

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



“Comparación del patrón electroforético de las proteínas salivales de las poblaciones del principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala: *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y otras especies relacionadas de Reduvidos”.

SANDY STEFFANY PINEDA GONZÁLEZ

BIÓLOGA

GUATEMALA, FEBRERO 2006

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

“Comparación del patrón electroforético de las proteínas salivales de las poblaciones del principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala: *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y otras especies relacionadas de Reduidos”.

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR:

SANDY STEFFANY PINEDA GONZÁLEZ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

GUATEMALA, FEBRERO 2006.

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	DECANO
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	SECRETARIO
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	VOCAL I
Licda. Liliana Vides de Urizar	VOCAL II
Licda. Beatriz Eugenia Bates de Jiménez	VOCAL III
Br. Juan Francisco Carrascoza Mayen	VOCAL IV
Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro	VOCAL V

INDICE

	Páginas.
1 RESUMEN	1.
2 INTRODUCCION	3.
3 ANTECEDENTES	5.
3.1 Historia del descubrimiento de la Enfermedad de Chagas.	5.
3.2 Principales características de la sub-familia Triatominae.	5.
3.3 Principales vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala.	6.
3.4 Campañas de control de los vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala.	7.
3.5 Implicaciones de la colonización de las viviendas por vectores.	8.
3.6 Utilización de las proteínas de la saliva para el análisis de poblaciones de triatominos.	10.
3.7 Separación de proteínas en geles de poliacrilamida.	11.
3.8 Comportamiento de las proteínas durante la electroforesis en geles de poliacrilamida.	12.
4 JUSTIFICACION	15.
5 OBJETIVOS	17.
5.1 Objetivo General.	17.
5.2 Objetivos Específicos.	17.
6 HIPOTESIS	17.
7 MATERIALES Y METODOS	18.
7.1 Materiales.	18.
7.1.1 Extracción, montaje y corrida de geles (reactivos).	18.
7.1.2 Equipo.	18.
7.1.3 Programas de computadora.	19.
7.1.4 Cristalería y otros materiales.	19.
7.2 Método.	20.
7.2.1 Universo de trabajo.	20.
7.2.2 Tamaño de la muestra.	20.
7.2.3 Diseño experimental.	20.
7.2.4 Protocolos de extracción corrida y montaje de geles.	22.
7.2.4.1 Extracción de Saliva.	22.

7.2.4.2	Desnaturalización.	22.
7.2.4.3	Montaje y corrida de geles.	23.
7.2.4.4	Fotografía y análisis de geles.	24.
7.2.4.5	Análisis estadístico.	26.
7.2.4.5.1	Análisis de agrupamiento.	26.
7.2.4.5.2	Prueba de homogeneidad basada en ji-cuadrado.	26.
7.3	Recursos Humanos.	27.
8	RESULTADOS	28.
8.1	Análisis de especies	28.
8.2	Análisis de poblaciones	30.
8.3	Análisis de poblaciones por lugar de colecta (ecotopo)	31.
8.4	Análisis de significancia de bandas para las poblaciones de <i>T. dimidiata</i> .	32.
9	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33.
9.1	Relación entre especies.	35.
9.2	Poblaciones de <i>T. dimidiata</i> .	38.
9.3	Análisis de ecotopos.	43.
9.4	Comentarios acerca de la técnica.	45.
9.5	Determinación de bandas marcadoras.	46.
9.6	Implicaciones para el control.	47.
10	CONCLUSIONES	49.
11	RECOMENDACIONES	51.
12	REFERENCIAS	52.
13	ANEXOS	60.

1. RESUMEN

La tripanosomiasis americana, conocida comúnmente como enfermedad de Chagas; es una infección crónica mortal causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*. El cual es transmitido principalmente por insectos chupadores de sangre pertenecientes a la subfamilia Triatominae. En América Latina, ésta enfermedad afecta entre 16 -18 millones de personas y se estima que unas 43,000 se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad anualmente (WHO 1999); y su principal vector en Guatemala es *Triatoma dimidiata*; conocida popularmente como chinche picuda. (Schofield 1994)

La chinche picuda, es una especie que presenta una amplia distribución dentro del territorio nacional, ya que se encuentra reportada en 21 de los 22 departamentos. (Tabaru *et al.* 1999) En Guatemala, las poblaciones de *T. dimidiata*, han sido estudiadas con técnicas moleculares y morfométricas, pero hasta el momento no se había estudiado la variabilidad de sus proteínas salivales.

El objetivo del presente trabajo fue comparar la variabilidad proteica salival de poblaciones de *T. dimidiata* y otras especies de reduvidos relacionados; mediante la técnica de electroforesis en poliacrilamida –SDS PAGE-. Con este fin, se realizó una comparación de los patrones electroforéticos de la saliva de *T. dimidiata* y las siguientes especies: *Triatoma nitida*, *Triatoma ryckmani* y *Triatoma pallidipennis*. Seguidamente se compararon los patrones electroforéticos de las proteínas salivales de los individuos de las poblaciones de *T. dimidiata* provenientes de los departamentos de Quiché, Jutiapa y Petén. Por último se compararon los patrones electroforéticos de los individuos de acuerdo a la procedencia de colecta (Ecotopo); es decir, si es doméstico (que se colectó dentro de la casa) y/o peri-doméstico (colecta fuera de la casa); de individuos provenientes del departamento de Jutiapa.

Se observó una amplia variación en cuanto al patrón electroforético; que va desde los 9 hasta los 201 kiloDaltons (kD). En el análisis de poblaciones para *T. dimidiata* se observó que, los individuos de las regiones de Petén y Quiché se agrupan a poblaciones domésticas de Jutiapa como lo son las del Carrizal, Jobo y Sillón, unido a este grupo en

la parte superior se encuentran las poblaciones del Tule y la Perla; dejando completamente separadas a las poblaciones de Laguna Seca y Lanquín. Esta marcada separación de estas poblaciones del resto, hace pensar en el caso de Lanquín, la posibilidad de un proceso de divergencia poblacional que ya ha sido expuesto por algunos autores (Bustamante *et al.* 2004, Calderón *et al.* 2004, Monroy *et al.* 2003). En cuanto a los ecotopos (doméstico y peri doméstico), el análisis realizado no muestra ninguna diferenciación en cuanto al patrón de bandas.

Finalmente, se sugieren como marcadores moleculares para *T. dimidiata* (excluyendo dentro de este grupo a las poblaciones de Lanquín, Quiché y Petén) las bandas con pesos moleculares de: 88.5, 19 y 18kD; para *T. pallidipennis* las bandas con peso molecular de: 38, 33 y 27 kD, para *T. nitida*: 37 y 24 kD; y para *T. ryckmani*: 36 y 20kD.

Palabras clave: Proteínas salivales, Marcador molecular, Patrones electroforéticos, Variabilidad proteica.

2. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es un padecimiento crónico considerado como uno de los problemas más serios en el sistema de salud pública en Latinoamérica. (WHO 1999) Esta enfermedad, es causada por el protozooario *Tripanosoma cruzi*; el cual es transmitido a los humanos a través de las heces de los vectores; que son los insectos pertenecientes al Orden: Hemiptera, Sub familia Triatominae.

Estimaciones de WHO (1999) indican que entre 16 -18 millones de personas en Latinoamérica se encuentran afectadas, y se consideran a otras 43,000 de personas en riesgo de contraer la enfermedad anualmente. En ausencia de control del vector, estas estadísticas pueden indicar una incidencia de casi 500,000 nuevos casos al año. (Schofield 1995, Pinto 1991) En Guatemala, se estima que 4 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad, 730,000 personas se encuentran infectadas y 30,000 personas se infectan anualmente. (Hayes y Schofield 1990, OPS 2000, Schofield 2000)

En el país, existen tres vectores de importancia en la transmisión de *T. cruzi*; los cuales son: *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma nitida*. De estas la primera es la que se considera el principal vector del país. *T. dimidiata* se puede encontrar en 21 de los 22 departamentos del país, siendo los más afectados aquellos de la región de oriente del país; en donde existe un mayor riesgo de transmisión. (Tabaru *et al.* 1999)

En el año 2000, Guatemala inició la Campaña Nacional de Control de los vectores de la enfermedad de Chagas, en lo que se denomina la Iniciativa de los Países Centroamericanos y Belice -IPCA-, (Ponce 1999) con el apoyo económico de la Agencia Japonesa de Cooperación Internacional -JICA-. El tiempo y dinero necesario para lograr los objetivos del -IPCA- son limitados. Por esta razón el control de la enfermedad de Chagas debe dirigirse al estudio de las poblaciones de los vectores, especialmente su distribución, estructuración, y su sistemática; con el fin de comprender de una mejor manera los movimientos poblacionales de la especie y elaborar una estrategia de control dirigida y efectiva. (Schofield, 1994)

En Guatemala el estudio de la enfermedad de Chagas, ha tratado de establecer patrones en cuanto a los movimientos poblacionales del vector. En años más recientes se han realizado estudios utilizando técnicas morfométricas como marcador fenético y el PCR-RAPD`s como marcador genético; para la diferenciación de las poblaciones de *T. dimidiata* (Silvestres, Domésticas y Peridomésticas). En dichos estudios existen algunas discrepancias que hacen necesaria la utilización de nuevas técnicas que produzcan nuevos marcadores que ayuden a clarificar estas discrepancias.

Varios han sido los estudios en los que se utilizan las proteínas salivales como una herramienta para el análisis de poblaciones de la misma especie y análisis entre especies. (Barbosa *et al.* 1999, Soares *et al.* 1998 y Pereira *et al.* 1996) Los resultados obtenidos por estas investigaciones; sugieren que, se pueden obtener patrones electroforéticos capaces de diferenciar grupos muy cercanos entre sí; y aunque la composición de las proteínas de la saliva no es bien conocida, los resultados podrían estar sugiriendo diferentes grados de adaptación hacia las condiciones domiciliarias (Barbosa *et al.* 1999); o bien, deberse a caminos evolutivos resultantes de una presión de selección hacia los hospederos (Pereira *et al.* 1996)

El objetivo del presente trabajo fue comparar los patrones electroforéticos de las proteínas salivales de *T. dimidiata* a tres niveles: 1) El de especie: en el cual se compara ésta con otras tres especies de reduvidos: *T. nitida*, *T. pallidipennis* y *T. ryckmani*. 2) El segundo: en el cual se comparan Individuos de *T. dimidiata* provenientes de las regiones de Petén, Quiché, Alta Verapaz (Lanquín) y Jutiapa. 3) Y el tercero: se comparan a los individuos de acuerdo a la procedencia de colecta (ecotopo) ya sea doméstica y peri-doméstica dentro de la región de Jutiapa.

Los patrones electroforéticos obtenidos para *T. dimidiata* que aquí se presentan, van desde los 9 a los 201 kD. Finalmente se sugieren algunas proteínas que pueden ser utilizados como marcadores, ya que presentan una ocurrencia mayor al 35% y se encuentran exclusivamente en esa población y/o especie. Siendo estos; para *T. dimidiata* (excluyendo a las poblaciones de Lanquín, Quiché y Petén) las bandas con pesos moleculares de: 88.5, 19 y 18kD; para *T. pallidipennis* las bandas con peso molecular de: 38, 33 y 27 kD, para *T. nitida*: 37 y 24 kD; y para *T. ryckmani*: 36 y 20kD.

3. ANTECEDENTES

3.1 Historia del Descubrimiento de la Enfermedad de Chagas

En 1909; el científico brasileño Carlos Chagas, descubrió los primeros casos humanos de un padecimiento que hasta ese momento permanecía desconocido y al que denominó “Tripanosomiasis Americana” y posteriormente se le nombró simplemente “Mal de Chagas” en honor a su descubridor. (Lent y Wygodzinsky 1979)

Carlos Chagas no solo descubrió la enfermedad si no comprobó que el agente causal de este padecimiento es el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi*; y que el vector del mismo, eran los insectos pertenecientes al orden Hemiptera, conocidos comúnmente en Brasil como “barbeiros”. (Lent y Wygodzinsky 1979)

Cuando Chagas descubrió la enfermedad, este se vio limitado a investigar únicamente casos en pacientes humanos; sin embargo, muy poco tiempo transcurrió hasta que se encontró el primer reservorio silvestre: un armadillo; y junto a este otras especies de Hemipteros hemátofagos (pertenecientes a la sub-familia Triatominae); capaces de infectarse y transmitir la enfermedad a otros animales. Este otro descubrimiento dejaba claro que la enfermedad era una zoonosis. (Lent y Wygodzinsky 1979)

3.2 Principales Características de la sub-familia Triatominae

La principal característica de la sub-familia Triatominae, es su condición hematófaga. Todos los triatominos necesitan sangre de un huésped vertebrado para completar su ciclo de vida.

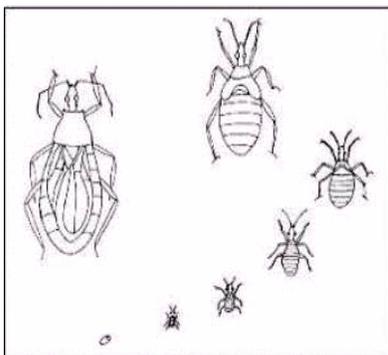


Figura 1. Ciclo de Vida de *Triatoma dimidiata*.

Tomado de: Universidad Simón Bolívar.

El hábitat primario de estos insectos se encuentra principalmente cerca de refugios, nidos y cuevas de animales silvestres. También pueden encontrarse en cúmulos de piedra y paredes de barro; donde, en muchos casos se alimentan de iguanas y otros reptiles. También han sido encontrados en troncos caídos, en brácteas de palmeras, en raíces expuestas y en bromelias. (Lent y Wygodzinsky 1979)

A raíz de la intervención del hombre en los hábitats naturales, los triatominos han sido capaces de invadir nuevos espacios como lo son: establos, gallineros, cochiqueras, etc.; adicionalmente, es muy común encontrar a estos dentro de las viviendas especialmente aquellas que poseen paredes de barro y adobe. (Lent y Wygodzinsky 1979)

Gracias a las características del hábitat en donde se encuentren pueden entonces ser divididas las poblaciones en tres grandes grupos: los silvestres (que se encuentran eminentemente en el bosque), los domésticos (triatominos encontrados dentro de la vivienda) y peridomésticos (triatominos que ocasionalmente son atraídos por la luz o bien se encuentran en gallineros, chiqueras, etc.). (Lent y Wygodzinsky 1979)

3.3 Principales vectores de la enfermedad en Guatemala

En la actualidad, la enfermedad de Chagas es un padecimiento crónico considerado como uno de los problemas más serios en el sistema de salud pública en Latinoamérica. Estimaciones recientes de la OMS indican que unas 16 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi*, y se consideran a otros 100 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad anualmente (OMS 1991). En ausencia de control del vector, estas estadísticas pueden indicar una incidencia de casi 500,000 nuevos casos al año. (Schofield 1995; Pinto 1991)

Por esta razón el control de la enfermedad de Chagas se ha dirigido al estudio de las poblaciones de los vectores, especialmente su distribución, estructuración, y su sistemática; con el fin de comprender de una mejor manera la dinámica poblacional de la especie y elaborar una estrategia de control dirigida y efectiva. (Schofield, 1994)

Los principales vectores del mal de Chagas en Guatemala son *Triatoma dimidiata*¹ y *Rhodnius prolixus*. De estas, la primera es la de mayor importancia en nuestro país, debido a que posee una amplia distribución y alta capacidad para ocupar una gran variedad de nichos ecológicos (viviendas, gallineros, palmeras, cuevas etc.). Asimismo, se estima que 30% a 34% de los insectos pertenecientes a esta especie se encuentran infectados con *T. cruzi*. (Monroy 1992)

Según Tabaru y colaboradores (1999), pueden encontrarse en paredes de barro y techos de palma en el área rural y esta relacionada a comunidades de escasos recursos. Esta especie se encuentra distribuida en 21 de los 22 departamentos de la República de Guatemala; de los cuales dieciséis, constituyen las áreas de mayor riesgo. Se estima que unas 330,000 personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad; la mayor parte de esa población se encuentra en los departamentos de Jutiapa, Chiquimula, Santa Rosa, Zacapa, Jalapa Quiché y Alta Verapaz.

