

INDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCION	7
3. ANTECEDENTES	10
3.1. Descripción de la enfermedad de Chagas	10
<i>3.1.1. Definición de la enfermedad</i>	10
<i>3.1.2. Situación nacional</i>	11
3.2. Subfamilia Triatominae, Historia Natural	12
3.3. <i>Triatoma dimidiata</i>	14
<i>3.3.1. Clasificación Taxonómica de <i>Triatoma dimidiata</i></i>	14
<i>3.3.2. Sinonimia de <i>Triatoma dimidiata</i></i>	14
<i>3.3.3. Características</i>	14
<i>3.3.4. Distribución</i>	15
<i>3.3.5. Biología de <i>Triatoma dimidiata</i></i>	15
<i>3.3.5.1. Capacidad vectorial</i>	15
<i>3.3.5.2. Ecotopos de <i>Triatoma dimidiata</i></i>	15
3.4. Control Vectorial	16
3.5. Descripción de lugares de Estudio	17
3.5.1. Guatemala	17
<i>3.5.1.1. Los Amates, Izabal</i>	18
<i>3.5.1.2. La Brea</i>	18
<i>3.5.1.3. San Andrés Sajcabajá</i>	18
<i>3.5.1.4. San Luís</i>	18

3.5.1.5. <i>Yaxja</i>	18
3.5.2. Honduras	19
3.5.2.1. <i>Intibucá</i>	19
3.5.2.2. <i>Copán</i>	19
3.5.3. El Salvador	20
3.5.3.1. <i>Santa Ana</i>	20
3.5.4. Nicaragua	20
3.5.4.1. <i>El Almendro, Río San Juan</i>	21
3.5.5. Costa Rica	21
3.5.5.1. <i>Heredia</i>	21
3.5.6. Panamá	21
3.5.6.1. <i>Santa Fé, Veraguas</i>	22
3.6. Estudios con Marcadores Moleculares como herramientas para el Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas	22
3.6.1. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	23
3.6.2. <i>Secuenciación de ADN</i>	24
3.7. ADN ribosomal (Segundo Espaciador Interno Transcrito – ITS2-) como Marcador Molecular para el estudio Genético de las variaciones de <i>Triatoma dimidiata</i>	24
3.7.1. <i>Ventajas de la utilización del ITS-2 frente a RAPD'S y Técnicas Fenotípicas en el Estudio de <i>Triatoma dimidiata</i></i>	26
3.8. Análisis Filogeográficos	27
3.8.1. <i>Parámetros Evolutivos de Kimura</i>	27
3.8.2. <i>Estimadores e Índices de Diversidad Genética</i>	28
3.8.2.1. <i>Análisis de Haplotipos</i>	28
3.8.2.2. <i>Diversidad Nucleotídica Pi</i>	29
3.8.3. <i>Análisis de Flujo Genético</i>	29

3.8.3.1. Estadísticos de Secuencia.....	30
4. JUSTIFICACIÓN.....	33
5. OBJETIVOS.....	35
5.1. General.....	35
5.2. Específicos.....	35
6. HIPÓTESIS.....	36
7. MATERIALES Y METODOS.....	37
7.1. Universo.....	37
7.1.1. Población.....	37
7.2. Muestra.....	37
7.2.1. Descripción de la muestra.....	37
7.2.2. Selección de la muestra.....	38
7.3. Recursos Humanos e Institucionales.....	39
7.4. Recursos Materiales.....	39
7.5. Instrumentos para registro y medición de las observaciones.....	40
7.6. Métodos.....	41
7.6.1. Aislamiento de ADN.....	42
7.6.2. Amplificación de ADN.....	43
7.6.2.1. Preparación de Mezcla Maestra	44
7.6.2.2. Ciclos de temperatura de Amplificación.....	45
7.6.3. Montaje y Corrimiento de Geles.....	45
7.6.3.1. Preparación de los Geles.....	45
7.6.3.2. Montaje de Geles.....	45
7.6.4. Lectura y Fotografiado de Geles.....	46

7.6.5. Purificación de Productos de PCR.....	46
7.6.6. Secuenciación de ADN.....	47
7.7. Análisis.....	48
7.7.1. Edición, Análisis y Obtención de Secuencias Consenso.....	48
7.7.2. Análisis Filo geográficos.....	49
7.7.2.1. Mapa de distribución de Grupos Filogeográficos.....	50
7.7.3. Genética de Poblaciones.....	50
7.7.3.1. Análisis de Genética de Poblaciones sin Asignación de Grupos.....	50
7.7.3.1.1. Análisis de Haplotipos.....	50
7.7.3.1.2. Distancia Genética.....	50
7.7.3.1.3. Estimadores e Índices de Diversidad Genética.....	50
7.7.3.1.3.1. Análisis de Polimorfismo.....	51
7.7.3.2. Análisis de Genética de Poblaciones por Sitio de Muestreo.....	51
7.7.3.2.1. Análisis de Flujo Genético.....	52
7.7.3.2.2. Análisis por pares de poblaciones (por sitio de muestreo).....	52
7.7.4. Análisis de Genética de Poblaciones por grupos Filogeográficos.....	53
7.7.4.1. Análisis por Pares (por Grupos Filogeográficos).....	54
8. RESULTADOS.....	55
8.1. Obtención y Alineación de Secuencias.....	55
8.1.1. Alineación de Secuencias.....	56
8.2. Análisis Filogeográficos.....	56
8.2.1. Mapa de Distribución de Grupos Filogeográficos.....	59
8.3. Genética de Poblaciones.....	60
8.3.1. Análisis de Genética de Poblaciones sin Asignación de Grupos.....	60

8.3.1.1. <i>Análisis de Haplotipos</i>	60
8.3.1.2. <i>Distancia Genética</i>	61
8.3.1.3. <i>Estimadores e Índices de Diversidad Genética</i>	64
8.3.1.3.1. <i>Análisis de Polimorfismo de ADN</i>	64
8.4.2. <i>Análisis de Genética de Poblaciones por Sitio de Muestreo</i>	67
8.4.2.1. <i>Análisis de Flujo Genético</i>	67
8.4.2.2. <i>Análisis por pares de poblaciones (por sitio de muestreo)</i>	69
8.4.3. <i>Análisis de Genética de Poblaciones por grupos Filogeográficos</i>	73
8.4.3.1. <i>Análisis de Flujo Genético</i>	73
8.4.3.2. <i>Análisis por Pares de Poblaciones (por Grupos Filogeográficos)</i>	75
9. DISCUSION DE RESULTADOS	76
9.1. <i>Análisis Filogeográficos (Análisis de Agrupamiento)</i>	76
9.1.1. <i>Tres Agrupaciones Principales y Distribución Geográfica de Grupos observados en el Análisis de Agrupamiento</i>	76
9.2. <i>Análisis de Genética de Poblaciones</i>	79
9.2.1. <i>Análisis de Haplotipos</i>	79
9.2.1.1. <i>Distribución de Haplotipos</i>	79
9.2.2. <i>Distancia Genética</i>	80
9.2.3. <i>Distribución de Polimorfismo de ADN</i>	81
9.2.4. <i>Análisis de Genética de Poblaciones por Sitio de Muestreo</i>	82
9.2.5. <i>Análisis de Genética de Poblaciones por agrupación Filogeográfica</i>	83
9.2.5.1. <i>Diferenciación Genética entre Grupos Filogeográficos</i>	83
9.2.6. <i>Análisis por Pares de Poblaciones (Comparación de análisis por pares de sitios de muestreo y por grupos filogeográficos)</i>	84
9.2.6.1. <i>Diferenciación Genética entre Pares de Poblaciones</i>	84

9.2.7. Estadísticos de Secuencia	85
9.2.7.1. <i>Flujo Genético y Diferenciación Genética</i>	85
9.2.7.1.1. <i>Estimación de Flujo Genético</i>	85
9.3. Implicaciones de Resultados en Dinámica de Poblaciones, Análisis de Ecotopos, Secuencias particulares y Control Vectorial	85
9.3.1. Análisis de Ecotopos	85
9.3.1.1. <i>Especímenes provenientes de Palmeras</i>	86
9.3.2. Secuencias Particulares	87
9.3.2.1. <i>El Salvador</i>	87
9.3.3. Implicaciones en el Control Vectorial	87
9.3.3.1. <i>Grupo Filogeográfico 3</i>	87
9.3.3.2. <i>Grupos Filogeográficos 2 y 1</i>	88
10. CONCLUSIONES	90
11. RECOMENDACIONES	93
12. REFERENCIAS	95
13 .ANEXOS	103

**Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

Determinación de las Diferencias Genéticas de Poblaciones Centroamericanas de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera; Reduviidae) (Latreille 1811) por medio de la secuenciación del Segundo Espaciador Interno Transcrito del ADN Ribosomal Nuclear -ITS 2-

INFORME DE TESIS

**Presentado por
Elizabeth Solórzano Ortiz**

**Para optar al título de
Bióloga**

Guatemala, noviembre del 2008

Junta Directiva

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón	Vocal I
Licda. Liliana Magaly Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	Vocal IV
Br. José Juan Vega Pérez	Vocal V

DEDICATORIA

A Dios porque es todo en mi vida, por ser mi fortaleza, mi guía, la razón de mi vida, por ser incondicional, amarme y bendecirme desde el primer día de mi existencia.

A la Virgen María, por su amor, protección y ejemplo.

A mis padres por sus cuidados, amor, apoyo, confianza; a mi mamá Sonia Ortiz por ser un ejemplo de mujer y de madre, por ser mi amiga, porque mis hermanos y yo siempre hemos sido y somos el primer lugar de su vida, por demostrárnoslo cada día de nuestras vidas; a mi papá Julio Solórzano por ser un excelente padre, por su amor, por ser mi amigo, por ser un ejemplo de bondad, por sus desvelos a mi lado desde el colegio hasta hoy, porque sin necesidad de palabras entiende y reconforta mi corazón. A ustedes dos porque no hay palabras que puedan expresar el amor, orgullo y agradecimiento que siento por ustedes.

A Bebito por ser el centro de mi corazón, por su amor, lealtad y la bondad de su corazón.

A mis hermanos por ser los compañeros de toda mi vida, porque hemos crecido juntos, por ser parte de mi vida, porque sin ustedes nada sería lo mismo, y porque jugamos en el mismo equipo de la vida.

A mis abuelitas María Carlota por consentirme y amarme sin condiciones, Martha por su cariño y compañía, y a mi Abuelita Concha por inculcar en mi familia el valor del estudio, aunque hoy ya no este aquí conmigo yo se que esta en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mi país Guatemala porque siento orgullo de formar parte de él.

A Cristian Kraker por darme la oportunidad de compartir nuestras vidas este tiempo, por lo que hemos crecido y madurado juntos.

A mis Amigas de la vida: Luz de Maria, porque sigues siendo una luz en mi vida, Vanesa y Ligia, porque ustedes son la prueba de que existe la amistad incondicional, siempre van a estar en mi corazón.

A mis primos, primas, tíos y tías.

A mis Amigos de la U en especial a Gandhi Ponce y Pilar, espero que sepan lo especiales que son para mí y que los quiero mucho.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y en especial a la Escuela de Biología, por darme la oportunidad de estudiar la carrera de Biología, por permitirme formar parte de ella y que ella formara parte de mi vida profesional y personal, por darme la oportunidad de ganar experiencias profesionales y personales que me han hecho crecer.

Al personal docente y administrativo de la Escuela de Biología y la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia en especial a Sandrita, Normita, Almita, Mirla y Pedrito.

Al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología por permitirme desarrollarme en el área de Genética Poblacional y Biología Molecular, por formarme en la investigación, por ser una institución ejemplar, y llevar el nombre de la USAC en alto, por permitirme formar parte de su equipo y a todos mis compañeros de trabajo en especial a quienes han sido más que compañeras de trabajo mis amigas.

A mis asesoras Patricia Landaverde y Bárbara Moguel, por su tiempo, enseñanzas, apoyo, paciencia y amistad.

Por el apoyo económico a esta investigación a la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología de Guatemala –SENACYT- y a la Red para la Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales en Centroamérica –NeTropica-; y a la Escuela de Biología y LENAP por su aval institucional.

