96) (1.5% de agarosa)
- Calentar hasta que la agarosa se disuelva.
- Enfriar más o menos a 60° C y verter en el molde, poner los peines.

#### Montaje de los Geles.

- Cubrir el gel con una película fina de TBE 0.5X.
- Mezclar 1 $\mu$ l de colorante de carga con 10 $\mu$ l de muestra de ADN amplificado y se vierten en el pozo.
- Correr el gel en la cámara de electroforesis, a 89 voltios por 2 horas y media.
- Colocar el gel en un recipiente con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml, (Ver anexos, en Pág. 96) por más o menos 30 a 45 minutos, para colorear las bandas.

---

### **7.3.6 Lectura y Fotografía y Análisis de los geles.**

#### Lectura y Fotografiado de Geles.

- Evidenciar las bandas de ADN de los geles en un transiluminador a una longitud de onda de luz UV 256 nm.
- Tomar la fotografía digital.

#### Análisis de Geles.

- Analizar las fotografías de los geles resultantes por medio del programa Geneprofiler versión 4.03 de Scanalytic, para la obtención de una matriz binaria, donde la presencia de una banda es igual a 1 y la ausencia igual a 0.
- Calcular las frecuencias génicas asumiendo que la población estudiada está en equilibrio Hardy-Weinberg y que las bandas presentes son alelos dominantes.
- Seleccionar los loci con frecuencias alélicas entre 0.1 y 0.6, debido que las presentes en este rango contienen más información. Los demás alelos se descartan para evitar introducir sesgo con las bandas poco frecuentes o propias de la especie.

### **7.3.7 Análisis Estadístico.**

- Calcular el índice de fijación ( $F_{ST}$ ) y del Número efectivo de migrantes mínimo ( $N_m$ ).** Esto se hace mediante el programa RAPDFST, para determinar la tasa de migración entre poblaciones (Black, 1997). Se calculan los valores del coeficiente de Fijación, que cuantifica el grado de endogamia causado por la estructuración de las poblaciones. Esto lo hace con tres métodos: Wright, Weir & Cockerhan y Lynch & Milligan, entre los cuales se puede mencionar existe diferencia únicamente para Lynch & Milligan.

El Número de migrantes efectivo ( $N_m$ ). El  $N_m$  es el número absoluto de migrantes independientemente del tamaño de la población (Tabachnick, 1996).

- Comparar la distancia genética entre las poblaciones utilizando el índice de Nei como estadístico.** Se calcula la distancia genética ( $D_N$ ) y el Índice de Nei ( $I_N$ ) a partir de las frecuencias génicas obtenidas por medio del análisis de todas las poblaciones.

---

Las matrices obtenidas a partir del análisis de los geles, se someten al método “bootstrapping”, realizado con el programa -RAPDDIST-, con el cual se obtienen varias repeticiones de muestreos al azar.

•**Elaborar un dendrograma.** Los datos obtenidos por medio de bootstrapping de matrices de distancia genética, son introducidos luego en los programas Neighbor y Consense de Phylip donde se obtiene un dendrograma consenso formado por los grupos que tienen mayor porcentaje de aparición en las repeticiones. (Hedrick, 1983; Hartl & Clark, 1989; Felsenstein, J. 1986-1993; Tabachnick & Black, 1996).

•**Realizar pruebas para comprobar la Reproducibilidad de la Técnica.**

Una consiste en realizar repeticiones de individuos dentro de los geles para controlar la variación que pudiera darse en una misma amplificación de un individuo a otro por factores experimentales.

La segunda prueba consiste en elaborar repeticiones de un mismo individuo en diferentes amplificaciones, con el fin de ver la proporción en que las condiciones de una amplificación difieren de los resultados proporcionados por otra amplificación.

## 8. RESULTADOS.

### 8.1. Loci Amplificados.

No todos los cebadores (primers) utilizados produjeron la misma cantidad de resultados para todos los individuos en una población. Los resultados, fueron como sigue:

\* El cebador con el que se obtuvo mayor número de individuos amplificados fue L4; 5' GTG GAT GCG A- 3' con 282 individuos amplificados y el que poseía menor cantidad fue L5; 5' AAG AGC CCG T – 3' con 269 individuos amplificados.

\* La población con menor cantidad de individuos amplificados fue Costa Rica, con un promedio aproximado de 14 individuos.

<b>Tabla 1.</b> Porcentajes de amplificación para cada cebador.			
<b>Población</b>	<b>L1</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>
CoRiSi1	14	14	15
GuaAVTu	25	23	23
GuaJtBr	25	25	23
GuaLang	21	22	21
GuaPete	27	27	25
GuaQSAS	19	19	22
HondYor	28	29	29
MxTxpnD	24	24	22
NicMasD	22	25	22
NicMasS	22	26	26
NicMtgd	25	25	24
SlvSAna	25	23	21
Total	277	282	273
Porcentaje	79%	80%	78%

## 8.2. Índice de Nei (I'N) y Distancia Genética (D'N).

Después del análisis de las doce poblaciones contempladas para este trabajo se realizaron dos análisis más; el primero quitando a la población de Lanquín. El segundo análisis se realizó agregando a las doce poblaciones de este estudio dos poblaciones más utilizadas en otros estudios. A continuación se observan tablas conteniendo valores de distancia genética (D'N), siendo su mínimo valor 0 para poblaciones con nula distancia genética entre sí. También se observa en la tabla el Índice de Nei (I'N), que nos indica el grado de similitud genética entre dos poblaciones, este valor se obtiene a partir de los valores de distancia genética, su valor de máxima similitud es 1.

### Leyenda.

Abreviatura.	Lugar.	Ecotopo.
CoRiSiI	Costa Rica. Guanacaste.	Silvestre.
GuaAVTu	Guatemala. Alta Verapaz. Tukurú.	Domestica.
GuaJtBr	Guatemala. Jutiapa. La Brea.	Domestica.
GuaAVLq	Guatemala, Cuevas de Lanquín.	Silvestre.
GuaPete	Guatemala. Peten, Yaxhá.	Silvestre.
GuaQSAS	Guatemala. Quiché, San Andres Sajcabaja.	Domestica.
HondYor	Honduras Yoro. Yoro.	Domestica.
MxTxpnD	México. Veracruz. Tuxpán.	Domestica.
NicMasD	Nicaragua. Masaya, Masatepe.	Domestica.
NicMasS	Nicaragua. Nindirí, Volcán Masaya.	Silvestre.
NicMtgD	Nicaragua. Matagalpa.	Domestica.
SlvSAna	Salvador. Santa Ana.	Domestica.
GuaQuic	Guatemala. Quiché. Varias aldeas.	Domestica.
GuaJtCa	Guatemala. Jutiapa. El Carrizal.	Domestica.

### 8.2.1. Análisis de las doce poblaciones originales.

**Tabla 2:** Valores de Distancia Genética -D'N- e Índice de Nei -I'N- para las doce Poblaciones propuestas. En la parte inferior se observan los valores para la Distancia genética -D'N- entre las poblaciones y en la parte superior los valores para los Índices de Nei -I'N-

	CoRiSiI	GuaAVTu	GuaJtBr	GuaAVLq	GuaPete	GuaQSAS	HondYor	MxTxpnD	NicMasD	NicMasS	NicMtgD	SlvSAna
CoRiSiI		0.9332	0.9679	0.8952	0.8674	0.9631	0.8375	0.8921	0.7133	0.8682	0.9778	0.9276
GuaAVTu	0.0691		0.9484	0.8705	0.8464	0.9147	0.8132	<b>0.9454</b>	<b>0.7104</b>	0.8599	0.9442	0.9364
GuaJtBr	0.0326	0.0530		0.9047	0.8932	0.9693	0.8504	0.9471	0.7520	0.8983	<b>0.9795</b>	0.9561
GuaAVLq	0.1107	0.1387	0.1001		0.9448	0.9232	0.9298	0.8957	0.8444	0.9146	0.9269	0.9369
GuaPete	0.1423	0.1668	0.1130	0.0568		0.9112	0.8994	0.8880	0.8274	0.9293	0.9168	0.9035
GuaQSAS	0.0376	0.0892	0.0312	0.0799	0.0930		0.8957	0.9193	0.8003	0.9093	0.9719	0.9449
HondYor	0.1773	0.2068	0.1621	0.0728	0.1060	0.1102		0.8456	0.8749	0.8828	0.8695	0.8744
MxTxpnD	0.1142	<b>0.0562</b>	0.0544	0.1102	0.1188	0.0841	0.1677		<b>0.7962</b>	0.9058	0.9335	0.9532
NicMasD	0.3379	<b>0.3419</b>	0.2850	0.1691	0.1895	0.2228	0.1336	0.2279		0.9155	0.7918	0.8450
NicMasS	0.1413	0.1509	0.1072	0.0893	0.0733	0.0951	0.1246	0.0989	0.0883		0.9127	0.9305
NicMtgD	0.0225	0.0574	<b>0.0207</b>	0.0759	0.0869	0.0285	0.1398	0.0688	0.2334	0.0914		0.9639
SlvSAna	0.0752	0.0657	0.0449	0.0652	0.1015	0.0567	0.1342	0.0479	0.1684	0.0720	0.0368	

### 8.2.2. Análisis de las poblaciones originales sin Lanquín.

**Tabla 3:** Valores de Distancia Genética -D’N - e Índice de Nei - I’N - para las poblaciones propuestas sin Lanquín. En la parte inferior se observan los valores para la distancia genética – D’N- entre las poblaciones y en la parte superior los valores para los Índices de Nei -I’N-

	CoRiSil	GuaAVTu	GuaJtBr	GuaPete	GuaOSAS	HondYor	MxTxpnD	NicMasD	NicMasS	NicMtgD	SlvSAna
CoRiSil		0.91925	0.95667	0.84046	0.95418	0.8571	0.89799	0.76483	0.86002	0.96793	0.91092
GuaAVTu	0.0842		0.93829	0.82919	0.90384	0.83444	<b>0.96609</b>	<b>0.75715</b>	0.8589	0.93491	0.92895
GuaJtBr	0.0443	0.0637		0.90611	0.96319	0.88736	0.95028	0.81554	0.89691	<b>0.97482</b>	0.95935
GuaPete	0.1738	0.1873	0.0986		0.90402	0.89467	0.89458	0.89021	0.9258	0.89826	0.91357
GuaOSAS	0.0469	0.1011	0.0375	0.1009		0.90756	0.91585	0.84265	0.89503	0.9657	0.93716
HondYor	0.1542	0.181	0.1195	0.1113	0.097		0.86424	0.90086	0.89306	0.90475	0.88285
MxTxpnD	0.1076	<b>0.0345</b>	0.051	0.1114	0.0879	0.1459		0.82094	0.89574	0.93501	0.95428
NicMasD	0.2681	<b>0.2782</b>	0.2039	0.1163	0.1712	0.1044	0.1973		0.94327	0.85727	0.87503
NicMasS	0.1508	0.1521	0.1088	0.0771	0.1109	0.1131	0.1101	0.0584		0.92118	0.92811
NicMtgD	0.0326	0.0673	<b>0.0255</b>	0.1073	0.0349	0.1001	0.0672	0.154	0.0821		0.95256
SlvSAna	0.0933	0.0737	0.0415	0.0904	0.0649	0.1246	0.0468	0.1335	0.0746	0.0486	

### 8.2.3. Análisis de las poblaciones originales más Jutiapa Carrizal y Quiché.

**Tabla 4:** Valores de Distancia Genética -D’N - e Índice de Nei - I’N - para las doce poblaciones propuestas más Jutiapa Carrizal y Quiché general. En la parte inferior se observan los valores para la Distancia genética –D’N- entre las poblaciones y en la parte superior los valores para los Índices de Nei -I’N-

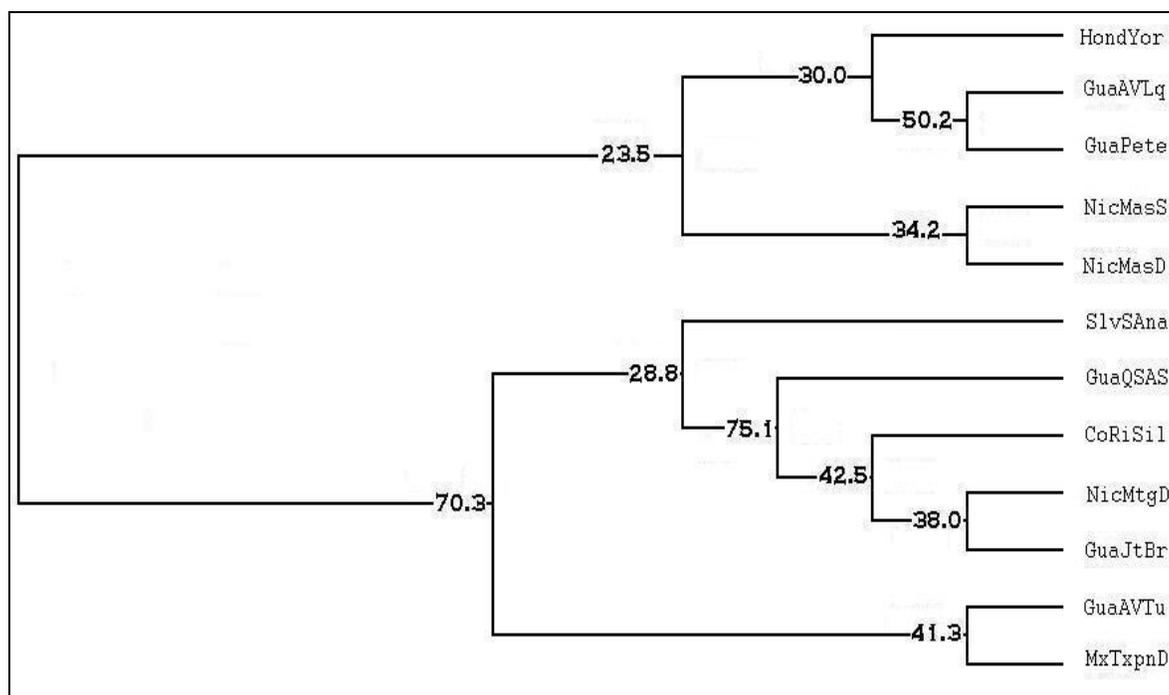
	CoRiSil	GuaAVTu	GuaJtBr	GuaJtCa	GuaAVLq	GuaPete	GuaOSAS	GuaQuic	HondYor	MxTxpnD	NicMasD	NicMasS	NicMtgD	SlvSAna
CoRiSil		0.9440	0.9592	<b>0.7079</b>	0.8821	0.8455	0.9693	0.9082	0.8588	0.9116	0.7123	0.8318	0.9684	0.9339
GuaAVTu	0.0576		0.9710	0.8049	0.9062	0.8885	0.9564	0.9232	0.8841	<b>0.9850</b>	0.7996	0.9072	0.9653	0.9624
GuaJtBr	0.0417	0.0294		0.7770	0.8998	0.8860	0.9671	0.9405	0.9001	0.9499	0.7913	0.8727	<b>0.9801</b>	0.9588
GuaJtCa	<b>0.3455</b>	0.2170	0.2523		0.8378	0.8465	0.7797	0.8344	0.8270	0.8420	0.8766	0.9174	0.7866	0.8361
GuaAVLq	0.1255	0.0985	0.1056	0.1770		0.9517	0.9027	0.9268	0.9344	0.9139	0.8222	0.9001	0.9219	0.9310
GuaPete	0.1678	0.1182	0.1210	0.1667	0.0495		0.8855	0.9328	0.9015	0.8885	0.8131	0.9096	0.9079	0.8990
GuaOSAS	0.0312	0.0446	0.0335	0.2488	0.1024	0.1216		0.9476	0.8964	0.9304	0.7873	0.8824	0.9692	0.9538
GuaQuic	0.0963	0.0799	0.0613	0.1811	0.0760	0.0696	0.0538		0.9434	0.9108	0.8464	0.9113	0.9461	0.9382
HondYor	0.1522	0.1232	0.1052	0.1899	0.0679	0.1037	0.1094	0.0583		0.8827	0.8932	0.8847	0.8971	0.9030
MxTxpnD	0.0926	<b>0.0151</b>	0.0514	0.1720	0.0900	0.1182	0.0721	0.0934	0.1248		0.8190	0.9230	0.9479	0.9630
NicMasD	0.3393	0.2237	0.2341	0.1317	0.1958	0.2069	0.2391	0.1668	0.1129	0.1997		0.9134	0.7938	0.8432
NicMasS	0.1842	0.0974	0.1362	0.0862	0.1053	0.0947	0.1251	0.0929	0.1225	0.0801	0.0906		0.8931	0.9338
NicMtgD	0.0321	0.0353	<b>0.0201</b>	0.2400	0.0813	0.0966	0.0313	0.0554	0.1086	0.0535	0.2309	0.1131		0.9709
SlvSAna	0.0684	0.0383	0.0421	0.1790	0.0715	0.1065	0.0473	0.0638	0.1020	0.0377	0.1706	0.0685	0.0295	

### 8.3. Análisis de Agrupamiento.

Luego de las tablas, se encontrarán los dendrogramas elaborados utilizando los valores de Distancia Genética –D’N- para cada uno de los análisis. En el árbol se pueden observar nodos asociados por pares, agrupados de acuerdo a su porcentaje de ocurrencia en 1000 repeticiones.

#### 8.3.1. Análisis de las doce poblaciones originales.

**Figura 12:** Dendrograma consenso con el método UPGMA para las doce poblaciones propuestas.

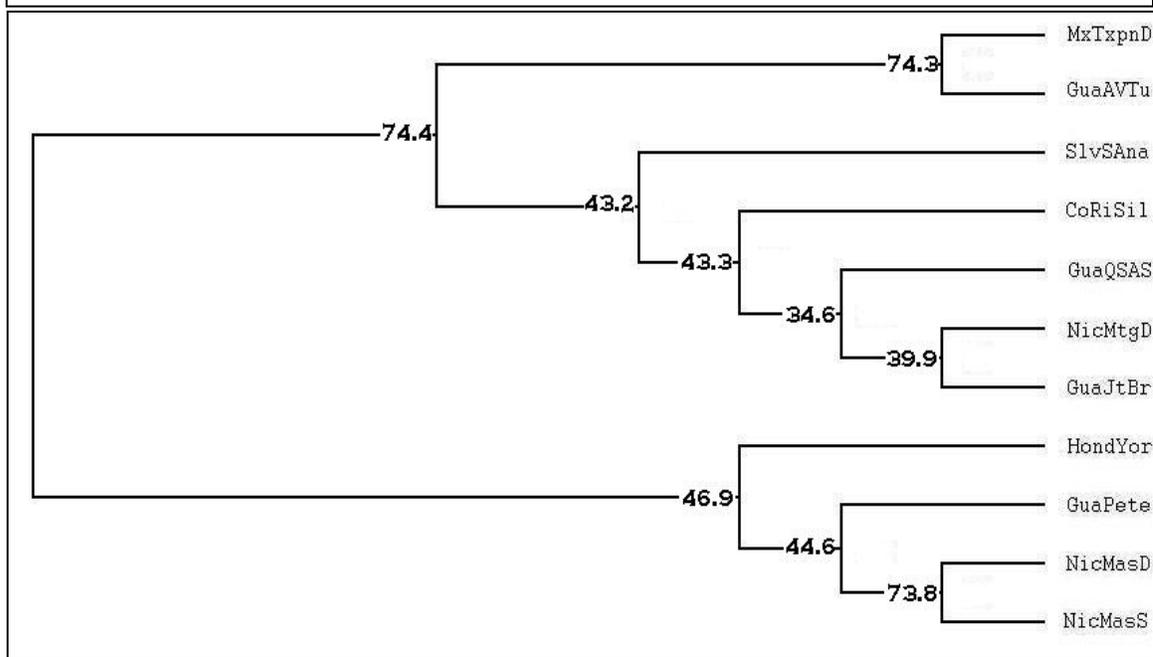


Como se observa en el primer grupo Lanquín con Petén en Guatemala y Yoro en Honduras más Masaya silvestre y doméstica de Nicaragua, existe cierta tendencia a asociar a las poblaciones en relación con su ecotopo silvestre, lo cual es el caso de la mayoría de poblaciones en este grupo. El segundo grupo es una mezcla de diversas poblaciones de Centroamérica. El tercer grupo Tukurú, Alta Verapaz en Guatemala y Tuxpan, Veracruz en México presenta una mezcla con relación a distribución geográfica y ecotopo.