En el país, las condiciones de la vivienda son propicias para la adaptación de los triatomos: el 85% de las casas mantienen animales dentro de ella, 77% cocinan con leña; la mayoría de camas se encuentran localizadas en las esquinas oscuras, sin ventanas; y el 60% de las viviendas son construidas de adobe. (Tabaru *et al.* 1999)

Además del ambiente domiciliar, *T. dimidiata* suele ocupar ambientes alrededor de la casa o peridomicilio como establos, gallineros, perreras y cochiqueras (Zeledón 1981) Existen también poblaciones silvestres, las cuales se han encontrado en cuevas, palmeras y chultunes (cavidades donde los mayas almacenaban los granos básicos). (Monroy *et al.* 2003)

3.4 Campañas de Control de los Vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala

Desde 1991, los gobiernos de los países del Cono Sur establecieron un programa, para eliminar poblaciones domésticas de *Triatoma infestans* el principal vector de la

¹ Descripción de la especie en Anexo.

enfermedad en esta parte del continente. En general esta estrategia ha sido acompañada de programas de eliminación transfusional en éstos y otros países Centroamericanos, generándose iniciativas de control y eliminación de vectores. (OMS 2002)

En el marco de salud pública, en el año 2000, Guatemala inició la Campaña Nacional de control de los vectores de la enfermedad de Chagas, en lo que se denomina la Iniciativa de los Países Centroamericanos y Belice –IPCA-. Los principales objetivos de la -IPCA- son la interrupción de la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas por *R. prolixus*, la disminución de la infestación domiciliar de *T. dimidiata* y la eliminación de la transmisión transfusional de *T. cruzi*. (Ponce 1999)

Esta campaña, se ha desarrollado con el apoyo económico y logístico de la Agencia Japonesa para la Cooperación Internacional –JICA-. Durante su primera fase, se trabajaron cinco departamentos prioritarios que corresponden a zonas de alto endemismo del vector; como lo son: Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa, Chiquimula y Zacapa. (Nakagawa *et al.* 2003)

El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social –MSPAS- con colaboración de -JICA-; en la actualidad utiliza como principal estrategia de control, el rociamiento (tradicional) de las viviendas con insecticidas residuales² (Nakagawa *et al.* 2003). Este método, sin embargo, resulta ser efectivo durante los primeros meses; siendo la re-infestación una de las consecuencias más comúnmente reportadas después de seis meses o un año de aplicado el insecticida. (Marroquín 2002)

3.5 Implicaciones de la colonización de las viviendas por los vectores

Los triatomíneos fueron originalmente poblaciones silvestres, pero por diferentes causas algunas especies han ido acomodándose gradualmente a la vivienda humana. Las modificaciones del medio ambiente causadas por el hombre han originado la desaparición de dichos focos; lo cual ha acelerado el proceso de colonización de las viviendas, de

² Los insecticidas residuales más utilizados en el rociamiento de viviendas son conocidos con los siguientes nombres comerciales: K-othine (Deltametrina formulación: SC al 2.5%), Icon (λ -Cihalotrina, formulación: PM al 10%) y Solfac (β - Ciflutrina, formulación: PM al 10%) (Schofield 1994)

algunas especies de triatomíneos (OMS 2002). De manera que las condiciones de los hábitats domiciliarios y peridomiciliarios, pasan a ser ideales ya que pueden crear microhábitats favorables y brindar protección contra depredadores. (OMS 2002)

Otro factor importante que promueve la colonización además de la vivienda; es el abundante y continuo flujo sanguíneo que les brindan tanto humanos como animales domésticos. (OMS 2002)

La principal repercusión de dicha invasión es el aumento del riesgo de transmisión de *T. cruzi* a los seres humanos. En la actualidad algunas técnicas moleculares y morfométricas pueden ayudar a encontrar los principales cambios genéticos y fenotípicos relacionados con esta invasión. Dichas técnicas han demostrado que este proceso suele asociarse a migraciones importantes; al mismo tiempo se produce una reducción de la variabilidad genética y una creciente inestabilidad en el desarrollo; es por esta razón que el insecto se vuelve más eficiente como vector, pero también es vulnerable a las medidas de control. (OMS 2002)

Debido a que solo algunos genotipos silvestres son capaces de producir poblaciones domésticas duraderas, se supone que durante las primeras fases de este proceso, se produce cierta restricción en cuanto a la variabilidad genética y la dispersión del insecto depende de su huésped y puede aumentar el transporte pasivo. (OMS 2002)

Todos estos cambios acelerados en la dinámica poblacional de los vectores han hecho que se haga necesaria la implementación de nuevos análisis, marcadores moleculares y fenéticos. Por esta razón Schofield (2000) sugiere que es una prioridad el estudio de la estructura genética y dinámica de las poblaciones de *T. dimidiata*.

En Guatemala; el estudio de las poblaciones de *T. dimidiata*, han sido encaminadas principalmente a la caracterización de estas; en cuanto a su distribución, abundancia y movimientos. En años más recientes se han utilizado técnicas como la morfometría para la identificación de marcadores fenéticos y el PCR- RAPD's para la identificación de marcadores genéticos. En dichos estudios existen algunas discrepancias en cuanto al análisis de las poblaciones, que hacen necesario la utilización de nuevas técnicas que

produzcan nuevos marcadores como: análisis de Sensillas de antenas, morfometría de huevos y genitalia de machos, proteínas de la saliva, proporción machos/hembras: “Sex Ratio” (por su nombre en Inglés) y asimetrías de alas.

3.6 Utilización de las Proteínas de la Saliva para el análisis de poblaciones de Triatomínos

En tres estudios realizados por separado (Pereira *et al.* 1996, Soares *et al.* 1998, Barbosa *et al.* 1999) se utilizan las proteínas de la saliva como un nuevo marcador capaz de distinguir entre poblaciones de la misma especie y entre especies.

El patrón electroforético de la saliva en estos estudios; muestra una compleja composición de proteínas; ya que si bien no se conoce la composición exacta, se sabe que posee sustancias con actividades farmacológicas que ayudan durante la ingestión de sangre como: anticoagulantes, vasodilatadores, anestésicos e inhibidores de la agregación plaquetaria. (Ribeiro 1981)

Según Barbosa y colaboradores; aunque la verdadera variación en la composición de la saliva de *Panstrongilus megistus* no es sabida (especie utilizada durante el análisis); las poblaciones en estudio muestran diferentes grados de adaptación a los ambientes domiciliarios (1999). De manera que es probable que dicha variación, se encuentre relacionada a los diferentes huéspedes presentes en los ambientes domésticos, peridomésticos y silvestres. Dicho de otra manera según Pereira *et al.* 1996, esta variación se debe a una presión de selección que favorece a los huéspedes.

Esta presión, afecta de alguna manera el comportamiento de las poblaciones y de las especies en cuanto a la concentración de las proteínas; por lo cual se sugiere que ésta puede ser un marcador capaz de diferenciar algunas poblaciones y especies. (Pereira *et al.* 1996, Barbosa *et al.* 1999).

Si los resultados obtenidos para las poblaciones y especies brasileñas, permite hacer estas diferenciaciones, es posible que las poblaciones guatemaltecas y otras especies de importancia para nuestro país muestren el mismo fenómeno; pudiendo encontrar patrones de banda únicos que permitan diferenciar a éstas, mediante técnicas relativamente sencillas; como lo es el análisis de proteínas en geles de poliacrilamida –SDS Page-; y, a largo plazo establecer pautas para mejorar el diseño de los programas y estrategias de control.

3.7 Separación de Proteínas en Geles de poliacrilamida

La electroforesis es un método analítico semi-preparativo, en el que se separan biomoléculas bajo la acción de un campo eléctrico. Este método fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937; en 1959 Raymond y Weintraub emplearon como soporte para electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE); posteriormente el método fue perfeccionado por varios investigadores como Davis y Ornstein. (García 2000)

La popularidad del método creció rápidamente y se logró un aumento en la resolución del mismo. El dodecil sulfato de sodio (-SDS-) se introduce en esta técnica en 1970 y ya hacia 1972 se emplearon agentes reductores y –SDS- en la determinación del peso molecular de proteínas en lo que se denominó geles de poliacrilamida con -SDS- o simplemente “SDS-PAGE” (García 2000)

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente iónicos y que permiten una buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro. (García 2000)

3.8 Comportamiento de las proteínas durante la electroforesis, en geles de poliacrilamida

Como se menciona anteriormente, la electroforesis con SDS es un excelente método para identificar y monitorear las proteínas durante un proceso de purificación; también se emplea para determinación del peso molecular de sub-unidades de proteínas. (García 2000)

La estructura del SDS empleado en esta variación de la electroforesis en gel es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2=\text{SO}_3^-\text{Na}^+$, el anión se une a las proteínas por absorción no específica (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácido con una relación SDS/proteína máximo de 1.4g/g). (García 2000)

El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Los grupos alifáticos dodecil se colocan en el interior, mientras que los grupos sulfato en la superficie y todos los complejos SDS- Proteína toman carga negativa (que excede la carga intrínseca de las cadenas de aminoácidos). (García 2000)

El complejo SDS-Proteína tiene forma de varilla con un diámetro de 1.8\AA y una longitud proporcional al peso molecular de la cadena polipeptídica. El tratamiento concomitante con un agente reductor de puentes bisulfuro, como el beta-mercaptoetanol (β ME) o el DTT; desnatura las proteínas y las rompe en sub-unidades que la componen. Por lo que el complejo SDS- Proteína tiene generalmente mayor densidad de carga y menor tamaño que las proteínas nativas. Se ha determinado que con 5 min. a 100°C es suficiente para la formación de enlaces estables SDS- proteína. (García 2000)

La migración de los derivados proteína SDS hacia el ánodo es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (Log PM). La relación carga/masa es aproximadamente igual para todas las proteínas de la muestra por lo que la talla de esta deviene en el factor determinante de la separación. El SDS PAGE se emplea para estimar el peso molecular de las proteínas y se compara con un patrón. (García 2000)

Bajo condiciones de pH y temperatura el SDS y las proteínas se concentran en la misma zona, pero como la cantidad de SDS es muy grande comparada con la de proteínas y su concentración en el gel concentrador se puede regular, se forma una zona de concentración amplia caracterizada fundamentalmente por ser estable con el frente de corrida y que continuamente aumenta durante la electroforesis dependiendo de la cantidad de SDS introducido en el tampón. (García 2000)

Se aprecia una progresiva difusión del borde de migración en la medida en la que aumenta la concentración de T. Estos autores demostraron que el ión glicinato no se concentra con el gel concentrador, lo que puede ser provocado por una interacción entre la glicina y el SDS. La concentración de pequeñas proteínas es difícil en estas condiciones, porque se forman complejos de proteínas y detergentes de igual talla y carga que las micelas de SDS solas, por lo que se recomienda el empleo de una mínima cantidad de SDS. (García 2000)

Las condiciones pueden ajustarse dependiendo de cómo se necesite separar las proteínas (en estado completamente desnaturalizada, parcialmente desnaturalizada o nativa). Las asociaciones covalentes entre las unidades de proteínas pueden mantenerse omitiendo el β ME del tampón de las muestras. (García 2000)

En ausencia de este agente reductor, los puentes bisulfuro intercatenarios de la muestra de las proteínas permanecen intactos; la movilidad electroforética del complejo SDS proteína se altera bajo estas condiciones de disociación y durante la electroforesis la movilidad de los Oligómeros-SDSproteínas es menor que con los componentes SDS polipéptidos completamente desnaturalizados. Las proteínas pueden mostrar una respuesta individual característica a la reducción lo que se determina al comparar los geles corridos con β ME o sin este. Adicionalmente, las proteínas no reducidas, pueden no estar del todo saturadas SDS por lo que puede variar su relación peso/peso en su integración con el detergente. Esto hace que las determinaciones de peso molecular con estas características no tengan la misma confiabilidad que el análisis hecho con polipéptidos del todo desnaturalizados. (García 2000)

Es necesaria la existencia de patrones y proteínas conocidas de igual configuración para una comparación válida. El SDS Page bajo condiciones reducidas y no reducidas es un método muy útil para el análisis de los puentes bisulfuro que contienen las proteínas. (García 2000)

4. JUSTIFICACION

En América Latina, ésta enfermedad afecta entre 16 -18 millones de personas y se estima que unas 43,000 se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad anualmente (WHO 1999). Este padecimiento es producido por el protozooario *Trypanosoma cruzi* y su principal vector en Guatemala es *Triatoma dimidiata*, el cual pertenece a la subfamilia Triatominae, Hemiptera: Reduviidae (chinchas verdaderas) que se caracterizan por su hábito hematófago y amplia distribución (Schofield 1994).

La chinche picuda se encuentra reportada en 21 de los 22 departamentos del país, siendo los más afectados aquellos de la región de oriente; que limitan con El Salvador y Honduras (OMS 2002). Esta gran distribución ha hecho que en los últimos años se le dé una mayor importancia a la vigilancia y control de estos vectores. Guatemala en el año 2000 inició la Campaña Nacional de control de los vectores de la enfermedad de Chagas, dentro de lo que se denomina la Iniciativa de los países Centroamericanos y Belice (IPCA). Los principales objetivos de la IPCA son la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por *Rhodnius prolixus*, la disminución de la infestación domiciliar de *T. dimidiata* y la eliminación de la transmisión transfusional de *T. cruzi* (Ponce 1999).

Esta campaña, se ha desarrollado con el apoyo económico y logístico de la Agencia Japonesa para la Cooperación Internacional (JICA). Durante su primera fase, se trabajaron cinco departamentos prioritarios dentro de los cuales se encuentra el departamento de Jutiapa, que corresponde a una zona de alto endemismo del vector (Nakagawa *et al.* 2003)

Para cumplir con los objetivos de la IPCA, el Ministerio de Salud y Asistencia Social, utiliza como principal estrategia de control en nuestro país, el rociamiento (tradicional) de las viviendas con insecticidas residuales (Marroquín 2002). El apoyo financiero a esta campaña, es limitado en cantidad y tiempo, y las re-infestaciones siguen constituyendo una amenaza para el control. Al mismo tiempo existen aún vacíos de información en cuanto al conocimiento de las poblaciones de los vectores. Por esta razón Schofield

(2000) sugiere que es una prioridad el estudio de la estructura genética y dinámica de las poblaciones de *T. dimidiata*, al mismo tiempo, este tipo de investigaciones debe ayudar a la identificación de marcadores genéticos y fenéticos eficientes que permitan análisis más detallados de esas poblaciones.

En este sentido, el estudio de la dinámica poblacional de los vectores en nuestro país, ha tratado de caracterizar a las poblaciones en cuanto a su distribución, abundancia y movimientos; en años más recientes se han utilizado técnicas como la morfometría para la identificación de marcadores fenéticos y el PCR- RAPD's para la identificación de marcadores genéticos; que permitan la diferenciación de las poblaciones de *T. dimidiata* (Silvestres, Domésticas y Peri domésticas). En dichos estudios existen algunas discrepancias en cuanto al análisis de las poblaciones, que hacen necesario la utilización de nuevos marcadores.

Es por esta razón que el presente trabajo tiene como fin comparar poblaciones de *T. dimidiata* y otras especies de reduvidos relacionadas, utilizando las proteínas salivales. Esta técnica fue propuesta inicialmente por Pereira *et al.* 1996; seguido por Barbosa y colaboradores (1999), en su trabajo con poblaciones brasileñas de *Panstrongilus megistus* (Hemiptera: Reduviidae).