A Claudia Calderón y Sandy Pineda, por ser unas asesoras extras, por su tutoría, enseñanzas, apoyo e impulso, por su cariño y amistad.

A la Licenciada Antonieta Rodas y la Doctora Carlota Monroy por sus revisiones, amistad y por dirigir la institución de la cual formo parte.

Por los especímenes utilizados en la investigación: Al Doctor Carlos Ponce de Médicos Sin Fronteras, Ministerio de Salud de Guatemala, El Salvador y Nicaragua, Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBio), Instituto Conmemorativo GORGAS de Estudios de la Salud en Panamá, al Doctor Azael Saldaña, a LENAP en especial a mi equipo de trabajo.

A Luis Montes y Amilcar Sanchez del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, por su apoyo con equipo y paquetes de computo para los análisis genéticos.

Al M.Sc. Sergio Melgar por la secuenciación de las muestras y apoyo con paquetes de computo.

A Pavel García por la elaboración del mapa.

1. RESUMEN

Triatoma dimidiata es el principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala, y el primero y segundo en el resto de los países Centroamericanos (comunicación personal Ph.D. Carlota Monroy); se encuentra en un amplio rango de hábitats selváticos (Zeledón 1981, Zeledón et al 2001, Monroy *et al.* 2003) y presenta variabilidad morfológica y adaptabilidad a diversos ecotopos (Lent & Wygodzinsky 1979), lo cual ha provocado incertidumbre taxonómica.

Estos factores tienen impacto en el control vectorial, ya que es necesario el conocimiento de la dinámica poblacional del vector para el establecimiento de estrategias de control regional, que tengan resultados efectivos.

En este estudio se utilizó el marcador molecular ITS 2, para obtener información de la dinámica poblacional de 13 localidades centroamericanas de *T. dimidiata*, a través de análisis Filogeográficos y de Genética Poblacional.

El análisis de agrupamiento de las secuencias de ADN de 22 especímenes provenientes de las trece localidades, utilizando los parámetros evolutivos propuestos por Kimura (1980) en el paquete de cómputo DNAMAN, mostró la existencia de tres grandes grupos Filogeográficos, los cuales al ser sobrepuestos en un mapa con las características fisiográficas del istmo centroamericano, evidenciaron coincidencia en la división de los tres grupos, con la Falla Polochíc- Motagua, el Cinturón Deformado de Costa Rica Central y el Canal de Panamá.

El primer grupo pertenece a la región norte de Guatemala y está representado por especímenes de Quiché y Petén, éste se encontraba separado del segundo y mayor grupo por la Falla Polochíc-Motagua, que se sospecha es la barrera que limita el flujo genético entre los dos primeros grupos; el segundo grupo está constituido por especímenes provenientes de Intibucá, Honduras; Río San Juan de Nicaragua y Heredia de Costa Rica, este segundo grupo a su vez se sospecha se encuentra aislado del tercer grupo por la barrera que representa el Cinturón Deformado de Costa Rica Central.

El tercer grupo observado está formado por los especímenes de Santa Fe de Panamá, una agrupación monomórfica, y aunque en Suramérica también se encuentra distribuido *T. dimidiata*, se cree que la limitación al flujo genético de éstos, con los especímenes de Santa Fé, está dada por la barrera que representa el Canal de Panamá.

Los análisis de agrupamiento fueron comparados con datos provenientes de un análisis de genética poblacional de las 22 secuencias, en éste se obtuvieron valores de distancia y flujo genético, así como se calcularon tanto estadísticos de secuencias (diversidad nucleotídica; índices de fijación, F_{st} , N_{st} y número efectivo de migrantes), como estadísticos de haplotipos (análisis de haplotipos y diversidad haplotípica).

Tanto los análisis filogeográficos, como los de genética de poblaciones, aportaron información que era coincidente, y que ayudó a la formulación de una hipótesis de dispersión de las poblaciones centroamericanas de *T. dimidiata*.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, fue descubierta en el año 1909 por el Dr. Carlos Chagas, quien en un inicio nombró a la enfermedad como Tripanosomiasis americana. La enfermedad, es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que es transmitido por vectores hematófagos, pertenecientes a la familia Triatominae (OMS 1991; Schoefield, 1994).

Esta enfermedad se encuentra restringida a las Américas (Bargues, *et al.* 2002), afecta actualmente alrededor de 18 millones de personas, y aproximadamente 100 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección en las áreas endémicas, principalmente en Centro y Suramérica (OMS, 1991 en Bargues *et al.* 2002, OPS 2007).

Existen varias rutas de transmisión de la enfermedad entre los huéspedes vertebrados y humanos. Sin embargo, la de mayor relevancia es la causada por insectos chupadores de la subfamilia Triatominae. Es por ello que las estrategias de control son directa y principalmente contra estos insectos vectores, debido a la inexistencia de una vacuna y a que, a excepción de la etapa temprana de la infección, el tratamiento químico no es efectivo (OMS 1991 en Bargues 2002).

T. dimidiata se encuentra en América Central como una especie nativa y está presente en un amplio rango de hábitats selváticos (Zeledón 1981, Zeledón *et al.* 2001, Monroy *et al.* 2003); esto lo hace competente para la infestación y colonización de hábitats domésticos y peridomésticos (Monroy *et al.* 1998, Monroy *et al.* 2003).

Aunque se han realizado controles químicos a partir del rociamiento de domicilios en Honduras, Guatemala, El Salvador y Nicaragua, en algunos lugares se ha observado la reinfestación de vivienda (Cordón, Rosales 2002). A pesar de los controles químicos, debido a las variaciones de comportamiento, de hábitats ocupados, y el espacio cubierto por *T. dimidiata*, el control de este vector en Centroamérica es difícil; siendo los hábitats silvestres considerados como posibles reservorios para la recolonización de las viviendas después de ser rociadas (Cordón, Rosales 2002, Zeledón 1981, Monroy *et al.* 2003). Razón por la cuál, la iniciativa para el control de la enfermedad de Chagas en Centro América, tiene como uno de

sus principales objetivos la reducción de la colonización domiciliar por *T. dimidiata* (OPS/OMS 1999, Monroy *et al* 2003).

Además de las variaciones en comportamiento, diferentes poblaciones de esta especie muestran diferencias morfológicas: en tamaño, patrones de coloración y estructuras genitales (Llent and Jurberg 1985, Monroy *et al.* 2003), también ha sido observada diferenciación genética en estudios de estas poblaciones utilizando marcadores moleculares como RAPD'S (informe de Tesis Calderón 2002, informe de Tesis Landaverde 2004) y otros marcadores genéticos como las proteínas salivares (informe de Tesis Pineda 2006), lo que provoca dudas sobre las denominaciones de grupos taxonómicos, es decir que no se sabe si se trata de un complejo de especies o si se están dando eventos de especiación (Comunicación personal con Ph.D.Carlotita Monroy). Por ello es necesaria la utilización de marcadores moleculares que permitan conocer la estructuración genética de las poblaciones y así acceder al establecimiento de estrategias de control efectivas.

En este estudio se utilizó el Segundo Espaciador Interno Transcrito del ADN ribosomal –ITS-2- como marcador molecular para la diferenciación de poblaciones centroamericanas de *Triatoma dimidiata*, ya que este marcador ha probado ser útil como reloj molecular para la estimación de eventos recientes, proveyendo información de taxa que han evolucionado en los últimos 50 millones de años (Mas-Coma 1999 en Bargues *et al* 2000), contando con un rango de substitución de bases de 0.3- 0.8% por 1 millón de años, esto obtenido para diferentes organismos (Despres *et al* 1992 en Bargues *et al* 2000), y ha mostrado ser útil en estudios previos para la diferenciación a nivel intraespecífica de *Triatoma dimidiata* (Bargues *et al* 2000).

Se seleccionó una muestra de 10 especímenes por sitio de colecta, con base en un análisis morfométrico previo, se extrajo y amplificó el ADN de cada espécimen con los cebadores correspondientes al segmento de ADN ribosomal –ITS 2-, el ADN amplificado fue verificado a partir de la electroforesis y posteriormente purificado para luego secuenciarlo.

El resultado de la secuenciación fueron cromatogramas de lectura en dos direcciones para cada espécimen, con los paquetes de cómputo Chromas pro ver 1.41, DNAMAN, ClustalX y DNASP, las secuencias fueron editadas manualmente y luego se obtuvieron

secuencias consenso para cada espécimen, las secuencias consenso de todos los especímenes fueron alineadas junto con un grupo externo y a partir de la alineación se realizó un análisis de agrupamiento utilizando parámetros filogeográficos y se realizaron análisis de genética de poblaciones.

3. ANTECEDENTES

3.1. Descripción de la enfermedad de Chagas

3.1.1. Definición de la enfermedad

La enfermedad de Chagas es una parasitosis hematofila producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad afecta en grado variable, diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y tracto digestivo. (Tabarú et. al 1999).

Los vectores de la enfermedad son reduvidos hematófagos que pertenecen a la subfamilia Triatominae, y debido a que más del 80% de los casos de Chagas se deben a la vía de transmisión causada por vectores, aunque existen otras vías como la transfusión sanguínea, transmisión congénita y trasplante de órganos (OPS 2007, WHO 1991; Schoefield, 1994), la forma más eficiente de protección contra la infección es el control del vector (Tabarú et. al 1999).

Los reduvidos transmisores se infectan cuando pican humanos o animales reservorios infectados; los tripanosomas que son ingeridos por el insecto se convierten en epimastigotes cortos (crithidias), los cuales se multiplican por división binaria y se desarrollan a formas largas, que se encuentran en la parte posterior del intestino medio del reduvido. Después de ocho a diez días aparecen en el recto del vector, pequeños tripanosomas que se originaron de las crithidias y son las formas metacíclicas que salen en las heces. Estas formas parasitarias son las que infectan al hombre y animales cuando éstos se frotan en la picadura causada por el insecto o cualquier otra lesión de la piel (Aguilar, 1997).

La enfermedad de Chagas presenta un curso variable, del cual pueden distinguirse tres fases (aguda, indeterminada o asintomática y crónica), cuyo período de duración también es variable de persona a persona, ya que este curso será acelerado o lento dependiendo de factores inherentes al organismo infectado, como la edad, estado nutricional, carga de parásito y otros factores relacionados con mecanismos inmunológicos (Rodas, 1994).

Aunque la enfermedad de Chagas es relativamente desconocida, su impacto socioeconómico (AVADS) en América Latina, ocupa el cuarto lugar después de las infecciones respiratorias, enfermedades diarreicas y SIDA (OPS,2007).

La enfermedad de Chagas es una causa importante de mortalidad y pérdida de capacidad de trabajo en Centroamérica; la Organización Mundial de la Salud en 1999, reportó que 100 millones de personas se encuentran en riesgo de infectarse en América Latina y que 45,000 personas mueren anualmente por la enfermedad (OMS, 1991). Debido a la inexistencia de una vacuna contra el mal de Chagas, la prevención de la enfermedad es entonces dependiente del control vectorial (Paz Bailey G., *et al.* 2002).

3.1.2. Situación nacional

En la República de Guatemala se estima que 730,000 personas están infectadas y la incidencia anual estimada es de 30,000 casos (OMS, 2000), la organización de Médicos Sin Fronteras, hizo énfasis en que Guatemala tiene la prevalencia más alta de infección por Chagas en la región centroamericana (MSF 2006).

Triatoma dimidiata (**ver Anexo 1**) se encuentra en 21 de los 22 departamentos de Guatemala, y debido a su amplia distribución es el principal vector en Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica, y el segundo en importancia en Honduras, Panamá y Colombia (Comunicación Personal Ph.D. Carlota Monroy). Existen reportes de *T. dimidiata* en más de 1,900 localidades ubicadas en 21 de los 22 departamentos que conforman el territorio nacional (a excepción del departamento de Totonicapán, hasta el momento). En el año 2003, Rizzo reportó que la mayoría de las localidades endémicas se encuentran ubicadas en el oriente del país, en donde la seroprevalencia en los niños escolares varía entre 2.7-7.9% (Rizzo *et. al.* 2003, citado en OPS 2007).