### 8.2.2. Análisis de las poblaciones originales sin Lanquín.

Para este análisis donde se retiró a la población de Lanquín, puede observarse que básicamente no existe un cambio en la estructuración del dendrograma. Únicamente la población de Petén queda individual para relacionarse un poco más con las de Honduras. Esto es importante ya que demuestra la relación que existe en los individuos que se encuentran en cada grupo en especial en el conformado por las poblaciones de Masaya silvestre y doméstico de Nicaragua, Petén de Guatemala y Yoro en Honduras.

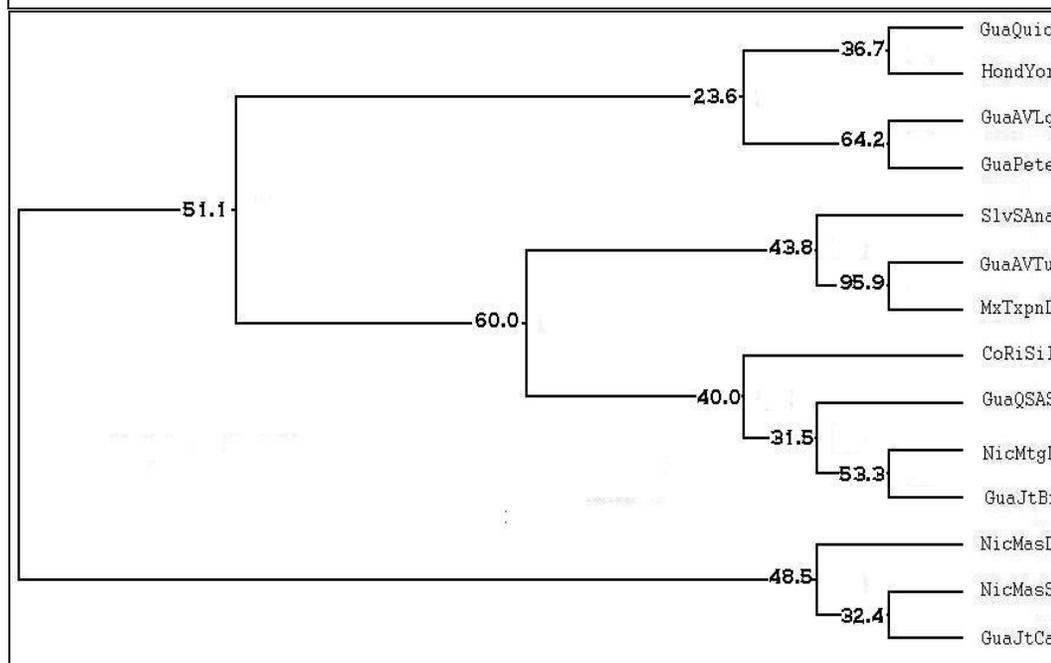
**Figura 13:** Dendrograma consenso con el método UPGMA para las doce poblaciones propuestas sin Lanquín.



### 8.2.3 Análisis de las poblaciones originales más Jutiapa Carrizal y Quiché.

En esta ocasión se logró que las poblaciones del grupo de Lanquín y Petén en Guatemala se separarán del grupo formado por Yoro en Honduras la cual esta unida a la mezcla de diversas poblaciones de Quiché en Guatemala. El grupo de Masaya silvestre, Nicaragua se unió con el grupo de Jutiapa Carrizal en Guatemala con Masaya doméstica de Nicaragua, separándose del resto de poblaciones como un grupo externo. Los otros grupos que permanecen constantes son los de diversas poblaciones de Centroamérica y el de Tuxpan, Veracruz en México con Tukurú, Alta Verapaz en Guatemala con Santa Ana, el Salvador.

**Figura 14:** Dendrograma consenso con el método UPGMA para las doce poblaciones propuestas más Quiche general y Jutiapa Carrizal.



Es de mencionarse que de forma general se observó una tendencia de las poblaciones a agruparse de manera similar en los diferentes análisis. Las poblaciones de La Brea, Jutiapa en Guatemala y San Ramón, Matagalpa en Nicaragua siempre tendieron a aparecer unidas formando un grupo junto a las demás poblaciones centroamericanas.

Las poblaciones de Tukurú, Alta Verapaz en Guatemala y Tuxpan, Veracruz en México, también tendieron a aparecer unidas en todos los análisis.

Las poblaciones silvestres de Nicaragua y Guatemala se mezclaban en un grupo junto a poblaciones procedentes de los mismos países o de Honduras. La excepción fue en este último análisis donde al agregar a El Carrizal, Jutiapa y Quiché, las poblaciones de Nicaragua se separaron para asociarse con la población de El Carrizal, Jutiapa y la población de Honduras se asoció con la población de Quiché.

#### **8.4. Coefficientes de Fijación ( $F_{ST}$ ) y Número efectivo de Migrantes(Nm).<sup>2</sup>**

Mediante el programa RAPDFST se obtuvieron los valores de Coeficiente de Fijación  $-F_{ST}$  y Número efectivo de migrantes  $-Nm$ . Estos valores fueron proporcionados por medio de tres métodos de los cuales el de Lynch & Milligan presentó diferencia en los resultados obtenidos, ya que es para poblaciones pequeñas. Por lo cual se escogieron sólo los dos que se observan.

**Tabla 5:** Cuadro con los valores de los Coeficientes de Fijación  $-F_{ST}$  y el Número Efectivo de migrantes  $-Nm$ -

	Wright		Weir & Cockerham	
	$F_{ST}$	Nm	$F_{ST}$	Nm
<b>Doce poblaciones originales.</b>	0.187	1.100	0.195	1.000
<b>Poblaciones originales sin Lanquin.</b>	0.180	1.100	0.188	1.100
<b>Poblaciones originales más Jutiapa Carrizal y Quiche.</b>	0.175	1.200	0.188	1.100

#### **8.5. Reproducibilidad de la Técnica.**

Se realizaron dos pruebas para verificar la reproducibilidad de la Técnica de RAPD PCR. Esta técnica aunque provee la ventaja de estudiar el polimorfismo en las frecuencias génicas de poblaciones cuyo genoma no se conoce, también posee la debilidad de no tener reproducibilidad confiable por lo cual se elaboraron dos pruebas mientras se amplificaba el ADN.

<sup>2</sup> Observar todos los datos en Anexos en Tablas de la 7-9, Págs. 98 a 0.

**Tabla 6:** Cuadro con los valores de reproducibilidad para las ampliaciones dentro y entre los geles.

	<b>L1</b>	<b>L4</b>	<b>L5</b>	<b>Promedio.</b>
<b>Reproducibilidad dentro.</b>	94.38%	94.64%	96.30%	95.10%
<b>Reproducibilidad entre.</b>	82.24%	76.02%	79.13%	79.13%

Una consistía en colocar repeticiones de individuos **dentro** de la misma ampliación, por medio de ésto se evaluaría qué grado de reproducibilidad daban las condiciones para cada individuo dentro de la ampliación. La otra consistía en colocar un mismo individuo como repetición **entre** las diferentes ampliaciones por medio de ésto se pretendía verificar que la elaboración de una ampliación en un tiempo determinado, fuera confiable. En todos los casos se empleó el ADN procedente de una misma extracción.

---

## **9. DISCUSION DE RESULTADOS.**

### **9.1. Loci Amplificados.**

Como se observa en la sección 8.1 en la tabla 1, los porcentajes de amplificación para los cebadores L4 y L5 varían sólo en un grado de uno por ciento, lo cual puede considerarse como una diferencia baja. De igual forma el hecho de poseer porcentajes de amplificación semejantes para todos los cebadores (L1,L4 y L5) puede considerarse como un buen indicador de que las condiciones a las que se han visto sometidos estos son constantes para cada uno. La diferencia en cuanto a porcentajes de amplificación para cada cebador puede deberse a factores como:

- la composición de nucleótidos del cebador ya que la naturaleza y cantidad de los mismos determina el valor de la temperatura de separación ( $T_m$ = temperature melting) a la cual el cebador puede funcionar al máximo con precisión.
- De igual forma la identidad y el porcentaje de los nucleótidos que conforman el genoma de la chinche puede determinar que las secuencias de los cebadores sean encontradas en menor o mayor grado produciendo los resultados que siempre se obtienen (Brown TA, 1995).

### **9.2. Análisis realizados.**

Se realizaron tres análisis, con diferente número de poblaciones:

El primero consistía en doce poblaciones; ocho poblaciones domésticas y cuatro silvestres. Se escogió una población o más por país, se buscó en lo posible que hubiera una mezcla de poblaciones silvestres y domésticas, ya que esto permitiría la observación de la existencia de posible flujo migratorio entre diversos ecotopos. De Guatemala se escogieron poblaciones que fueran representativas de las diferentes regiones del país y ecotopo. De los demás países se trabajó con las poblaciones disponibles. Nicaragua fue el segundo país con más poblaciones involucradas, de ellas Masaya es de sumo interés ya que se ha podido observar el ingreso de individuos silvestres a los ambientes domésticos, mientras que Matagalpa es uno de los lugares con más seroprevalencia para la enfermedad. A estas poblaciones se les llamó las originales ya que son las que fueron propuestas al inicio del proyecto de investigación.

---

El segundo análisis esta constituido por once *de* las poblaciones originales al retirar a Lanquín. Esto debido a que en trabajos previos, en los que se estudiaba solo poblaciones de chinches silvestres y domésticas de Guatemala, la población de Lanquín presentaba valores que la separaban de las demás poblaciones, (Calderón *et al*, 2004) además se ha podido observar en el trabajo de campo esta población una proporción de machos vrs hembras mucho menor que el de otras poblaciones, es decir la proporción de machos presente en la población es menor en comparación de la encontrada para otras poblaciones, esto indica poca movilidad de los miembros de esta población y es interesante ya que implicaría otra dinámica poblacional para ésta. También morfológicamente se ha encontrado que los miembros de esta población presentan características morfológicas muy diferenciales con respecto a las demás poblaciones incluso silvestres, esto es en cuanto al tamaño, el color ya que los individuos tienden a ser más simétricos, grandes y de colores pálidos frente al gran colorido encontrado. En trabajos realizados con técnicas fenéticas como la morfometría esta población se ha presentado separada como otra especie (Díaz, 2002). Se considera que estas diferencias encontradas en la población se deben al aislamiento moderado que la misma ha sufrido debido a que se le suele encontrarse asociada a cuevas. Al discutir todas estas características se considera necesaria la realización de una prueba para observar cómo la ausencia de esta población puede afectar la agrupación de las demás.

El tercer y último análisis consistió en el estudio de catorce poblaciones: las poblaciones originales más El Carrizal en Jutiapa (GuaJtCa) y Quiché (GuaQuic) (constituida por varias aldeas de Quiché). Estas poblaciones fueron introducidas al análisis ya que en estudios anteriores donde se estudian poblaciones de tres diferentes países se han observado resultados interesantes. El Carrizal en Jutiapa (GuaJtCa) siempre se separa del resto de las poblaciones, presentándose como si se tratase de un grupo externo, con lo cual nos indicaría que muy probablemente se trata de una población constituida por individuos de otra especie diferente a *Triatoma dimidiata*. Mientras que Quiché (GuaQuic) (constituida por varias aldeas de Quiché) es una población que tiende a enlazarse fuertemente con una población doméstica al norte de Honduras, vale la pena recalcar que de igual forma este último modelo es frecuentemente encontrado en diversos modelos incluso de morfometría por lo que puede considerarse de mucha validez. (Landaverde, 2003) (Monroy, 2003)

---

### **9.3. Índice de Nei (I'N), Distancia Genética (D'N) y El complejo de especie de *Triatoma dimidiata*.**

El Índice de Nei, (I'N) posee un valor máximo de 1, en donde indica que las poblaciones analizadas con dicho valor poseen frecuencias génicas idénticas. El valor de Distancia Genética, (D'N) posee un valor mínimo de 0, en el cual indica que cuando las poblaciones poseen frecuencias génicas muy similares la distancia genética entre ellas no existe.

En el Análisis de las doce poblaciones originales, se observa en la tabla 2, que los rangos del Índice de Nei oscilan en valores que van desde 0.7104 hasta 0.9795 y la distancia genética en valores desde 0.0207 hasta 0.3419. Para este análisis las poblaciones con el índice de Nei más alto y que por lo tanto eran las poblaciones con mayor semejanza genética eran las de La Brea, Jutiapa en Guatemala (GuaJtBr) y San Ramón, Matagalpa en Nicaragua (NicMtgD) con un I'N = 0.9795. Seguidas de las poblaciones de Tucurú, Alta Verapaz en Guatemala (GuaAVTu) y Tuxpan, Veracruz en México, (MxTxpnD) con un I'N = 0.9454

En la tabla 3, observamos los valores de I'N y D'N para el análisis realizado sin Lanquín, en la cual no existe ninguna diferencia ya que las poblaciones más cercanas siguen siendo –GuaJtBr- y –NicMtgD- con un I'N = 0.9748, seguidas de las poblaciones de –GuaAVTu- y –MxTxpnD-, con un I'N = 0.9661. Los valores de I'N para este análisis van desde 0.7571 a 0.9748 y los de D'N desde 0.0255 a 0.2782, valores muy similares a los encontrados en el análisis anterior, de todas las poblaciones incluyendo Lanquín

En el análisis de las catorce poblaciones, las originales más Carrizal, Jutiapa en Guatemala (GuaJtCa) y Quiché (GuaQuic) (conformada por diversas aldeas del departamento), se observan que la presencia de estas poblaciones tiene mayor influencia sobre los resultados en comparación con la población de Lanquín. En este análisis hubo una diferencia en las poblaciones más cercanas siendo éstas (GuaAVTu) y (MxTxpnD). Este cambio en los valores de I'N y D'N no es muy diferente de los anteriores y en realidad sólo se da un incremento en la cercanía existente entre (GuaAVTu) y (MxTxpnD), mientras las poblaciones de (GuaJtBr) y (NicMtgD), se mantienen con valores semejantes. Los valores de I'N se encuentran entre 0.7079 y 0.9850 y de D'N de 0.0151 a 0.3455 los cuales siguen siendo valores similares a los encontrados en los otros análisis.

---

Dujardin, *et al.* (2002) señalaron que el valor de D’N obtenido a partir de isoenzimas entre dos especies diferentes *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* era de 0.504. Los valores encontrados entre poblaciones son muy inferiores, lo cual sugeriría que se encuentran en el rango en el cual se les puede considerar como miembros de una misma especie, sin embargo debe considerarse, diferentes aspectos:

- La utilización de una técnica totalmente diferentes puede proporcionar valores de distancia genética que sirvan únicamente como referencia ante la ausencia de trabajos ejecutados con la misma técnica para la especie, sin embargo no nos dan un acercamiento verdadero a los valores reales que nos ayuden a clasificar a la especie. Esto debido a que cada técnica obtiene los índices de forma diferente: para la técnica de RAPD-PCR se utiliza todo el genoma del individuo mientras que para isoenzimas son ciertas secuencias de ADN las que se estudian por medio de estas, es decir no se comparan la misma identidad ni la misma cantidad de loci. De igual forma según Dujardin, (Dujardin, 1997) la técnica de RAPD es una técnica en la cual no se puede asumir el principio de H.W. mientras que para isoenzimas si se hace esto.
- El índice de distancia genética D’N fue obtenido entre dos especies pertenecientes a dos complejos totalmente diferentes; El complejo *Triatoma* (*T. dimidiata*) y el complejo *Rhodnius* (*Rhodnius prolixus*) (Carvalho, 2000). Por lo cual individuos pertenecientes al mismo complejo pero de diferentes especies siempre quedarán por debajo de este valor, pudiendo caer en el error de clasificar a dos diferentes individuos como *T. dimidiata* cuando en realidad podrían ser dos especies diferentes. En este caso lo recomendable sería la utilización de un Índice de distancia genética D’N entre dos especies del mismo complejo como *T. dimidiata* vrs *T. mexicana* o *T. nítida*.

Sin embargo diversos estudios sobre las poblaciones de *T. dimidiata* han mostrado que la diversidad morfológica que poseen, presenta patrones difíciles de explicar y sugieren un fuerte proceso de diferenciación para algunas poblaciones.

Entonces ¿Puede considerarse a las poblaciones de *T. dimidiata* como una misma especie? Según estudios de morfometría la población silvestre de Lanquín tiende a separarse del grupo comprendido por diversas poblaciones de *T. dimidiata* lo cual sugiere que esta población ha sufrido de procesos de aislamiento que han logrado su especiación

---

(Díaz, 2002). De igual forma en trabajos donde se han comparado poblaciones de Guatemala, la población de Lanquín y la de El Carrizal en Jutiapa (GuaJtCa) se han presentado como poblaciones muy diferenciadas del resto (Calderón *et al*, 2004)(Landaverde, 2003).

En este trabajo (GuaJtCa), es una población que al ser introducida se ha separado del grupo de las poblaciones de *T. dimidiata*. Junto a esta población se han separado las poblaciones nicaragüenses de Masaya silvestre y doméstica, como si se tratase de un grupo externo. La población de Lanquín ha quedado dentro del grupo de todas las poblaciones de *T. dimidiata*, sin embargo esta ha formado un grupo diferente al de las poblaciones domésticas, unida fuertemente a la población silvestre de Petén por lo cual debe considerarse la posición taxonómica de ambas poblaciones.

Al observar los valores de Distancia genética D’N se observa que los valores más altos corresponden siempre a la población de GuaJtCa. Al no poder utilizar un valor más apropiado de índice de distancia genética D’N, que nos ayude a discriminar que poblaciones son parte aún del complejo de especies formado por *T. dimidiata*, se hacen deducciones de las mismas en relación a su dinámica poblacional en los diferentes análisis realizados. En estos análisis se puede observar que ambas poblaciones tienden a separarse del grupo de poblaciones de *T. dimidiata*. En base a esto puede deducirse que la población (GuaJtCa) podría tratarse de otra especie diferente a *T. dimidiata* o de una población muy diferenciada del resto. La población de Lanquín también puede ser considerada una especie con mucha diferenciación genética que se encuentra en proceso de especiación o que ya es otra especie.