Los resultados obtenidos para *P. megistus*, sugieren que las proteínas salivales pueden ser utilizadas como un marcador fenotípico capaz de diferenciar poblaciones domésticas, peri domésticas y silvestres. Es por ello que consideramos que si esta técnica es lo suficientemente sensible para diferenciar poblaciones de la misma especie y algunas especies relacionadas, se podría proponer a éste como un marcador útil para el análisis poblacional del vector en nuestro país.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Comparar la variabilidad de las proteínas salivales de poblaciones de *T. dimidiata* y otras especies de Reduidos relacionados, utilizando la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-Page).

5.2 Específicos

- a) Comparar el patrón de bandas de las proteínas salivales, provenientes de poblaciones de *T. dimidiata* y algunas especies relacionadas.
- b) Calcular el índice de similitud de Dice para comparar las proteínas salivales de las poblaciones y especies muestreadas.
- c) Determinar si existen diferencias significativas en el patrón de bandas presentado por las poblaciones de *Triatoma dimidiata*.
- d) Determinar la existencia de bandas de proteína únicas, que puedan ser utilizadas como un nuevo marcador para el análisis poblacional de *T. dimidiata* y especies relacionadas.

6. HIPOTESIS

Existen diferencias en los patrones electroforéticos producido por las proteínas salivales, entre las poblaciones de *Triatoma dimidiata* y otras especies de reduvidos relacionadas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales:

7.1.1 Extracción, Montaje y Corrida de Geles: REACTIVOS

Agua Ultrapura (Aldrich 500ml)
 Acrilamida/bisAcrilamida 37:5:1 (6C) (BioRad, Sol. 500ml)
 Dodecil Sulfato de Sodio –SDS- (detergente) (USB 100g)
 Persulfato de Amonio (BioRad 10g)
 TEMED –N,N,N,N´tetrametilnediamina- (BioRad 50ml)
 Buffer Tris-HCl 1M pH 8.8. (BioRad Sol. 1L)
 Buffer Tris-HCl 0.5M pH 6.8. (BioRad Sol. 1L)
 Buffer Tris/Glicina/SDS (BioRad 5L)
 Marcador Molecular (Precision Standard® Unstained 1 ml BioRad)
 Glisina (BioRad 250g)
 Colorante Azul de Coomassie Blue R-250 (BioRad Sol. 1 L)
 Glicerol (Sygma® 1L)
 Metanol (1L)
 Acido Acético Glacial (EM 500ml)
 Etanol Absoluto (Merck® 1000 ml)
 Dithiothreitol –DTT- (Fisher brand® 5g)
 Azul de Bromofenol (BioRad 10g)
 Albúmina Sérica de Bovino (Standard BSA BioRad 10g)
 Colorante Azul de Coomasie Blue G-250 (BioRad) 10g
 Agua desmineralizada (5 L)
 Metanol (3 L)

7.1.2 Equipo

Mini Protean® III Celda. Equipo para Electroforesis (BioRad)
 Power Pac Basic™ Power Supply (BioRad)
 1 Secadora de Geles BioRad
 1 Circuito Eléctrico de 25V
 1 Orbital Shaker Daigger®

Baño de María 0-110°C.
 2 Termómetros
 1 Computadora Hurracaine®
 1 Computadora Portátil Toshiba Satellite A-70®
 Vortex Genie 2™ Fisher Scientific INC.
 Cámara fotográfica Sony Cybershot®. 3.1 Mega-píxeles
 Impresora Hewlett-Packard© pcs.1315

7.1.3 Programas de Computadora

Gene Profiler® (Scan-Analytics. INC.)
 SPSS® Versión 12.0.
 PAST® Paleontological Statistics Versión 1.27
 Microsoft Office® Word y Exell
 PC-ORD Versión 3.12

7.1.4 Cristalería y otros materiales

Prot/Elec.™ Pipet Tips (1000 unidades)
 Tubos Eppendorf® 1.5ml
 Pipeta Eppendorf® de 1-10ul
 Pipeta Eppendorf® de 1-100ul
 Pipeta Eppendorf® de 1-1000ul
 Puntas Eppendorf® 1-1000ul (1000 unidades)
 Puntas Eppendorf® 1-100ul (1000 unidades)
 Puntas Eppendorf® 1-10ul (1000 unidades)
 Beackers de cristal 100ml. Pyrex® (5 unidades)
 Beackers de cristal 50ml. Pyrex® (5 unidades)
 Frascos Pyrex® 1L (4 unidades)
 Tubos Fisher brand® 15ml (25 unidades)

7.2 Método

7.2.1 Universo de Trabajo

Insectos provenientes de tres regiones del departamento de Jutiapa (delimitadas según su proximidad geográfica)³; Quiché, Alta Verapaz (Lanquín), Petén y especímenes de tres especies de Reduidos relacionados como lo son: *T. nitida*, *T. ryckmani* y *T. pallidipennis*.

7.2.2 Tamaño de la Muestra

En esta investigación se plantea la necesidad de realizar tres análisis por separado; por lo que el tamaño de la muestra varía de acuerdo a cada uno:

1. Se trabajó con 30 individuos de *Triatoma dimidiata* de la región uno del departamento de Jutiapa, 18 de la segunda región y 13 de la tercer región. Adicionalmente se trabajó con 13 individuos del departamento de Quiché, 6 del departamento de Petén y 2 de Alta Verapaz (Lanquín); para el análisis de diferenciación de poblaciones. (figura 3 y 4 en Anexo)
2. Se trabajó con 35 individuos del ecotopo doméstico y 18 del peri doméstico de *Triatoma dimidiata* del departamento de Jutiapa.
3. Para la comparación entre especies, se utilizaron 3 individuos de *Triatoma pallidipennis*; 6 individuos de *Triatoma nítida* 1 Individuo de *Triatoma ryckmani* y un grupo de individuos de *Triatoma dimidiata* de los departamentos Jutiapa y Quiché.

7.2.3 Diseño Experimental

Como se mencionó con anterioridad, la investigación requirió de tres niveles de análisis: el poblacional, de ecotopo y el de especies; con el fin de establecer la posible diferenciación de *T. dimidiata* en alguno de los tres niveles.

³ Figura 4 en Anexo.

Cuadro No. 1 Diseño experimental.

Descripción	Análisis de Poblaciones	Análisis de Ecotopo	Análisis de Especies
Unidad Experimental:	1µl de saliva (aproximadamente) por individuo.	1µl de saliva (aproximadamente) por individuo.	1µl de saliva (aproximadamente) por individuo.
Unidad Muestral:	Individuos provenientes del departamento de Jutiapa, Petén, Alta Verapaz y Quiché	Individuos provenientes de cada ecotopo: Doméstico, peri doméstico	Procedencia de los individuos de cada especie.
Tamaño de Muestra:	Se trabajó con 30, 18 y 13 individuos de cada región del departamento de Jutiapa; 6 del departamento de Petén, 13 de Quiché y 2 de Alta Verapaz.	35 individuos del ecotopo Doméstico y 18 del peri doméstico.	3 individuos de <i>Triatoma pallidipenis</i> ; 6 individuos de <i>Triatoma nítida</i> 1 Individuo de <i>Triatoma ryckmani</i> y un grupo de individuos de <i>Triatoma dimidiata</i> .
Variable independiente:	Región geográfica.	Ecotopo	Especie
Variable dependiente:	Patrones electroforéticos obtenidos.	Patrones electroforéticos obtenidos.	Patrones electroforéticos obtenidos.
Distribución espacial:	Geles de poliacrilamida al 12%	Geles de poliacrilamida al 12%	Geles de poliacrilamida al 12%
Distribución temporal:	Abril-Mayo	Abril-Mayo	Abril-Mayo

Las muestras se analizaron en cada caso, siguiendo cada uno de los protocolos enumerados en la siguiente sección.

7.2.4 Protocolos de Extracción, Corrida y Montaje de geles

7.2.4.1 Extracción de saliva

- Cada individuo colectado se colocó en un insectario a una temperatura aproximada de $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y a una humedad relativa de 60-70%. Los insectos mantenidos dentro del laboratorio se alimentaron con ratones cada 15 días hasta obtener individuos adultos; en caso de que estos fueran ninfas. De lo contrario los adultos obtenidos durante las colectas se trabajaron inmediatamente.
- Los individuos adultos, se colocaron, dentro de una cámara (diseñada de acuerdo a las medidas corporales de la especie). Posteriormente se colocó la probóscide del insecto en un tubo eppendorf de 1.2ml, y se estimuló eléctricamente la región latero ventral, para lo cual se utilizó un electrodo⁴.
- El voltaje utilizado para aplicar las descargas fue de aproximadamente 25 voltios⁵ por un tiempo no mayor de 3 minutos. Durante ese tiempo, se colectó aproximadamente 1-2 μl de saliva por individuo⁶.

7.2.4.2 Desnaturalización

Previo a la preparación, montaje y corrida de geles; es necesario preparar el amortiguador que se agregó a las proteínas a fin de desnaturalizarlas; para ello se preparó la siguiente solución 2X:

1. 0.5 M Tris pH. 6.8, 2.5 ml.
2. 4% -SDS-, 0.4g.
3. 4% Dithiothreitol -DTT-, 0.4g.

⁴ Figura 7 en anexo.

⁵ Se realizó una prueba preliminar utilizando descargas aproximadas de 11V que produjeron estimulación; sin embargo, se utilizaron descargas de 25V. Se encuentra pendiente de confirmación la frecuencia y amperaje aplicado durante las descargas. (Informe Final de Investigación -IIQB- 2003).

⁶ Según ensayos previos realizados (Informe Final de Investigación -IIQB- 2003).

4. 20% Glicerol, 2ml.
5. 0.002g de azul de bromofenol.
6. Agua ultra pura (hasta llegar a 10ml) 5.5ml.

Posteriormente en el tubo eppendorf donde se realizó la extracción de las proteínas se agregó 20 μ l del amortiguador 2X previamente preparado. Esta solución recién preparada (amortiguador + proteína) se mezcla bien y se calienta por 4 min. a 100°C.

Nota: a la solución amortiguadora, se agrega el –DTT- hasta unos minutos antes de realizarse el procedimiento; por lo que se recomienda preparar cantidades pequeñas de este. Para este caso se preparó 2ml por cada 4 corridas; entonces la cantidad de –DTT- requerida para 2ml de solución es de 0.08g.

7.2.4.3 Montaje y corrida de geles

- Preparación de placas: antes de iniciar cualquier procedimiento, asegurarse que las placas de vidrio estén perfectamente limpias, si sucede lo contrario primero se debe lavar cada una de ellas con agua y jabón. Posteriormente estas se limpian con etanol antes de usar.
- Las placas limpias fueron colocadas dentro de un marco o “Casting Frame”⁷.
- En un beacker de 100ml debidamente rotulado se agregaron las cantidades abajo descritas para preparar el gel de separación:

Gel de separación (abajo) 10ml:

1. 3,300 μ l de agua desionizada.
2. 4,000 μ l de Acrilamida/BisAcrilamida 37:5:1 (6C).
3. 2,500 μ l de Tris-HCl 1M pH 8.8.

⁷ Figura 5 en Anexo.

4. 100µl de solución al 10% de -SDS-.
5. 100µl de Persulfato de Amonio –APS- (solución al 10%).
6. 15µl de N,N,N,N´tetrametilnediamina –TEMED-

Al finalizar se vierte la preparación en medio de las placas de vidrio, previamente preparadas. Al llegar aproximadamente a 4 cm. del borde superior del vidrio se deja la solución y se debe de agregar agua desionizada para nivelar. Posteriormente, se espera a que polimericen los reactivos y el agua se retira. Seguidamente se prepara el gel de concentración o “Stacking gel” y se repite el procedimiento, con la diferencia de que al llegar al borde de los vidrios se colocarán los peines que darán forma a los pozos donde se deposita la muestra.

El gel de Concentración se preparó de la siguiente manera:

1. 3,150 µl de agua desionizada.
2. 550 µl de Acrilamida/BisAcrilamida 37:5:1 (6C).
3. 1,250 µl de Tris-HCl 0.5M. pH 6.8.
4. 100µl de solución al 10% de –SDS- .
5. 100µl de Persulfato de Amonio –APS- (solución al 10%).
6. 15µl de TEMED.

Al finalizar la fase de preparación del gel y de las muestras se procede al montaje de las muestras en los pozos (sin olvidar antes llenar la cámara con el amortiguador de corrida o “running buffer”⁸ y retirar los peines). En este caso se depositó una cantidad de 5µl de muestra y 10µl de marcador molecular (BioRad). Colocadas las muestras y el marcador molecular, estos se corrieron a 100V durante 2 horas aproximadamente.

Al concluir la corrida del gel, este se sumergió en una solución de Azul de Coomasie (R-250) por 12 horas. Pasado este tiempo el gel se colocó en una nueva solución que contiene 40% de metanol, 10% de ácido acético glacial y agua desionizada. Dicha

⁸Si se tiene el amortiguador de corrida 10XTris/Glicine/SDS (5L), entonces diluir 50ml del Stock 10X en 450ml de agua desmineralizada.

solución se dejó actuar durante una hora aproximadamente antes de cambiar una vez más el gel con la misma solución. Este procedimiento se repitió una vez más; ya que la tercera, es una solución fijadora que contiene 20% de metanol, 3% de glicerol y agua destilada.

Finalizada la fase de desteñido, el gel; se colocó por encima de una base de madera circular un pedazo de papel celofán mojado, y por encima de éste, otro pedazo de papel celofán (también mojado). Esta preparación se ubica en un marco circular y se deja secando en una incubadora a 70°C durante 2 horas aproximadamente. Concluido este procedimiento los geles quedaron listos para ser fotografiados, o bien, obtener los escanogramas correspondientes que han de ser analizados utilizando el programa Gene Profiler® (Scan-Analytics. INC.).

7.2.4.4 Fotografía y análisis de geles

De cada gel seco se obtuvo un escanograma utilizando una impresora marca Hewlett-Packard© pcs.1315. Posteriormente fueron almacenados los escanogramas en la computadora con la extensión de programa TIFF y fueron cambiados de color a escala de grises.

Estos escanogramas fueron importados hacia el programa Gene Profiler® (Scan-Analytics. INC.); en donde se procedió al análisis y marcaje de cada banda. Al finalizar con cada uno de los escanogramas, se exportan al Database manager (programa que se encuentra dentro del Gene Profiler®) y en el cual se calculó la matriz de presencia ausencia de bandas, así mismo se trazó, el perfil de un gel idealizado con cada una de las muestras y sus pesos moleculares calculados aproximados (Gráfica 7 en Anexo)

7.2.4.5 Análisis estadístico

7.2.4.5.1 Análisis de Agrupamiento:

Para la realización de la comparación de poblaciones y especies, se utilizó el análisis de agrupamiento; tomando como variable el promedio de la presencia/ausencia de bandas en cada una de ellas dentro de la población. Posteriormente se elaboró un dendrograma por el método del grupo par no ponderado con promedios aritméticos UPGMA (por sus siglas en inglés).

Adicionalmente se realizó un análisis de agrupamiento para la comparación de los ecotopos; mediante la comparación de los datos de presencia-ausencia de bandas de cada individuo. Para ello, se utilizó el índice de similitud de Dice.

7.2.4.5.2 Prueba de homogeneidad basada en Ji-cuadrado

Para determinar si existen diferencias significativas en cuanto al patrón de bandas presentado por las poblaciones y especies; se practicó una prueba de homogeneidad basada en ji- cuadrado. Esta prueba, se ocupa de responder si las muestras extraídas provienen de poblaciones homogéneas con respecto a algún criterio de clasificación. (Daniel 1999).

Como variable se utilizó la frecuencia de presencia de cada una de las bandas en cada población; de manera que se realizaron comparaciones entre pares de poblaciones. Si dos poblaciones son iguales, se esperaría que la frecuencia de presencia de banda sea igual. Como se realizaron comparaciones múltiples con todos los pares de poblaciones se realizó una corrección de Bonferroni.