En el año 2002 los bancos de sangre detectaron presencia del *T. cruzi* en el 1.0% de las unidades de sangre colectadas, en el 2003 el porcentaje ascendió al 1.2% y en el 2004 al 1.6%. La cobertura en el tamizaje para *T. cruzi* también se incrementó: en el 2002 fue de 92.7% y para el 2003 y 2004 alcanzó el 99.8% (OPS 2007). Además la OPS reportó que la mayoría de los casos detectados por los bancos de sangre son de la fase crónica (OPS 2007).

3.2. Subfamilia Triatominae, Historia Natural:

La subfamilia *Triatominae* (Reduviidae) posee numerosas especies que actúan como vectores o vectores potenciales de la enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi* (Lent & Wygodzinsky 1979). Las especies de Triatominae han sido agrupadas en 17 géneros formando cinco tribus. De éstas, Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini y Rhodniini son consideradas monofiléticas, mientras que Triatomini es claramente polifilética (Dujardin *et al.*, 2000 en Bargues *et al.*, 2007).

En el género *Triatoma* se encuentran incluidas 76 especies, las cuales según la filogenia de secuencias de ADN ribosomal, parecen dividirse en dos clados principales, uno correspondiente a Norte y Centro América y el otro de las especies de Sur América, que se separaron antes del cierre del istmo de Panamá hace alrededor de 3 millones de años (Bargues *et al.*, 2000, 2002, 2007; Marcilla *et al.*, 2001).

Además, las especies de *Triatoma* son distribuidas en tres grupos, (la mayor parte de Norte América y El Viejo Mundo, Rubrofasciata; la mayor parte de Mesoamérica y El Caribe Phyllosoma; y la mayor parte de Sur América Infestans, cada una incluye diferentes complejos y subcomplejos en clasificaciones que son progresivamente actualizadas de acuerdo con los datos genéticos y morfométricos nuevos (Bargues 2007).

La principal característica biológica de Triatominae es su condición hematófaga obligada. Todos los estadios necesitan sangre para completar su ciclo de vida, además en algunas instancias las ninfas de triatominos se alimentan de otros insectos en la naturaleza; y en laboratorio se ha observado canibalismo (Lent & Wygodzinsky 1979).

Los triatominos permanecen inmóviles durante el día, y salen durante la noche en búsqueda de animales domésticos (principalmente perros y gatos) y de áreas del cuerpo no cubiertas de humanos, cuando éstos se encuentran dormidos; aunque algunos insectos domésticos pueden picar durante el día cuando se les presenta la oportunidad (Lent & Wygodzinsky 1979).

Los triatominos se alimentan en un tiempo normal de 20 a 30 minutos, y la víctima no presenta dolor por la picadura, esto, debido a la acción anestésica de la saliva del insecto; los

insectos pueden pasar sin alimentarse por meses, y sus actividades se reducen en la época fría del año, lo cual provoca problemas en cuanto al control vectorial a partir de la utilización de insecticidas, ya que, el individuo puede encontrarse en una grieta profunda donde se encuentra protegido y al no moverse no entra en contacto con el insecticida (Lent & Wygodzinsky 1979).

En cuanto a la reproducción los triatominos son ovíparos y la oviposición se da diez a treinta días después de la cópula, y puede continuar por varios meses, el número total de huevos puestos en un momento durante el tiempo de vida completo de la hembra, varía con la especie y por factores externos como la habilidad para alimentarse. Una hembra sola puede producir arriba de 1000 huevos en toda su vida, pero un total de alrededor de 500 es lo más usual (Lent & Wygodzinsky 1979).

Depositán los huevos en la tierra o en lugares de refugio; los huevos generalmente son blancos y operculados, de 1.5 a 2 x 1mm. El período de incubación es variable, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales; el ciclo huevo-adulto va de 66 a 134 días (Aguilar, 1997)

Los miembros de la subfamilia Triatominae se caracterizan por presentar una cabeza alargada con rostro recto, tri-articulado que durante el reposo se encuentra colocado debajo de la cabeza, llegando hasta el tórax; además presentan antenas tetra-articuladas, insertas en la porción antero-ocular de la cabeza, junto a los ojos en la mitad de esa porción o casi en la extremidad cefálica; los ojos son salientes, grandes, con un par de ocelos. Las alas anteriores presentan el corio más oscuro y consistente que la membrana. Las patas son caminadoras, con tres artejos en los adultos (**ver Anexo 2**) (Aguilar, 1997).

Los triatominos se encuentran distribuidos por todo el continente americano y algunas islas del Caribe, entre latitudes 42° N y 46° S. Todas las especies de Triatominae son de origen selvático, pero algunas se han adaptado en mayor o menor grado a los ambientes domésticos y peridomésticos ofrecidos por la actividad humana (Schofield, 1994 en Bargues et al. 2002). Por su comportamiento y fisiología similares, todas las especies tienen la capacidad de ser portadoras del protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Lent & Wygodzinsky, 1979). De esta manera las especies que forman asociación cercana con el ambiente del

humano, actúan como importantes vectores del parásito *Trypanosma cruzi* para los mismos (Bargues *et al.* 2002).

3.3. *Triatoma dimidiata*

3.3.1. Clasificación Taxonómica de *Triatoma dimidiata*

Reino: Animalia.

Phylum: Arthropoda.

Clase: Insecta.

Orden: Hemíptera.

Familia: Reduviidae.

Sub Familia: Triatominae.

Género: *Triatoma*.

Especie: *T. dimidiata* (Latreille 1811)

3.3.2. Sinonimia de *Triatoma dimidiata*

Triatoma dimidiata es un artrópodo, insecto reduvido hematófago que recibe el nombre común de chinche picuda (adulto), talaje y telepate (ninfas) (Comunicación Personal Ph.D. Carlota Monroy).

3.3.3. Características

Los especímenes de *Triatoma dimidiata* miden de 25 a 35 mm., la hembra es de tamaño un poco mayor. El color es negro, como alquitrán, con el conexivo y el corio que van de amarillo pálido a anaranjado intenso, las alas anteriores o hemiélitros presentan la porción anterior más gruesa, de coloración anaranjada con manchas negras y la posterior delgada, membranosa y de coloración grisácea; el par de alas posteriores son delgadas, membranosas y se doblan debajo de las primeras (Aguilar, 1997).

3.3.4. Distribución

T. dimidiata posee una amplia distribución geográfica, se encuentra desde la parte norte de Sur América (Colombia, Venezuela, Ecuador, y Perú), pasando por todos los países de Centro América y el Sur de México (Dorn, et al. 2003), en Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México (Campeche, Chiapas, Jalisco, Tabasco, San Luís Potosí, Puebla, Quinta Roo, Veracruz y Yucatán), Nicaragua, Panamá, Perú, San Salvador y Venezuela (Lent & Wygodzinsky 1979) (**ver Anexo 3**).

3.3.5. Biología de *Triatoma dimidiata*

3.3.5.1. Capacidad vectorial

Los especímenes de *Triatoma dimidiata* son organismos atraídos por la luz, frecuentemente domésticos y peridomésticos, y han mostrado ser un importante vector del mal de Chagas en Centroamérica, Ecuador y Perú (Lent & Wygodzinsky, 1979).

T. dimidiata se ha encontrado infectado de forma natural con *Trypanosoma cruzi*; en el campo los especímenes se han encontrado en madrigueras de armadillos, y en las casas se ha observado que las ninfas de *T. dimidiata* se cubren así mismas con partículas de tierra (Lent & Wygodzinsky, 1979).

T. dimidiata es una especie altamente variable, en patrones cromáticos, extensión total corporal y proporciones corporales (Lent & Wygodzinsky, 1979).

3.3.5.2. Ecotopos de *Triatoma dimidiata*

Triatoma dimidiata no es estrictamente domiciliar y puede ser encontrando en una variedad de ambientes (Dumoteil, et al.2002). Dependiendo de su asociación con las viviendas humanas, las poblaciones de triatominos han sido clasificadas en ecotopos:

Intradomiciliares: En este caso los especímenes se encuentran dentro de las viviendas humanas, donde prefieren la oscuridad y lugares de refugio, como grietas de paredes, respaldo de muebles, troncos, maletas, cajas con papeles viejos, detrás de papeles pegados en las paredes, entre ropas colgadas en paredes, en camas pegadas a la pared y en varios tipos de materiales como bajareque y adobe, con los que a menudo se construyen las viviendas en el área rural,

sobre todo en las regiones donde vive la población de escasos recursos. Los vectores intradomiciliarios colonizan las viviendas humanas, viven, se alimentan, reproducen y desplazan en el interior de la vivienda (Lent & Wygodzinsky 1979).

Peridomésticos: hábitat intermedio, aquí los individuos son ocasionalmente atraídos hacia adentro de las casas por la luz, pero no colonizan y se alimentan ocasionalmente de humanos, y se encuentran en patios, cercanías de las casas, cercos vivos y de piedra (Dumonteil, et al. 2002), en gallineros, perreras, chiqueros entre otros, y se alimentan de animales domésticos (perros, gatos, gallinas), los cuales constituyen reservorios de alimento para las chinches (Lent & Wygodzinsky 1979, informe de tesis Landaverde 2004).

Silvestres: habitan en bosques, selvas y cuevas (Dumonteil, et al. 2002). Se trata del hábitat primario de los triatomíneos que se encuentra en las cercanías de refugios, madrigueras y nidos de animales salvajes homeotermos, como marsupiales, edentados, roedores, carnívoros, murciélagos y aves; también se encuentran entre rocas, muros de piedra, donde se alimentan de pequeños roedores y en algunos casos de iguanas y otras lagartijas, compartiendo su hábitat. Además también pueden encontrarse en árboles caídos, entre raíces expuestas, en frondas de palmas y en bromelias epífitas (Lent & Wygodzinsky 1979).

3.4. Control Vectorial

El éxito en el control vectorial en Suramérica redujo el número de personas infectadas de 16-18 millones (OMS 1991) a 10 -12 millones (Schmunis, 1999 citado en OPS, 2007). En Centroamérica y México, un total de 2.3 millones personas están infectadas con una incidencia anual de 70,000 (OMS 2000).

La Iniciativa de Chagas para Centroamérica (IPCA) ha tenido tres objetivos específicos que son, la eliminación de *Rhodnius prolixus*, disminución de *Triatoma dimidiata* y la eliminación de transmisión transfusional (OPS 2007).

En Guatemala el laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –LENAP-, en coordinación con el Ministerio de Salud ha desarrollado proyectos de control vectorial, que incluyen fases de laboratorio y de campo. En cuanto a la fase de laboratorio se han

desarrollado estudios que proveen información útil para la dilucidación de la diferenciación genética y morfológica de *Triatoma dimidiata*, a partir de marcadores genéticos y fenéticos, así como serología de los habitantes de las comunidades más afectadas. En cuanto a la fase de campo se han desarrollado proyectos multidisciplinarios en la búsqueda de la disminución de la transmisión vectorial por medio de educación en las comunidades, capacitación para la mejora de vivienda a partir de materiales propios de la región y reforestación, en búsqueda de que el vector al permanecer en su hábitat primario (selvático) no migre en búsqueda de alimento al ambiente domestico.

3.5. Descripción de lugares de Estudio

3.5.1. Guatemala

Guatemala se encuentra situada en el extremo noroccidental de América Central siendo por lo tanto la más septentrional de las repúblicas centroamericanas. Limita al Norte y al Oeste con México al Este con Belice, el mar Caribe, Honduras y El Salvador, y al Sur con el Océano Pacífico (Atlas Océano 1991).

Su geografía física es gran parte montañosa. Posee suaves playas en su litoral del Pacífico y planicies bajas al norte del país. Es atravesado en su parte central por la Sierra Madre del Sur. El país está irrigado por dos vertientes, la Atlántica y la Pacífica. Superficie 108 889 km². Presenta un clima tropical, al que los vientos húmedos del Caribe y su orografía le otorgan características propias. El litoral Atlántico es cálido (28°C de media), húmedo y presenta lluvias abundantes (aprox. 4 000 mm anuales). En el interior del país el relieve montañoso propicia el descenso de las temperaturas, que son frías a partir de los 3 000 m de altura. La costa Pacífica es menos húmeda que la Atlántica (Atlas Océano 1991).