Por otro lado Dorn, *et. al.* (2003) con la misma técnica de RAPD-PCR, señalaron que los valores para poblaciones que pertenecen a una misma especie y que poseen mucha similitud genética al no encontrarse reproductivamente aisladas y formar parte de una gran población panmíctica entre y dentro de aldeas adyacentes en Guatemala, se encontraba entre 0.013 y 0.022. En este trabajo las poblaciones de (GuaJtBr) y (NicMtgD) poseen un valor que indica poca separación genética entre las poblaciones en dos de los tres análisis y la de (GuaAVTu) y (MxTxpnD) en uno de los tres análisis, por lo cual debe dársele mayor atención, ya que ésto podría indicar la existencia de flujo genético fuerte entre éstas poblaciones. Los valores de D’N, para ambas agrupaciones son muy bajos por lo cual puede deducirse que la diferenciación genética es leve y por lo

---

tanto debe de existir algún fenómeno que hace que las poblaciones no se separen genéticamente como subpoblaciones.

Debe señalarse los posibles factores que pudieran influenciar en la formación de agrupaciones, los cuales podrían ser:

- el hecho de existiera una correlación positiva para la relación entre la distancia genética y la distancia geográfica.
- A la existencia de una selección de hábitat, ocasionada por la preferencia de la chinche a determinados tipos de hábitat y clima. Provocando de esta forma que ella o su hospedero se muevan sólo entre lugares que tengan características similares.
- o a la poca diferenciación de una misma población ancestral separada de forma relativamente reciente.

De estos tres posibles factores debe tomarse con mucho cuidado el primero ya que si la distancia genética estuviera influenciada por distancia geográfica las poblaciones más cercanas podrían ser las de Quiché y Alta Verapaz, así como las de Jutiapa con el Salvador. Ya que estas poblaciones poseen aproximadamente entre 376 Km (Quiché-Alta Verapaz) y 184.64 Km (GuaJtBr-SalvStAn) correspondientemente en contraste de los más o menos 1,138 Km que existen para GuaJtBr-NicMtgD. De igual forma ya en otros trabajos se ha podido observar que las poblaciones del Atlántico, Lachúa, Petén y Lanquín que son geográficamente cercanas se encuentran genéticamente separadas (Calderón *et al*, 2004).

#### **9.4. Análisis de dendrogramas y de agrupamiento.**

De manera general puede observarse que los dendrogramas obtenidos para los análisis de las doce poblaciones originales y el de las poblaciones originales sin Lanquín presentan agrupaciones similares tendiendo a variar únicamente en los porcentajes de validación para cada agrupación. De esta manera se sugiere que la presencia de la población de Lanquín tiende a afectar los resultados de los análisis pero no de manera significativa, esto puede deberse quizá a que aunque la misma posee efectos de aislamiento, al encontrarse asociada a cuevas y a su relación con hábitat silvestre, de alguna manera ha logrado mantener cierto flujo genético con algunas poblaciones. Lo interesante en estos dos dendrogramas es observar como las poblaciones silvestres

---

tienden a agruparse en un grupo separado de las demás poblaciones que son de naturaleza domésticas (a excepción de Costa Rica que se une con el grupo de domésticas de Centroamérica).

En el tercer análisis sí se logran observar diferencias en cuanto a la agrupación de las poblaciones en el dendrograma. Encontrándose que la población de El Carrizal, Jutiapa se une a la población silvestre de Nindiri en Masaya, Nicaragua, que a su vez se une a la doméstica de Masaya. Esta agrupación se aparta del grupo de las poblaciones donde incluso se encuentran poblaciones silvestres, presentándose como un grupo aparte y diferente de las demás. Ya en otros trabajos la población de El Carrizal se había presentado como una población muy diferenciada como si se tratase de un grupo externo, en esta ocasión la forma en la que se agrupan los datos sugiere que las poblaciones de Masaya, Nicaragua se hallan también diferenciadas del resto de poblaciones de Centroamérica.

También se puede observar que aunque el grupo de Silvestres se encuentra dentro del grupo de *T. dimidiata* de Centroamérica el valor de validación de la agrupación de chinches de Centroamérica es alto por lo cual puede considerarse a estas poblaciones como otro grupo aparte diferenciadas del resto. Aquí también puede observarse la fuerte asociación de la población de Petén junto a Lanquín lo cual implica que debe considerarse la posición taxonómica de ambas poblaciones en relación a las demás.

La técnica de bootstrapping utilizada para obtener las matrices con los valores de distancia genética D’N, examina la consistencia con la cual los datos RAPD, permiten formar las relaciones que se encuentran en los dendrogramas entre las poblaciones estudiadas. Si la relación entre poblaciones se deriva de frecuencias génicas de menos del 50% de los loci que se están estudiando en el genoma se encontrará poco soporte de la técnica para el grupo formado.

Los resultados obtenidos para cada análisis deben ser discutidos individualmente para poder comprender los posibles factores que influenciaron en su aparición. Estos se discuten de acuerdo a las agrupaciones encontradas de esta forma:

#### **9.4.1. Agrupación Matagalpa-La Brea y otros de CA.**

En el análisis de las doce poblaciones originales, la agrupación correspondiente a NicMtgD-GuaJtBr posee un índice de distancia genética D’N =

---

0.0207 esto nos indica que existe poca diferencia genética. Estas poblaciones también aparecen agrupadas en el dendrograma.

Al analizar las condiciones ambientales de éstas observamos que las condiciones climáticas y de altura son más o menos similares, Matagalpa presenta clima Bosque húmedo Tropical y Jutiapa bosque húmedo subtropical, con altura entre los 600 y 900 msnm (Programa Nacional de Control de la Enfermedad Chagas Ministerio de Salud Nicaragua, 2001). La información ambiental es de interés ya que podría considerarse como un factor que influya para que estas poblaciones se encuentren relacionadas, esto debido a la posibilidad de que exista una preferencia de los organismos tanto del vector como del hospedero a moverse dentro o hacia determinados sitios que posean las características ambientales similares. Se observa también que los grados de infestación de *T. dimidiata* en dichas áreas son altos en ambas regiones, lo que sugiere que el comportamiento de ambas poblaciones es semejante. (NicMtgD de 10.7% y GuaJtBr de 12%).

Otro factor podría ser el hecho de que quizá exista un movimiento continuo de personas entre estas dos poblaciones en mayor grado que el que existe para las demás o que la semejanza entre las mismas se deba a que en algún momento reciente se realizó un transporte accidental pasivo de vectores de una población y que el tiempo transcurrido para lograr la diferenciación de las poblaciones aun no sea suficiente ante la presencia de flujo genético entre estas poblaciones. Algunos autores han encontrado por medio de técnicas como ADN ribosomal, ADN mitocondrial y morfometría enormes similitudes entre las poblaciones de *Triatoma dimidiata* de Ecuador y Honduras atribuyendo ésto a un efecto de introducción reciente por transporte pasivo del vector *Triatoma dimidiata* a las costas Ecuatorianas-peruvianas provocado por el hombre (Solis-Mena, 2000; Marcilla, A, 2001).

Al observar los grupos formados en el dendrograma, (figura 13) vemos que el grupo GuaJtBr-NicMtgD posee un porcentaje de repetición de 38 %, lo cual nos indica que estas poblaciones poseen algunos loci en común con una alto grado de similitud como se observa en los Índices de Nei -I'N- y de distancia genética -D'N-. Sin embargo, el bajo porcentaje de repetición nos indica también que los otros loci en cuales no poseen un alto grado de similitud, se están asociando con otras poblaciones

---

de Centroamérica como Costa Rica (CoRiSil) y San Andrés Sajcabajá en Quiché (GuaQSAS), también con altos grados de similitud, lo que se evidencia al observar los valores de los Índices de Nei. De esta manera se forma otro grupo con un porcentaje de repetición de 75.1 %, por lo cual esta ramificación posee mayor solidez. Finalmente a este grupo se une aunque con un porcentaje muy bajo de 28.8% El Salvador (SlvSAAna).

De igual forma, en el análisis de las once poblaciones originales sin Lanquín, se observa que todo el grupo se une con valores de porcentaje entre 39% y 43% con (SlvSAAna) totalmente unido al grupo. Lo cual nos muestra cómo todas las poblaciones centroamericanas comparten loci en común con valores de similitud significativos ( $I^*N$  arriba de 0.9).

En el análisis de las catorce poblaciones, originales más (GuaJtCa) y Quiché, (GuaQuic) se observa el mismo patrón de asociación de las poblaciones. La única diferencia es la separación de la población del (SlvSAAna) de todo este grupo para unirse al grupo de (MxTxpnD) y (GuaAVTu). Sin embargo el porcentaje de aparición de (SlvSAAna) con este grupo no tiene mucha validación, 43.8% por lo cual podría colapsarse el brazo que se une con dichas poblaciones y unirse al grupo de Centroamérica. Formando de nuevo el interesante corredor a través de una parte de las planicies costeras del pacífico de Centroamérica.

Al observar el grupo completo con las poblaciones ubicadas en el mapa de la figura 17 en anexos (Pág. 101) y el alto porcentaje de validación que posee el mismo, la interpretación de los resultados proporcionados por éste es más lógica. Aparentemente parece existir un patrón de flujo genético a través de esas poblaciones desde Guatemala hasta Costa Rica en su mayoría por el lado de la vertiente del Pacífico. Esta área como se observa en la gráfica es una área de planicies en su mayoría, con excepción de (GuaQSAS) que se encuentra situado en la base de la Sierra de Chuacús a 1500 msnm en Guatemala. Este patrón de flujo genético quizás no es lo suficientemente grande como para permitir que todas las poblaciones posean frecuencias genéticas muy similares, (a excepción del caso de NicMtgD-GuaJtBr) pero sí lo es para que se mantengan de alguna forma conectadas evitando de esta forma la separación de las poblaciones por aislamiento genético. Este patrón que une a las poblaciones de chinches de Centroamérica puede estar siendo

---

provocado principalmente por relaciones comerciales o de otra índole entre las diversas poblaciones haciendo de esta forma que las personas viajen continuamente a través de Centroamérica y accidentalmente transporten al vector entre su mercancía o sus pertenencias. Este fenómeno de transporte pasivo ha sido reportado por diversos autores para diversas especies de Triatomíneos (Zeledón, 1981; Schofield, 1994; Dumonteil, 2002).

Esto representa un factor importante a considerar para la formulación de propuestas de control del vector, ya que implica una dinámica de migración a través de la región Centroamérica.

#### **9.4.2. Agrupación Tuxpan-Tucurú.**

Para el análisis de las doce poblaciones originales, las poblaciones de (GuaAVTu) y (MxTxpnD), poseen un valor  $D'N = 0.0562$ , lo cual es un valor de distancia genética bastante bajo, por lo cual pueden considerarse como poblaciones con poca diferenciación genética. Estas poblaciones poseen condiciones ambientales similares, como el tipo de clima, el cual es cálido con un promedio de precipitación de 1600mm de agua y el tipo de vivienda el cual es de carrizo (bambú) en Tuxpan, (200) y de bambú en Tucurú (476 msnm). Por lo que de nuevo podría sugerirse que las condiciones ambientales similares influyen para que el vector o el huésped del mismo se movilice dentro de estas poblaciones (Salazar, *com pers*; Yurrita, *com pers*).

La relación que existe en este grupo es un poco más difícil de explicar ya que se observan otras poblaciones más cercanas con las que podría presentar mayor similitud genética, no sólo por el hecho de encontrarse geográficamente más cerca (Tucurú-San Andrés Sajcabajá, por ejemplo) sino porque la presencia de la sierra de las minas funcionaría como una barrera geográfica, para poblaciones más alejadas. De ésta forma sería de suponer que Tucurú-San Andrés Sajcabajá que se encuentran cerca no serían afectadas por la barrera provocada por la Sierra de las Minas al encontrarse ambas dentro del mismo sistema (Figura 18 en anexo Pág. 102).

Sin embargo, al observar el porcentaje de repetición de esta agrupación del 41.3% se entiende que no es un valor alto ya que en un 58.7% de las veces estas

---

poblaciones pueden aparecer agrupadas de otra forma. Analizando el nodo de unión entre el grupo GuaJtBr-NicMtgD y otras poblaciones de Centroamérica, se encuentra un porcentaje de 70.3%. Esto nos muestra que a pesar de que estas dos poblaciones se están uniendo y que poseen un alto valor de semejanza según su índice de Nei, en realidad más de la mitad de sus loci siguen relacionados con las poblaciones del resto de Centroamérica. Esto sugiere la existencia de un patrón de flujo genético a través de Centroamérica y México. Una vez más se vuelve a fijar la atención sobre el tipo de control que debe emplearse para la erradicación del vector ya que si este “corredor” es real ya sea por transporte accidental a través de la mercancía o pertenencias de personas migrantes, transporte pasivo a través de especies migrantes como aves o murciélagos, transporte activo anual de la chinche adulta en época seca o por algún otro tipo de razón que promueva la migración, significa que las estrategias de control a tomar para erradicar al vector *Triatoma dimidiata* o por lo menos lograr su disminución deben considerar estos aspectos y tomar medidas en cuanto a ellos (Bustamante, 2004; Dumonteil, 2002).

En cuanto al análisis de las once poblaciones sin Lanquín, se observa que aumenta el porcentaje presentado en el dendrograma consenso a un 74.3% indicándonos que la ausencia de Lanquín (GuaAVLq) aumenta la diferencia entre este grupo con el resto de Centroamérica, lo cual se observa también en el hecho de que los D’N son un poco mayores en este análisis (Tabla 3). Esto, se puede deber a que las poblaciones se hayan estructurado a través del tiempo diferenciándose, creando poblaciones aisladas que anteriormente se encontraban relacionadas a pesar de tener cierto grado de flujo genético.

En el análisis de las catorce poblaciones se observa que la agrupación de (GuaAVTu) y (MxTxpnD) poseen un I’N de 0.9850 y un D’N de 0.0151. (Tabla 4) (SlvSAAna) posee un valor muy bajo de unión a este grupo por lo que su valor podría unirse al del grupo de GuaJtBr-NicMtgD y Centroamérica. Aunque estos dos grupos, GuaJtBr-NicMtgD, Centroamérica y MxTxpnD- GuaAVTu se unen con un alto porcentaje de 60% mostrando la existencia de flujo genético a través del corredor formado por México y Centroamérica, el porcentaje de aparición entre estas últimas es extremadamente mayor, con un valor del 95.9% (figura 14).

---

Si bien es cierto que los factores ambientales y de hábitat podrían afectar el equilibrio de las frecuencias génicas al permitir o influenciar el flujo genético entre localidades con clima semejantes, el efecto de éste se observa para estudios como morfometría donde se analizan parámetros que son fácilmente influenciados por el ambiente. En el caso de estudios moleculares como RAPD-PCR es mucho más evidente la existencia de flujo genético por medio de migración.

Otro punto importante de discutir al observar los cambios en el análisis con catorce poblaciones es el cambio que se da al aparecer más estrechamente relacionadas las poblaciones de (MxTxpnD) y (GuaAVTu). Este cambio se puede deber quizá a que ante la presencia de más poblaciones se provoque que las relaciones de las ya presentes se vean más acentuadas. Este efecto puede ser causado por la existencia de estructuración en las poblaciones de *Triatoma dimidiata*. Es decir, las poblaciones de *Triatoma dimidiata* son en realidad “sub-poblaciones” de una gran población comprendida por las chinches de México y Centroamérica. Por razones entre las que se puede considerar el aislamiento, endogamia y deriva génica se da una fijación de los alelos única para cada “sub-población” que conforman a la población total. Al analizarlas por separado o por grupos sus frecuencias génicas aparentan estar en equilibrio Hardy-Weinberg y suelen dar resultados de sólo una parte de la estructuración formada. Sin embargo, al agregar más poblaciones se puede observar más del panorama de la “población total”, cuyas frecuencias génicas aparecen en desequilibrio Hardy-Weinberg, esto debido a que al agregar más poblaciones, aparecen loci que son únicos para cada una, resultados del procesos individuales de aislamiento y deriva génica y que dan como resultado la estructuración genética encontrada en las poblaciones. A esto se le llama efecto de Wahlund (Hedrick, 1983; Hartl & Clark, 1989; Dorn *et al*, 2003).

#### **9.4.3. Agrupación Petén-Lanquín y Honduras.**

Se puede observar, en el análisis de las doce poblaciones originales, que esta agrupación permanece constante. En diferentes investigaciones en las cuales se ha trabajado con estas poblaciones se encuentra que constantemente las poblaciones silvestres de Petén y Lanquín están asociadas con valores de D’N cercanos y la

---

población de Yoro, (HondYor) se une a este grupo junto con el conjunto de varias poblaciones de Quiché (Landaverde, 2003).

En otros trabajos donde sólo se comparan poblaciones de Guatemala, se observa también que estas dos poblaciones (Petén y Lanquín) no se unen con las demás. Se separan del resto con valores casi similares. Sugiriendo, por medio de ésto, que tienen algo en común (Bustamante, 2001; Calderón *et al*, 2004; Ordóñez, 2002).

Si se observan las condiciones ambientales en estas poblaciones son similares, un mismo ecotopo el silvestre, con Cuevas en Lanquín, Alta Verapaz y en Yaxhá, Petén encontrarseles frecuentemente asociadas a chultunes (pequeñas cuevas en el suelo construidas por los Mayas). Esto nos sugiere que podría estarse dando también una selección por la preferencia de la chinche a determinados tipos de hábitat y clima, provocando de esta forma que ella principalmente o su hospedero se puedan mover sólo entre lugares que tengan características similares (Bustamante, 2001).

En el análisis de las once poblaciones, sin Lanquín, se observa que este grupo tiende a mantenerse casi similar variando únicamente en cuanto a los valores de solidez de las agrupaciones. Esta conducta se ha observado en otros trabajos donde la presencia de Lanquín provoca que las poblaciones se diferencien más y al retirarla las poblaciones tienden a unirse, mostrando la existencia de flujo genético. Esto puede ser provocado quizá por el grado de aislamiento que esta población posee. En este punto es interesante mencionar que la población de Petén fuertemente unida a la de Lanquín, queda sola al retirar a Lanquín siempre en el grupo de las silvestres, no se asocia directamente con ninguna otra población. Esto es interesante ya que implicaría que la población de Petén también presenta características individuales que la diferencian fuertemente de otras poblaciones, por lo cual debe reconsiderarse la forma en la cual esta ha sido clasificada hasta ahora.

En el último análisis con las dos poblaciones extras, parece ser que el principal factor que podría afectar a estos individuos es quizá la preferencia por parte del insecto de ambientes y ecotopo similares, lo cual puede provocar que la migración se de en mayor proporción entre estas poblaciones. Esta preferencia podría ser provocada por el tipo de hospedero del vector que posiblemente puede

---

poseer una distribución entre éstos hábitats. Lo más interesante de esta formación es observar cómo Honduras se separa del grupo para unirse con Quiché y las silvestres del norte de Guatemala (ver figura 19 en anexo. pág.102). Esto podría ser influenciado por el efecto de barrera que el sistema montañoso del norte de Guatemala y Honduras posee.

De esta forma puede deducirse que la población de Lanquín es una población en proceso de especiación debido a que posee mayores grados de aislamiento que las demás poblaciones lo cual se evidencia en la disminución de los índices de distancia genética del grupo al presentarse esta población incluida.

De igual forma si esta población se asocia tan cercanamente a Petén entonces debe de reconsiderarse la posible posición taxonómica de esta población ya que los resultados sugieren que Petén al igual que Lanquín es otra población con bastante diferenciación genética que puede encontrarse en proceso de especiación junto a Lanquín.