7.3 Recursos Humanos

Investigadora: Sandy Steffany Pineda González.

Asesores:

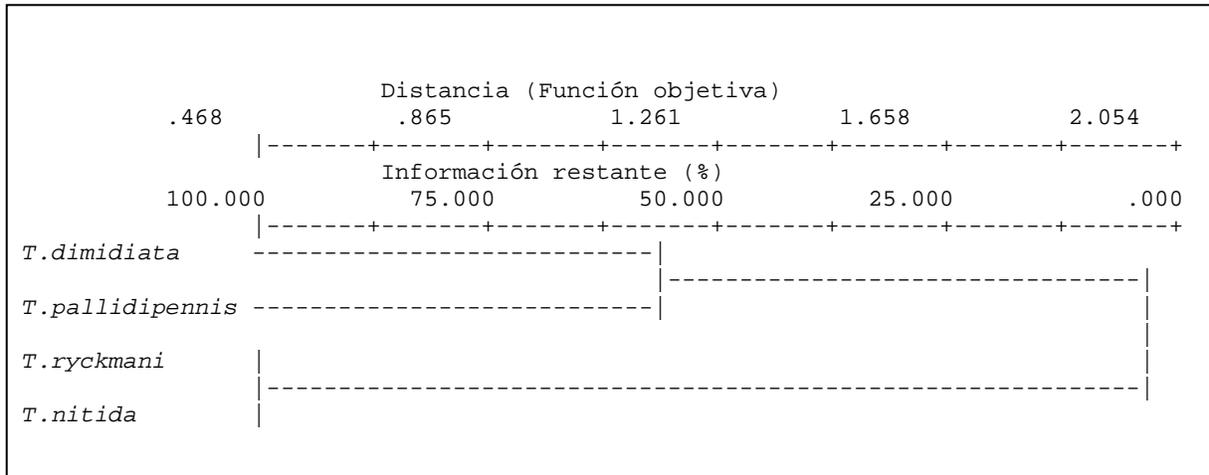
M.Sc. Sergio Melgar.

Ph.D Carlota Monroy

Revisor: Ph.D Jorge Erwin López G.

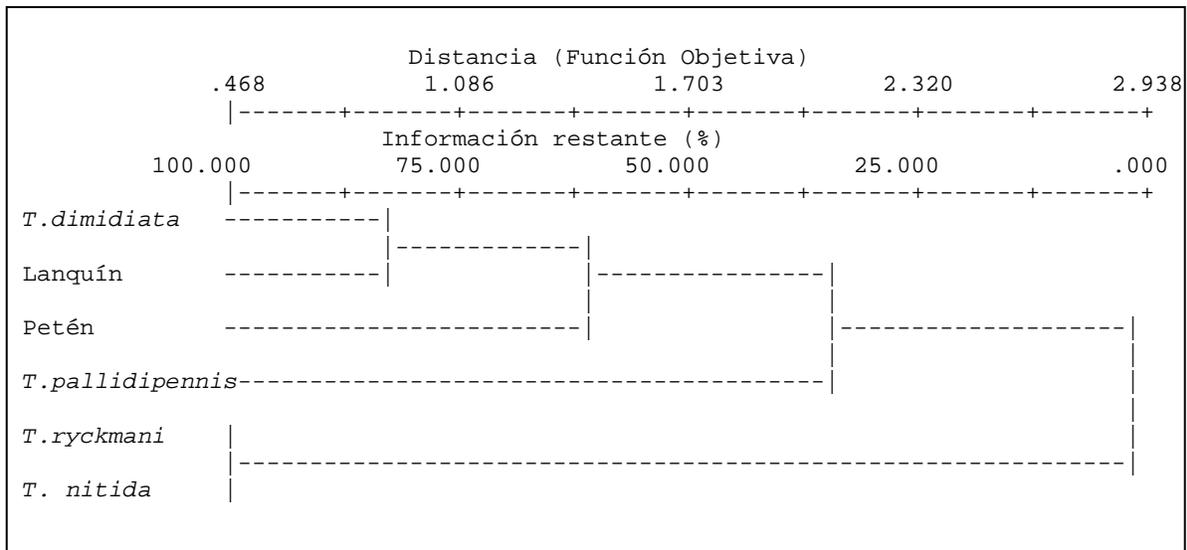
8. RESULTADOS

8.1 Análisis de Especies



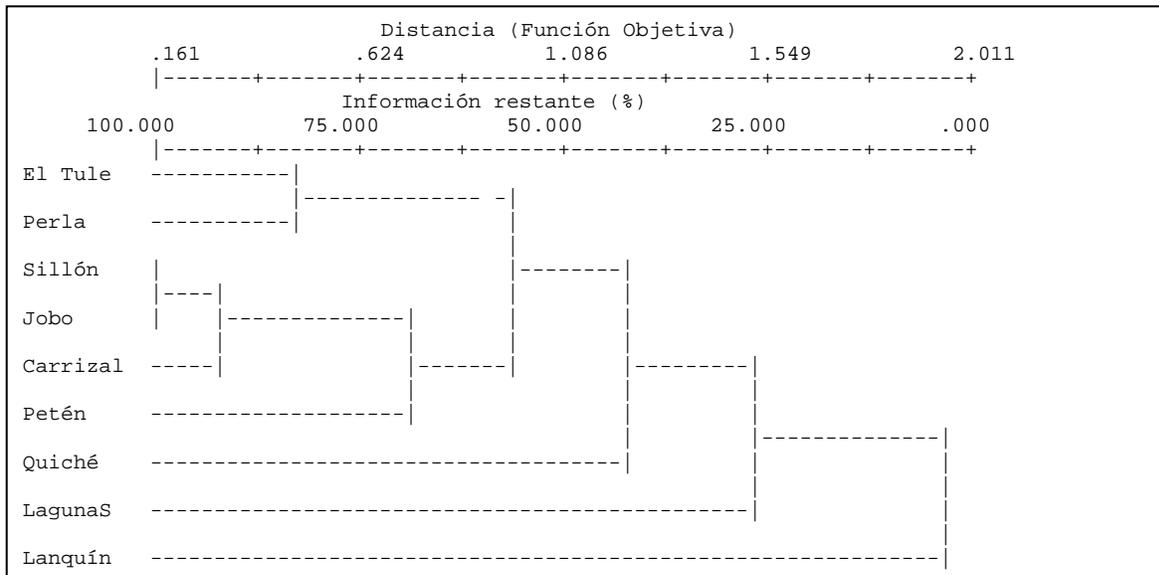
Gráfica No. 1. Análisis de Agrupamiento de las Especies: poblaciones domésticas de *Triatoma dimidiata*⁹, *Triatoma ryckmani*, *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma nitida*; **basado en los promedios de apareamiento de bandas.** Se observa una separación entre las especies que se encuentran dentro del complejo Phyllasoma (*T. dimidiata* y *T. pallidipennis*) y *T. nitida* que se encuentra dentro del complejo protracta; siendo *T. ryckmani* la única especie que hasta el momento no posee una posición taxonómica definida, en este caso sus proteínas salivales son más parecidas a las del complejo protracta que a las del complejo Phyllasoma.

⁹ Para la construcción de este dendrograma se utilizó un grupo de individuos de *T. dimidiata* que incluye individuos del departamento de Jutiapa y Quiché excluyendo las poblaciones silvestres de Lanquín y Petén.

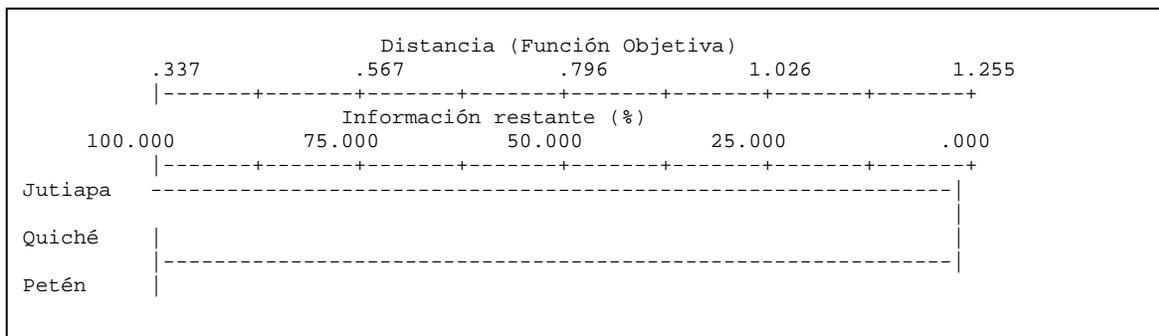


Gráfica No. 2 Análisis de Agrupamiento de las Especies: *Triatoma ryckmani*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma nitida*, *Triatoma dimidiata* y sus poblaciones silvestres; **basado en los promedios de apareamiento de bandas.** Al igual que el análisis de agrupamiento anterior, existe una separación entre las especies que componen los dos diferentes complejos analizados. Las poblaciones silvestres de *T. dimidiata* (Petén y Lanquín) aparecen siempre dentro del complejo *Phyllasoma* pero en posiciones distantes, este comportamiento ya ha sido descrito en otros estudios con otras técnicas y han sido propuestas como poblaciones en vías de especiación: Lanquín y Petén. (Landaverde, 2004, Bustamante *et al.*, 2004, Menes, 2004, Calderón *et al.* 2004)

8.2 Análisis de Poblaciones de *T. dimidiata* de los departamentos de Petén, Jutiapa y Quiché.



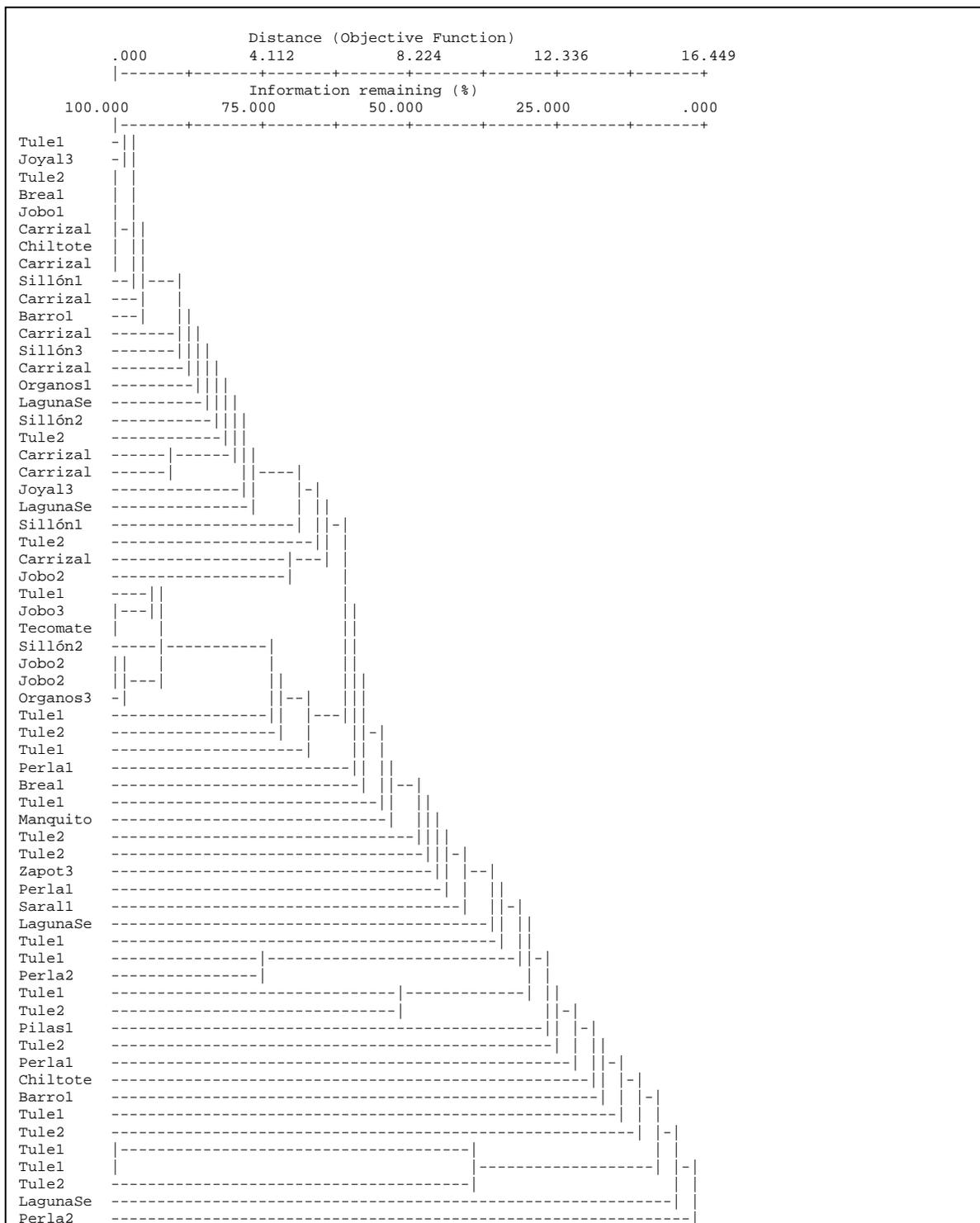
Gráfica No. 3 Análisis de Agrupamiento de las Poblaciones de *Triatoma dimidiata* basado en los promedios de apareamiento de bandas. El análisis de las poblaciones de *T. dimidiata* muestran a las poblaciones de Petén y Quiché agrupadas a las poblaciones domésticas de Jutiapa como el Carrizal, Jobo y Sillón; por encima de ellos el Tule y la Perla. Separando por completo a las poblaciones de Laguna Seca y Lanquín.



Gráfica No. 4 Análisis de Agrupamiento de las Poblaciones de *Triatoma dimidiata* por departamento trabajado; basado en los promedios de apareamiento de bandas. El siguiente análisis de agrupamiento muestra una clara diferenciación entre los patrones electroforéticos obtenidos de las poblaciones de la región geográfica del norte (Quiché y Petén) y la del sur (Jutiapa).

8.3 Análisis de poblaciones de *T. dimidiata* de Jutiapa por lugar de colecta:

Ecotopo



* Aparecen dentro del dendrograma la codificación correspondiente al nombre de la aldea y un número que corresponde de la siguiente manera: 1: Domicilio, 2: Peridomicilio y 3: Sin información.

Gráfica No. 5 Análisis de Agrupamiento de los Ecotopos: Doméstico – Peridoméstico del departamento de Jutiapa, basado en el Índice de Similitud de Dice.

El análisis de agrupamiento utilizando el índice de similitud de Dice, muestra que no existe diferencia en cuanto a las patrones electroforéticos de las proteínas salivales de los individuos colectados dentro de la casa (domicilio) de aquellos colectados afuera de esta (peridomicilio) y que las tres regiones analizadas del departamento de Jutiapa, se encuentran mezcladas.

8.4 Análisis de Significancia de bandas para poblaciones de *Triatoma dimidiata*.

A continuación se presentan los valores observados de p ; para 4 bandas de proteína, que se encuentran en las poblaciones de *T. dimidiata*. Posteriormente se comparan estos mismos con el valor de p ; con los obtenidos a través de la corrección de Bonferroni. Los resultados de la corrección denotan que no existe diferencia significativa al realizarse las comparaciones múltiples entre las poblaciones.

Tabla No. 1 Valores de χ^2 de las Bandas presentes en todos los individuos de las poblaciones de *Triatoma dimidiata*.

Peso Molecular en kD	88.9	19	18
Valor χ^2 cuadrado calculado	0.0303*	0.0127*	0.03*
p 0.05	0.05	0.05	0.05

*Valores que presentan diferencia significativa $p < 0.05$.

Tabla No. 2 Corrección de Bonferroni para los valores de χ^2 obtenidos para la presencia de bandas de las Poblaciones de *Triatoma dimidiata*.