Su topografía hace que posea una variedad de paisajes y climas, por lo tanto una riqueza de flora y fauna abundante. Guatemala se encuentra organizada en 22 departamentos y 331 municipios (**Ver Anexo 4**) (Atlas Océano 1991).

3.5.1.1. *Los Amates, Izabal*

Los Amates, municipio del departamento de Izabal. Área aproximada: 1,615 km². Colinda al norte con Morales y Livingston (Izabal); al este con Morales y la República de Honduras; al sur con la república de Honduras y con Gualán (Zacapa) al oeste con Gualán y El Estor (Izabal) (IGN, 1999).

3.5.1.2. *La Brea.*

Aldea del municipio de Quesada, Jutiapa. En la afluencia de la quebrada El Beneficio en la quebrada Seca; por rodera rumbo sureste hay 3 Km. a la aldea Santa Gertrudis, de allí por camino de revestimiento suelto, al sur hay 6 km. a la cabecera municipal. Latitud 14°19'43", longitud 90°03'50" (IGN, 1999).

3.5.1.3. *San Andrés Sajcabajá*

Municipio del departamento del Quiché. Categoría. Área aproximada: según el Instituto de Estadística: 476 km². Colinda al norte con Cunén y Uspantán (Quiché); al este con Canillá (Quiché.) y Cubulco (Baja Verapaz); al sur con Chinique y Zacualpa (Quiché); al oeste con San Pedro Jocopilas, San Bartolomé Jocotenango y Sacapulas (Quiché). La cabecera está en un pequeño valle en la sierra de Chuacús, al este de la montaña Los Achiotes, río Agua Caliente de por medio, en las cabeceras del arroyo Tilojoj y al norte del río Las Casas, latitud 15°10'31", longitud 90°56'36" (IGN, 1999).

3.5.1.4. *San Luís*

Municipio del departamento del Petén. No puede indicarse la extensión, ya que se creó el antiguo municipio Santa Bárbara con el nombre de Poptún, desmembrando su territorio de San Luís. Colinda al norte con Poptún (Petén); al este con Belice (Belice); al sur con Livingston (Izabal); al oeste con Sayaxché y Dolores (Petén). Latitud 16°11'55", longitud 89°26'35" (IGN, 1999).

3.5.1.5. *Yaxja*

(Yaxhá) Sitio arqueológico en el municipio de Flores, Petén. En la margen norte de la laguna Yaxjá, al oeste de la laguna Sacnab, al este-sudeste del sitio arqueológico Tres Ollas. 250 metros sobre el nivel del mar, latitud 17°04'10", longitud 89°24'00". Conforme a datos

obtenidos que no se han verificado, Yaxjá es un sitio arqueológico del período clásico Maya (Diccionario Geográfico de Guatemala).

3.5.2. Honduras

Honduras limita al norte con el Mar Caribe en el cual posee numerosas islas, cayos e islotes de las cuales las más importantes son las Islas de la Bahía y las Islas del Cisne, al este con el Mar Caribe y Nicaragua, al oeste con Guatemala y al sur con el Golfo de Fonseca, El Salvador y Nicaragua. Honduras se subdivide en 18 departamentos, como se describen en el anexo 6 (**Ver Anexo 5 y 6**).

Siendo el segundo país más grande de Centroamérica (después de Nicaragua), tiene cuatro distintas áreas geográficas: montañas en el interior, la Costa Caribeña, la Costa de la Mosquitia, y las llanuras por el Golfo de Fonseca, en la costa Pacífica de Honduras.

El terreno Hondureño consiste principalmente de montañas (~80%), pero también hay valles pequeños por las costas y en varios lugares del territorio principal. El clima hondureño es tropical, de elevadas temperaturas, y mucho más húmedo en la vertiente Antillana que en la Pacífica. En las montañas el clima es más templado, mientras que en la costa norte las temperaturas son muy altas, sin embargo las brisas marinas y las constantes lluvias de la zona moderan el calor. La estación seca abarca de noviembre a abril, mientras que la húmeda va de mayo a octubre. (Universia.net, Latinoamérica).

3.5.2.1. Intibucá

Departamento del Sur de Honduras, limítrofe con El Salvador; 3,072 Km². Capital La Esperanza. Relieve montañoso. El río Lempa forma la frontera internacional, al suroeste. Clima suave (Diccionario Enciclopédico Océano Uno, 1995).

3.5.2.2. Copán

Departamento del oeste de Honduras, en el límite con Guatemala; 3 203 km². Capital Santa Rosa de Copán. Atravesado por la cordillera del Merendón y avenado por el Chamelecón. Clima tropical (Diccionario enciclopédico Océano Uno, 1995).

3.5.3. El Salvador

País de clima tropical, con una población de aproximadamente 6,7 millones de habitantes. Debido a su extensión territorial (21,041 km²) tiene la densidad poblacional más alta de América continental. El Salvador se subdivide en 14 departamentos (**ver Anexo 7**) y éstos a su vez en 39 distritos, los cuales se dividen en 262 municipios. Así mismo, los departamentos están agrupados en tres zonas, las cuales son: Occidental, Oriental y Central (Atlas Geográfico Universal y de El Salvador, 1995).

Es el único país centroamericano sin costa sobre el Mar Caribe. El terreno es en mayor parte montañoso con un cinturón costero estrecho y meseta central. Su litoral se extiende desde la desembocadura del río Paz, al Suroeste, hasta la del río Goascorán, al Sureste. El Salvador se encuentra ubicado en la zona climática tropical y ofrece condiciones térmicas similares durante todo el año. Sin embargo, debido a su franja costera a lo largo del Océano Pacífico, ocurren oscilaciones anuales importantes relacionadas con la brisa marina que transporta humedad y calor (Atlas Geográfico Universal y de El Salvador, 1995)

3.5.3.1. Santa Ana

Departamento de El Salvador, ubicado en la zona occidental. Su capital es Santa Ana. Su población aproximada es de 245,421 habitantes, y su extensión territorial es de 2.023. km^a. El departamento de Santa Ana se encuentra a una altitud de entre 500 y 3000 metros sobre el nivel del mar. Los volcanes más importantes son: el volcán de Santa Ana o Ilamatepec y el volcán Chingo. Entre los cerros más importantes están: el Cerro de Verde y el Cerro Montecristo. Los principales ríos del departamento son: el río Iempa, el río Guajoyo (Atlas Geográfico Universal y de El Salvador, 1995)

3.5.4. Nicaragua

País limitado al Norte por Honduras y al Sur por Costa Rica, se sitúa entre el mar Caribe al Este y el océano Pacífico al Oeste (**Ver Anexos 8 y 9**). De Este a Oeste está formada por cuatro unidades de relieve: la estrecha llanura costera del Pacífico; la cordillera Centroamericana que cruza el país en dirección Noroeste-Sureste y presenta actividad volcánica y sísmica en el Eje volcánico nicaragüense-costarricense (cordillera de Marrabios);

dicho Eje comprende la fosa ocupada por los lagos Managua y Nicaragua; al Este la meseta del Escudo central está cruzada por algunas alineaciones (Isabelita, Dariense, Huapi) y enlaza con una amplia llanura litoral el Caribe. El clima es tropical, con variaciones pluviométricas según la altitud y la influencia de los vientos (Diccionario Enciclopédico Océano Uno, 1995).

3.5.4.1. El Almendro, Río San Juan

El Almendro es una municipalidad rural del departamento de Río San Juan en Nicaragua. Río San Juan es un departamento de Nicaragua que limita al Sur con Costa Rica, bañado al este por el Caribe y al Oeste por el lago Nicaragua; 7,254 Km². Presenta un clima tropical (Diccionario Enciclopédico Océano Uno, 1995).

3.5.5. Costa Rica

País Centroamericano que limita al norte con Nicaragua, al Noreste por el mar Caribe, al SE por Panamá y al Oeste y Suroeste por el océano Pacífico. Se encuentra atravesado en dirección Noroeste y Suroeste por varias cadenas de montañas (**Ver Anexo 10 y 11**). La depresión tectovolcánica del Valle Central ocupa unos 3 000 Km². Presenta un clima tropical modificado por la altitud (Diccionario Enciclopédico Océano Uno, 1995).

3.5.5.1. Heredia

Es una provincia del Norte de Costa Rica, limítrofe con Nicaragua; 2 656 Km². Abarca parte de la meseta Central. Clima cálido, suavizado por la altitud, y muy húmedo. Heredia se encuentra dividida en cantones; el cantón número 5 de la provincia de Heredia, es San Rafael (Diccionario Enciclopédico Océano Uno, 1995).

3.5.6. Panamá

País Centroamericano que limita al Norte con el mar Caribe, al Sur con el Pacífico, al Este con Colombia y al Oeste con Costa Rica (**Ver Anexo 12**). El centro está dividido en dos por el territorio del canal de su nombre. El istmo centroamericano presenta en este país su mínima anchura (65 Km.). Una gran cadena montañosa (Volcán Chiriquí, 3 478 m) divide las

dos terceras partes del país en dos llanuras (Diccionario Enciclopédico Océano Color Uno, 1995)

3.5.6.1. Santa Fé, Veraguas

Es la capital del distrito de Santa Fé de la provincia de Veraguas en Panamá (Diccionario Enciclopédico Océano Uno, 1995).

3.6. Estudios con Marcadores Moleculares como herramientas para el Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas

La gran variabilidad morfológica que presenta el principal vector de la enfermedad de Chagas en Centroamérica, *Triatoma dimidiata*, y su gran adaptabilidad a diversos ecotopos, provocan un problema en cuanto a la clasificación taxonómica y la delimitación de sus poblaciones; suponiendo esto a su vez dificultades en el control vectorial; por lo que resulta necesario conocer la dinámica poblacional del vector, para establecer estrategias de control vectorial regionales que sean efectivas.

Para acceder a dilucidar la dinámica poblacional de *T. dimidiata*, el principal vector de la enfermedad de Chagas en Centro América, en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología -LENAP- han sido utilizados marcadores tanto genéticos como fenéticos, entre los marcadores fenéticos, se han utilizado la morfometría de cabezas, alas, genitalia, y huevos de chinches, hidrocarburos, análisis de proteínas salivares, sensillas en antenas y asimetrías en estructuras relacionadas con el movimiento como lo son alas y patas (Comunicación personal Licda. Marianela Menes).

Entre los marcadores moleculares únicamente se ha utilizado la amplificación aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD'S- PCR). Sin embargo aunque éste último ha brindado importantes aportes en cuanto al conocimiento de la dinámica poblacional de *T. dimidiata*, su carácter aleatorio limita sus resultados y conclusiones, además de implicar posibles errores en sus deducciones, debido a problemas como:

- Homología de bandas (que consiste en analizar como homólogas bandas del mismo tamaño aunque no procedan de una misma secuencia –no homólogas-), esto sucede debido a que en la técnica no se buscan secuencias específicas sino que se buscan secuencias al azar en todo el genoma)
- Efecto de dominancia entre alelos (lo cual introduce un sesgo en cuanto al cálculo de las frecuencias genotípicas y por lo tanto de las génicas pues en una técnica dominante como RAPD'S no se puede distinguir a los heterocigotos que contienen enmascarados alelos recesivos)
- Incertidumbre en la asignación de pesos específicos (como en el caso de los análisis de huellas genéticas (fingerprintings) donde múltiples marcas aparecen en el mismo gel, puede existir incertidumbre en la asignación a pesos específicos sin un análisis de pedigrí previo).
- Comigración (posibilidad de que productos de diferente peso tengan pesos moleculares similares y entonces se conviertan en indistinguibles en un gel por el efecto de comigración)
- Falta de reproducibilidad de la técnica (lo cual implica que no son comparables los resultados de estudios que no se llevaron a cabo utilizando exactamente las mismas condiciones) (Lynch and Milligan, 1994).

Por lo que resulta necesaria la complementación con una técnica molecular más precisa y reproducible, como por ejemplo alguna que implique la secuenciación de segmentos informativos no codificantes del ADN.