#### **Agrupación Honduras-Quiché.**

Esta agrupación continuamente aparece asociada en diversos análisis incluidos los de morfometría (Ver figura 24 y 25 en anexo Pág. 107). Ya que como se observa en la Figura 18 en anexos en Pág. 102, éstas poblaciones se encuentran dentro del sistema conformado por las sierras que formaban América nuclear. Quizá como punto extra esta misma conformación ha favorecido la migración de personas u otro tipo de hospedero entre estas áreas en la actualidad contribuyendo a la dispersión del vector.

#### **9.4.4. Agrupación Nicaragua, Masaya silvestre y Doméstico.**

En el análisis de las doce poblaciones originales, se observa que dicha población presenta de igual forma resultados similares a los encontrados en otros estudios donde las poblaciones silvestres y doméstica de Masaya, Nicaragua se observan agrupados (Landaverde, 2003). En estudios de Morfometría también se han encontrado estos resultados (figura 24 y 25 en anexo Pág. 107) donde todas las poblaciones de Nicaragua, Masaya domésticas y silvestres y Matagalpa se encuentran asociadas.

---

A diferencia de las demás agrupaciones, los resultados en éste caso nos muestran que a pesar de la diferencia de ecotopo al cual la chinche se encuentra asociada, ésta puede movilizarse con suma facilidad al otro. Para fines de control el movimiento de importancia es de silvestre a doméstico, ya que nos indicaría que la posible fuente de reinfestación en las viviendas rurales provenga de ecotopos silvestres. Sin embargo algo importante a considerar es que ambas poblaciones se encuentran muy cerca geográficamente. La población silvestre proviene del Volcán Masaya en Nindirí, Masaya (NicMasS) y la población doméstica a Masatepe, Masaya (NicMasD) la cual esta muy cerca del volcán (Figura 26, anexo en Pág. 108). Unido a esto el grado de alteración del ecotopo silvestre, provoca que la chinche tenga que movilizarse, ya sea por transporte pasivo en animales silvestres que invaden las viviendas, transporte accidental pasivo al ser introducida en madera u otro material que las comunidades utilicen o transporte activo del vector adulto. De esta manera es como se da la migración del vector de ecotopo silvestres a domésticos adaptándose a su nuevo nicho. (Bustamante, 2004)

Otro factor interesante a discutir, es que los valores de validación del ‘bootstrapping’ son bajos para esta población llegándola a unir con la agrupación de las silvestres de Guatemala y domésticas de Honduras. Esto sugiere que el hábitat silvestre influencia de alguna forma el desarrollo evolutivo de las poblaciones de *Triatoma dimidiata*. Quizá, la influencia esté siendo provocada por el movimiento de ésta en hábitat similares por la preferencia que la misma o su hospedero posea por determinadas condiciones ambientales.

Como se mencionó la ausencia de Lanquín tiende a provocar una mayor cercanía entre las poblaciones ya que para este caso el porcentaje de aparición de este grupo sube a un 73.8% entre las poblaciones silvestres y domésticas de Masaya, Nicaragua, indicándonos la existencia de un flujo migratorio entre poblaciones silvestres y domésticas lo cual se ve mayormente reforzado al unirse a éstas la población de Petén (GuaPete) Silvestre y la de Honduras Doméstica (HondYor).

Para el análisis con catorce poblaciones se observa que estas poblaciones se separan totalmente de todos los grupos. Presentándose como un grupo externo diferenciado de las poblaciones de *T. dimidiata*. La fuerte relación entre las poblaciones de El Carrizal en Jutiapa y las poblaciones silvestres y domesticas de

Masaya en Nicaragua sugiere que son el resultado de un efecto fundador reciente posiblemente provocado por el transporte accidental de algunos individuos en pertenencias o mercancías. Esto se ve reforzado como se mencionó anteriormente con los hallazgos realizados para las poblaciones de Honduras y Ecuador de *Rhodnius prolixus*, genéticamente similares por transporte accidental pasivo (Solis-Mena, 2000; Marcilla, A, 2001).

La asociación de El Carrizal, Jutiapa a las poblaciones silvestres de Nicaragua, sugieren que esta población posee una dinámica poblacional muy activa tratándose quizá de una especie con mucho movimiento, lo cual la asocia con las poblaciones silvestres de Nicaragua. Sin embargo este movimiento no parece ser entre poblaciones domésticas ya que esto la uniría a las diversas domésticas presentes en el estudio o quizá esta preferencia de movimiento se deba a una diferenciación fuerte de esta población con respecto a las demás. Finalmente la forma como la población de El Carrizal en Jutiapa se presenta en este trabajo y en otros donde se estudiaban poblaciones de Guatemala, Honduras y Nicaragua, parece sugerir que esta población observada generalmente como un grupo externo se trata de una población con un alto grado de diferenciación genética y que quizá presenta ya una especiación avanzada con respecto a las demás poblaciones. (Landaverde, 2003)

#### **9.5. Coefficientes de Fijación ( $F_{ST}$ ) y Número efectivo de Migrantes( $N_m$ ).**

Con el fin de describir el arreglo de la variación genética en poblaciones subdivididas, se desarrolló un enfoque que consiste en tres diferentes coeficientes F. Estos son índices de correlación y son diferentes de los estadísticos F usados para el análisis de varianza. En el presente trabajo se utiliza el Índice de Fijación  $F_{ST}$  el cual es la medida de la diferenciación genética de “sub-poblaciones” y siempre es positivo. Es decir que nos indicará en qué porcentaje las frecuencias génicas de dichas “sub-poblaciones” están perdiendo heterocigosidad (Hedrick, 1983). Como puede observarse en la Tabla 5, todos los valores para  $F_{ST}$  según Wright y según Weir & Cockerhan están entre un rango de 0.175 y 0.195 y según Lynch & Milligan de 0.233 a 0.240.

Wright en 1978 sugirió ciertos rangos para la interpretación de los  $F_{ST}$ :

- El rango de 0 a 0.05 puede ser tomado como un indicador de poca diferenciación genética

- 
- El rango de 0.05 a 0.15 indica una diferenciación genética moderada.
  - El rango de 0.15 a 0.25 indica una diferenciación genética grande.
  - Los valores de  $F_{ST}$  superiores a 0.25 indican una diferenciación genética muy grande. (Calderón *et al*, 2004)

Nuestros datos se encuentran dentro del rango de una diferenciación genética grande. En este trabajo se puede observar perfectamente cómo ante la presencia de Lanquín los valores de  $F_{ST}$  son mayores (0.187- 0.240) en comparación de los obtenidos al retirar a dicha población (0.180-.233). En otros estudios realizados con sólo seis poblaciones de Guatemala puede encontrarse que los valores de  $F_{ST}$  oscilan entre 0.239 y 0.500 con Lanquín y entre 0.171 a 0.187 sin Lanquín.

Estos resultados parecen indicarnos que la presencia de Lanquín aumenta el nivel de diferenciación genética de las poblaciones, lo cual pueda deberse en parte a que esta población pertenece a un ambiente aislado como lo son las cuevas y que al incluir a esta población se pueda observar el efecto que dicho aislamiento ha tenido sobre las frecuencias génicas de esta población, haciéndola diferente y separándola de las demás.

Sin embargo otro factor interesante de observar es que al agregar más poblaciones Carrizal, Jutiapa y a Quiché podemos observar como los valores de  $F_{ST}$  disminuyen. Al comparar los análisis ya realizados, uno sólo con seis poblaciones de Guatemala ( $F_{ST}$  sin Lanquín = 0.171-.187  $F_{ST}$  con Lanquín = 0.239-.500) y otro con siete poblaciones de Guatemala, Nicaragua y Honduras ( $F_{ST}$  sin Lanquín = 0.16-.211  $F_{ST}$  con Lanquín = 0.167-.353) se observa que los valores de  $F_{ST}$  en general, tienden a disminuir.

Si las poblaciones son más semejantes se esperaría que  $F_{ST}$  disminuya, pero si son diferentes se espera que esté aumente. En el análisis con catorce poblaciones, los valores de  $F_{ST}$  van desde 0.175-0.188 al compararlos con los resultados obtenidos con menos poblaciones se observa un aumento. Esto, demuestra que las poblaciones se encuentran altamente estructuradas debido a efectos de aislamiento y endogamia principalmente, provocando que se observen poblaciones diferentes en algunos muestreos y otras un poco más similares en otros análisis. Esto se debe a que al haber aislamiento las frecuencias génicas tienden a diferenciarse independientemente de las demás poblaciones dándose diferentes dinámicas para cada caso y provocándose para todas una pérdida en el porcentaje de heterocigotos existente, lo cual se evidencia al unir todas las

---

poblaciones y en este análisis se observa al ver que el valor de diferenciación de especies aumenta. A este efecto de pérdida de heterocigotos cuando se suman los totales de varias “sub-poblaciones” juntas se le llama efecto de Wahlund, y no es más que una subdivisión temporal o espacial de las poblaciones que causa que la población total se encuentre en desequilibrio de sus frecuencias génicas con relación a lo esperado en el modelo Hardy-Weinberg (Hartl & Clark, 1989; Hedrick, 1983; Schofield et. al., 1997).

En cuanto a los valores del Número efectivo de migrantes ( $N_m$ ) puede mencionarse que tienden a mantenerse dentro de rangos más o menos similares entre 1.0 a 1.2 sin importar si se retira o se coloca en el análisis poblaciones. Si se considera que el  $N_m$  es el número absoluto de migrantes por generación independiente del tamaño de la población, podría decirse que en general el número efectivo de migrantes por generación para todas las poblaciones es alrededor de 1. En la Tabla 5 se observan las diferencias provocadas al retirar a la población de Lanquín. El valor de  $N_m$  según Weir & Cockerhan aumenta un poco de un valor de 1.0 a 1.1. Lo cual podría corroborar de nuevo el hecho de que Lanquín esta mostrando poseer características de aislamiento y endogamia. Esto también se ha observado repetidamente en otros trabajos como en el de “Variabilidad genética de *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811) en tres poblaciones domésticas del Pacífico de Guatemala, utilizando la técnica de RAPD-PCR” (Calderón *et al.*, 2004) o los estudios de asimetrías de alas realizados en morfometría que muestran una clara separación de esta población (Bustamante, 2001).

### **9.6. Reloj molecular y sus implicaciones.**

Al observar la forma como se agrupan las poblaciones en el estudio, lo cual también se ha evidenciado en otros trabajos con ITS, donde se asocian poblaciones separadas, como poblaciones de Guatemala con Costa Rica, dejando al grupo de Honduras y Nicaragua asociándose con poblaciones de Ecuador en Suramérica se desarrollan una serie de preguntas. (Solis-Mena, 2000)

¿Por qué existe relación entre poblaciones geográficamente aisladas o disyuntas? ¿Por qué no se relacionan poblaciones cercanas geográficamente y que tienen ecotopos similares, como Tukurú y San Andrés Sajcabajá en vez de diferenciarse?

Una explicación posible parece ser que se trata de una misma población ancestral diferenciada de forma relativamente reciente.

---

Al revisar la información existente sobre *T. dimidiata* se encontró que: “Los hemípteros en general representaban un orden antiguo, con restos fósiles que databan del Pérmico (aproximadamente 232-280 millones de años) y que probablemente la evolución de los triatomínicos y otros grupos hematófagos haya sido una serie de eventos mucho más recientes, comenzando en diferentes momentos y partiendo de diferentes formas ancestrales” (Schofield, 1994). De esta forma se da cierta pauta a considerar que si los triatomínicos en especial *T. dimidiata* es un taxa relativamente viejo, entonces algunos eventos de la historia geológica podrían haber contribuido en parte al moldeado de las frecuencias génicas en las poblaciones. Sin embargo ¿qué tan antiguas son estas poblaciones?

Según BARGUES (2000), por medio de técnicas moleculares de ADN ribosomal (rADN) nuclear encontró que los ancestros de los Triatomini y los Rodniini se separan hace más o menos 48.9-64.4 millones de años (ma) esto es a principios del Terciario en el Paleoceno. Esta misma autora señala que *T. dimidiata* se separó del complejo *Phyllosoma* hace 19.5-38.3 m.a. entre el Mioceno y el Oligoceno. La presencia de América nuclear data más o menos del Eoceno (hace más o menos 50 millones de años) e incluso algunos pedazos de Centroamérica como los Cuchumatanes datan de finales del Pérmico y principios del Triásico<sup>1</sup> (Ver anexo, Tabla 10, Págs.103 y figura 20 Pág. 104) (Méndez; *com pers*; Dengo, 1973; Villar, 1981).

Parece ser entonces que el ancestro de *T. dimidiata* separado durante el mioceno ya contaba con territorio para desarrollarse en Centroamérica, sin embargo esto no es suficiente, ¿en qué momento este ancestro se convirtió en lo que ahora conocemos y se dispersó por toda Centroamérica? Esta misma autora, señala que *T. dimidiata* de Yucatán, difiere del resto de poblaciones de la misma especie en más o menos 5.9 a 10.5 m.a. esto es a finales del mioceno, justo antes de la formación del puente de unión de norte y sur América, en el Plioceno. De igual forma señala que las poblaciones del sureste de México (se incluye Veracruz, se excluye Yucatán) se separa de las poblaciones de Centroamérica en hace 0.74 a 2.28 m.a. esto es más o menos en el Pleistoceno y finales del Plioceno (BARGUES, 2000). Pero la pregunta lógica en este caso sería ¿existía para ese tiempo algún tipo de huésped para *T. dimidiata* que contribuyera con la dispersión de la misma? Briones en el 2001, señala que existió una coevolución entre

---

<sup>1</sup> Para comprender mejor la forma se recomienda leer la información colocada en anexos sobre eras geológicas. Anexos. Tabla 10. En la página 103 (Dengo, 1973).

---

los huéspedes insectos y mamíferos de *Trypanosoma cruzi* indicando como posible hospedero mamífero a marsupiales en Suramérica y mamíferos placentarios en Norteamérica hace más o menos 100-37 m.a. a principios del Cenozoico (Ver anexo, Figura 21, Pág. 105).

Entonces ¿Qué puede deducirse de toda esta información? Para empezar la información nos indica que ya existían poblaciones y que quizá empezaron a separarse en el Pleistoceno, hace más o menos 5 millones de años. En esta época con la reciente formación del puente que conectaba Norte y Suramérica existía migración de individuos a través de Centroamérica. En este proceso por medio de transporte pasivo las poblaciones de *T. dimidiata* pudieron ser dispersadas, sin embargo aunque algunas poblaciones empezaron su proceso de aislamiento y diferenciación, es posible que no fuera en este momento preciso en el que se dio la total diferenciación de dichas poblaciones. Posiblemente, la diferenciación se empezó a dar a finales del Pleistoceno cuando todas las especies se vieron afectadas por las glaciaciones. Según la información que se posee, la última glaciación ocurrió hace 30,000 años tiempo quizá posible para lograr diferenciación de las poblaciones y no una especiación de las mismas. Pero ¿Qué permitió la sobrevivencia de estas especies a estos eventos? Trabajos realizados con vegetación de la región mesoamericana han demostrado que el sistema montañoso conformado por los Cuchumatanes, la Sierra de Chamá, Chuacús, de las Minas, de Santa Cruz, del Mico y Montañas Mayas en Belice ha funcionado como refugios especialmente para los eventos glaciares del Pleistoceno (Figura 22 en anexo, Pág.106) (Villar, 1981; Wendt, 1989). Méndez señala que estos refugios pudieron haber abarcado también parte de las tierras altas de Petén, pasando por Yaxhá, formando de esta manera un arco húmedo que permitiera el mantenimiento de las condiciones de humedad en estas áreas mientras se daban las glaciaciones (Ver figura 23 en anexo, Pág. 106) (Méndez, *com pers*). La contracción de las especies durante condiciones adversas y la dispersión de las mismas al finalizar los períodos de glaciaciones podría explicar ¿por qué poblaciones geográficamente cercanas no se relacionan genéticamente?. Especialmente, si éstas se reducían y dispersaban en diferentes direcciones y áreas del arco húmedo durante cada evento adverso del clima. De igual forma se ha encontrado en las áreas del norte del país comprendidas dentro de las zonas consideradas refugios Pleistocénicos que muchas especies de plantas se presentan de forma disyunta, sugiriendo ésto, que los procesos que los han provocado sean resultado de un número separado de eventos de

---

aislamiento durante diferentes períodos en la misma área (Wendt, 1989). Esto es muy similar a lo que sucede con las poblaciones de *T. dimidiata*, de las cuales algunas tienden a separarse a pesar de estar conectadas por un posible flujo genético a través de Centroamérica. Además se ha discutido por muchos autores (Usinger, 1941-1944) que el término de especie no se aplica a *Triatoma dimidiata*, ya que esta especie está representada en toda Centroamérica por un complejo de organismos con mucha variabilidad morfológica y según estos trabajos genética también (Solis-Mena, S, 2000; Bustamante, 2001; Marcilla, *et al.*, 2001; Calderón *et al.*, 2004; Landaverde, 2003;).

Entonces las poblaciones de *T. dimidiata* del sureste de México y algunas poblaciones en el norte de Guatemala así como las poblaciones en Quiché y Honduras parecen sugerirnos que resultaron de procesos de migración durante el pleistoceno y que los diferentes procesos de contracción y dispersión debido a las glaciaciones contribuyeron a su dispersión a diferentes poblaciones alrededor del istmo. ¿De qué forma pudo haberse dado esto? Durante los períodos adversos cuando se daban las glaciaciones las áreas comprendidas en el arco húmedo funcionaron como refugios ecológicos al poseer las condiciones ideales para el mantenimiento de especies entre las que se podían encontrar a los triatomíneos. Es en este momento cuando se daba la contracción de las especies, éstas se refugiaban en dichos lugares. Posteriormente ante la presencia de mejores condiciones climáticas las especies pudieron dispersarse a otros sitios donde no habían podido llegar, creando poblaciones dispersas. Sucesiones similares de contracciones durante las glaciaciones y dispersiones durante las mejoras de clima, provocaron en cada evento que se dieran dispersiones al azar de las poblaciones en diferentes direcciones. Quizá durante los períodos de mejores condiciones climáticas pudieron darse varios efectos fundadores para varias poblaciones lejos de los refugios ecológicos, por lo cual en la actualidad las que conservaron el flujo genético entre ellas se podrían observarse como poblaciones con características genéticas similares, como en el caso de Tuxpan y Tucurú. Mientras que para las poblaciones cercanas pero con diferencias genéticas dentro de los refugios se dieron diferenciaciones ante flujo genético deficiente.. Esto pudo deberse quizá al efecto de las condiciones adversas existentes, que provocaban competencia de las poblaciones ya sea de insectos o de hospederos del insecto. Dándose de esta forma diferenciación entre algunas poblaciones y una asociación de otras. Otro factor que pudo influir para que el flujo genético se mantuviera entre algunas poblaciones, es la posible existencia de poblaciones intermedias, que al

---

poseer ciertas características podrían contribuir aumentando o disminuyendo la migración de vectores a través de las poblaciones que se analizaron en este trabajo.

Por otro lado, el aumento de la degradación ambiental por parte de las tribus indígenas hace más de 2,800 años en estas regiones pudo contribuir a una mayor dispersión de los vectores (los cuales quizá siempre estuvieron conectados por medio de la migración de sus hospederos vertebrados) y al inicio de su especialización hacia hábitat doméstico, especialmente en los períodos de mayor deforestación y consumo del bosque en las tierras de Petén (Holoceno) (Curtis, J.H., 1997).