Peso Molecular en kD	88.9	19	18
Valor de p	0.01*	0.03	0.032
Bonferroni	0.0169524	0.0253	0.05

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se han empleado técnicas morfométricas y moleculares para estudiar la diferenciación de las poblaciones y la identidad taxonómica en que se encuentran clasificadas las diferentes especies de Triatominos que son los principales vectores de la enfermedad de Chagas.

Desde hace ya algún tiempo existe discusión a cerca de las relaciones filogenéticas de ésta y otras especies de importancia epidemiológica. Se ha observado una alta variación morfológica y molecular en estos insectos, que ha llevado a muchos científicos a describir algunas variantes de la especie como subespecies o en algunos casos como nuevas especies. Usinger en 1944, describió una forma típica de *T. dimidiata*, sugiriendo que la mayor parte de especímenes revisados procedentes de México pertenecían a la subespecie *maculipennis*; y que los provenientes de Colombia se considerasen *capitata*.

En 1979 la revisión taxonómica de Lent y Wygodzinsky concluyó que *T. dimidiata* era una especie que no se ha diferenciado o segregado en poblaciones alopátricas que se puedan separar, y que las variaciones fenotípicas de algunos especímenes se debían a excepciones de la naturaleza; por ende la clasificación hasta el momento continúa siendo de esta forma, considerando a *T. dimidiata* como una sola especie y no un complejo de especies.

Hasta el momento, la tribu Triatomini se encuentra compuesta por numerosos complejos de los cuales en este trabajo se utilizan únicamente dos: El complejo *Phyllasoma* al cual pertenecen *Triatoma dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. Phyllasoma y picturata*, *T. longipennis*, *T. mazzotti* y *T. mexicana*; y el complejo *Protracta* compuesto por: *T. nitida*, *T. neotomae*,

T. barberi, *T. protracta*, *T. incrassata*, *T. penninsularis* y *T. sinaloenses*. (Lent y Wygodzinsky 1979) Según Schofield (2000) los datos disponibles hasta el momento (utilizando diferentes técnicas de análisis poblacionales) sugieren que *T. dimidiata* puede estar distribuida en una serie de poblaciones relativamente aisladas y con poco flujo genético entre ellas.

En nuestro país las técnicas ampliamente utilizadas para el estudio de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* han sido el PCR- RAPD's y la Morfometría. Como un nuevo esfuerzo de encontrar técnicas nuevas que nos permitan comprender de una mejor manera la relación que existe entre las diferentes especies presentes en Guatemala y las poblaciones de las mismas, se utilizaron las proteínas salivales. Esta es la primera vez que se trabaja con perfiles electroforéticos de estas proteínas utilizados como herramienta en el análisis poblacional de *T. dimidiata* y de otras especies de Reduidos relacionadas.

Utilizando estos perfiles electroforéticos de las proteínas salivales, Barbosa y colaboradores (1999) sugieren que las poblaciones en estudio muestran diferentes grados de adaptación a los ambientes domiciliarios. De manera que es probable que dicha variación, se encuentre relacionada a los diferentes hospederos presentes en los ambientes domésticos, peri domésticos y silvestres. Dicho de otra manera según Pereira *et al.* 1996, esta variación se debe a una presión de selección que favorece la adaptación a los hospederos. Esta presión entonces, afecta de alguna manera las características de las proteínas salivales de las poblaciones y de las especies en cuanto a la concentración de las proteínas. (Pereira *et al.* 1996, Barbosa *et al.* 1999).

9.1 Relación entre Especies

Para las especies analizadas en este estudio: *T. dimidiata*, *T. nitida*, *T. pallidipennis*, *T. ryckmani*, se observa que existe una asociación cercana entre *T. nitida* y *T. ryckmani*. Unido a este grupo en otro clado, se encuentra *T. pallidipennis* y en extremo más lejano *T. dimidiata* (Grafica No. 1).

Según la agrupación tradicional, *T. nitida* pertenece al complejo *protracta*, mientras que *T. pallidipennis* y *T. dimidiata* conforman el complejo *Phyllasoma*. Siendo *T. ryckmani* la única que no posee a la fecha un grupo asignado según los criterios de Clasificación de Lent y Wygodzinsky (1979).

Según Bustamante *et al.* (2004), en un estudio de morfometría comparativa entre varias poblaciones de *T. dimidiata* y algunas especies relacionadas como lo son *T. nitida*, *T. pallidipennis* y *T. ryckmani*; se encontró una clara separación entre *T. nitida* (complejo *Protracta*) y las especies que se encuentran dentro del complejo *Phyllasoma* como lo son *T. pallidipennis* y *T. dimidiata*. Según estos resultados, *T. ryckmani* se encuentra en una posición intermedia entre los dos complejos; aunque parece presentar menores variaciones en la forma de la cabeza comparadas con individuos del complejo *Phyllasoma*. Sin embargo, según Dujardin *et al.* (2000b) *T. ryckmani* ha sido propuesta a ser incluida dentro del complejo *Phyllasoma*; ya que poseen un abdomen particularmente ancho y las numerosas similitudes que se encuentran entre ésta y las otras especies del complejo.

Como se puede observar existen dudas a cerca de si esta especie pertenece o no al complejo Phyllasoma, sin embargo la evidencia aquí obtenida en base a las proteínas presentadas, sugieren que *T. ryckmani* se encuentra en un grupo intermedio entre los complejos, aunque presenta una mayor similitud al complejo Protracta.

Esto significa que si esta asociación existe, *T. ryckmani* tendería a agruparse dentro del complejo Protracta y no al Phyllasoma; aunque claro está, que para aclarar su posición taxonómica es necesario hacer más pruebas que determinen con exactitud si las proteínas obtenidas, en efecto tienen el mismo punto isoeléctrico y la comparación de estos resultados con otras técnicas moleculares y morfológicas sensibles. Aunque vale la pena mencionar que en estudios realizados utilizando la técnica de PCR- RAPD's se dio exactamente la misma asociación. (Pineda, 2003)

Es preciso hacer notar también que esta baja cantidad de proteínas exhibidas por *T. ryckmani* cuestiona, el papel que éstas juegan dentro de la alimentación de la misma. Ya que esta ha sido encontrada en cactus secos y en bromelias en el bosque seco en la región de oriente en nuestro país. (Marroquín *et al.* 2004, Monroy *et al.* 2004) Las fuentes alimenticias en esos ecotopos, son escasos y esporádicos, bajo estas condiciones muy pocos individuos se han encontrado ingurgitados de sangre. (comm. pers, Monroy C.)

Por el contrario, especies como *T. dimidiata* que presentan un amplio contenido proteico en variedad de pesos moleculares, posiblemente denota o sugiere que ésta, se encuentra mucho mejor adaptada a una mayor diversidad de hospederos haciendo que la variación sea máxima para poder alimentarse bajo cualquier circunstancia y que efectivamente existe una presión de selección que favorece la adaptación al hospedero.

Según Barbosa *et al.* (1999) la variabilidad de las proteínas observadas en las poblaciones sugieren que dicha composición, se encuentra relacionada al hospedero del cual cada una de ellas se puede alimentar.

En cuanto al comportamiento exhibido por *T. dimidiata* como especie, vemos que existe una gran diversidad en cuanto a la composición proteica, que se encuentra desde los 9 kD hasta los 201kD. Según los perfiles de Gel idealizados¹⁰ obtenidos a partir del análisis, la mayor parte de las bandas para la especie se encuentran entre los 9 y 100 kD.

En el primer intento por caracterizar la especie mediante los patrones electroforéticos de las proteínas salivales, se utilizó un conjunto de individuos que pertenecen a los departamentos de Jutiapa y Quiché, excluyendo a los individuos de Petén y Lanquín por tratarse de poblaciones que en estudios anteriores han tendido a la separación casi completa del resto. (Landaverde, 2004, Bustamante *et al.*, 2004, Menes, 2004, Calderón *et al.* 2004).

Al analizar las poblaciones de Lanquín y Petén, como poblaciones que poseen características especiales (resultado de análisis previos utilizando morfometría y PCR-RAPD's y observaciones de campo¹¹) dentro del análisis anterior se observa una separación de Lanquín y Petén del resto de poblaciones de *T. dimidiata*; pero siempre incluidas dentro del complejo *Phyllasoma*.

¹⁰ Perfil en Anexo

¹¹ La población de Petén es de origen selvático, en su mayor parte son colectadas mediante la utilización de Trampas de luz negra dentro de la selva, lo cual sugiere que se movilizan en busca de fuentes alimenticias. En contra posición, la población de Lanquín (también silvestre) presenta poca movilidad, y sus fuentes alimenticias se ven limitadas al ecotopo al cual se encuentran: Cuevas naturales. (comm. pers, Monroy C)

Este mismo resultado se encontró en el estudio de Bustamante *et al.* 2004, (utilizando caracteres morfométricos), el cual sugiere un proceso de especiación para la población de Lanquín.

9.2 Poblaciones de *Triatoma dimidiata*:

Al considerar el estudio de las proteínas salivales se propuso el análisis de las mismas a tres niveles: Especies, poblaciones de la misma especie y el de ecotopo dentro de una región.

Algunos autores han discutido si *T. dimidiata* es o no un complejo de especies altamente diferenciado, según Schofield (2000) los datos disponibles hasta el momento de diferentes técnicas, parecen sugerir que *T. dimidiata* a lo largo de toda su distribución en Latinoamérica, podría estar constituyendo una serie de poblaciones con poco flujo genético entre ellas.

Utilizando PCR- RAPD's en los estudios de *T. dimidiata* en nuestro país, se ha obtenido que mediante la comparación de la diversidad genética de especímenes de tres localidades en el departamento de Santa Rosa, las distancias genéticas obtenidas son muy pequeñas entre casas muestreadas ($D = 0.013 - 0.022$) y entre las localidades ($D = 0.0199$). Al mismo tiempo que se obtiene un índice de fijación bajo ($F_{ST} = 0.019 \pm 0.033$) y un número de migrantes $Nm = 9.7$ a 12 entre casas y entre localidades, respectivamente.

Esto sugiere que las casas entre pueblos no constituyen poblaciones aisladas sino una población panmíctica (Dorn *et al.*, 2003).

Al comparar poblaciones de *T. dimidiata* en diferentes departamentos del país localizados en las vertientes del Atlántico y del Pacífico, se ha encontrado que no hay una asociación clara de las mismas, influenciadas por factores geográficos o por pertenecer a determinadas vertientes; por el contrario, 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).

Utilizando Morfometría en la comparación de poblaciones se obtiene que hay diferencias entre las poblaciones domésticas y silvestres, y dentro de estas últimas existe una clara separación, Petén que se agrupa con poblaciones del norte como lo son Tuxpan y Yucatán y las de Lanquín con otras de Colombia que habitan en cuevas: Boavita (Menes 2004) Con las técnicas mencionadas con anterioridad, se observó que existe una diferenciación entre las poblaciones del norte geográfico del país y de Centroamérica y aquellas que se encuentran hacia el Sur.

Utilizando las proteínas salivales se observa que existe una gran diversidad en cuanto a la cantidad de bandas obtenidas dentro de cada una de las poblaciones; diferencias que son perceptibles a simple vista. (Gráfica No. 8 en Anexo) Es muy evidente que existe una gran diferencia en cuanto a los patrones electroforéticos obtenidos, siendo la población

más diversa la de la aldea El Tule, que es la que presenta una mayor diversidad de proteínas (esto como resultado del análisis de todos los individuos) seguida de Quiché, La Perla, y Laguna Seca, etc; y siendo las aldeas de El Chile, El Bran, Los Tecomates y Zapotitlancito aquellas que presentan el menor número de bandas, todas ellas del departamento de Jutiapa. (Tabla No.3 en Anexo)

En el análisis de agrupamiento se observa la existencia de varios grupos (Gráfica No. 3), el primer clado está conformado por las poblaciones del Tule y la Perla, unida a esta se encuentran las poblaciones del Sillón, el Carrizal y el Jobo. De estas tres poblaciones existe información de estudios anteriores en RAPD's para el Carrizal, la cual al ser comparada con otras aldeas como el Tule y la Brea se comporta como un grupo completamente diferente. (Solórzano E., comm. pers.) Según Landaverde (2004) el Carrizal posee loci particulares que provocan que esta población se asocie con las poblaciones silvestres de Nicaragua y que se separe de todas las poblaciones, lo cual sugiere que la población de El Carrizal Jutiapa es una población altamente diferenciada.

El Carrizal no se comporta como un grupo diferenciado con base en la comparación de las proteínas salivales, pero su posición con respecto al Sillón y Jobo hace interesante estudiar estas dos poblaciones con el resto, utilizando otras técnicas para observar si la semejanza persiste. Unido a este Clado se encuentran las chinches silvestres de Petén y a éstas se encuentran unidas la población de Quiché (domésticas+peridomésticas). En este caso existe una asociación (por la ubicación geográfica del departamento) hacia el norte; entre Quiché y Petén; unido a estos encontramos a las poblaciones de Laguna Seca y Lanquín que se encuentran alejadas completamente del resto de las poblaciones, en la sección anterior fue abordado el tema de la posible especiación de Lanquín.

Según Bustamante (2001), en el caso de las poblaciones domésticas de *T. dimidiata* se puede concluir que los procesos evolutivos de especiación principalmente modelados por la adaptación a diferentes ambientes, han conducido a la expresión de diferentes morfologías (fenotipos) estos fenotipos pueden seguir diferentes destinos evolutivos ya que diferentes ambientes (estables - vivienda humana-, cueva o inestables selva); actúan como diferentes mecanismos evolutivos. Y de acuerdo con el término aplicado por Dujardin *et al.* (1999b) las tres diferentes poblaciones detectadas, (Petén, Alta Verapaz y domésticas) podrían estar en proceso de constituir especies ecológicas; es decir, presentan consistentes diferencias morfológicas que surgen a través de la adaptación ecológica divergente.

Es claro que hay que seguir estudiando el papel que cada una de estas poblaciones juega dentro del gran rompecabezas que supone *T. dimidiata* y en la medida que se tenga un mejor conocimiento de como éstas se comportan en el espacio y tiempo va a ser posible establecer mejores interpretaciones de los fenómenos cambiantes.

Analizando el apareamiento de bandas por región es posible notar una diferenciación de aquellas poblaciones que se encuentran al norte del país y las del sur (excluyendo Alta Verapaz), lo cual es de importancia epidemiológica ya que es en el sur donde se encuentra la zona de hiperendemia y de mayor riesgo de transmisión de la enfermedad en el país. (Gráfica 4)

Con el fin de determinar si existían diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de bandas que se encontraron dentro de las poblaciones de *Triatoma dimidiata*, se procedió a realizar un análisis de χ^2 de aquellas bandas que se encontrarán presentes en todas las poblaciones. De todas las bandas obtenidas durante el análisis un 4.91% (3/61) del total fue utilizado.

En la tabla No. 1 se presentan los valores calculados de χ^2 para cada una de las bandas analizadas. En ellos se encontró que existe diferencia significativa para las poblaciones en las tres bandas utilizadas para el análisis. Por tratarse de comparaciones múltiples entre poblaciones, estos valores de χ^2 fueron comparados con aquellos obtenidos mediante la corrección de Bonferroni; en el cual se concluye que una de las tres bandas analizadas presenta diferencia significativa.

Este hecho hace que sea un poco difícil sustentar la validez de las comparaciones realizadas dentro de las poblaciones; sin embargo, se puede decir que aunque la diferencia significativa sea solo para una banda, los resultados obtenidos pueden sustentarse de una mejor manera utilizando un mayor tamaño de muestra de cada población; utilizando las reglas se han desarrollado basadas en el nivel de confianza y no en el número de categorías dentro de la población. Según este criterio, el tamaño mínimo de muestra para hacer comparaciones múltiples con tres categorías (como lo son Especies, Poblaciones y Ecotopos) es de 510 muestras (Mosser, 2004).