3.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa también conocida como PCR, por sus siglas en inglés (**Ver Anexo 13**), es una tecnología desarrollada para la producción de millones de copias de ADN a partir de una pequeña cantidad, a un menor costo y en un proceso más rápido que la clonación genética en bacterias. El proceso se basa en las propiedades de la enzima polimerasa que se une a una hebra molde de ADN y a partir de ésta, forma una hebra nueva utilizando la complementariedad de las bases, para que el proceso se lleve a cabo *in Vitro*, es necesaria la utilización de cebadores oligonucleótidos que permiten la unión de una

enzima polimerasa (que en este caso es la que proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, debido a que ésta resiste los cambios de temperatura necesarios para el desarrollo del proceso), nucleótidos, un cofactor de la enzima (Cloruro de Magnesio), agua y el ADN objetivo. Durante el proceso se utiliza un termociclador que produce ciclos de temperatura que permiten la desnaturalización del ADN, unión de cebadores y por último la elongación de la cadena (Audesirk, 1997).

3.6.2. Secuenciación de ADN

Durante la década de los ochenta se desarrollaron máquinas automatizadas que permiten analizar la secuencia de genes bastante largos (de hasta algunos cientos de miles de nucleótidos de longitud). Basados en la clonación de segmentos de ADN y utilizando diversos procesos de marcaje de nucleótidos (Sanger, Maxam-Gilbert), las máquinas automatizadas proveen un cromatograma que presenta picos de colores que se interpretan como la presencia de un nucleótido específico (**ver Anexo 17**). El proceso no es barato, y 50,000 nucleótidos representan menos del 10 por ciento de los 60 millones de nucleótidos en un cromosoma humano promedio, por lo que es importante determinar el lugar preciso de los genes (Audesirk, 1997).

3.7. ADN ribosomal (Segundo Espaciador Interno Transcrito – ITS2-) como Marcador Molecular para el estudio Genético de las variaciones de *Triatoma dimidiata*

Los organismos eucariotas presentan el ADN ribosomal nuclear organizado en agrupaciones que contienen las subunidades 18S, 5.8S y 28S. Los genes que codifican para dichas subunidades son separados por dos espaciadores internos transcritos (ITS): El ITS1 que se encuentra separando los genes de las subunidades 18S y 5.8S, y el ITS2 separa los genes de las subunidades 5.8S y 28S (**Ver Anexo 14**). Estas agrupaciones de genes se encuentran en bloques repetitivos en todo el genoma (Gómez- Zurita, *et al* 2000).

Como se mencionó los ITSs se presentan usualmente en bloques repetitivos o microsatélites (Almeida-Artigas, *et al.*, 2000), cuya unidad de repetición es entre 1 y 5 pares de

bases y el cual es muy buen marcador molecular polimórfico para la diferenciación de poblaciones entre especies (Jarne and Lagoda, 1996).

La hipótesis de la existencia de un reloj molecular asume que la sustitución de nucleótidos en una secuencia dada ocurre a un rango constante, proveyendo un método como medida del tiempo de divergencia de las diferencias entre dos secuencias, el cual ha sido establecido para Triatominae, como un reloj molecular inferido del segundo espaciador interno transcrito del ADN ribosomal nuclear de estos Reduviidae, siendo estimado este en alrededor de 0.4%- 1% de cambio en pares de bases en un millón de años (Bargues, *et al* 2000, Marcilla, *et al.* 2001). La región de estas repeticiones más apropiada para comparaciones a nivel de género y especie es el ITS2 (Bargues, *et al.* 2002).

La resolución provista por la secuenciación del Segundo Espaciador Interno Transcrito - ITS2- ha permitido realizar análisis de especies cercanamente relacionadas como las del complejo *Triatoma phyllosoma*. (Bargues 2002). Además, dicha técnica presenta muchas ventajas sobre el marcador molecular anteriormente utilizado en el LENAP (RAPD'S- PCR), por ejemplo: la falta de aleatoriedad respecto a los segmentos amplificados del ADN que elimina errores en los análisis como la homología de bandas, el proceso es reproducible y por lo tanto comparable con resultados provistos por otros estudios con el mismo marcador, además de ser un marcador codominante.

Estudios previos indicaron que el ITS2, muestra que *Triatoma dimidiata* se encuentra en proceso de especiación en diferentes regiones de su distribución geográfica (Marcilla *et al*, 2000). La capacidad del ITS2 para diferenciar entre poblaciones de una especie dada de Triatominae, se ha presentado como una herramienta muy útil para estudios en regiones en donde el mal de Chagas es endémico; de esta manera el ITS-2 es un marcador sensible para ser utilizado en la clasificación de especies, subespecies, híbridos, variedades y poblaciones de triatominos (Marcilla *et al*, 2000).

Según Young (2004) el El ITS-2 presenta una longitud típica de 200 a 400 pares de bases y puede ser amplificado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de una pequeña cantidad de ADN y posteriormente ser secuenciado. (Young y Coleman, 2004).

Otro aspecto importante de la técnica es que puede ser útil para resolver problemas taxonómicos como el que se observa en el complejo de especies *T. phyllosoma* que ha presentado cruces entre especies en condiciones de laboratorio, y cuya descendencia (F1) ha resultado viable (Mazzoti y Osorio, 1942). Por lo que, estudios que utilicen herramientas moleculares para clarificar la validez de las designaciones de especie/subespecie, y para estudios eco-epidemiológicos de la importancia de los diferentes miembros del complejo en la transmisión de la enfermedad de Chagas, se hacen necesarios (Marcilla *et al.* 2000).

De hecho, la relación entre las subpoblaciones de triatominos de diferentes ambientes no es siempre completamente entendida, aun pensando que esto tiene implicaciones considerables en la transmisión del parásito (Dumonteil *et al.*, 2002). La secuenciación de solo uno de los marcadores resultantes de los espaciadores íntergénicos es suficiente para el desarrollo de los estudios mencionados (Marcilla *et al.*, 2001).

3.7.1. Ventajas de la utilización del ITS-2 frente a RAPD'S y Técnicas Fenotípicas en el Estudio de *Triatoma dimidiata*

Debido a que la secuenciación de solo uno de los espaciadores es suficiente para el desarrollo de los estudios filogenéticos y de genética de poblaciones, esto presenta al ITS 2 como un marcador muy confiable; y debido a su carácter no aleatorio, es claramente ventajoso respecto a la técnica utilizada anteriormente en el LENAP, de la Amplificación de ADN Aleatorio (RAPD'S, PCR), ya que la secuenciación de la sección del ITS 2 que, no solo ha probado ser útil en estudios previos para *Triatoma dimidiata* (Marcilla *et al.*, 2001), sino que, además presenta la gran ventaja de evitar los errores supuestos en el marcador utilizado anteriormente, por la implicación de la homología de bandas .

Otra clara ventaja del análisis del ITS-2 frente a RAPD'S, es el hecho de que el primero se trata de un marcador codominante, permitiendo diferenciar organismos heterocigotos dominantes de los homocigotos dominantes, mientras que RAPD'S por tratarse

de un marcador dominante, reduce la percepción de la variabilidad real por considerar a los heterocigotos dominantes y los homocigotos dominantes como lo mismo.

Además el nuevo marcador molecular presenta reproducibilidad, característica de la cuál carecía el marcador anteriormente utilizado, lo que permite el intercambio de información entre diferentes laboratorios, y de esta forma la posibilidad de desarrollar estrategias de control vectorial regionales y lo cuál implicaría la justificación del costo del desarrollo de la técnica; ya que no es necesario el intercambio de material biológico, pues una vez conocidas las secuencias, los resultados pueden enviarse fácilmente por correo electrónico. Además de la ventaja que representa el que otras secuencias ya se encuentran disponibles en el Banco electrónico de secuencias genéticas (GeneBank) y esto permite hacer alineaciones (“Blast”) con las secuencias más semejantes de otras especies del mismo género.

Por otro lado el método presenta ventajas respecto a los marcadores fenéticos, ya que la especie presenta variabilidad fenotípica en diferentes aspectos, lo cual puede hacer incurrir en conclusiones falsas cuando únicamente se considera el fenotipo (Marcilla, *et al* 2001).

Aunque se han descrito ventajas sobre otro tipo de marcadores, su complementación con marcadores fenéticos como la morfometría y proteínas salivares es de gran importancia, para el desarrollo de modelos de la dinámica poblacional de los organismo estudiados.

3.8. Análisis Filogeográficos

3.8.1. Parámetros Evolutivos de Kimura

Los parámetros de Kimura permiten a partir de una simple fórmula, la estimación de las distancias evolutivas, en términos del número de sustituciones nucleotídicas (y también los rangos evolutivos cuando el tiempo de divergencia es conocido) (Kimura, 1980).

Cuando se compara un par de secuencias nucleotídicas es posible distinguir entre dos tipos de diferencias encontradas; si los sitios homólogos son ocupados por diferentes bases nucleotídicas, pero ambos son purinas o ambos son pirimidinas, estas diferencias se conocen con el nombre de transiciones; mientras que si el cambio es de purina a pirimidina o de

pirimidina a purina, las diferencias se conocen con el nombre de transversiones (Kimura, 1980).

Dejando a P y Q respectivamente como la fracción de sitios nucleotídicos que muestran transiciones y transversiones, entre dos secuencias comparadas, la distancia evolutiva por sitio es $K = (1/2) \ln \{(1-2P-Q) \sqrt{1-2Q}\}$. El rango evolutivo por año está dado por $k = K/(2T)$, donde T es el tiempo desde que divergieron dos secuencias (Kimura, 1980).

3.8.2. Estimadores e Índices de Diversidad Genética

La diversidad genética y el flujo genético dentro y entre poblaciones puede ser evaluada utilizando los siguientes índices y estimadores:

3.8.2.1. Análisis de Haplotipos

Diversidad de secuencias y su varianza de muestreo (Nei 1987; ecuaciones 8.4 y 8.2 pero reemplazando 2n por n).

Diversidad Haplotípica

La diversidad haplotípica es un parámetro que indica la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar en una población sean diferentes, y puede estimarse a partir de:

$$h = \frac{n}{n-1} \left[1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right] \quad \text{Nei y Tajima (1981)}$$

Donde n es el número de copias génicas en la muestra, k es el número de haplotipos y p_i es la frecuencia del haplotipo i en la muestra. La diversidad haplotípica da una medida de diferentes tribus matriarcales en una población, y en una población monomórfica su valor es cero (Nei y Tajima, 1981 citados en Vera 2006).

3.8.2.2. Diversidad Nucleotídica Pi

Es el promedio del número de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias (Rozas, 2006). La diversidad nucleotídica es un indicador del grado medio de divergencia nucleotídica entre los individuos presentes en la población y se pueden estimar como:

$$d = \frac{\sum_{i=1}^k \sum p_i p_j d_{ij}}{L} \quad \text{Nei (1987)}$$

Donde d_{ij} es una estimación del número de sustituciones nucleotídicas entre los haplotipos i y j , mientras que k es el número de haplotipos, p_i es la frecuencia del haplotipo i , y L es la longitud en pares de base de la secuencia analizada (Nei, 1987; Rozas, 2006).

Diversidad Nucleotídica (Jukes and Cantor) Pi (JC)

El promedio del número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre dos secuencias (Lynch and Crease 1990, ecuaciones 1-2).

$$\delta_{xy} = -\frac{3}{4} \left(1 - \frac{4 \hat{\Pi}_{xy}}{3} \right)$$

$$\hat{v}_i = \frac{2}{n_i(n_i - 1)} \sum_{x < y} n_{ix} n_{iy} \delta_{xy}$$

A diferencia de las estimaciones previas (Nei 1987, ecuaciones 10.5 o 10.6), esta ha sido obtenida utilizando las correcciones de Jukes and Cantor (1969). La corrección ha sido desarrollada en la comparación de cada par, el Pi (π) estimado fue obtenido como el promedio de los valores para todas las comparaciones.