Sin embargo, para poder observar de mejor forma como se asocian las poblaciones ante la presencia de otras provenientes de las áreas que conforman del arco húmedo, es necesaria la utilización de una mayor cantidad de individuos por población (el número recomendado según Apostol, *et al.* (1996)) es de más o menos 50 individuos por población) y más poblaciones silvestres y domésticas por país.

### **9.7. Reproducibilidad de la Técnica.**

La técnica de RAPD ha demostrado ser eficiente debido a que trabaja con todo el genoma y a que generalmente revela más variabilidad genética de la que es evidente con otras técnicas genéticas como isoenzimas. Además técnicas como morfometría se centran en las variaciones genéticas que influyen el fenotipo mientras que RAPD PCR en todo el genoma (Bustamante, 2001). En comparación con otras técnicas que son dependientes del sexo del organismo, ciclo de vida y factores ambientales ésta no lo es y además requiere pequeñas cantidades ADN para amplificar múltiples bandas (Hadrys, *et al.* 1992).

Sin embargo muchos autores (Hadrys, *et al.*, 1992; Lynch & Milligan, 1994) señalan que uno de los principales problemas de la técnica, es la poca reproducibilidad que posee, debido a que se trata de cebadores que se unen al azar al genoma. Por tal razón se elaboraron dos pruebas que demostraran en qué porcentaje se tenía reproducibilidad del material amplificado.

Se pudo observar que en las repeticiones dentro de las amplificaciones el porcentaje de similitud o reproducibilidad fue del 95.10%, mientras que en las repeticiones entre las amplificaciones fue del 79.13%.

---

El valor encontrado para las repeticiones dentro es un valor alto que nos indica que puede confiarse, que más del 95% de las amplificaciones de cada uno de los individuos dentro de un mismo experimento se está dando de forma eficiente y con condiciones experimentales muy similares.

Acerca del valor encontrado para las repeticiones entre las amplificaciones puede mencionarse que aunque es mayor del 75%, se esperaría (con el fin de tener un mayor grado de confianza) un valor más alto. Sin embargo el poseer un valor arriba del 75% sugiere que se cumple con un buen porcentaje de reproducibilidad en la forma como se han llevado a cabo las condiciones experimentales para las diferentes amplificaciones.

### **9.8. Retos en la Caracterización Genética de *T. dimidiata*.**

Una de las principales preguntas que queda en el aire es si todas las poblaciones de *T. dimidiata* son una misma especie o si se trata en algún momento de alguna especie diferente. Muchos de los resultados obtenidos en diversos estudios entre los que se cuenta este trabajo, parecen sugerir que las diversas poblaciones en el estudio consisten en más de una especie o que los procesos de aislamiento a través del tiempo a pesar de la existencia de flujo genético han formado grupos de poblaciones muy diferentes al resto que se encuentran en proceso de especiación. Sin embargo las herramientas genéticas para responder a esta pregunta aun son muy pocas, por lo que uno de los principales objetivos para estudios posteriores es la búsqueda de la determinación de las diversas poblaciones de este organismo como una misma especie o como diversas.

La utilización de una sola técnica genética o fenética para responder a comparaciones entre diferentes especies, no es lo más adecuado, ya que se necesita de la comparación de los diversos aspectos estudiados por estas técnicas. Por lo cual otro gran desafío para el estudio genético de las poblaciones de *T. dimidiata* consiste en implementar nuevas técnicas que permitan completar la información obtenida de la dinámica poblacional de la misma. Actualmente existen estudios en relación con la utilización de microsatélites en estos individuos sin embargo hasta ahora la técnica ha presentado algunos problemas ante el polimorfismo encontrado en los loci de las poblaciones de *T. dimidiata*. Otras técnicas que parece dar buenos resultados son la de ITS y la de ADN mitocondrial, pudiendo ser estas otra opción para el estudio del polimorfismo de las poblaciones de *T. dimidiata*.

---

## **10.CONCLUSIONES.**

- 10.1 Los valores de Distancia genética para todas las poblaciones estudiadas oscilan entre 0.0151 a 0.3455. Aunque los valores encontrados entre dos especies diferentes con isoenzimas, (D’N *Rhodnius prolixus* vrs. *Triatoma dimidiata* = 0.504) están por encima de los encontrados en este trabajo con RAPD-PCR, no puede concluirse que se trate de individuos que sean la misma especie. Esto debido a que el índice fue obtenido entre especies lejanas genéticamente ya que pertenecen a diferentes complejos, por lo cual este índice proporciona un rango de clasificación para una misma especie muy amplio. Un segundo factor, es el hecho de haber obtenido el índice por medio de dos técnicas que analizan diversas partes del genoma genético y que asumen de diferente forma el cálculo de los índices de distancia genética.
- 10.2 Las poblaciones con menor distancia genética son La Brea, Jutiapa en Guatemala y San Ramón, Matagalpa en Nicaragua con un Índice de Nei –I’N- con valores entre 0.9748 y 0.9801. Sin embargo, la distancia geográfica existente entre estas dos poblaciones es muy grande llegando a ser de incluso más de 1,000 Km, lo cual nos sugiere que existen otros factores con mayor influencia que la distancia geográfica sobre las características genéticas de las poblaciones encontradas.
- 10.3 La extrema similitud encontrada entre las poblaciones de La Brea, Jutiapa en Guatemala y San Ramón, Matagalpa en Nicaragua, se debe quizá a algún efecto causado por el transporte accidental pasivo reciente del vector *Triatoma dimidiata* de un sitio a otro y al mantenimiento de un flujo genético lo suficientemente satisfactorio como para mantener las frecuencias genéticas similares.
- 10.4 El segundo grupo con menor distancia genética formado por dos poblaciones de la cuenca del Atlántico, fue Tukurú, Alta Verapaz en Guatemala y Tuxpan, Veracruz en México, con un I’N entre y 0.9454 y 0.9850. De nuevo vuelve a observarse que pueden existir otros factores que influyen de mayor forma sobre las agrupaciones formadas en comparación con la distancia geográfica, ya que la misma para estas poblaciones es muy grande (mayor a los 1,000 Km.).

- 
- 10.5 Los cambios observados en los valores de los Índices de Fijación  $-F_{ST}$ - y en los valores de Distancia genética  $-D'N-$  que hacen que las poblaciones se asocien de diferente forma ante la ausencia de Lanquín y la presencia de las poblaciones de El Carrizal, Jutiapa y el conjunto de varias poblaciones de Quiché se deben precisamente a la aparición de loci únicos para éstas, que se asocian con cada una de forma diferente. Estos cambios nos muestran la existencia de estructuración poblacional ocasionado por el aislamiento y endogamia, lo cual es conocido como efecto de Wahlund.
- 10.6 Los valores de  $-F_{ST}$ - de las poblaciones analizadas en este estudio que indican una pérdida de heterocigosidad entre 17.5% y 24.0% se encuentran entre los rangos considerados de una diferenciación genética de moderada a grande, lo cual puede ser causado por la presencia en los análisis de poblaciones muy similares genéticamente y de poblaciones con mucha diferenciación genética.
- 10.7 La presencia o ausencia de la población de Lanquín no causa ningún cambio en cuanto a la conformación de las agrupaciones en el dendrograma. Sin embargo, su presencia sí provoca una pequeña disminución en los valores del número efectivo de migrantes y un aumento en los valores Índices de Fijación  $-F_{ST}$ -, indicando que hay una disminución del porcentaje de heterocigosidad en las poblaciones.
- 10.8 La disminución observada en el porcentaje de heterocigosidad de las poblaciones al introducir a Lanquín en el análisis puede estar indicando que el aislamiento que la población posee, ha provocado que ésta posea un alto grado de diferenciación genética y que posiblemente se encuentra en proceso de especiación o se trata de otra especie.
- 10.9 La fuerte asociación de la población de Lanquín con la población silvestre de Petén en los análisis realizados nos indica que debe reconsiderarse la posición taxonómica de la segunda, al encontrarse unida a una población tan diferenciada como Lanquín.

- 
- 10.10 La población (GuaJtCa) podría tratarse de otra especie diferente a *T. dimidiata* o de una población muy diferenciada del resto. Lo cual se evidencia al ser encontrada constantemente como si fuera un grupo externo.
- 10.11 La asociación de El Carrizal con las poblaciones silvestres de Masaya, Nicaragua observada, sugiere que la primera es una población con mucha movilidad, pero que la misma junto con el grupo de chinches de Masaya, Nicaragua poseen características genéticas muy diferentes a las encontradas para las demás poblaciones.
- 10.12 A pesar que es evidente la existencia de loci en común para el grupo de poblaciones de La Brea, Jutiapa en Guatemala y de San Ramón, Matagalpa en Nicaragua que las hacen aparecer altamente similares. Estas comparten también otros loci que las acercan genéticamente con otros países centroamericanos, (Costa Rica, Santa Ana El Salvador, San Andrés Sajcabajá). Esto también se observa para el grupo de Tukurú, Alta Verapaz en Guatemala y Tuxpan en Veracruz, México. Lo cual sugiere la posible existencia de una especie de “corredor migratorio” centroamericano a través de parte del norte de México y Guatemala y la mayor parte de planicie de las costas del pacífico.
- 10.13 Las poblaciones de Tukurú, Alta Verapaz en Guatemala y Tuxpan, Veracruz en México forman una agrupación que se une a la agrupación formada por los países centroamericanos de Guatemala a Costa Rica, completando de esta forma lo que parece ser un corredor de flujo migratorio del vector a través de México y Centroamérica.
- 10.14 El flujo genético existente entre las poblaciones de *Triatoma dimidiata* en todos los países desde México hasta Costa Rica puede estar siendo posiblemente provocado por la migración de vectores de forma pasiva, accidental o activa.

- 
- 10.15 La llegada de Los Mayas y la rápida degradación del ambiente que se asume los mismos provocaron hace más de 2,800 años en estas regiones pudo posiblemente contribuir a una mayor dispersión de los vectores y al inicio de su especialización hacia hábitat doméstico. Manteniendo de esta forma el flujo genético de los vectores a través de México y Centroamérica.
- 10.16 La presencia de poblaciones dispuestas de forma geográficamente separada pero similar, podría deberse a que posiblemente forman parte de una población ancestral que en el pleistoceno se dispersó a través de Centroamérica. Quizá en los diversos períodos adversos encontrados en este período geológico, estas poblaciones se redujeron varias veces hacia refugios ecológicos. Las diferentes formas de dispersión durante cada período de condiciones climáticas favorables pudieron propiciar las asociaciones de estas poblaciones separadas que ahora se observan y posiblemente la existencia de flujo genético entre ellas ha permitido que las mismas no se diferencien.
- 10.17 El mantenimiento del flujo genético a graves de las poblaciones analizadas en este estudio especialmente las que se encuentran geográficamente separadas puede deberse a la existencia de poblaciones intermedias que contribuyan aumentando o disminuyendo la migración del vector a través de ellas.

---

## **11.RECOMENDACIONES.**

- 11.1 Para efectos del control del vector de la enfermedad de Chagas *Triatoma dimidiata* debe tomarse en consideración la existencia de flujo genético entre poblaciones silvestres y domésticas especialmente en la región de Nicaragua ya que esto podría implicar que estas pueden ser la fuente de reinfestación en las viviendas rurales luego de una fumigación.
- 11.2 También se recomienda la realización de estudios más detallados con diferentes marcadores moleculares de las poblaciones que se presentan muy diferenciadas del resto de poblaciones, como; Petén/Lanquín y el Carrizal junto a las poblaciones de Masaya, Nicaragua que se separan como grupos externos.
- 11.3 De igual forma se recomienda el uso de una mayor cantidad de individuos por población, ya que el número recomendado según Apóstol, *et al.* 1996 es de 50 individuos por población. El valor de 30 individuos por población es un valor que se puede considerar aún válido sin embargo debe tomarse en consideración que luego de las amplificaciones el número final de individuos utilizados siempre es menor que el inicial.
- 11.4 Sería mejor contar con un mayor número de poblaciones por país de diferente tipo de hábitat –silvestre, peridoméstico y doméstico- provenientes de diferentes áreas del mismo para poder observar de esta forma la variabilidad real que *Triatoma dimidiata* pueda presentar en todo el istmo centroamericano.
- 11.5 Debido a que las herramientas genéticas para responder a la pregunta de que si todas las poblaciones de *T. dimidiata* son una misma especie aun son muy pocas, se recomienda la búsqueda de diseños experimentales y otros marcadores moleculares efectivos que complementen la información que permita determinar si *T. dimidiata* es un complejo de especie.
- 11.6 Debido a que se postula la hipótesis de la posible existencia de un “corredor migratorio” centroamericano para el vector de la enfermedad de Chagas *Triatoma dimidiata*, esto debe observarse y analizarse. Ya que esto representa un factor importante a considerar para la formulación de propuestas de control

---

del vector *Triatoma dimidiata* que impliquen su eliminación o por lo menos lograr su disminución.

- 11.7 Se recomienda la realización de estudios más detallados sobre los grupos que se observaron constantes en este estudio; La Brea/Matagalpa, El Carrizal/Masaya, Honduras/Quiché y Tuxpan/Tucurú. Ya que de esta forma podrá comprenderse las posibles causas que generan estas agrupaciones.
- 11.8 Los procesos genéticos estudiados en el presente trabajo, no pueden separarse de los enfoques ecológicos y geológicos ya que estos se encuentran mutuamente influenciados, por lo cual debe de analizarse los resultados que se obtengan siempre tomando en consideración estos aspectos.
- 11.9 Quizá para estudios posteriores sería recomendable tratar de obtener poblaciones cerca de las áreas que constituyen el arco húmedo del sureste de México, centro norte de Guatemala y Honduras, para observar si se siguen encontrando poblaciones separadas geográficamente pero similares genéticamente y tratar de encontrar alguna hipótesis que explique ¿cómo se dio la dispersión de estas especies?
- 11.10 De igual forma se considera conveniente estudiar más a fondo la manera en que la historia geológica de Centroamérica se pueda relacionar con los patrones actuales de dispersión del vector *Triatoma dimidiata* y la historia de aparición del mismo para poder comprender la dinámica poblacional que posea el mismo.
- 11.11 La utilización de otras técnicas diferentes a RAPD-PCR podría ayudar a dilucidar de mejor forma ¿Cómo el vector *Triatoma dimidiata* ha llegado a tener estos patrones de dispersión en Centroamérica? Así como se obtendrían más datos que validaran los resultados obtenidos.

---

## **12. REFERENCIAS.**

1. **Anderson J.M., Lai J.E., Dotson E.M., Cordon-Rosales C., Ponce C., Norris D.E., & Beard C.B.** Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2002;1:243-248.
2. **Apostol, B.L., Black, W.C., Reiter, P., Miller, B.R., & Beaty, B.J.** Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theor Appl Genet* . 1993;86:991-1000.
3. **Apostol, B.L., Black, W.C., Reiter, P., & Miller, B.R.** Use Randomly Amplified Polymorphic DNA Amplified by Polymerase Chain Reaction Markers to estimate the number of *Aedes aegypti* Families at oviposition site in San Juan Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51(1):89-97.
4. **Apostol, B.L., Black, W.C., Reiter, P., & Miller, BR.** Population genetics with RAPD-PCR marker: The breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*. 1996;76:325-334
5. **Asociación Forestal Integral San Andrés, Petén (AFISAP)** Resumen Publico de Certificación. Certificado: SW-FM/COC-160. Consejo Forestal Mundial (Forest Stewardship Council o FSC) y de SmartWood/SmartWood Program c/o Rainforest Alliance Agosto 2001, 2002. 42 p.
6. **Ayau Milla, O.** **Enfermedad de Chagas.** Experiencias Personales y revisión Bibliográfica. 1998. 145 p.
7. **Bargues MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S.** Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. 95(4):567-573 jul/Aug. 2000
8. **Beard, C.B., & Lyman D. F.** DNA-based Approaches for Inter- and Intraspecific Analysis of Chagas Disease Vectors. Proveniente: del II Taller Internacional sobre Genética Poblacional y Control de triatominos. Tegucigalpa, Honduras. Marzo 8-11 1998 131 p. (p. 74-77)

- 
9. **Beaty, B.J., & Marquardt, W.C.** Population Genetics of disease vectors. In Biology of Disease vectors University Press of Colorado. U.S.A. 1996. 632p.
  10. **Berkow, R. MD. ed.** El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. 8ava edición. España. Ediciones Doyma.. 1989. 2944p. 1998. 145 p.
  11. **Black W.** RAPDFST 4.0.1 - A FORTRAN Program to estimate F(ST) and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files. Department of Microbiology Colorado State University Fort Collins. February 27, 1997.
  12. **Black, W. Antolin, M.** Explanation of RAPDDIST 1.0. Department of Microbiology Department of Biology Colorado State University
  13. **Black, W. DuTeau, N.** RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. Molecular biology of insect of Disease vector: A method manual Chapman and Hall ISBN. 1997. Págs.361-363
  14. **Bookstein, F.** Foundations of Morphometrics. Annu Rev Ecol Syst 1982 13:451-470
  15. **Brown T,A.** Gene Cloning and DNA analysis. An introduction. 4th edition. Blackwell. Science Ltd. Oxford USA. 2001. 363 p.
  16. **Bustamante Zamora, D.M.** Morfometría de seis poblaciones del principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala, *Triatoma dimidiata* (Latreille)1811 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), para la caracterización geográfica de la especie. (Tesis de Graduación, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.) Octubre 2001. 114 p.
  17. **Bustamante D.M. Monroy C. Menes M. Rodas A. Salazar-schettino P.M. Rojas G. Pinto N. Guhl F. Dujardin J.P.** Metric Variation Among Geographic Populations of the Chagas Vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and Related Species. Journal of Medical Entomology. Entomological Society of America. (41):3 May 2004:296-301(6)
  18. **Cadena, S.** <http://www.ciat.cgiar.org/> International Center for Tropical Agriculture - CIAT - Information and Communications Assistant CGIAR SP-IPM Whitefly Project. Actualización: 20 Feb. 2002 06:09:42 -0800 Fort Collins, CO 80523 August 12, 1997

- 
19. **Calderón, C.** A preliminary Assessment of Genetic Differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: reduviidae) in Guatemala by Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Medical Entomology*. 2004;41(5):882-887
  20. **Carvalho, R., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., & Gaivao, C.** Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Proposals For Taxonomic Arrangements. Entomología y Vectores*. Río de Janeiro. Jun. 2000;(1):1-99.
  21. **Casa de la Cultura ecuatoriana.** Publicado completo en "Carlos Chagas y la Trypanosomiasis Americana" p.73-92, en Quito, Ecuador. 1980. [www.mondialhosting.com/axxon/mus/museoimg/m-020501-07.htm](http://www.mondialhosting.com/axxon/mus/museoimg/m-020501-07.htm)
  22. **Coen, E., Thoday, J., & Dover, G.** Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature (Lond.)* 295:564-568
  23. **Curtis HJ, Brenner M y Hodell AD, Balsler RA, Islebe GA & Hooghiemstra H.** A multi-proxy study of Holocene environmental change in the Maya lowlands of Petén, Guatemala. *Journal of Paleolimnology*. (Bélgica) 1997:00:1-21
  24. **Dengo, G.** Estructura Geológica, Historia Tectónica y Morfología de América Central. Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. (ICAITI) Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el Desarrollo Internacional (AID) México / Buenos Aires. 1973. 52 p.
  25. **Díaz, L.** Comparación de la simetría entre las poblaciones silvestres y domésticas del vector de la enfermedad de Chagas *Triatoma dimidiata*. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. (Informe Final de Ejercicio Docente con la Comunidad. –EDC-) 2001
  26. **Dorn, PL., Melgar, S., Rouzier, V., Gutierrez, A., Combe, C., Rosales, R., Rodas, A., Kott, S., Salvia, D., y Monroy, C.M.** The Chagas Vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. *J. Med. Entomol.* 2003. 40(4):436-440
  27. **Dujardin JP.** Aporte de la genética poblacional al control y vigilancia de vectores de la enfermedad de Chagas, p. 13-15. In F Guhl, *Curso Posgrado Genética Poblacional de triatomíneos Aplicada al Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas*, Corcas Editores Ltda, Santa Fé de Bogotá. 1997. 90 Pags.