9.3 Análisis de Ecotopos:

Para analizar el último nivel de asociación entre poblaciones de *T. dimidiata* se utilizó el Índice de Similitud de Dice para establecer si existe diferencias en cuanto a la composición proteica de las poblaciones, dependiendo del lugar donde fueron colectadas, ya sea dentro de la casa (domicilio) o fuera de esta (peridomicilio). Dentro de este análisis se realizó una agrupación arbitraria basada en las distancias geográficas de las localidades, de ahí que se tengan tres grupos definidos y en base a los cuales se realizó la comparación (Figura No.4 en Anexo).

De acuerdo con esos criterios, el análisis de agrupamiento (Gráfica 5) no muestra ninguna diferenciación entre los patrones electroforéticos de las chinches que provienen del ecotopo doméstico de las peridomésticas. Por el contrario se observan dos grandes grupos, y dentro de cada uno de ellos existen, tanto, individuos que pertenecen al domicilio y el peridomicilio. De igual manera aparecen las tres regiones intercaladas unas con otras.

Existen varias causas por las cuales se pueda dar este fenómeno: desde el año 2000, Guatemala al igual que muchos otros países de Centro América, inició la campaña de Control y Vigilancia de la Enfermedad de Chagas; en ella, se establecieron las pautas a seguir para erradicar en parte la transmisión de la enfermedad, mediante la reducción de los índices de infestación. La principal estrategia para controlar y/o reducir estos índices es mediante el rociamiento de las viviendas con insecticidas piretroides. Desde ese año, ha sido puesto en práctica el rociamiento de viviendas, el efecto que esto ha tenido sobre las poblaciones de vectores a sido variado; en algunos casos, efectivamente, se ha

logrado bajar significativamente la infestación domiciliar, mientras que en otros los índices han incrementado o bajado muy poco (Monroy C., comm. pers.). Como resultado de toda esta intervención masiva sobre algunos departamentos (Santa Rosa, Quiché, Jutiapa, Zacapa, Chiquimula, etc.), las poblaciones han sido puestas bajo otra fuente de presión de selección.

Si bien es cierto la aplicación del insecticida no es efectivo al 100%, existe la posibilidad que exista un flujo o movimiento del domicilio al peridomicilio durante la aplicación del insecticida; o bien lo contrario podría suceder al pasar el efecto residual del mismo a los 3 meses. De ahí que las poblaciones podrían estar en un constante movimiento por factores externos. En nuestro caso, la fumigación de localidades pudo haber influido ya que se requiere de cierto tiempo de estabilidad para que las poblaciones posean proteínas específicas para un hospedero. Lo cual hace pensar que, el que no existan diferencias a este nivel implica que no existe una alta especificidad hacia un hospedero que se encuentre dentro o fuera de la vivienda.

Este tipo de especulación debe complementarse con estudios que caractericen la ingesta de los insectos a la hora de ser colectados. O bien, la mejor solución para determinar si en realidad cambios a este nivel tan bajo pueden ser detectados es mediante el estudio de poblaciones que no hayan sido puestas bajo ningún estrés; es decir, localidades que se encuentren sin rociar y a partir de ellas iniciar la caracterización de los ecotopos. Si bien esto puede explicarse de esta manera, puede ser que la proximidad geográfica de las localidades permita un flujo genético constante, que haga que no exista diferenciación.

9.4 Comentarios acerca de la Técnica

Existen un sin número de técnicas disponibles hoy en día que hacen del análisis de proteínas una de las herramientas más útiles, fáciles y rápidas de ejecutar, sin embargo, este trabajo se limitó únicamente a explorar los patrones electroforéticos obtenidos a partir de la simple desnaturalización de las proteínas salivales. Es importante mencionar que los patrones electroforéticos obtenidos se ven afectados por un sin número de condiciones dentro de las cuales se puede mencionar: la concentración, la cantidad variable de muestra que se puede obtener de un individuo, variabilidad en los voltajes utilizados y el tiempo de ayuno.

De éstas sin duda la que mayor atención requiere es la cuantificación de la concentración de proteína que se carga en cada corrida. Este paso simple puede mejorar significativamente la reproducibilidad de la técnica y la mejor apreciación de las bandas durante el teñido. (Pereira M., comm. pers.)

Según Williams *et al.* (1999) el utilizar una doble tinción simultánea; es decir, teñir un gel con azul de Coomassie y otro con tinción de plata, puede revelar de una mejor manera la existencia de proteínas, que de otra manera no hubieran sido reportadas. Al mismo tiempo que también recomienda la utilización de la electroforesis en dos dimensiones con el mismo fin. Asimismo Hallinan (2005) en un estudio con saliva de las paratiroides humanas en geles de poliacrilamida, reporta que el método de tinción con plata resulta ser hasta 100 veces más sensible que la tinción de azul de Coomassie.

La Utilización de escanogramas para el análisis de bandas es un método relativamente fácil de utilizar si se tiene el equipo necesario para el secado de geles, como parte de las pruebas realizadas durante la fase de estandarización de protocolos, se observó que se obtenían mejores imágenes de los geles cuando éstos se encontraban secos; ya que evitaba en gran medida la filtración de burbujas y la apariencia acuosa remanente. Según Fisher *et al.* (1997) durante la evaluación del desempeño del sistema de software y escáner ofrecido por Hewlett Packard® (HP) para la cuantificación de proteínas teñidas con azul de Coomassie, después de corridas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se concluyó que utilizando éste (HP- ScanJet Plus Scanner) es posible obtener patrones reproducibles y precisos a la hora de realizar una densitometría cuantitativa. Este procedimiento fue replicado por nosotros utilizando también un equipo y software similar, obteniendo una definición de imagen considerablemente buena.

9.5 Determinación de Bandas Marcadoras

Como se mencionó anteriormente, puede mejorarse la caracterización de las proteínas salivales; sin embargo, el trabajo apunta a que existen algunas proteínas que pueden ser sugeridas como marcadores; principalmente a nivel de Especie, siendo éstos: Para *T. dimidiata* (excluyendo Lanquín, Quiché y Petén) las bandas con pesos moleculares de: 88.5, 19 y 18 kD; para *T. pallidipennis* las bandas con peso molecular de: 38, 33 y 27 kD, para *T. nitida*: 37 y 24 kD; y para *T. ryckmani*: 36 y 20kD. Estas bandas fueron seleccionadas de un total de 61, el criterio de selección básico es que aparezcan al menos en un 35% y que no se repitan entre especies. (Tabla No. 4 en Anexo)

9.6 Implicaciones para el Control

Los triatominos fueron originalmente poblaciones silvestres, pero por diferentes causas, algunas especies han ido acomodándose gradualmente a la vivienda humana. Las modificaciones del medio ambiente causadas por el hombre han originado la desaparición de dichos focos, lo cual ha acelerado la domiciliación de algunas especies de triatominos (OMS 2002)

Las condiciones de las viviendas en general (dentro y fuera de ésta) son factores importantes que pueden determinar la colonización. Los hábitats domiciliarios y peridomiciliarios, pasan a ser ideales ya que pueden crear microhábitats favorables y brindar protección contra depredadores. (OMS 2002)

La principal repercusión de dicha invasión es el aumento del riesgo de transmisión de *T. cruzi* a los seres humanos. En la actualidad algunas técnicas moleculares y morfométricas pueden ayudar a encontrar los principales cambios genéticos y fenotípicos relacionados con esta invasión. Dichas técnicas han demostrado que este proceso suele asociarse a migraciones importantes; al mismo tiempo se produce una reducción de la variabilidad genética y una creciente inestabilidad en el desarrollo; es por esta razón que el insecto se vuelve más eficiente como vector, pero también es vulnerable a las medidas de control. (OMS 2002)

Debido a que sólo algunos genotipos silvestres son capaces de producir poblaciones domésticas duraderas, se supone que durante las primeras fases de este proceso, se produce cierta restricción en cuanto a la variabilidad genética y la dispersión del insecto depende de su huésped y puede aumentar el transporte pasivo. (OMS 2002)

En este trabajo se pudo observar que existe una gran variabilidad en cuanto a la composición de las proteínas salivales, que permiten diferenciar aceptablemente al nivel de especies y de poblaciones de una misma especie. Sin embargo, a nivel de ecotopo esta diferenciación no es evidente o bien los resultados no sugieren que exista una clara correlación entre las proteínas y el ambiente que ocupan.

Esto no significa que las diferencias entre ecotopos descritas por Barbosa *et al.* (1999 y 2004) para otra especie (*Panstrongilus megistus*), no existan como tal, sino que tendería a pensarse que un análisis más profundo de otras poblaciones es requerido, en particular se necesita aumentar el tamaño de muestra y el análisis de poblaciones dentro de otras regiones en las cuales podrían encontrarse diferencias en cuanto a los patrones electroforéticos a este nivel.

Para fines de control, el análisis de la procedencia de colecta (ecotopo) es importante debido a que el, problema más serio al cual nos enfrentamos en estos momentos es la re-infestación de las viviendas. Este hecho deja la incógnita de si ¿es posible caracterizar eficientemente una población completamente doméstica y/o peridoméstica mediante esta técnica?

El grupo de poblaciones silvestres (Petén y Lanquín) aparentemente no forman parte del grupo de poblaciones de *T. dimidiata*, sin embargo la comparación de éstas con otras da una idea de cómo se comportan y si se encuentran o no relacionadas con movimientos dispersivos de re-infestación, esto para el caso de Petén.

Como se mencionó con anterioridad, este es el primer esfuerzo por caracterizar a las poblaciones de *T. dimidiata* y algunas especies relacionadas, por lo cual se trabajó un enfoque integrado tratando de establecer comparaciones de los resultados obtenidos con aquellos obtenidos por otras técnicas.

10. CONCLUSIONES

- a) El análisis de las proteínas salivales exhiben una gran variabilidad, pues se encuentran desde los 9 kD hasta los 201 kD.
- b) Para *T. dimidiata* existe una mayor cantidad de bandas que se encuentran localizadas entre los pesos moleculares de 9 -100 kD.
- c) En cuanto al análisis de especies realizados; se puede concluir que se observa una cercana relación entre *T. nitida* y *T. ryckmani*. Este grupo se encuentra considerablemente separado de *T. pallidipennis* y en un clado más alejado *T. dimidiata*, lo cual hace que se cuestione una vez más la posición taxonómica de *T. ryckmani* con relación a los complejos *Phyllasoma* y *Protracta*. Según las observaciones realizadas aparentemente pertenece al grupo *protracta*.
- d) Del análisis poblacional de *T. dimidiata* se puede decir que existe una marcada tendencia a agrupar las poblaciones de Petén y Quiché a poblaciones domésticas como lo son las del Carrizal, Jobo y Sillón y por encima de ellos el Tule y la Perla (Jutiapa). Separando completamente a las poblaciones de Laguna Seca y Lanquín. Esta marcada separación de éstas poblaciones del resto hace pensar en la posibilidad de un proceso de especiación, ya expuesto por algunos autores (Bustamante *et al.* 2004, Calderón *et al.* 2004, Monroy *et al.* 2003). Para el caso de Laguna Seca esta es la primera vez que se trabaja por lo que hace falta describir el ambiente en el cual fueron colectadas.
- e) Del total de bandas analizadas un 4.91% fue utilizado para el análisis de significancia de los patrones electroforéticos de las bandas obtenidas. De estas todas presentaron valores de p significativos para las poblaciones de *T. dimidiata*; sin embargo, al realizar la corrección de Bonferroni solo una de tres de estas, resultó ser significativo. Por lo que a fin de sustentar más este análisis debe de aumentarse el tamaño de la muestra para cada uno de los casos.

f) De acuerdo con los patrones electroforéticos observados es evidente de que no existe una clara diferenciación entre los patrones exhibidos en el domicilio y el peridomicilio. Y que la caracterización de estos ambientes utilizando esta técnica están sujetos a mejoras en el tamaño de muestra.

g) Los resultados obtenidos sugieren como marcadores moleculares principalmente a nivel de Especie las siguientes: para *T. dimidiata* (excluyendo las poblaciones de Lanquín, Quiché y Petén) las bandas con pesos moleculares de: 88.5, 19 y 18kD; para *T. pallidipennis* las bandas con peso molecular de: 38, 33 y 27 kD, para *T. nitida*: 37 y 24 kD; y para *T. ryckmani*: 36 y 20kD.

11. RECOMENDACIONES

- a) Hacer estudios con otras poblaciones de *T. dimidiata* que se encuentren libres de estrés de campañas de rociamiento, con el fin de clarificar si existen diferencias en cuanto al patrón proteico entre los ecotopos domésticos y peridomésticos.
- b) Aumentar el tamaño de muestra utilizado en cada uno de los análisis, por lo menos, a 30 individuos por población y al nivel de especie, al menos 10 individuos.
- c) Efectuar estudios con otros marcadores fenéticos y moleculares que sirvan para aclarar más la posición taxonómica de algunas poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Petén y Lanquín) y de algunas especies como *T. ryckmani*.
- d) Estudiar a profundidad las causas de la posible diferenciación proteica de las diferentes poblaciones basado en un estudio de preferencia alimentaria (precipitinas) de cada insecto colectado.
- e) Determinar mediante la utilización de SDS- PAGE de segunda dimensión, si las proteínas sugeridas como posibles marcadores moleculares son diferentes de acuerdo en al Punto Isoeléctrico.
- f) Definir la concentración promedio de proteínas para cada especie; y dentro de *T. dimidiata*, calcular el promedio de aquellas poblaciones que aparentemente se encuentran inmersas dentro de un proceso de divergencia.
- g) Utilizar juegos de tinción dobles (azul de Coomasie + tinción de plata) para el análisis de cada gel y la detección de nuevas proteínas que no hayan sido consideradas en este trabajo.

12. REFERENCIAS

Anderson J.M., JE. Lai, EM. Dotson, C. Cordon, C. Ponce, DE. Norris, y CB. Beard. 2002. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. Infection, Genetics and Evolution. 1:243-248.

Barbosa, SE., L. Diotaiuti, RPP. Soares y MH. Pereira. 1999. Differences in saliva composition among three brazilian populations of *Panstrongilus megistus* (Hemiptera, Reduviidae). Acta Tropica. 72: 91-98.

Barbosa, SE., L. Diotaiuti., EM. Braga y MH Pereira. 2004. Variability of the salivary proteins of 20 brazilian populations of *Panstrongilus megistus*. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Acta Tropica 92: 25-33.

Bustamante, DM. 2001. "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". Informe final de Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 117pp.

Bustamante, DM., C. Monroy., M. Menes., A. Rodas., PM., Salazar- Schettino., G. Rojas., N. Pinto., F. Ghuil y JP. Dujardin. 2004. Metric variation among geographic populations of the Chagas Vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. J. Med. Entomol. 41(3): 296-301.

Calderón Fernández, G., MP. Juárez., MC. Monroy., M. Menes., DM. Bustamante y S. Mijailovsky. 2005. Intraespecific variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Guatemala based on Chemical and morphometric analyses. J. Med. Entomol. 42(1): 29-35.

Calderón, C., P. Dorn., S. Melgar., JJ. Chávez., A. Rodas., R. Rosales y C. Monroy. 2004. A preliminary Assessment of Genetic Differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. J. Med. Entomol. 41(5):882-887

Carvalho, R., J. Jurberg, H. Lent., F. Noireau., y C. Gaivao. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for Taxonomic Arrangements. Entomología y Vectores. Río de Janeiro. (1):1-99.

Cordón, C. 2000. Genetic markers in domestic and sylvatic populations of *Triatoma dimidiata*. WHO, Second Expert Committee on the Control of Chagas Disease, Brasilia.

Daniel, WW. 1999. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Uthea Noriega- Editores. México.

Dhar. R y N. Kumar. 2003. Role of mosquito salivary glands. Current Science. 85(9): 1308-1313.