3.8.3. Análisis de Flujo Genético

La información de flujo genético puede ser accesada con el cálculo de las siguientes medidas de la información provista por los datos de la secuencia nucleotídica:

Hudson et al. 1992b:

Fst (ecuación 3) y Nm (ecuación 4).

$$\langle F_{ST} \rangle = 1 - \frac{H_w}{H_b}$$

$$\langle N_m \rangle_F = \frac{1}{2} \frac{H_w}{H_b - H_w}$$

Lynch and Crease 1990:

Nst (ecuación 36) y Nm.

$$N_{ST} = \frac{\hat{v}_b}{\hat{v}_w + \hat{v}_b}$$

El estimador Nst es casi el mismo que el Fst (Hudson et al. 1992b). La diferencia es que el Nst utiliza la corrección de Jukes and Cantor (1969).

3.8.3.1. Estadísticos de Secuencia

Índices de Fijación F_{ST} y N_{ST}

Wright (1943, 1951, 1965) mostró que la variación en la frecuencia génica entre subpoblaciones podía ser analizada por índices de fijación o estadísticos F; y derivó la fórmula:

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) \quad (a)$$

Donde F_{IT} y F_{IS} , son correlaciones entre dos gametos unidos para producir los individuos relativos a la población total y relativos a las subpoblaciones, respectivamente, mientras que el F_{ST} es la correlación entre dos gametos arrastrados al azar de cada subpoblación (Nei 1973). De esta forma el grado de diferenciación genética entre subpoblaciones puede ser medido por el estadístico F_{ST} .

Desde el desarrollo de este estadístico F, múltiples correcciones o variaciones del mismo han sido desarrolladas para acoplarse a las características de los datos a utilizar (Weir and Cockerman, 1984; Lynch and Crease, 1990; Jukes and Cantor, 1969; Nei, 1973, 1982).

Debido a las características de los datos a partir de los cuales se obtuvo la información genética en este estudio (secuencias de ADN ribosomal, de un organismo diploide), utilizando el programa DNAsp se calculó el valor del F_{ST} a partir de la fórmula desarrollada por Hudson y su colaboradores en 1992.

$$(F_{ST}) = 1 - H_w/H_b \quad b)$$

Donde, H_w es la media de las diferencias, entre diferentes secuencias muestreadas de la misma subpoblación, y H_b es la media de las diferencias, entre secuencias muestreadas de dos diferentes subpoblaciones muestreadas.

El supuesto de la fórmula desarrollada por Hudson es el mismo que el $\hat{\theta}$ de Weir and Cockerham (1984), para el caso de la unión aleatoria de gametos con iguales tamaños de muestras de cada subpoblación, y donde la información de cada sitio polimórfico es combinada como Weir y Cockerham recomiendan para información combinada de diferentes loci; lo que varía es la forma de calcularlo, ya que en la fórmula de Hudson, esta se acopla a datos provenientes de secuencias.

También, el estimador de Hudson es casi el mismo que el N_{ST} de Lynch and Crease (1990), diferenciándose sólo en que no se desarrolla la corrección de Jukes and Cantor, porque Hudson asume un modelo de sitios-infinito, el cual no requiere ninguna corrección para uniones múltiples (Hudson, 1992b). El estimador de Hudson es levemente diferente del y_{ST} de Nei's (1982) porque en el valor H_w no se incluye una comparación de la secuencia muestra con ella misma, ambos estimadores, Nei's y Takahata and Palumbi's difieren de la ecuación de Hudson en términos de $1/n$ donde n es el número de secuencias muestreadas para cada subpoblación (Hudson, 1992b).

En 1978 Wright sugirió rangos para la interpretación de los valores de F_{ST} obtenidos:

De 0 – 0.005 → Indicador de poca diferenciación genética.

De 0.005 – 0.15 Indicador de diferenciación genética moderada.

De 0.15 – 0.25 → Indicador de diferenciación genética grande

Valores superiores a 0.025 → Indicador de diferenciación genética muy grande

(Wright, 1978 en Landaverde, 2004).

Número Efectivo de Migrantes

Además de los F_{ST} otro método para estimar los niveles promedio de flujo genético a partir de datos de secuencias de ADN, es el que se basa en el cómputo del número mínimo de eventos de migración consistente con el árbol genético inferido de sus secuencias.

$$(Nm)_F = \frac{1}{2} - \frac{H_w}{H_b - H_w}$$

Donde H_w es una estimación del promedio del tiempo de divergencia de pares de genes muestreados dentro de la subpoblación, y H_b es una estimación del tiempo promedio de divergencia de los genes muestreados de diferentes subpoblaciones. Si H_b es menor o igual que H_w , entonces $(Nm)_F$ es negativo o infinito, en este caso el estimador es indefinido para la muestra.

4. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas continúa siendo un serio problema en América Latina, cerca de 18 millones de personas se encuentran infectadas con el parásito causante de la enfermedad, *Trypanosoma cruzi*, y alrededor de 120 millones de personas (lo que significa aproximadamente el 25% de la población de América Latina) vive en condiciones que las colocan en riesgo de contraer la infección (Moncayo, 1999, Dorn., *et al.* 2003).

Los principales vectores de la enfermedad en América Central son *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (Tabaru *et al.* 1999, Dorn *et al.*, 2003). Sin embargo, a partir de los esfuerzos realizados para controlar la transmisión de la enfermedad en Centro América, ha resultado más sencilla la erradicación de *R. prolixus*, por ser éste un vector únicamente del domicilio, no conociéndose reinfestación por éste después del rociamiento. En este aspecto existe un contraste remarcado con *T. dimidiata*, que presenta un gran reservorio selvático, y los insectos de dicho reservorio podrían actuar como una fuente de recolonización de viviendas después de la aplicación de pesticidas (Cordón- Rosales *et al.* 1999).

En *Triatoma dimidiata* se han encontrado diferencias significativas en la respuesta al rociamiento con insecticidas y la capacidad de colonización, para Guatemala, en el departamento de Zacapa después del rociamiento, el insecto desapareció de las viviendas (Nakagawa, 2003); en Jutiapa se ha observado re-infestación tres meses después del rociamiento (Hashimoto, 2006), y en la región del Petén el insecto no tiende a colonizar las viviendas (Monroy *et al.* 2003), mientras que en Costa Rica se ha observado una preferencia del vector por la región peridomiciliar (Zeledón, 2006)

Debido a lo anterior y a la variabilidad morfológica, conductual y de hábitat que *T. dimidiata* presenta, este se convierte en el mayor vector de Chagas en México y Centroamérica, y representa un reto importante en los esfuerzos de control (Cordón- Rosales *et al.* 1999).

Además del conocimiento de la historia evolutiva del vector, preferencia de hábitats, ciclo de vida, entre algunos aspectos, es importante conocer acerca de la estructuración genética de las poblaciones del vector (Dorn *et al.*, 2003).

El conocimiento de la estructura genética puede llegar a mostrar, si se trata de distintas subpoblaciones de *T. dimidiata*, que pueden diferir en la competencia o sensibilidad a los insecticidas. El análisis de la estructura poblacional entre las poblaciones puede darnos una idea de la dinámica poblacional entre subpoblaciones, y el área geográfica que es necesario cubrir para un control vectorial efectivo (Dorn *et al.* 2003).

Los esfuerzos focalizados de control en las localidades con mayor incidencia de la enfermedad, resultan inútiles si las poblaciones no se encuentran diferenciadas genéticamente; y debido a que la delimitación política de los países no corresponde con las fronteras biológicas de los organismos, es necesario conocer la dinámica poblacional de los vectores de enfermedades de importancia, para poder establecer estrategias de control vectorial regionales que permitan efectivamente la interrupción de la transmisión de la enfermedad.

Las aproximaciones moleculares en comparación con las técnicas tradicionales pueden contribuir sustancialmente al entendimiento de la historia evolutiva de Triatominae (Bargues *et al.* 2002), y los datos provistos por la genética de poblaciones son necesarios para la optimización de programas de control que se dirigen a la reducción del riesgo de la transmisión natural de la enfermedad de Chagas (Dumonteil, *et al.* 2002).

Recientemente, análisis de la secuencia completa de los genes del ADN ribosomal y sus espaciadores, han provisto de información significativa a niveles elevados de taxones como, género, especie, subespecie, híbridos, variedades y poblaciones (Bargues *et al.*, 2001 en Bargues, *et al.* 2002).

Los resultados obtenidos de la utilización del análisis de la secuencia del Segundo espaciador del ADN ribosomal para el estudio y diferenciación genética de poblaciones de *Triatoma dimidiata*, sugieren que el ITS 2, puede convertirse en el marcador de ADN por excelencia para estudios de Triatominae a niveles específicos y subespecíficos, que ayude a la dilucidación de históricos problemas en cuanto a la denominación taxonómica de *Triatoma dimidiata* y el flujo genético entre poblaciones (Remigio & Blair, 1997 citado en Bargues, *et al.* 2002).

5. OBJETIVOS

5.1. General

Comparar la variabilidad genética de trece poblaciones centroamericanas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) por medio del análisis de las secuencias del segundo espaciador interno transcrito del ADN ribosomal-ITS2- y observar su relación geográfica.

5.2. Específicos

5.2.1. Analizar las secuencias de los fragmentos de ADN producidos por amplificación del Segundo Espaciador Interno Transcrito del ADN ribosomal -ITS2-, para cada población.

5.2.2. Determinar relaciones genéticas de los grupos estudiados.

5.2.3. Determinar la existencia de grupos filogeográficos a través de la información provista por el análisis de agrupamiento y de haplotipos.

5.2.4. Determinar la existencia de flujo genético entre las poblaciones estudiadas y los grupos filogeográficos formados.

6. HIPÓTESIS

Existe variación genética entre las poblaciones de *Triatoma dimidiata*, evidenciada a partir del segmento correspondiente al segundo espaciador interno transcrito del ADN ribosomal –ITS2–

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Universo

7.1.1. Población

Poblaciones de *T. dimidiata* de Centroamérica.

7.2. Muestra

Especímenes de *T. dimidiata* de 13 poblaciones de Centroamérica.

7.2.1. Descripción de la muestra

Tabla 1: Descripción de los especímenes de la muestra y sitios de colecta

No	País	Departamento	Localidad	Ecotopo	Tamaño muestra Inicial
1	Guatemala	Jutiapa	La Brea	Intradomiciliar	10
2	Guatemala	Quiché	San Andrés Sajcabajá	Domiciliar	10
3	Guatemala	Petén	Sitio Arqueológico Yaxjá-Nakum-El Naranjo	Silvestre, palmera	10
4	Guatemala	Petén	San Luís	Silvestre, Palmera	10
5	Guatemala	Izabal	Los Amates	Silvestre, Palmera	10
6	Guatemala	Alta Verapaz	Lachua	Silvestre	10
7	Nicaragua	Río San Juan	El almendro	Intradomiciliar	10
8	Nicaragua	Carazo		Introdomiciliar	10
9	Honduras	Intibucá	San Marcos Sierra	Intradomiciliar	10
10	Honduras	Copán	El, Masical, San Antonio	Intradomiciliar	10
11	Costa Rica	Heredia	Cantón San Rafael y cantón Santo Domingo	Peridomiciliar	10
12	Panamá	Santa Fé	Veraguas	Intradomiciliar	10
13	El Salvador	Santa Ana		Intradomiciliar	10

Fuente: Datos experimentales.

7.2.2. Selección de la muestra

Las poblaciones analizadas en este estudio fueron elegidas en base a los intereses para el desarrollo de estrategias de control vectorial regional.

Cinco hembras y cinco machos de cada localidad, la muestra fue seleccionada a partir de un tamizaje realizado en otro estudio, a partir de análisis morfométricos y que permite la selección de los individuos encontrados en el centroide (así se denomina el área encontrada dentro de una gráfica de dispersión, donde confluyen el mayor número de puntos, que en este caso representan los especímenes estudiados) y que constituyen los individuos con las características morfológicas más representativas de la población (comunicación personal Licda Marianela Menes).

La técnica del análisis de ITS 2, ha reflejado ser lo suficientemente sensible con la utilización de muestras pequeñas (hasta un individuo). Por esta razón y por tratarse de una técnica costosa, la fase inicial, es decir el aislamiento de ADN, se realizó con una muestra de no más de 10 individuos por localidad (Marcilla *et al.* 2001, datos no publicados Dorn).