- 
28. **Dujardin, J.P., Panzera, P., & Schofield, C.J.** Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 1999;94;(1):223-228.
  29. **Dumonteil E, Gourbière S, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Felix E, Ruiz-Piña H, Baños-Lopez O, Ramirez-Sierra MJ, Menu F, Rabinovich JE** Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatán península, Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. (2002) 67: 176-183.
  30. **Falconer D.S.** Introducción a la genética Cuantitativa. Editorial Continental. S.A. de C.V. México. 1981. 428p.
  31. **Felsenstein, J.** Consensus tree program instruction. University of Washington. Copyright. 1986-1993
  32. **García, A. L., Carrasco H.J., Schofield C.J., Valente S.A., Frame I.A., Stothard R., Miles M.A.** Random amplification of Polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs. (Hemiptera: Reduviidae) J. Med. Entomol. 1998;35:38-45.
  33. **González, A. ed.** Almanaque Mundial 2000. Nuevo Milenio. Editorial México. Televisa. 2000. 465p.
  34. **Hadrys H, Balick M y Schierwater B.** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Molecular Ecology 1992;(1)55-63
  35. **Hartl D.L, & Clark A.G.** Principles of Population Genetics. 2nd Edition. Massachusetts. Copyright. 1989. 682 p. (p. 343-344)
  36. **Hedrick, P.W.** Genetics of Populations. USA. Science Books International Publisher. 1983 . 629 p.
  37. **INETER. –Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales-** Atlas escolar Nicaragua. Gobierno de La Republica. Ministerio de Construcción y Transporte. 2da edición. Nicaragua. 1995. 31p.
  38. **INIFOM -Instituto Nicaragüense de Fomento Municipal-** Caracterizaciones Municipales. Proyecto de Transmisión de Gobiernos Locales (TGL) del Instituto Nicaragüense de Fomento Municipal (INIFOM) Instituto Nicaragüense de Fomento Municipal. 2001. <http://www.pinoleros.com/municipios/>
  39. **Jackson, J.** Instituto del Tercer Mundo. Guía del Mundo. 2001. [www.eurosur.or/guiadelmundo/01\\_paises.htm](http://www.eurosur.or/guiadelmundo/01_paises.htm)

- 
40. **Jaramillo, C., Monaña, M.F., Castro, L.R., Vallejo, G., & Guhl, F.** Differentiation and Genetic Analysis of *Rhodnius Prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD Amplification. Mem Inst Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. November 2001;96(8):1043-1048
  41. **Landaverde P.** Comparación del polimorfismo genético de poblaciones Silvestres y domésticas de *Triatoma dimidiata* de Guatemala, Honduras y Nicaragua, por medio de la Técnica de Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD PCR) Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. (Informe Final del Ejercicio Profesional Supervisado. –EPS-) Julio 2003.
  42. **Lent, H., & Wygodzinsky, P.** Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas Disease. Boletín del museo de historia Natural de América. 1979;163(3):123-520
  43. **Harris, K.D., Ramsey J.M., Ordoñez R., Cordón-Rosales C., Salazar Schettino P.M., Monteiro F.A., Dotson E., & Beard C.B.** Evidence of a Species Complex in the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*. Am Soc Trop Med Hyg 2002. Submitted.
  44. **Lewin B.** Genes VII. Oxford. University Press. New York.. 2000. 990 p.
  45. **Lyman D.E., Monteiro F.A., Escalante A.A., Cordon-Rosales C., Wesson D.M., Dujardin J.P., & Beard C.B.** Mitochondrial DNA Sequence Variation Among Triatomine Vectors of Chagas' Disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1999;60(3):377-386.
  46. **Lynch M, & Milligan BG.** Analysis of population genetics structure with RAPD markers. Molecular Ecology. 1994;(3)91-99
  47. **Marcilla, A., Bargues, M.D., Ramsey, J., Magallon-Gastelum, E., Salazar, P.M., Abad-Franch, F., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., & Mas-Coma, S.** The ITS-2 of the nuclear rDNA as a Molecular Marker for populations especies an Phylogenetic Relationships in Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) Vectors of Chagas Disease. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2001;18(1):136-142
  48. **Mendez, Claudio.** Biogeografía de Guatemala. Documento Técnico. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Mayo del 2001.
  49. **Microsoft Corporation.** Enciclopedia Microsoft® Encarta® Reservados todos los derechos. 2002. © 1993-2001

- 
50. **Monroy, CM., Chávez, JJ., Morales-Betoulle, ME., Landaverde, P., Rodas, A., Enriquez, E., Bor, Silvia., & Melgar, S.** Relaciones parentales de *Triatoma dimidiata* en una vivienda de El Cuje, Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa. Revista Científica Edición Especial. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2002. 37 p. (p. 10-17)
51. **Monroy, CM. Bustamante, D. Menes, M. Melgar, S. Landaverde, P. Rodas, A. Marin, F.** Morphometric and genetic characterization of sylvatic and domestic *Triatoma dimidiata* populations in Guatemala, Honduras and Nicaragua, to understand the migration and reinfestation pattern of the species. Informe final de proyecto de investigación financiado por Netropica. 2003.
52. **Nakagawa, J., Cordón-Rosales, C., Juárez, J., Itzep, C., & Nonami, T.** Impact of Residual Spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the Department of Zacapa in Guatemala. Memb. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Marzo 2003.98(2): 277-281.
53. **Noireau, F., Zegarra, M., Ordoñez, J., Gutierrez, T. & Dujardin, J.P.** Genetic Structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) Domestic Populations from Bolivia. Application on Control Interventions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. May/jun. 1999;94(3);347-352
54. **OPS–Organización Panamericana de la Salud.** Taller para el Establecimiento de pautas técnicas en el control de *Triatoma dimidiata*. Documento OPS/HCP/HCT/214/02. Organización Panamericana de la Salud. San Salvador. OPS. 2002. 35p.
55. **Ordoñez Cruz, Pedro Alejandro.** “Caracterización de Poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) mediante perfiles de Hidrocarburos Cuticulares de Alas.” (Tesis de Graduación, Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.) Noviembre del 2002. 74 p.

- 
56. **Panzer, F., Hornos, S., Pereira J., Cestau, R., Canale, D., Diotaiuti, L., Dujardin, J.P., & Pérez, P.** Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am. J. of Tropical Medicine & Hygiene* 1997;57(6):732-739 Taller para el Establecimiento de pautas técnicas en el control de *Triatoma dimidiata*. Documento OPS/HCP/HCT/214/02. Organización Panamericana de la Salud. San Salvador. OPS. 2002. 35p.
  57. **Panzer, F., Perez, R., Hornos, S., Panzer, Y., Cestau, R., Delgado, V., & Nicolini, P.** Chromosome Numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review *Mem Inst Oswaldo Cruz. Río de Janeiro Jul./Aug., 1996;Vol:91(4): 515-518.*
  58. **Programa Nacional de Control de la enfermedad Chagas** Ministerio de Salud Nicaragua. Sistema Local de atención Integral en Salud. Nicaragua. Doc. Tec. 2001. 54 pp. (21-31)
  59. **Roche.** [www.roche.htm/genetic](http://www.roche.htm/genetic) F. Hoffman- La Roche Ltd. 1996-2003 Fecha de Actualización: 18 agosto 2003.
  60. **Rohlf, J.** Morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1990. 21:299-316
  61. **Sanson, G.F.O., Kawashita, S.Y., Brunstein, A., Amino, R., Zingales, B. and Briones, M.R.S.** Application of mathematical models of DNA sequence evolution in experimental phylogenetics and studies of *Trypanosoma cruzi* genetic diversity. *Proceedings of the Brazilian Symposium on Mathematical and Computational Biology, Institute of Pure and Applied Mathematics (IMPA), Rio de Janeiro, R.J., Brazil. (2001)*
  62. **Schofield C.J.** Field Testing and Evaluation of Insecticides for Indoor Residual Spraying against Domestic Vector of Chagas Disease. *Global Collaboration for Development of Pesticides for Public Health. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP 2001. 62p.*
  63. **Schofield, C.J.** Challenges of Chagas Disease Vector Control in Central America. *WHO/CDS/WHOPES/GCDPP 2000. 36p.*
  64. **Schofield, C.J.** Triatominae, Biología y Control, Zeneca Public Health Eurocommunica Publications. 1994. 80p.
  65. **Schofield, C.J.** Triatominae. Biología y Control. Zeneca. Trad. Tims S. y Schofield C.J. Reino Unido. 1994. 77 p.

- 
66. **Solis-Mena, S.** Genetic variability and Morphometrics of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) geographical populations. (Upgrading reporta from London School of Hygiene and Tropical Medicine.) 2000. 14p.
  67. **Solomon, E.P., Berg, L.R., Martin, D.W., & Vilee C.** Biología de Vilee. 3era edición. México. Interamericana McGraw-Hill 1996. 1194 p.
  68. **Tabachnick, W.J., & Black, W.C.** Population genetics of disease vectors. In Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado 1996. (p. 417-437 )
  69. **Universidad Simón Bolívar.** Primer encuentro Internacional sobre la Enfermedad de Chagas en México. Facultad de Medicina UNAM. 1999. 158p.
  70. **Villar Anleu, L.** Guatemala desde sus Orígenes. Historia del país de volcanes. Documento Técnico del Centro de Estudios Conservacionistas. –CECON- Escuela de Biología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1981. Págs.118-137
  71. **Wendt, T.** Las Selvas de Uxpanapa, Veracruz-Oaxaca, México. Evidencia de refugios florísticos cenozoicos. Anales Inst Biol Univ Nac Mex, Ser Bot 1989;58:29-54
  72. **Zeledón, R.** El *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas. EUNED. San José, Costa Rica. 1981. 147p.

#### **Comunicación Personal.**

73. **Paz María Salazar Schettino.** Universidad Autónoma de México. –UNAM- Comunicación personal.
74. **Claudio Méndez.** Escuela de Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Comunicación personal.
75. **Carmen Lucia Yurrita.** Escuela de Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Comunicación personal.
76. **Antonieta Rodas.** Escuela de Biología. Universidad de San Carlos de Guatemala. Comunicación personal.
77. **Pamela Pennington.** Universidad del Valle de Guatemala. Comunicación personal.

---

# Anexos.

## GLOSARIO.

**Alelo:**

Cada una de las modificaciones a un gen en cromosomas homólogos que codifican para una misma función.

**Alicuotar:**

Distribuir una sustancia o reactivo en partes iguales en diferentes recipientes.

**Análisis de Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico:**

Es una técnica de PCR, que usa para amplificar cebadores cortos aleatorios, que puede ser representativo del genoma estudiado con el cual puede ser usado para fabricar comparaciones entre la estructura del genoma y los diferentes organismos.

**Bromuro de etidio:**

Un químico fluorescente que se intercala entre las bases pares en una molécula de ADN doble hebra, usado para la detección de ADN.

**Cebadores:**

Secuencia de nucleótidos que conforman un oligonucleótido corto de hebra simple, el cual se une por apareo de bases a una molécula plantilla, el cual actúa como el punto para la síntesis directa de la cadena complementaria por la enzima ADN polimerasa.

**Cebadores decámeros:**

Secuencias de ADN con un número de 10 nucleótidos cuya función es actuar como un activador de la síntesis de ADN en vitro.

**Complementariedad:**

Se refiere a dos poli-nucleótidos que pueden aparearse en pares para formar una molécula de cadena doble.

**Coxa:**

Parte basal que compone la pata de los insectos.

**Cromosoma holocéntrico:**

Cromosoma cuyo centrómero se haya ubicado en uno de los extremos.

**Delección:**

Mutación genética que consiste en la eliminación de uno o más nucleótidos de una secuencia de ADN.

**Deoxirribonucleasa:**

Una enzima que degrada ADN.

**Desnaturalización:**

De moléculas de nucleácidos; ruptura por cambios químicos o físicos en los puentes de hidrógeno envueltos en el apareo por pares.

**Disectar:**

Abrir y separar piezas y sustancias orgánicas del cuerpo de un organismo vivo. Para el caso de las chinches consiste en la obtención de heces fecales para buscar al parásito causante de la enfermedad de Chagas *Tripanosoma cruzi*.

**Disyunta:**

Separación de especies u organismos.

**Electroforesis:**

Separación de moléculas basándose en sus cargas.

**Electroforesis en gel:**

Electroforesis que se lleva a cabo en una matriz de gel. De esta forma las moléculas de similar carga eléctrica pueden ser separadas basándose en su tamaño.

**Endonucleasa:**

Una enzima que rompe uniones fosfodiéster dentro de una molécula de nucleácidos.

**Exonucleasa:**

Una enzima que secuencialmente remueve nucleótidos del final de una molécula de nucleácidos.

**Fenético:**

Es el resultado de la expresión genética de un gen.

**Gen:**

Un segmento de ADN que codifica para una molécula de ARN o polipéptidos.

**Genética:**

Rama de la biología dedicada al estudio de genes.

**Genoma:**

El completo set de genes de un organismo.

**Hemimetabólico:**

Organismos generalmente insectos que poseen metamorfosis incompletas en base a transformaciones graduales de forma que las larvas no se diferencian mucho de las formas adultas.

**Hibridización de nucleácidos:**

Formación de moléculas de cadena doble por medio de apareo de bases entre polinucleótidos complementarios u homólogos.

**Inserción:**

Mutación genética consistente en que se agregan uno o dos nucleótidos.

**Ligasa. (Ligasa ADN):**

Una enzima que repara discontinuidad en moléculas de ADN doble hebra en la célula. Ligasas de ADN purificado se usan en clonación de genes para unir moléculas de ADN.

**Lisozima:**

Enzima que debilita la pared celular de ciertos tipos de bacterias.

**Nucleasa:**

Enzima que degrada o separa nucleótidos de las secuencias de ADN.

**Oligonucleótidos:**

Secuencia de nucleótidos de ADN.

**Población Panmictica:**

Población en la cual se realiza entrecruzamiento al azar solo entre los miembros de la misma.

**Piretroide**

Insecticida de efecto residual, consistentes en Delta metrin y Beta Cyfluthrin.

**Plantilla de ADN:**

Una región de ADN polinucleótido de hebra simple, obtenido por síntesis directa de un polinucleótido complementario.

**Polimerasa**

Precipitación con etanol:

Precipitación de moléculas de nucleácidos por concentración de etanol y sal, usado primariamente como una forma de concentrar el ADN.

**Proteasa:**

Enzima que degrada proteínas.

**Protozoo:**

Organismos unicelulares, cuya clasificación se basa en las características morfológicas, de composición química que poseen entre otras.

**Recombinación:**

Es el intercambio de diferentes secuencias de ADN.

**Regiones codificantes:**

Secuencias de ADN que contienen información genética que al expresarse proporciona información de proteínas, hormonas u órganos.

**RFLPscan:**

Análisis de ADN con Enzimas de Restricción que genera Fragmentos de ADN de longitud polimórfica.

**Ribonucleasa:**

Una enzima que degrada ARN.

**Secuencias consenso:**

Es una secuencia de nucleótidos usada para describir a un largo número de relaciones a través de secuencias no idénticas. Cada posición de la secuencia consenso representa al nucleótido más frecuentemente encontrado en la posición en la real secuencia.

**Superenrollamiento:**

La conformación de una molécula covalente de ADN circular, que se enrolla por torsión de la cadena.

**Tandem:**

Se refiere a la forma como se colocan las secuencias de ADN de forma que estas funcionan de manera simultánea.

**Taq polimerasa**

ADN polimerasa que soporta altas temperaturas de desnaturalización obtenida a partir de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*.

**Temperatura de desnaturalización (T<sub>m</sub>):**

Es la temperatura a la cual una molécula de hebra doble del ADN o ADN-ARN se desnaturaliza.

**Termociclador:**

Aparato utilizado para la síntesis de ADN en Vitro, el cual se basa en cambios de temperatura.

**Tansiluminador:**

Aparato utilizado para la observación de bandas de ADN corridas en electroforesis que puede constar de luz ultravioleta para geles de agarosa o luz clara para geles de poliacrilamida.

### Preparación de Reactivos.

#### Buffer de Extracción. (Para obtener una concentración 10X)

Mantener todo frío.

Buffer de lisis:	Para 100 ml	Solución stock
0.1 M NaCl	2 ml	5M NaCl
0.2 M glucosa	6.9 g	342.3 g/mol
50 mM EDTA	10 ml	0.5 M EDTA, pH 8.0
100 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0	10 ml	1 M Tris-HCl, pH 8.0
0.05% SDS	500 $\mu$ l	10% SDS

Usando agua esterilizada llevar a 100 ml, filtrar a través de un filtro de 0.2  $\mu$ m y calentar a 65° C por 1 hora. Mantener refrigerado y estéril. Alícuotas de 1 ml; guardar a -20° C.

#### EDTA 0.5M (pH 8.0)

Se quiere obtener una solución de 0.5M y pH 8.0 para ello se necesita.

Disolver 186.1g de Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O en 700 ml H<sub>2</sub>O. Ajustar pH a 8.0 con 10M NaOH (~50ml). Agregar H<sub>2</sub>O aforando al litro.

#### Ingredientes para la preparación del Mezcla de Reacción.

REACTIVO.	Volumen para 1 Reacción.	Volumen para 25 reacciones.
H <sub>2</sub> O	31.38 $\mu$ l	784.5 $\mu$ l
ThermoBuffer.	4 $\mu$ l	100 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1.2 $\mu$ l	30 $\mu$ l
dNTP's	0.32 $\mu$ l	8 $\mu$ l
Primers.	0.1 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l

#### Bromuro de Etidio. (10mg/ml)

**\*Cuidado:** El Bromuro de Etidio es un mutágeno y debe ser manejado con guantes desechables.

Disolver 200mg de Bromuro de Etidio en 20ml de H<sub>2</sub>O. Mezclar bien y mantener a 4° C en oscuridad.