Dorn, PL., S. Melgar., V. Rouzier., A. Gutierrez., C. Combe., R. Rosales., A. Rodas., S. Kott., D. Salvia., y MC. Monroy. 2003. The Chagas Vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. J. Med. Entomol. 40(4):436-440

Dujardin, JP., F. Panzera y CJ. Schofield. 1999. Triatomine as a model of morphological plasticity under ecological pressure. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 (Supl. I) 223-228.

Dujardin, JP., F. Panzera y CJ Schofield. 2000a. Triatominae as models for understanding basic evolutionary processes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95(Supl.II): 32-33.

Dujardin, JP., CJ Schofield y F. Panzera . 2000b. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences D`Outre-Mer, Belgique, Brussels, Belgaum. 162pp.

Fisher, JT., SG. Vincent., PR. Cunningham., NL. Stephens y AJ Halakayko. 1997. Quantitative densitometry of proteins stained with coomasie blue using Hewlett Packard scan jet scanner and scan plot software. Electrophoresis. 18(1): 67-71.

Golodne, DM., RQ. Monteiro., AV. Graca Souza., AC. Silva Neto y GC. Atella.. 2003. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Journal of Biological Chemistry. 278(30): 27766-27771.

Hallinan, FM. 1983. Studies of silver staining of human parotid saliva protein polyacrylamide gel electrophoretograms. Electrophoresis 4(4): 265-269.

Harris, HD., JM Ramsey., R. Ordóñez., C. Cordón, PM. Salazar., FA. Monteiro., E. Dotson., CB. Beard. Evidence of a Species Complex in the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*. Am. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002. Submitted.

Hayes, RJ. y CJ. Schofield. 1990. Estimación de las tasas de incidencia de infecciones y parasitosis crónicas a partir de la prevalencia: la enfermedad de Chagas en América Latina. Bol. OPS 108: 308-316.

Hubbard, BD. y E. Lazarides. 1979. Copurification of actin and desmin from chicken smooth muscle and their copolymerization in vitro to intermediate filaments. J. Cell Biology. 80: 166-182.

García, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrílida: fundamentos actualidad e importancia. Universo diagnóstico. 1(2): 31-43.

Landaverde, P. 2004. "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)" Tesis de Graduación. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 108pp.

Lent, H, y P. Wygodzinsky 1979. Revision of *Triatominae* (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 163: 123-520.

Marcilla, A., MD. BARGUES., J. Ramsey., E. Magallón- Gastelum., PM. Salazar-Schettino., F. Abad- Franch., JP Dujardin., CJ. Schofield., y S. Mas-Coma. 2001 The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. Molecular phylogenetics and evolution. 18(1): 136-142.

Marroquín, L. 2002. Estadísticas sobre la enfermedad de Chagas. Taller de métodos de investigación epidemiológica –OMS-. Antigua Guatemala.

Menes, M. 2004. Diferencias métricas entre poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) de México, Centroamérica y Colombia, efecto de la procedencia y el ecotopo. Tesis de Graduación. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 115pp.

Marroquín R., S. Bor., C. Monroy. 2004. A mass collection of *Triatoma ryckmani* (Hemiptera: Reduviidae) from *Stenocereus eichlamii* (Cactaceae) in the semiarid region of Guatemala. Rev. Biol. Trop. 52(4): 931-936.

Monroy, C. 1992. Vectores de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Enfermedades Tropicales en Guatemala. Informe Anual No.1 del Proyecto de Cooperación Guatemala-Japón para la Investigación de Enfermedades Tropicales. JICA. Guatemala. Págs. 1-8.

Monroy, MC. 2003b. Ecology and Control of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) Vectors of Chagas disease in Guatemala, Central America. University of Uppsala. Suecia. 22pp.

Monroy, C. R. Marroquín., A. Rodas, R. Rosales y T. Jaenson. 2004. Dispersion and colonization of *Triatoma ryckmani* (Hemiptera: Reduviidae) in a artificial environment in a semi- arid region of a Chagas disease endemic Area in Guatemala. Acta Tropica 9(2): 145-151.

Mora, M., A. Herrera y O. León. Análisis electroforético de las secreciones adhesivas de onicóforos del género *Epiperipatus* (*Onychóphora: Peripatidae*) en publicación.

Moser, B. 2004. Fundamental sampling techniques. Summer 2004 edition. Louisiana State University. Baton Rouge. 229pp.

Nakagawa, J., J. Juárez y J. Marroquín. 2003. Evaluation report of the Chagas disease control project in Guatemala, Ministry of Health Guatemala. Guatemala. 15 pp.

OMS. 2002. Control de la Enfermedad de Chagas. Serie de Informes Técnicos 905. Organización Mundial de la Salud. Ginebra. 117pp.

OMS. 1991. Control de la Enfermedad de Chagas. Serie de Informes técnicos 811. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. 102pp.

OPS. 2000. Segunda reunión de la Comisión intergubernamental de la iniciativa de Centroamérica y Belice para la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas por *Rhodnius prolixus*, disminución de la infestación domiciliar por *Triatoma dimidiata*, y la eliminación transmisión transfusional del *Trypanosoma cruzi*. OPS/HCP/HCT/164/00. Organización Panamericana de la Salud. Washington DC. 8pp.

Pereira, MH., MEL. Souza, AP. Vargas, MS. Martins, CM. Penido y L. Diotauiti. 1996. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/Triatominae). *Acta Tropica*, 61: 255-261.

Pineda, SS. 2003. Diferenciación de 4 especies de Tritominos: *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nítida*, *Triatoma ryckmani* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae), utilizando la técnica de PCR- RAPD's. Informe Final de Experiencias Docentes con la Comunidad –EDC-. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 60pp.

Pinto, JCD. 1991. Chagas disease control in Brazil: which strategy after the attack phase? *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 71 (supl1): 75-86.

Ponce, C. 1999. Elimination of the vectorial transmission of Chagas disease in Central American countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(Suppl.1): 417-418.

Ribeiro, JMC. y ES. García.1981.The role of Saliva in feeding in *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 94: 219-230.

Rodas, A. y S. Pineda. 2004. Estandarización del protocolo de extracción y corrida de geles para proteínas salivales de *Triatoma dimidiata* utilizando la técnica de SDS-Page. Informe Final de Investigación: Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas –IIQB-. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 28pp.

Schofield, CJ. 1994. *Triatominae, Biología y Control.* Eurocommunica Publications. Inglaterra. 80pp.

Schofield, CJ. JP. Dujardin., J. Jurbeg. (editores) 1996. Proceedings of the internacional workshop on population genetics and control of Triatominae. Santiago de los Colorados, Ecuador. INDRE, México. 116pp.

Schofield, C., JP. Dujardain., J. Moreno y F. Guhl. 1997. Memorias, Curso de Postgrado Genética Poblacional de Triatomíneos Aplicada al Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas. Corcas editores, Bogotá Colombia. 89pp

Schofield, CJ y C. Ponce. (editores) 1999. Proceedings of the Second International Workshop on population genetics and control of Triatominae. Tegucigalpa, Honduras. INDRE, México. 130pp.

Schofield, CJ. 2000. Challenges of Chagas Disease Vector Control in Central America. WHO/CDC/WHOPES/GCDPP/2000.1. 36pp.

Soares, RPP., NF. Gontijo, AJ. Romanha, L. Diotauti y MH. Pereira. 1998. Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Acta Tropica. 71: 285 – 291.

Tabaru, Y., C. Monroy, A. Rodas, M. Mejía y R. Rosales. 1999. The Geographical distribution of vectors of Chagas disease and populations at risk of infection in Guatemala. Med. Entomol. Zool., 50(1): 9-17.

Tercero C. 1992. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. En K. Ogata (editor) Informe anual No. 1 (GJET – 1) del Proyecto de Cooperación Guatemala Japón para la Investigación de Enfermedades Tropicales. JICA. Guatemala, 128pp.

Universidad Simón Bolívar. Primer encuentro Internacional sobre la Enfermedad de Chagas en México. Facultad de Medicina UNAM. 1999. 158pp.

Williams, KM., J. Ekström y T. Marshall. 1999. High resolution electrophoretic analysis of rat parotid salivary proteins. Electrophoresis. 20(7): 1373-1381.

WHO. 1999. Chagas disease, Chile – Interruption of transmission. World Health Organization, Weekly Epidemiological Record. 74: 9-11.

Zeledón, R. y JE. Rabinovich. 1981. Chagas disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annual Review of Entomology*, 26: 101-133.

Zeledón, R., VM. Guardia., A. Zúñiga y JC Swatzwelder. 1970. Biology and Ethology of *Triatoma dimidiata* (Laterille, 1811). *J. of Med. Entomol.* 7(3): 313-319.

Comunicación personal:

Ph. D. Maria Carlota Monroy. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ph. D. Marcos Horacio Pereira. Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil.

Br. Elizabeth Solórzano. Escuela de Biología, Universidad de San Carlos de Guatemala.

13. ANEXOS

***Triatoma dimidiata* (Latreille 1811):**

Se encuentra entre los vectores más importantes, los cuales son muy domésticos, construyen grandes colonias en casas y son muy susceptibles a la infección con *T. cruzi* siendo el modo de transmisión del parásito el defecar sobre el receptor durante o poco después de alimentarse.

Esta es una especie que junto a *Rhodnius prolixus* es considerado uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala. *T. dimidiata* se encuentra adaptada a la vivienda humana y constituye en muchos hogares un porcentaje muy alto de los insectos colectados en los mismos, además de asociaciones entre esta especie y los humanos; es capaz de encontrarse en diversidad de nidos de animales silvestres como el tepezcuintle, armadillo, en gallineros, palmeras y en algunas aves migratorias, las cuales muy probablemente ayudan a aumentar los rangos de distribución de esta especie.

Se encuentra distribuida principalmente en Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Panamá, Ecuador, Las Guyanas, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, El Salvador, Venezuela y Surinam. (Lent, 1979)

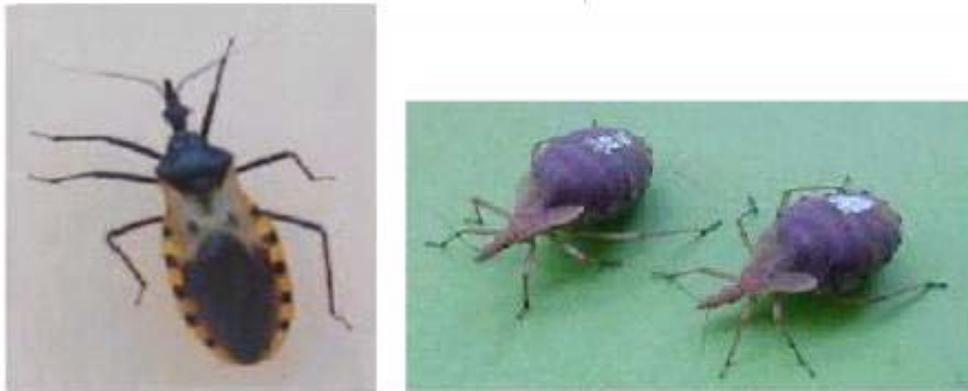


Figura 2: Macho de *T. dimidiata*. Figura 2: Ninfas del 5 estadio de Lanquín.

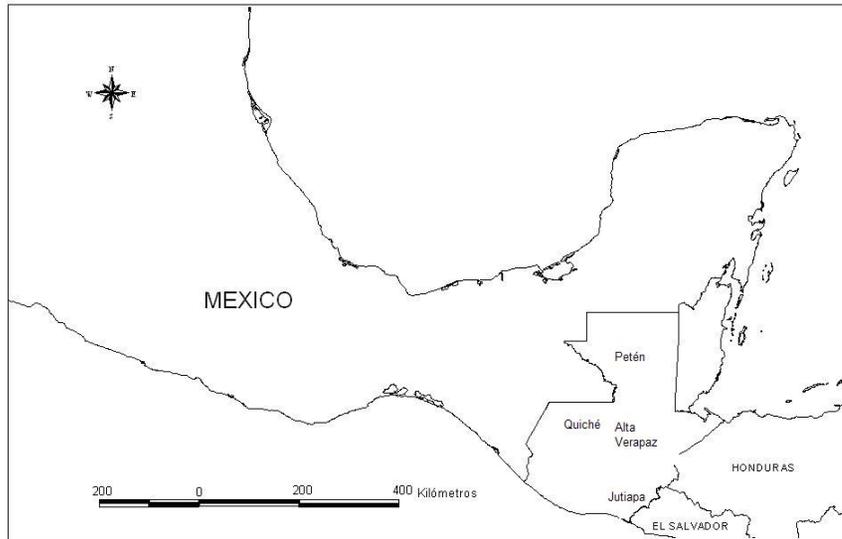


Figura No. 3 Mapa de las regiones de Petén, Quiché, Alta Verapaz y Jutiapa

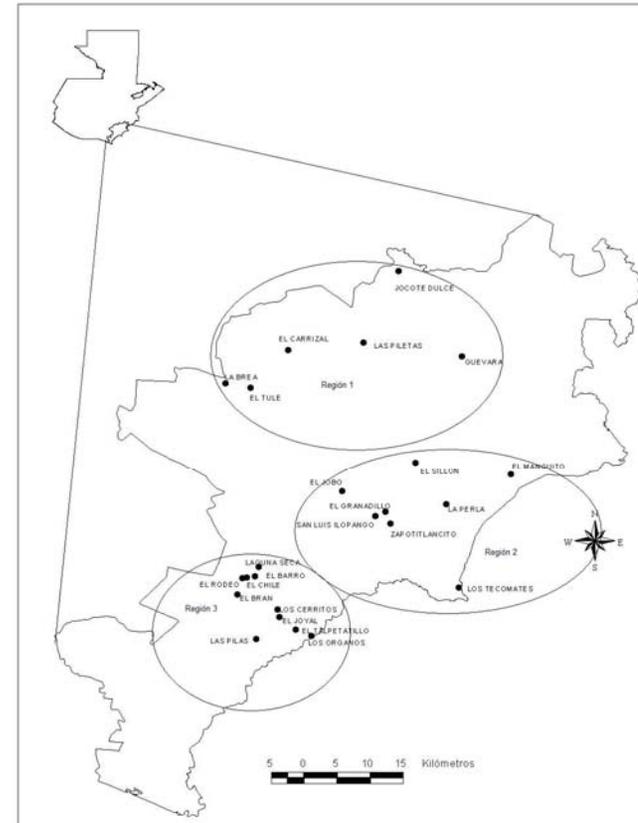


Figura No. 4
Mapa de las tres regiones de Jutiapa utilizadas para el análisis de Ecotopo.

1. Colocar el plato corto por encima del plato espaciador.

2. Se deslizan los dos platos por encima del marco o "Casting frame", colocando el plato corto hacia delante, y con cuidado de tener el marco y los vidrios en una superficie recta.