A pesar de que el tamaño inicial por sitio de colecta, como se mencionó era de 10 especímenes, a través de todo el proceso de tratamiento de ADN, hasta el análisis de secuencias, el tamaño muestral fue reduciéndose hasta quedar cada localidad con una muestra de tamaños desde tres, hasta un espécimen por localidad (en algunos casos quedó hasta eliminada la localidad). Las causas de reducción en el tamaño muestral son las siguientes:

El resultado de las amplificaciones: positiva o negativa (no todos los ADN extraídos presentaron amplificaciones positivas).

Secuenciación: Cuando fue posible se envió a secuenciación el ADN de cuatro especímenes que presentaron una amplificación positiva para el ADN blanco.

Legibilidad de Cromatogramas: Cuando se recibieron los cromatogramas (gráficas de contenido nucleotídico de las secuencias), no todos eran legibles, algunos por problemas presentados durante el proceso de secuenciación; y en otros casos como se verá más adelante la lectura de los cromatogramas de las secuencias es indescifrable, lo cual puede ser provocado por características inherentes a los especímenes de la localidad (como fue el caso de las

secuencias provenientes de Santa Ana, El Salvador; Carazo Nicaragua y Lachúa, cuyas secuencias de ninguno de sus especímenes presentaba un patrón convencional para la región) o puede ser causada por contaminación del segmento secuenciado.

Los problemas que ocasionaron la reducción del tamaño muestral, son característicos de los análisis de ITS, y se debe a que en algunos casos para ciertos especímenes no se presenta amplificación en la región de interés del ADN.

7.3. Recursos Humanos e Institucionales

Investigadora: Elizabeth Solórzano Ortiz

Asesoras: Licda. Patricia Landaverde, Licda. Bárbara Moguel.

Revisora: Licda. Antonieta Rodas.

Instalaciones y Personal Escuela de Biología

Instalaciones y Personal Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología.

Instalaciones e Investigadores: Licda Claudia Irene Calderón y el MsC. Sergio Melgar del departamento de Horticultura de la Universidad de Madison Wisconsin.

7.4. Recursos Materiales

Tabla 2: Equipo

pHmetro
Autoclave
Congelador -20 C
Termociclador de 24 pozos
Campana de flujo laminar
Transiluminador
Centrífuga
Refrigeradora
Balanza analítica
Estufa con mezclador
Cámara electroforética

Tabla 3: Reactivos

ARNasa
kit de purificación de ADN
Spray DNA free
1 Litro de Agua grado molecular
Tinte para montaje
Agarosa grado molecular
Galón de alcohol isopropílico
Galón de alcohol etílico
Frasco de bromuro de etidio
Cebadores 1 y 2
Dodecil sulfato de sodio
NaCl
EDTA
Tris
HCl
Acetato de potasio
Enzima <i>Taq</i> polimerasa Recombi-Nante
dNTP's
Cloruro de Magnesio
Buffer de PCR
NaOH
Sucrosa

7.5. Instrumentos para registro y medición de las observaciones

Para los datos de los individuos que se amplificaron y se corrieron por electroforesis, se utilizaron boletas en las cuales se colocó el código de identificación de cada individuo de la población en la colección entomológica del Laboratorio, además en las boletas se colocó el nombre de la persona que realizó el procedimiento, la fecha, hora y observaciones si las hubieron (**ver Anexo 15**).

7.6. Métodos

El método implica la colecta y preparación del material biológico (las chinches). Sin embargo en la entomoteca del laboratorio se contaba previamente a la elaboración de este trabajo con los especímenes que serían utilizados.

Los especímenes fueron colectados en diferentes años previos a la elaboración de este trabajo y la colecta fue realizada por diferentes instituciones; los especímenes provenientes de Guatemala fueron colectados por personal del LENAP y El Ministerio de Salud, en el caso de los especímenes que no provienen de Guatemala, estos fueron adquiridos por donaciones o intercambios hechos por las instituciones que se mencionan a continuación:

Honduras: Médicos sin fronteras, Doctor Carlos Ponce, MSP.

El Salvador: Ministerio de Salud, Curso sobre colecta de Vectores de la Enfermedad de Chagas.

Nicaragua: Ministerio de Salud Nicaragua (MINSA), Doctora Francisca Marín.

Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBio).

Panamá: Instituto Conmemorativo GORGAS de Estudios de la Salud en Panamá, Doctor Azael Saldaña.

Una vez colectadas, las chinches fueron introducidas a una base de datos dentro de la colección de referencia del LENAP. De manera que los especímenes se encontraban clasificados según la especie de triatmino y el país de procedencia.

Los especímenes tomados de la entomoteca fueron, como se mencionó anteriormente, sometidos a un estudio fenético (Morfometría de cabezas), realizado por los investigadores del LENAP, Licda Marianela Menes y Mauricio García, este estudio fenético permitió seleccionar a los especímenes más representativos (fenéticamente) de cada población. Posteriormente se realizó la extracción de ADN a partir de las extremidades de los triatominos.

7.6.1. Aislamiento de ADN

Para realizar el aislamiento del ADN de los especímenes de estudio, primero fue necesario preparar una serie de soluciones que se utilizaron en el proceso y para la elaboración de un buffer de extracción (**ver Anexo 16**).

El proceso de extracción de ADN implicó la remoción de las extremidades de los especímenes, desde la coxa hasta la punta, intentando obtener la mayor cantidad de músculo posible, posteriormente la maceración de las patas en un tubo de microcentrífuga, con ayuda de un pistilo y utilizando los reactivos y las temperaturas (descritas abajo). Este proceso permite la liberación del ADN de las células y su separación y eliminación de otras sustancias que se encuentran en la misma.

El protocolo de extracción que se utilizó para aislar el ADN de las chinches es el mismo que fue previamente desarrollado por Cohen en 1982 y descrito por Dorn *et al.* (2003), con las modificaciones descritas en Calderón *et al.* (2004).

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

Adultos y 5° Estadio: 2 patas.

4 y 3° estadio: 3 patas.

2° estadio: 4 patas.

1° estadio: el individuo entero

En este caso sólo se utilizaron individuos adultos, por requerimientos de la técnica fenética previa (**ver Anexo 1**)

-Las patas se extrajeron del espécimen con pinzas estériles (las pinzas se flamearon entre cada muestra, con ayuda de etanol y un mechero).

-Se realizó un lavado de las patas con 500 µl etanol y luego con agua.

-Las patas se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, debidamente identificados.

-Se agregó 100µl del buffer de extracción.

-Se maceraron las muestras con pistilos estériles.

- Se centrifugaron momentáneamente para homogenizar todo al fondo del tubo de ensayo.
- Se incubaron las muestras a 65° C durante 15 -30 minutos.
- Se agregaron 14µl de K-Acetato 8M frío para una concentración final de 1M.
- Se mezclaron e incubaron en hielo durante 15 minutos.
- Se centrifugaron en frío 10 minutos a máxima velocidad (a 14,000rpm).
- Se alícuotaron 200µl de etanol frío al 95%.
- Se transfirió el sobrenadante para cada muestra al tubo con etanol frío al 95%, en ese momento se observó la formación de una sustancia blanquecina como un halo, el cual correspondía a los fragmentos de ADN.
- Las muestras se agitaron suavemente.
- Se incubaron en hielo 10 min., luego se centrifugaron 20 min. en frío a máxima velocidad (14,000 rpm). Después de esto se observó la formación de un precipitado blanquecino, en el cuál se encuentra el ADN aislado.
- Se descartó el sobrenadante.
- Se lavó el precipitado (hebras de ADN) en 100 µl etanol al 70 % y después en etanol al 95%.
- Se dejó secar el precipitado por 12 horas.
- Se disolvió el precipitado en 50 µl de TE estéril con 1U ARNasa.
- Las muestras se almacenaron a -70°C.

7.6.2. Amplificación de ADN

Una vez extraído el ADN de los especímenes de estudio se realizó la amplificación del ADN objetivo, esto a partir de la preparación de una mezcla maestra que debía contener todos los reactivos para que la Reacción en Cadena de la Polimerasa se llevara a cabo. La amplificación se realizó utilizando los cebadores del ITS2 Cebador 1 (delantero o como es comúnmente conocido, por su nombre en inglés “forward”)= 5’CTA AGC GGT GGA TCA CTC GG3’) y el ITS2 Cebador 2 (reverso o como se conoce comúnmente por su nombre en inglés “reverse”)= 5’GCA CTA TCA AGC AAC ACG ACT C3’).

Ambos cebadores son complementarios a los segmentos adyacentes a la región de interés (cuya secuencia fue obtenida de: Marcilla *et al.* 2001), y a partir de las condiciones de los ciclos térmicos, previamente descritos en el mismo.

Las muestras se amplificaron en un termociclador Applied Bio Systems, según la programación de los ciclos de temperaturas necesarias para que el proceso se desarrollara, el producto fue clonado para el ITS 2 completo, como se describe a continuación.

7.6.2.1. Preparación de Mezcla Maestra

La mezcla maestra se realizó como fue previamente descrito por Marcilla en el 2001, con las modificaciones descritas en el Informe de EPS de Solórzano, 2006.

Tabla 4: Mezcla Maestra

Reactivo	Volumen para 1 reacción	Concentración Final
Agua ultrapura libre de ADNAsas	16.6 microlitros	--
MgCl ₂	1 microlitros	2.22mM
Termo buffer	2.5 microlitros	1.11X
Dntp's	0.1 microlitros	0.44mM
Cebador	0.1 microlitros (de c/u, P1 y P2)	100pmol/ul
Taq Polimerasa Recombinante	0.2 microlitros	1 unidad/ul
ADN (producto de extracción)	2 microlitros	---

Receta de Mezcla Maestra para amplificación de ITS2 de *Triatoma dimidiata*, nombre del reactivo, Volumen utilizado y concentración final de cada reactivo en la solución.

Fuente: Datos experimentales.

La mezcla se realizó en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones; posteriormente se alicuotó en unidades de 20.5 microlitros en tubos PCR y luego a cada alícuota se le agregaron 2 microlitros de cada uno de los productos de extracción del ADN de la muestra.

Más tarde se realizó el proceso de amplificación en un termociclador (Gene Amp PCR Systems 2400 de Applied Biosystems) utilizando los siguientes ciclos como fueron descritos en el protocolo de amplificación elaborado por Marcilla en el 2001.

7.6.2.2. Ciclos de temperatura de Amplificación

94 °C 2 minutos

25 ciclos de:

94 °C – 30 segundos

58 °C – 30 segundos

72 °C – 30 segundos

Y por último 72 °C – 7 minutos

7.6.3. Montaje y Corrimiento de Geles

Luego se realizó el montaje de los productos de amplificación en geles de agarosa para su corrimiento electroforético y lectura en un transiluminador, para comprobar la presencia de la banda de ADN de interés, como se detalla a continuación:

7.6.3.1. Preparación de los geles

-Se mezclaron 1.5 g. de agarosa y 150 ml. de TBE (1% de agarosa)

-Se calentó la solución hasta que la agarosa se disolvió.

-Se enfrió más o menos a 60° C, se le agregó una gota de bromuro de etidio (10mg/ml), se mezcló y se vertió en el molde.

Para trabajar con bromuro de etidio debió utilizarse guantes, bata, y tener sumo cuidado en su manipulación, ya que se trata de un agente cancerígeno

(Dorn, 2003).

7.6.3.2. Montaje de Geles

-Se cubrió el gel con una película fina de TBE 0.5X.

-Se mezclaron 2µl de colorante, se cargó en la micropipeta y se mezcló con 2µl de muestra de ADN amplificado y se vertió en el pozo del gel.

-Se corrió el gel en la cámara de electroforesis, a 110 voltios hasta que la marca de la muestra llegó a 2 dedos del final del gel, esto fue aproximadamente por 1 hora.

-Al tercer y ante penúltimo pozo del gel se les colocó el marcador molecular; en este caso se utilizó el Phi (100bp) (Dorn, 2003).