#### TBE al 5X. (1 litro)

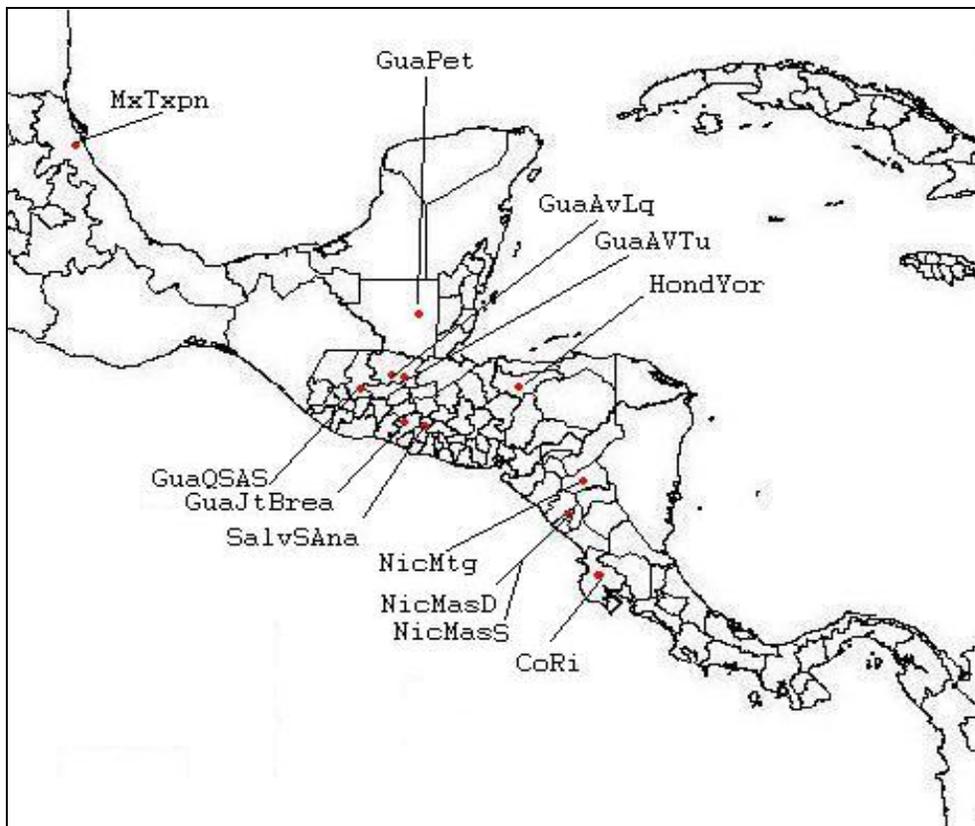
54g TRIZMA Base

27.5g Ácido Bórico.

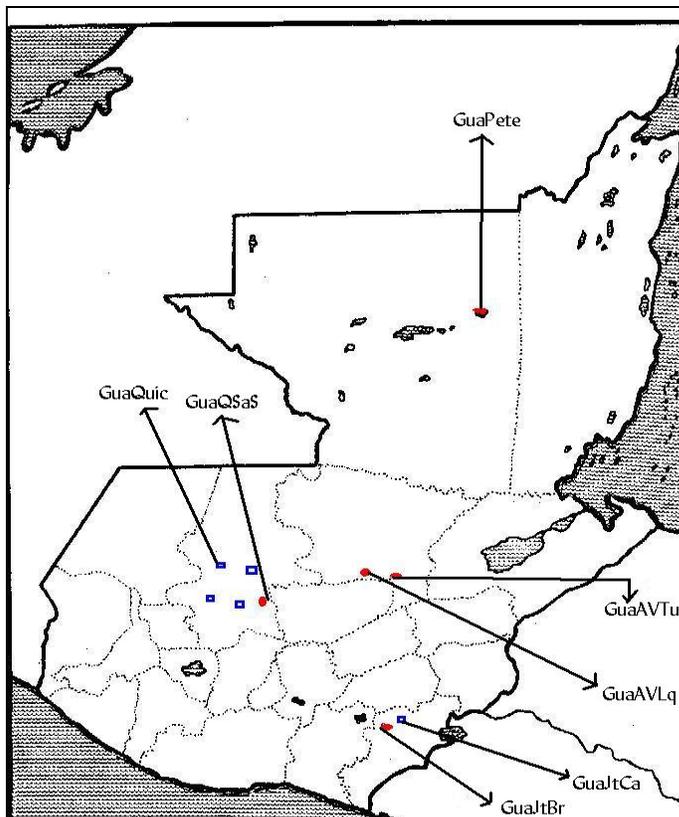
20ml de 0.5M EDTA (pH 8.0)

Agregar agua tridestilada para llegar a 1 litro.

Mezclar bien y disolver todo el sólido en el líquido.



**Figura 15:**  
Poblaciones con las que se trabaja en este trabajo de investigación.



**Figura 16.** En este mapa se muestran las poblaciones originales a estudiar para Guatemala en un círculo rojo y las que se agregaron en un cuadro azul.

**Tabla 7:** de Valores de  $F_{ST}$  para cada uno de los Loci estudiados para las doce poblaciones originales con tres cebadores.

Tesis: frec. gen. C.A. L1,L4 y L5.

LOCUS	$F_{ST}$	Nm	Prob.	Theta	Nm(Theta)	$F_{ST}$ (Lynch)	Nm(Lynch)
L1-19	.151	1.4	.0000	.144	1.5	.272	.7
L1-27	.116	1.9	.0000	.106	2.1	.216	.9
L1-31	.285	.6	.0000	.288	.6	.398	.4
L1-41	.241	.8	.0000	.241	.8	.395	.4
L1-42	.161	1.3	.0000	.155	1.4	.309	.6
L1-49	.191	1.1	.0000	.188	1.1	.326	.5
L1-56	.345	.5	.0000	.352	.5	.492	.3
L1-64	.151	1.4	.0000	.144	1.5	.252	.7
L1-71	.117	1.9	.0000	.107	2.1	.239	.8
L4-25	.208	1.0	.0000	.206	1.0	.319	.5
L4-31	.149	1.4	.0000	.143	1.5	.276	.7
L4-32	.309	.6	.0000	.313	.5	.463	.3
L4-35	.091	2.5	.0000	.079	2.9	.182	1.1
L4-37	.102	2.2	.0000	.091	2.5	.201	1.0
L4-39	.184	1.1	.0000	.180	1.1	.301	.6
L4-46	.137	1.6	.0000	.130	1.7	.225	.9
L4-47	.296	.6	.0000	.300	.6	.411	.4
L4-54	.057	4.2	.0008	.041	5.8	.095	2.4
L4-59	.131	1.7	.0000	.123	1.8	.227	.9
L5-39	.171	1.2	.0000	.165	1.3	.293	.6
L5-50	.347	.5	.0000	.353	.5	.510	.2
L5-55	.125	1.7	.0000	.116	1.9	.210	.9
L5-60	.077	3.0	.0000	.063	3.7	.146	1.5
L5-61	.225	.9	.0000	.224	.9	.403	.4
L5-69	.132	1.6	.0000	.123	1.8	.252	.7
L5-70	.096	2.3	.0000	.084	2.7	.204	1.0
L5-71	.131	1.7	.0000	.121	1.8	.245	.8
L5-78	.394	.4	.0000	.402	.4	.531	.2
L5-79	.462	.3	.0000	.472	.3	.588	.2
L5-84	.026	9.4	.2350	.006	40.8	.007	35.3
Avg.	.187	1.1	.0000	.195(.195)	1.0	.240	.8
St.Dv.	.105			.112 (.024)	(Jackknife)	.133	

**Tabla 8:** de Valores de  $F_{ST}$  para cada uno de los Loci estudiados para las poblaciones originales sin Lanquín con tres cebadores.

Tesis: frec. gen. C.A. L1,L4 y L5 slq.

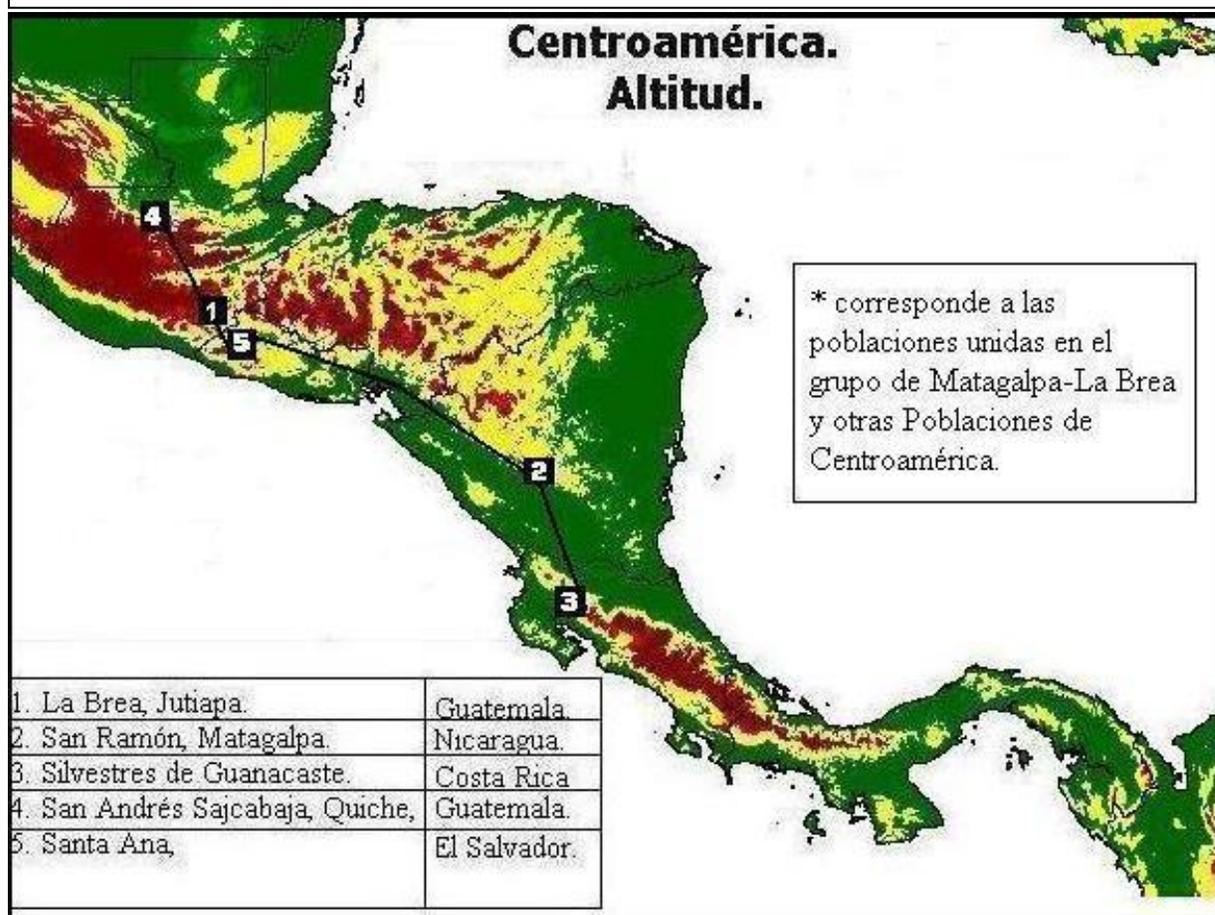
LOCUS	$F_{ST}$	Nm	Prob.	Theta	Nm(Theta)	$F_{ST}$ (Lynch)	Nm(Lynch)
L1-23	.099	2.3	.0000	.088	2.6	.176	1.2
L1-27	.314	.5	.0000	.321	.5	.427	.3
L1-37	.224	.9	.0000	.225	.9	.371	.4
L1-39	.168	1.2	.0000	.164	1.3	.317	.5
L1-47	.104	2.2	.0000	.094	2.4	.204	1.0
L1-54	.150	1.4	.0000	.145	1.5	.263	.7
L1-55	.066	3.5	.0002	.052	4.5	.121	1.8
L1-57	.079	2.9	.0000	.067	3.5	.157	1.3
L1-67	.161	1.3	.0000	.157	1.3	.267	.7
L1-74	.127	1.7	.0000	.119	1.8	.259	.7
L4-21	.171	1.2	.0000	.168	1.2	.272	.7
L4-28	.221	.9	.0000	.222	.9	.366	.4
L4-32	.085	2.7	.0000	.073	3.2	.172	1.2
L4-34	.106	2.1	.0000	.097	2.3	.215	.9
L4-36	.175	1.2	.0000	.172	1.2	.286	.6
L4-44	.117	1.9	.0000	.108	2.1	.192	1.1
L4-45	.321	.5	.0000	.329	.5	.437	.3
L4-50	.046	5.2	.0088	.029	8.2	.066	3.5
L5-25	.206	1.0	.0000	.204	1.0	.327	.5
L5-36	.391	.4	.0000	.401	.4	.548	.2
L5-44	.086	2.6	.0000	.074	3.1	.167	1.3
L5-46	.313	.5	.0000	.319	.5	.485	.3
L5-48	.080	2.9	.0000	.067	3.5	.161	1.3
L5-51	.118	1.9	.0000	.109	2.0	.243	.8
L5-52	.116	1.9	.0000	.107	2.1	.216	.9
L5-60	.460	.3	.0000	.473	.3	.587	.2
L5-61	.509	.2	.0000	.523	.2	.633	.1
L5-67	.022	11.1	.3598	.002	115.9	-.008	-32.5
Avg.	.180	1.1	.0000	.188(.188)	1.1	.233	.8
St.Dv.	.125			.133(.030)	(Jackknife)	.154	

**Tabla 9:** Valores de  $F_{ST}$  para cada uno de los Loci estudiados para las poblaciones originales más Jutiapa, Carrizal y Quiche, con tres cebadores.

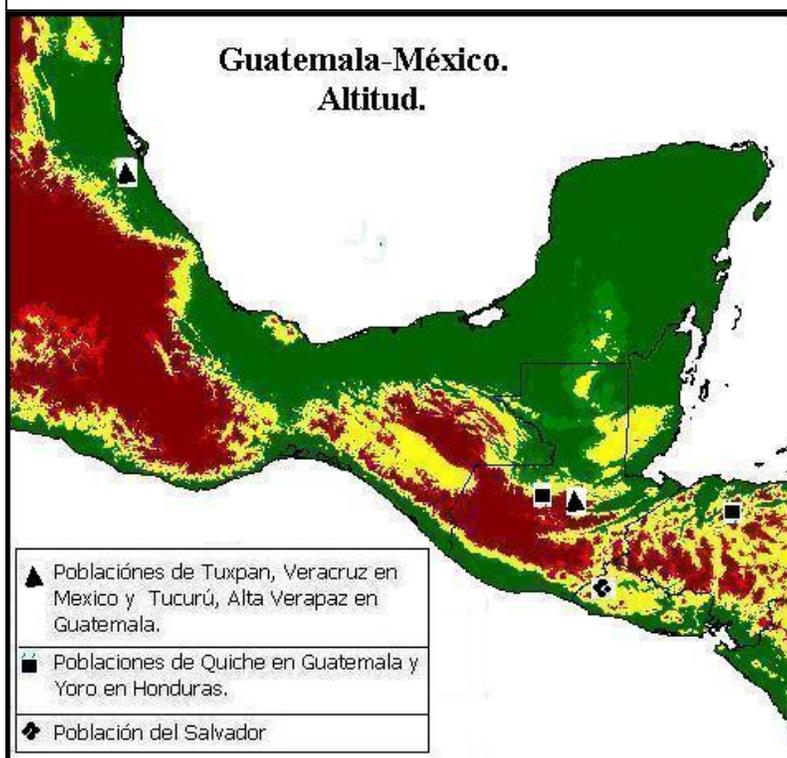
Tesis: L1,L4 y L5 con JutCar y Quiché.

LOCUS	$F_{ST}$	Nm	Prob.	Theta	Nm(Theta)	$F_{ST}$ (Lynch)	Nm(Lynch)
L1-22	.178	1.2	.0000	.172	1.2	.313	.5
L1-30	.129	1.7	.0000	.118	1.9	.247	.8
L1-34	.225	.9	.0000	.222	.9	.369	.4
L1-39	.094	2.4	.0000	.081	2.8	.186	1.1
L1-42	.272	.7	.0000	.271	.7	.429	.3
L1-43	.096	2.4	.0000	.083	2.8	.205	1.0
L1-51	.166	1.3	.0000	.159	1.3	.309	.6
L1-55	.297	.6	.0000	.298	.6	.445	.3
L1-59	.050	4.7	.0020	.033	7.3	.081	2.8
L1-61	.164	1.3	.0000	.157	1.3	.282	.6
L1-66	.071	3.3	.0000	.056	4.2	.137	1.6
L4-25	.311	.6	.0000	.313	.5	.505	.2
L4-30	.153	1.4	.0000	.144	1.5	.275	.7
L4-31	.360	.4	.0000	.364	.4	.532	.2
L4-32	.115	1.9	.0000	.103	2.2	.235	.8
L4-33	.170	1.2	.0000	.163	1.3	.334	.5
L4-34	.179	1.1	.0000	.173	1.2	.269	.7
L4-39	.326	.5	.0000	.328	.5	.462	.3
L4-46	.062	3.8	.0001	.045	5.3	.118	1.9
L4-48	.051	4.6	.0016	.034	7.1	.078	3.0
L4-49	.155	1.4	.0000	.147	1.5	.281	.6
L5-46	.200	1.0	.0000	.194	1.0	.345	.5
L5-56	.439	.3	.0000	.446	.3	.595	.2
L5-57	.182	1.1	.0000	.176	1.2	.335	.5
L5-58	.122	1.8	.0000	.110	2.0	.212	.9
L5-60	.128	1.7	.0000	.117	1.9	.212	.9
L5-69	.023	10.4	.3113	.003	75.5	-.002	-122.6
Avg.	.175	1.2	.0000	.188(.188)	1.1	.239	.8
St.Dv.	.103			.110(.023)	(Jackknife)	.145	

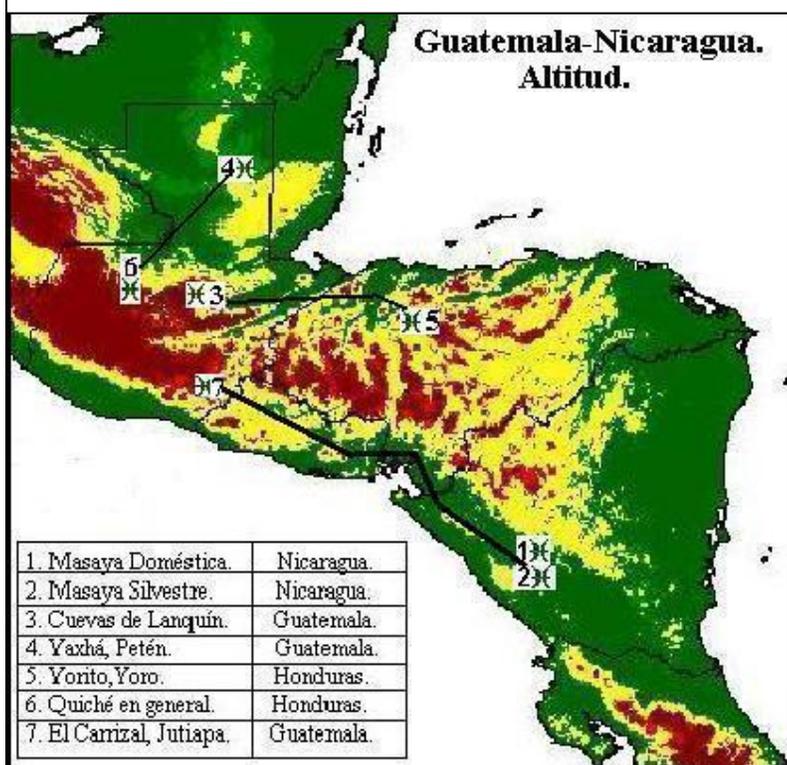
**Figura 17:** Poblaciones de la cuenca del Pacífico de Guatemala a Costa Rica, vistas en un mapa de altitud.