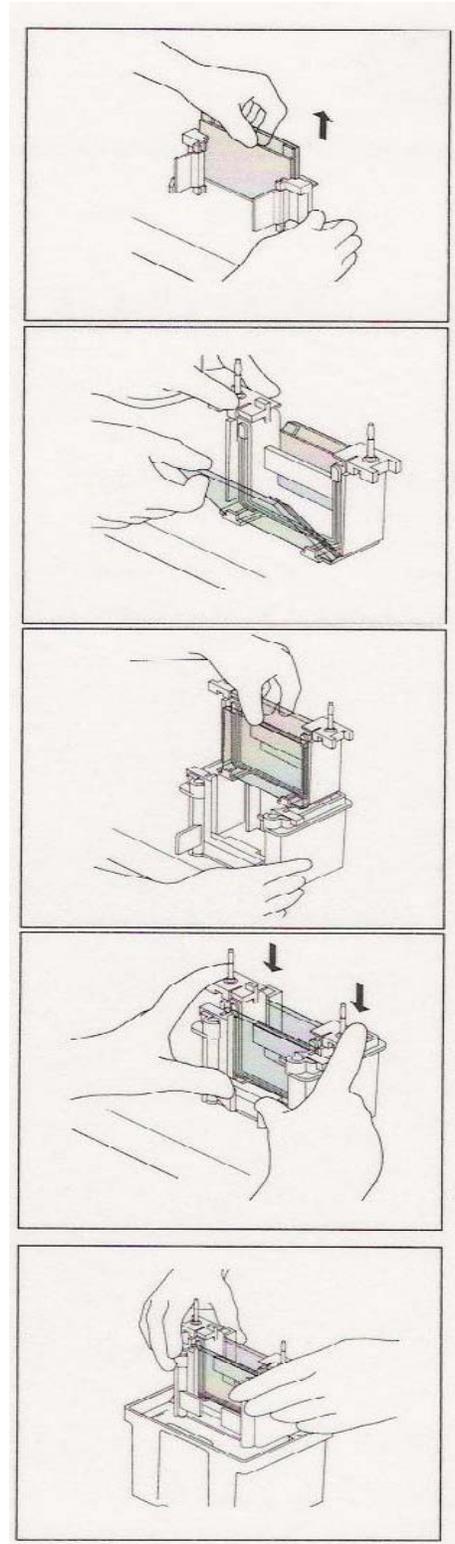
3. Colocados los platos en el marco se presionan las abrazaderas, a manera de asegurar los platos.

4. Al terminar de asegurar los platos en el marco, estos se colocan en sobre una esponja que se encuentra en la parte inferior y se sujeta en la parte superior con un gancho. Posteriormente se llena con las soluciones que darán origen al gel.

5. Cuando la solución este completamente seca, los platos se retiran del marco.

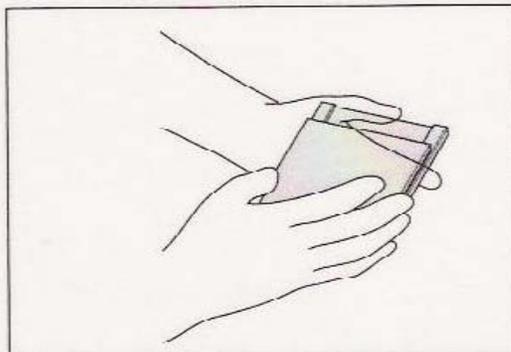
6. Posteriormente cada juego de platos; se ensambla en el electrodo; con cuidado de dejar hacia adentro el plato corto.

Figura No. 5¹Elaboración de geles: Colocación de platos en el marco o "Casting frame".

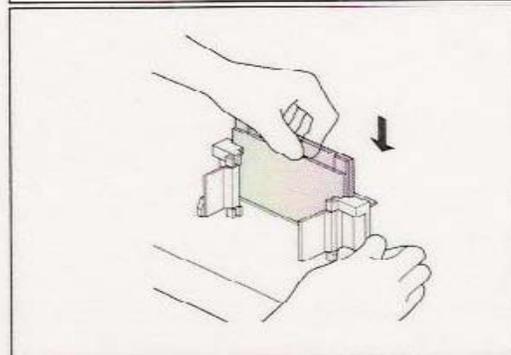


¹ Fuente: Mini Protean® 3 Cell. Instruction Manual. Biorad

7. Cuando se tienen los dos juegos de platos colocados ensamblados, el electrodo se coloca dentro de otro marco donde quedara sujeto.



8. Al terminar de colocar el electrodo este se asegura con dos agarraderas de plástico dispuestas en la parte inferior del mini tanque.



9. Finalmente se coloca el mini tanque y se coloca en el tanque de la cámara electroforética.

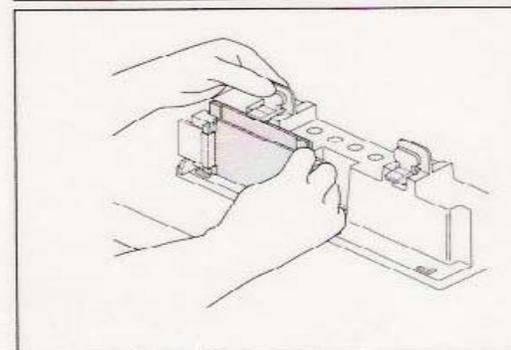
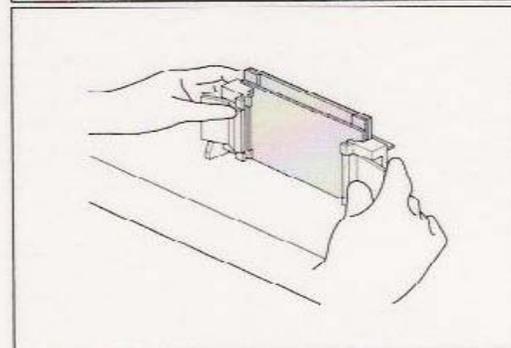
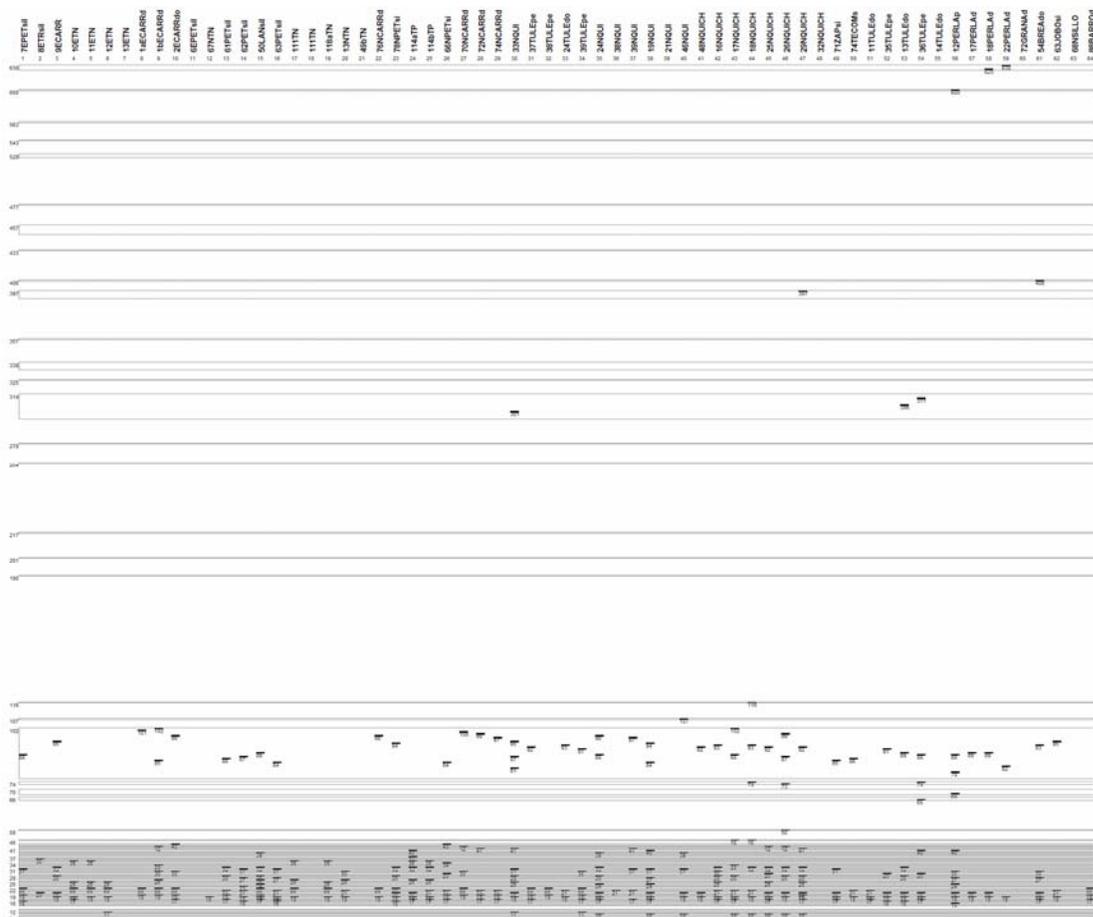


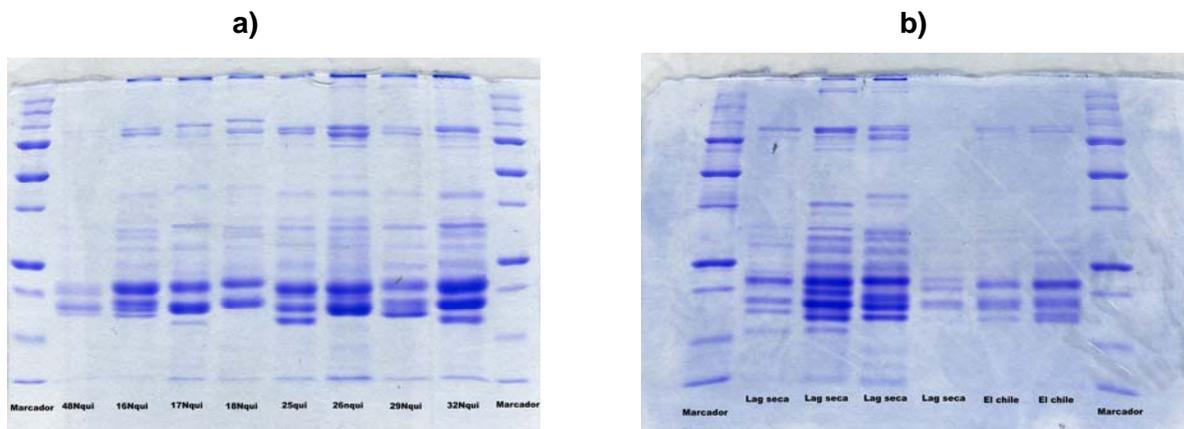
Tabla No. 3 Número de banda y su peso molecular calculado. En esta tabla se muestra cada una de las bandas (1-61) y su peso molecular aproximado calculado a partir del análisis de bandas generado en el programa Database Manager® del Gene profiler®.

MW en kD	Banda
>250kD	1 al 17
201	18
190	19
116	20
107	21
88.9	22
73.8	23
68.6	24
65.5	25
50	26
45	27
43	28
42	29
41	30
40	31
39	32
38	33
37	34
36	35
35	36
34	37
33	38
32	39

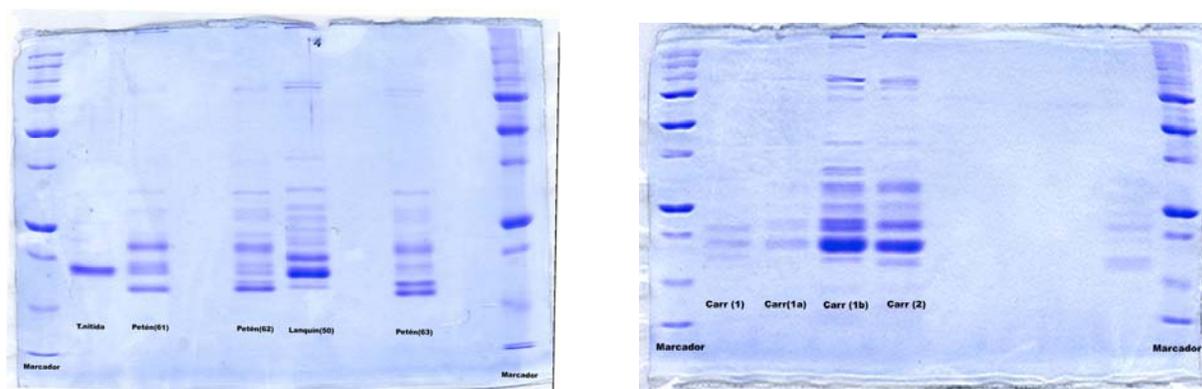
MW en kD	Banda
31	40
30	41
29	42
28	43
27	44
26	45
25	46
24	47
23	48
22	49
21	50
20	51
19	52
18	53
17	54
16	55
15	56
14	57
12	58
11	59
10	60
9	61



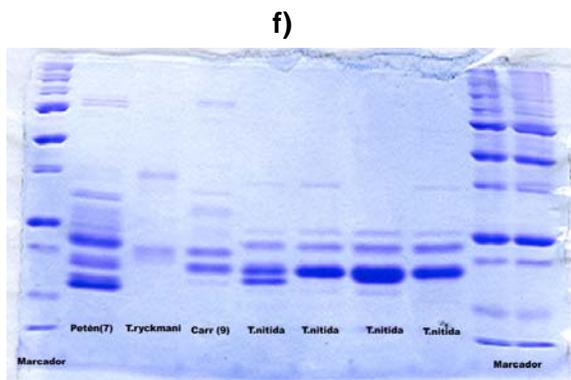
Gráfica No. 7 Perfil Idealizado de las bandas obtenidas mediante el análisis de presencia ausencia (de bandas) para *T. dimidiata* y algunas especies de Reduviduos relacionadas.



Perfiles electroforéticos de la población de a) Quiche Carril (1-10) y b) Jutiapa



Perfiles electroforéticos de las poblaciones de: c) Petén, Lanquín (Carril 2 y 4) y d) Carrizal (carril 1-4)



Patrones electroforéticos de la especie *T. nitida* (carril 5-8) y *T. ryckmani* (Carril 3)

Gráfica No. 8 Algunas muestras de geles de las diferentes poblaciones estudiadas.

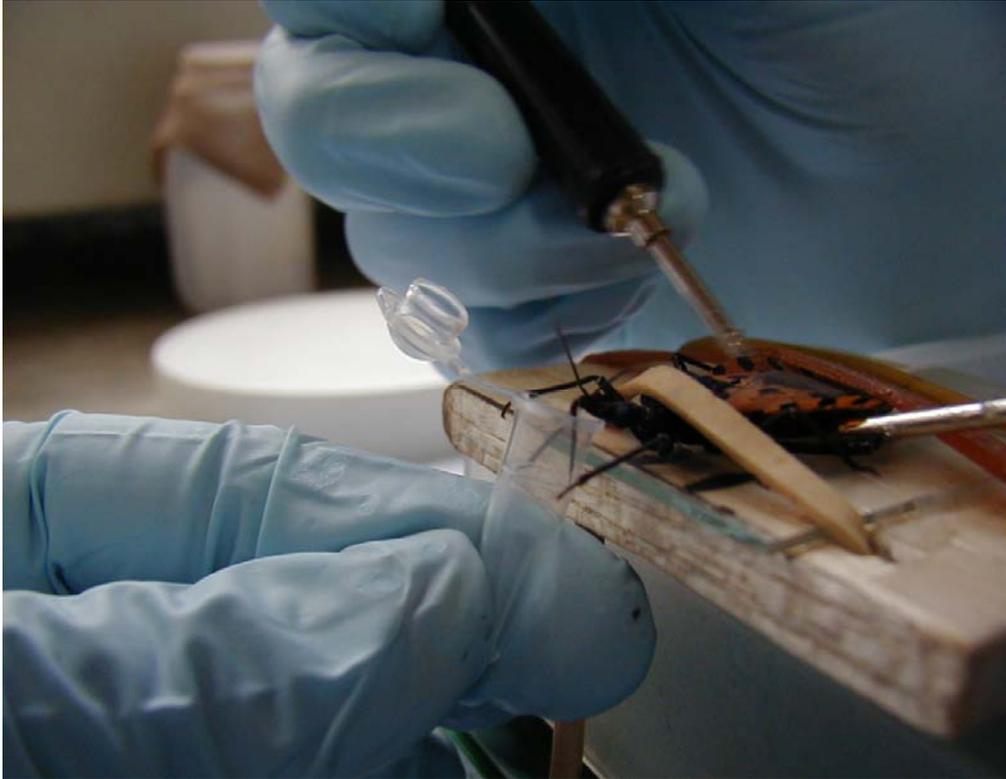


Figura No. 7 Estimulación de la región Latero-ventral del Insecto por medio de electrodos.