**Figura 18:** Veracruz, México y Guatemala.



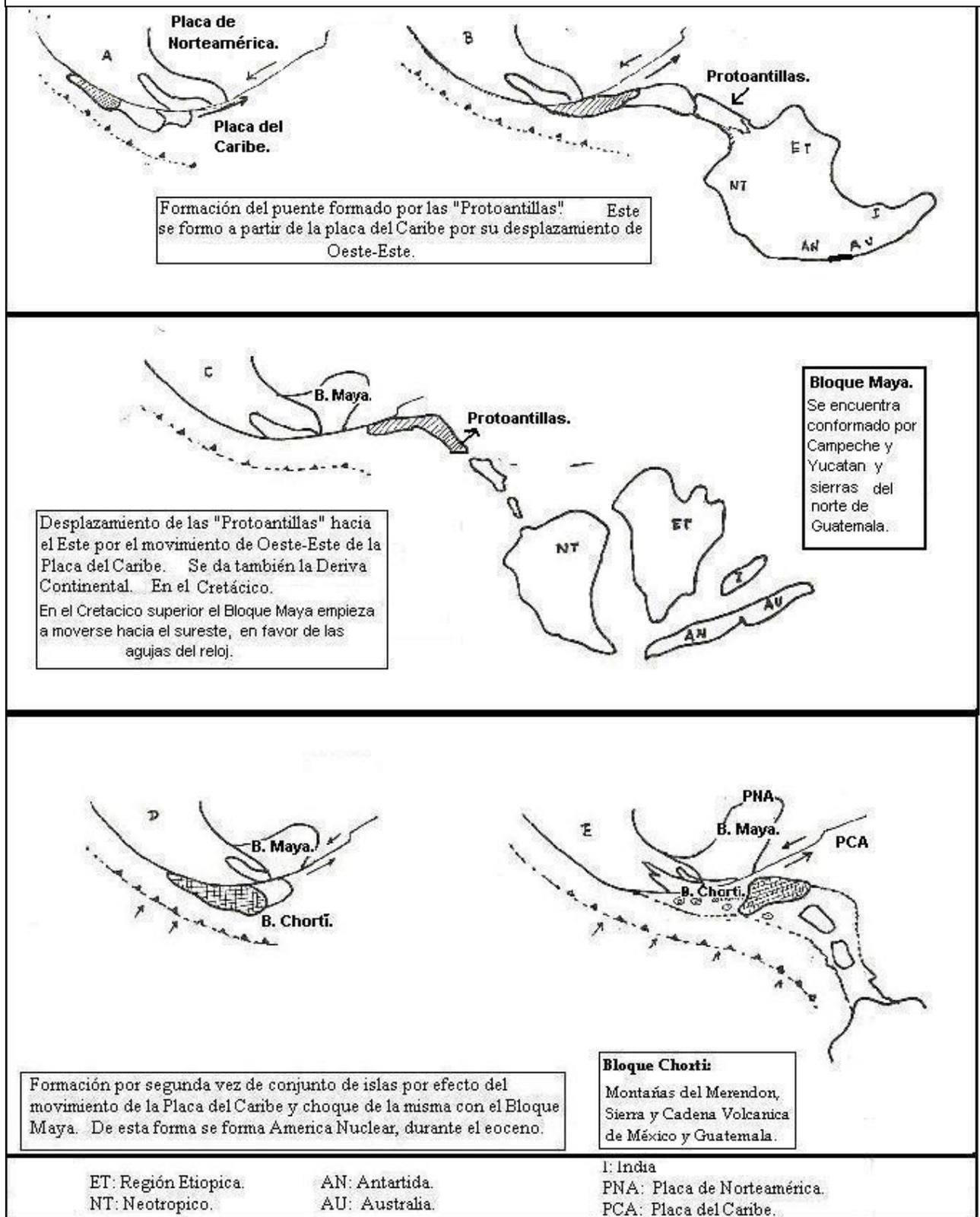
**Figura 19:** Guatemala, Honduras y Nicaragua.



**Tabla 10.** Cuadro con algunos datos climáticos y geológicos de importancia.

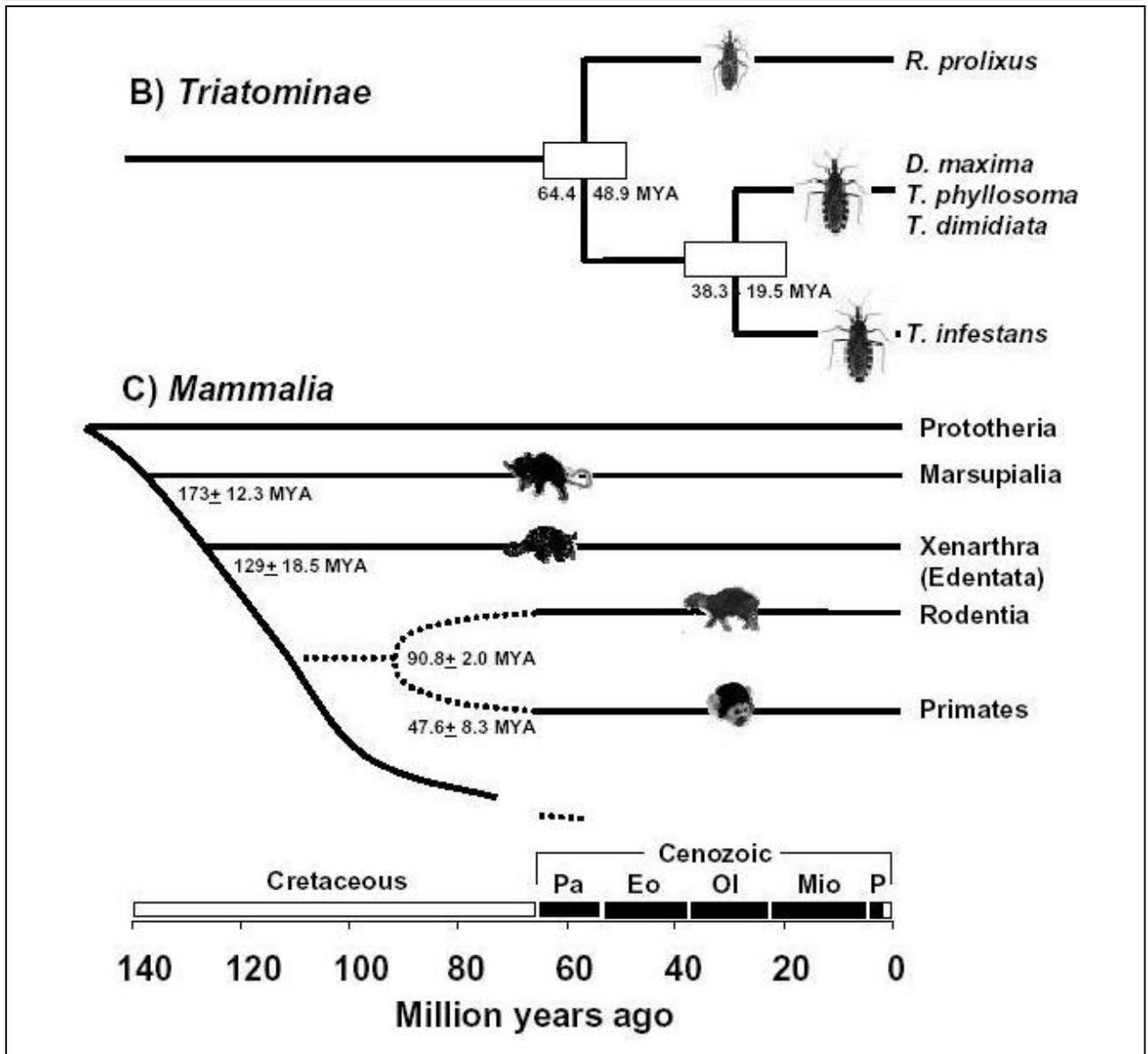
Eras	Períodos	Epocas	Millone de años	Eventos Climaticos.
CENOZOICO	Cuaternario	Holoceno	0.01 m.a.	El clima se hace más frío y seco. El nivel del mar sube unos 250 metros e inunda tierras continentales.
		Pleistoceno	1.8 m.a	Se producen las grandes glaciaciones; la corteza terrestre es cubierta por los hielos en 4 etapas sucesivas que alternaron con etapas cálidas.
	Terciario	Plioceno	5	Se conforma el puente Centroamericano definitivo. En la Provincia de Buenos Aires impacta un asteroide con consecuencias dramáticas.
		Mioceno	25	Clima más seco a más frío. Se forman montañas.
		Oligoceno	37.5 m.a	En los continentes los climas se enfrían ligeramente y las floras tropicales son remplazadas por bosques templados.
		Eoceno	55	La actividad de la Placa del Caribe y su continuo movimiento genera por segunda vez una serie de islas volcánicas, que al chocar con el muñón del actual bloque Maya, forma Centroamérica Nuclear. En Patagonia el mar ocupa zonas continentales. Existen reptiles de gran tamaño.
		Paleoceno	65	Clima templado a frío desaparecen los mares internos.
MESOZOICO	Cretácico		145 m.a	Se separan los continentes; formación de las Montañas Rocosas; otros continentes descienden; existe un estrecho puente continuo derivado de la placa del Caribe. - Las Protoantillas- Grandes mares interiores y pantanos.
	Jurásico		210 m.a	Comienza la deriva continental; mares interiores; formación de montañas.
	Triásico		250 m.a	Se forman muchas montañas; grandes desiertos.
PALEOZOICO	Pérmico		290 m.a	Glaciares; formación de los Apalaches; surgen los continentes y se unen en Pangea.
	Carbonífero		360 m.a	Tierras bajas
	Devónico		408 m.a	Glaciares; mares internos
	Silúrico		438 m.a	Continentes básicamente llanos; inundaciones
	Ordovícico		505 m.a	El Mar cubre a las tierras; clima cálido.
	Cámbrico		590 m.a	Clima templado; tierras bajas: rocas más antiguas con abundantes fósiles.
PROTEROZOICO	o Precámbrica.		3500 m.a	El planeta se enfria, glaciares.
AZOICO	o Arqueana		4600 m.a	La atmósfera consistía en vapor de agua, dióxido de carbono, nitrógeno, monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno e hidrógeno. La temperatura promedio de la Tierra estaba entre los 0-100°C, y el sol brillaba sólo en un 60-70% de su intensidad actual. Restos carbonosos de origen orgánico.

**Figura 20.** Formación de Centroamérica la cual se da en tres etapas diferentes.



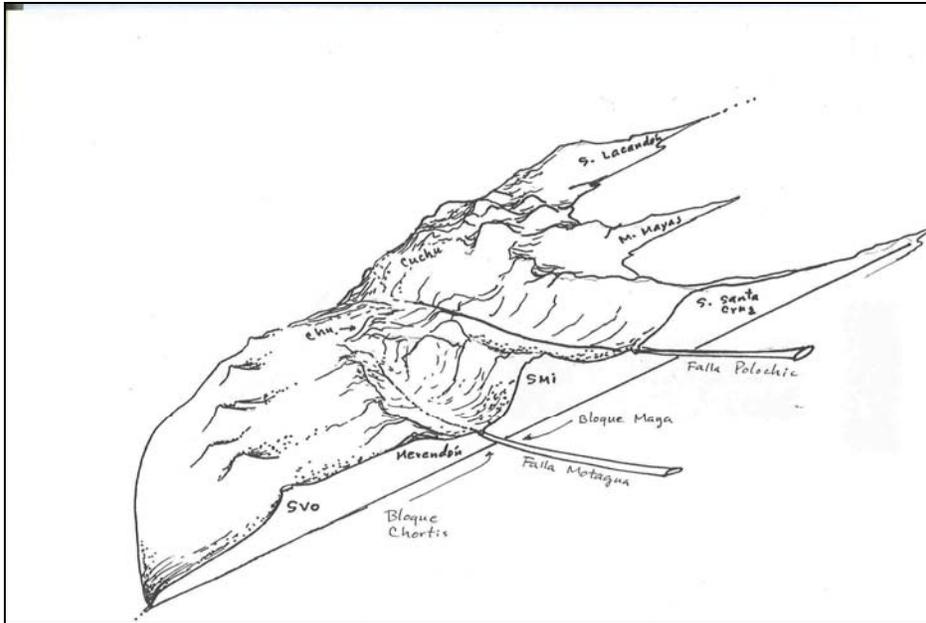
Fuente: Mendez, 2001.

**Figura 21:** Coevolución de los hospederos mamíferos e insectos de *Trypanosoma cruzi*. Los árboles fueron dibujados proporcionalmente a la escala de tiempo en parte inferior.



*Fuente:*

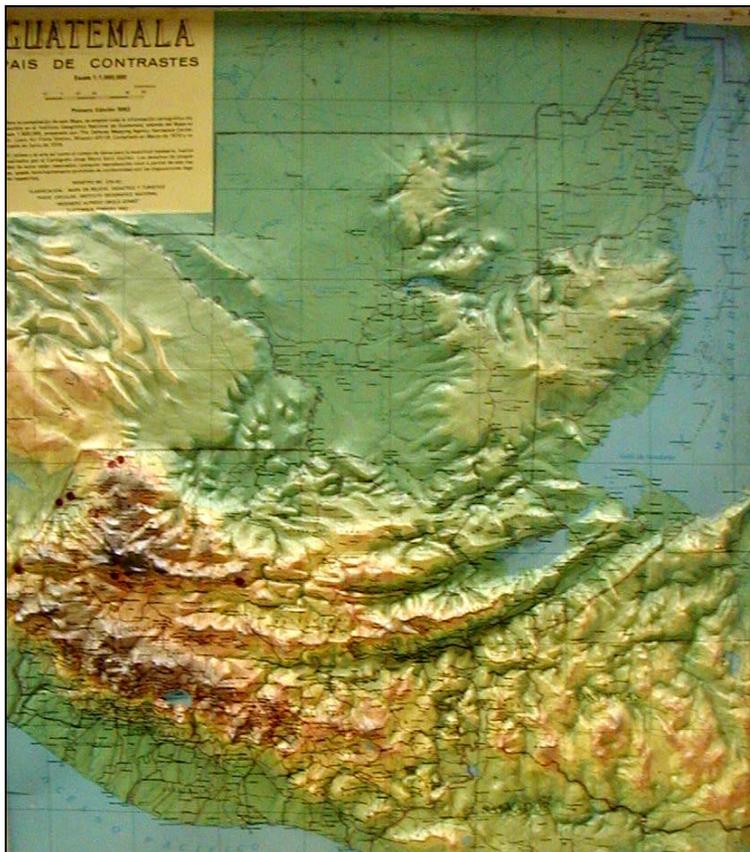
Briones, *et al.*, 2001.



**Figura 22.** Arco húmedo según Went, (1989) visto a través de un corte transversal que muestran los sistemas montañosos, las tierras bajas y su relación con las fallas Polochic-Motagua.

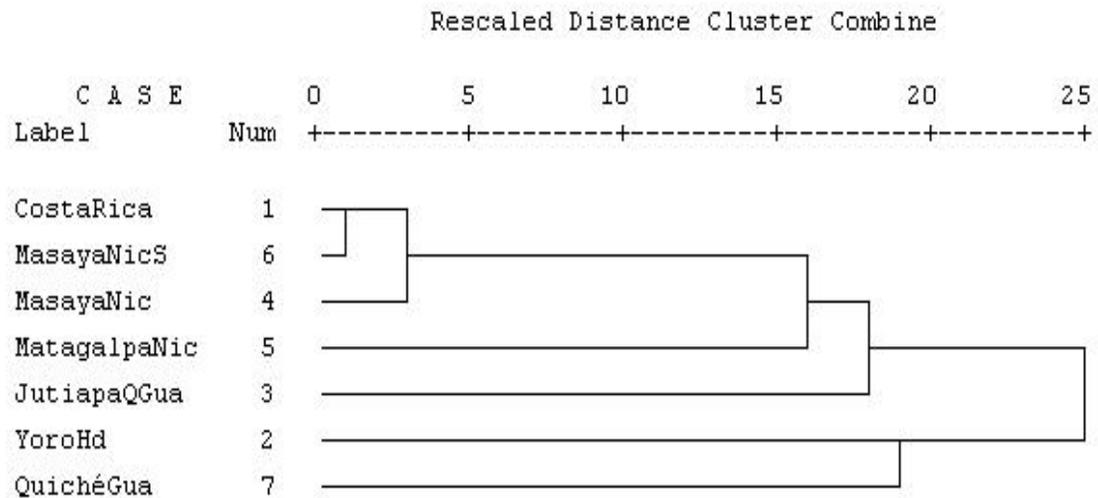
Fuente:

*Mendez, et al., 2001.*



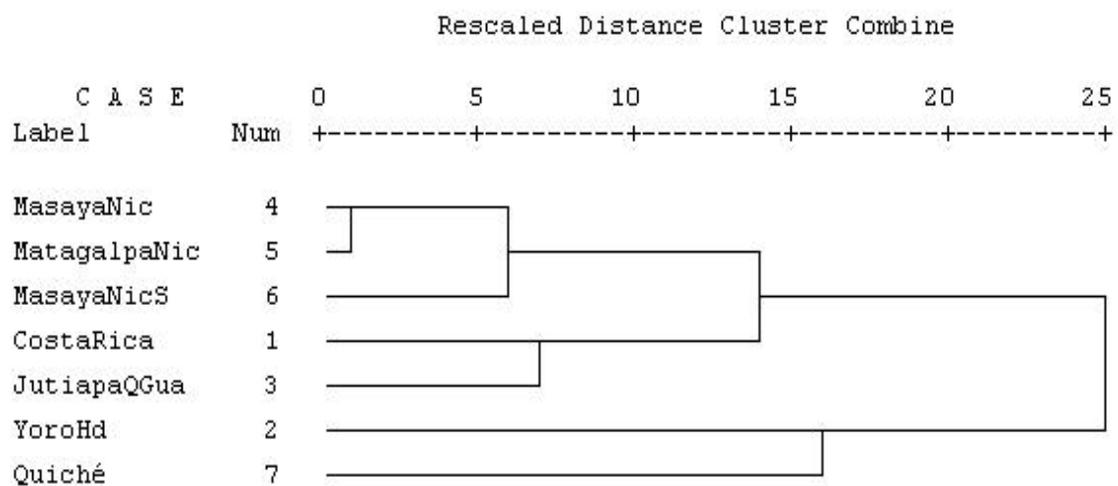
**Figura 23.** Mapa de escalas Fisiográficas, mostrando el Arco Húmedo, según Méndez (2001) formado por Las Sierras del Centro-Norte del País, Montañas Mayas y Tierras Altas de

**Figura 24:** “Isometry free” Morphometry  
 Males2 (Wilks’  $\lambda=0.34$ ,  $p=0.00$ ,  $r^2$  1.12%)  
 Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



**Figura 25:** “Isometry free” Morphometry  
 Females2 (Wilks’  $\lambda=0.39$ ,  $p=0.00$ ,  $r^2$  5.49%)

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



**Figura 26:** Masaya. En Nindirí a orilla del lago se observa el Volcán de Masaya. A corta distancia se observa Masatepe.