7.6.4. Lectura y Fotografiado de Geles

-Los geles fueron revelados en un transiluminador a una longitud de onda de luz UV de 256nm., para observar si se había obtenido la banda de ADN de interés.

-Se tomó una fotografía digital con una cámara Nikon de 7.2 mega píxeles que posteriormente se analizó en la computadora.

-Las observaciones fueron descritas en las boletas de registro de la electroforesis.

Las imágenes digitales fueron importadas a una computadora y posteriormente fueron analizadas utilizando el paquete de cómputo Gene Profiler V 4.1, para comprobar que la banda obtenida presentaba el peso molecular esperado, al ser comparada y alineada con una regla o marcador molecular.

7.6.5. Purificación de Productos de PCR

Después de haber obtenido el producto de la PCR, se realizó una purificación del ADN presente en los amplicones, esto se realizó utilizando un kit comercial de purificación de productos de PCR, el cuál utiliza un proceso de purificación por medio de arrastre a través de columnas.

La purificación de ADN se realizó siguiendo el protocolo de manufactura contenido en el kit de purificación para productos de PCR PureLink, Invitrogen ®, como se describe a continuación:

-Se añadieron 10 ml. de isopropanol al 100% a 54 ml. de un buffer de unión.

-Se añadieron 32 ml. de etanol 96-100% a 8 ml de un buffer de lavado.

-Se añadieron 4 volúmenes del buffer de unión con isopropanol a 1 volumen de producto de PCR (50-100ul).

-Se mezcló bien.

- A un tubo en una columna giratoria se le añadió la muestra con el buffer.
- Se centrifugó la columna a temperatura ambiente a 1,000 rpm por 1 minuto.
- Luego se descartó el fluido y se colocó de nuevo la columna en el tubo colector
- Para lavar el ADN se añadieron 650 ul de buffer con etanol a la columna.
- Más tarde se centrifugó la columna a 10,000rpm /g/1min.
- Se descartó el fluido del tubo colector y se colocó la columna en el tubo.
- Se centrifugó la columna a máxima velocidad, a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos para remover cualquier residuo del buffer de lavado.
- Se descartó el tubo colector.
- Para eluir el ADN se colocó la columna giratoria en un tubo de elusión.
- Se añadieron 50 ul de buffer de elusión o agua destilada estéril (pH>7) al centro de la columna.
- Se incubó la columna en un cuarto a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Se centrifugó la columna a máxima velocidad por 2 minutos.
- Del tubo de elusión que contenía el producto de PCR purificado se retiró y descartó la columna.
- Y se recuperó un volumen de aproximadamente 48 microlitros.
- Posteriormente se almacenó el purificado a -20 °C.

7.6.6. Secuenciación de ADN

Una vez purificados los productos de PCR, se procedió a preparar cada una de las muestras en tubos de centrífuga de 1.5 ml. que posteriormente fueron almacenados en hielo seco para ser enviados al Departamento de Horticultura en la Universidad de Madison-Wisconsin con el MsC. Sergio Melgar, quien realizó el proceso de secuenciación en un secuenciador automático, utilizando la técnica de los dideoxinucleótidos también conocida como Método de Sanger.

La razón por la cuál no se realizó el proceso de secuenciación en Guatemala, fue porque en el momento en que se desarrolló el proceso, en el país no existía ningún secuenciador que se encontrara en funcionamiento.

7.7. Análisis

7.7.1. Edición, Análisis y Obtención de Secuencias Consenso

Como se mencionó anteriormente la muestra inicial fue reduciéndose por varias razones, como la ausencia de amplificaciones positivas, resultados electroforéticos (se eligieron como mínimo tres especímenes por población para la secuenciación), cromatogramas ilegibles causados por patrones de secuencias obtenidos no convencionales, probablemente inherentes a las poblaciones utilizadas (como fue el caso de El Salvador y Carazo Nicaragua, en los cuales todas las secuencias analizadas presentaban cromatogramas con más de una lectura de secuencia o como en El Salvador, donde no fue posible encontrar el inicio ni final del segmento ITS2), de manera que la muestra se redujo a 22 especímenes como se describe más adelante.

Una vez realizada la secuenciación se obtuvieron archivos que contenían los cromatogramas (**Ver Anexo 17**) de cada uno de los individuos secuenciados (dos cromatogramas por individuo debido a que se realizaron lecturas en dos direcciones 3'-5' y 5'-3').

Utilizando el paquete de cómputo Chromas Pro versión 1.41 (Technelysium, 2003--2007), las secuencias contenidas en los cromatogramas fueron revisadas, cortadas y editadas, además se realizó la transformación de dirección de lectura de las secuencias reversas, para posteriormente realizar un ensamblaje (unión de lecturas de la secuencia en ambas direcciones) en el paquete de cómputo DNAMAN versión 5.2.9 (Lynnon Bio Soft, 1994-2001), en este último también se realizó la obtención de secuencias consenso para cada individuo y posteriormente todas las secuencias consenso obtenidas, de todos los especímenes analizados, fueron alineadas.

Como una forma de verificación y para transformación de formato de las secuencias, se realizó la alineación también en el paquete de cómputo Clustal X version 1.83 (Higgins, 1988, 1989); ambas alineaciones fueron revisadas manualmente.

7.7.2. Análisis Filogeográficos

Utilizando el software DNAMAN versión 5.2.9. y para propósitos de comparación se construyeron dos tipos de árboles, el primero utilizando el método de Kimura, el cual utiliza la Divergencia Observada de las secuencias; y aplica los dos parámetros de corrección de Kimura (Kimura, 1980).

El segundo árbol construido fue el de Máxima Probabilidad o Verosimilitud (Maximum Likelihood), el cual busca una estimación de las distancia filogenéticas entre dos secuencias con rangos de mutación estimados de las secuencias actuales (Hasegawa *et al*, 1985). Para el modelo de ADN existen tres parámetros: Alpha/Beta ratio (=4), AlphaY/R ratio (=1) y Beta12 ratio (=1).

Ambos árboles se construyeron a partir de una matriz de distancia utilizando el método del vecino más cercano o como es conocido comúnmente “Neighbor-Joining method” (Saitou y Nei, 1987). Además en la construcción de los árboles de Máxima Probabilidad y Kimura, para acceder a un soporte estadístico se realizó un análisis de remuestreo (conocido comúnmente como bootstrap) con 10,000 permutaciones (Felsenstein, 1985). El método de bootstrap envuelve la creación de un nuevo juego de datos por un muestreo aleatorio con reemplazo, lo cual resulta en juegos de datos del mismo tamaño que el original, pero algunos caracteres han sido dejados afuera y otros duplicados. El método asume que los caracteres evolucionan independientemente (Felsenstein, 1985, en DNAMAN, 1994-2001). Además en la construcción de los árboles se utilizó como grupo externo la secuencia para el ITS2 de *Triatoma nítida* obtenida del Genbank

7.7.2.1. Mapa de distribución de Grupos Filogeográficos

Para comprender espacialmente las interacciones y dinámica genética de las poblaciones analizadas, utilizando el Sistema de Información Geográfica (SIG), en un mapa de Centroamérica se colocaron los puntos correspondientes a cada espécimen en su sitio de colecta, cada punto que representaba a cada espécimen fue coloreado de acuerdo al grupo al cuál perteneció en el análisis Filogeográfico (de acuerdo a los clados observados en el dendograma).

7.7.3. Genética de Poblaciones

Para el desarrollo de los análisis de genética de poblaciones en todos los casos se excluyeron los sitios con grietas (vacíos) en la alineación, para no sobreestimar las diferencias entre secuencias.

7.7.3.1. Análisis de Genética de Poblaciones sin Asignación de Grupos:

7.7.3.1.1. Análisis de Haplotipos:

Utilizando el paquete de computó DnaSP se procedió a la asignación de haplotipos para la totalidad de las secuencias analizadas.

7.7.3.1.2. Distancia Genética

Utilizando el paquete de cómputo DNAMAN versión 5.2.9 se construyó una matriz de distancia a partir de la alineación. Esta matriz muestra las distancias relacionadas entre todos los pares de secuencias en la alineación. Los valores bajos presentan baja divergencia (alta homología) entre dos secuencias.

El método utilizado para el cálculo de las distancias en la matriz fue el de Kimura. Este método utiliza la Divergencia Observada, y aplica los dos parámetros de corrección de Kimura. (Kimura, 1980; DNAMAN, 1994-2001).

7.7.3.1.3. Estimadores e Índices de Diversidad Genética

La diversidad genética y el flujo genético dentro y entre las poblaciones de *Triatoma dimidiata* estudiadas fue evaluada utilizando el paquete de cómputo DnaSP versión 4.10.9 (Rozas *et al*, 2006), calculando los siguientes índices y estimadores: Haplotipos (Nei ,1987); Diversidad Haplotípica (Nei y Tajima, 1981 en Vera 2006); Diversidad Nucleotídica, Pi (Nei, 987); Diversidad Nucleotídica con las correcciones de Jukes and Cantor, Pi (Jukes and Cantor, 1969).

7.7.3.1.3.1. Análisis de Polimorfismo

Para acceder a la información de polimorfismo de las secuencias correspondientes al segmento ITS 2 del ADN ribosomal de los especímenes analizados, utilizando el paquete de computo DNASP versión 4.1., se realizaron tres tipos de análisis de polimorfismo para las 22 secuencias obtenidas, se realizó un análisis de sitios polimórficos, de datos intraespecíficos y graficas de polimorfismo, estos tres análisis permitieron obtener información acerca del número y ubicación de sitios invariables, polimórficos, parsimonicamente informativos, con grietas en la alineación, así como número total de sitios variables, número total de mutaciones, contenido de citosina-guanina, diversidad haplotípica y nucleotídica, número de mutaciones por secuencia y por sitio, además las gráficas permitieron observar la distribución espacial (posiciones en pares de bases en la secuencia) de la mutaciones, sitios polimórficos y diversidad nucleotídica.

7.7.3.2. Análisis de Genética de Poblaciones por Sitio de Muestreo

Para los análisis de flujo genético es necesario nombrar las secuencias como pertenecientes a una población, de manera que, inicialmente las poblaciones se agruparon de acuerdo a su sitio de muestreo de la siguiente forma:

- Petén Palmera (secuencias obtenidas de especímenes provenientes de San Luís Petén, Guatemala y colectados en palmera)
- Petén Trampa de Luz (secuencias obtenidas de especímenes provenientes de San Luís, Petén, Guatemala y colectados en trampas de luz)*
- Quiché (secuencias provenientes de especímenes colectados en San Andrés Sajcabaja, Quiché, Guatemala)
- Izabal (secuencias provenientes de especímenes colectados en palmeras en Los Amates, Izabal, Guatemala)
- La Brea (secuencias obtenidas de especímenes provenientes de La Brea, Jutiapa, Guatemala)
- Honduras Intibucá (secuencias obtenidas de especímenes colectados en El lodo Negro, Sierra Intibucá, Honduras)

- Honduras Copán (secuencias obtenidas de especímenes colectados en El Masical, San Antonio Copán, Honduras)*
- Panamá Santa Fe (secuencias provenientes de especímenes colectados en El Macho, Santa Fe, Veraguas, Panamá)
- Nicaragua (secuencias obtenidas de especímenes colectados en El Almendro, Río San Juan, Nicaragua)*
- Costa Rica (secuencias obtenidas de especímenes provenientes de Heredia, Costa Rica)

* Estas Poblaciones (Petén Luz, Copán Honduras, Nicaragua) fueron excluidas en los análisis de flujo genético por el propio paquete de computo (DnaSP), por no cumplir con el número mínimo de secuencias para la realización de los análisis (dos secuencias).

7.7.3.2.1. Análisis de Flujo Genético

El flujo genético se computó en el programa DnaSP y se calcularon las siguientes medidas de flujo genético:

De la información provista por los datos de la secuencia nucleotídica, se calcularon índices de fijación (F_{st}) (Hudson *et al*, 1992b) y N_{st} (Jukes and Cantor, 1969; Lynch and Crease, 1990) y número de migrantes por generación (N_m) (Hudson *et al*, 1992b; Lynch and Crease 1990, Wright 1951)

La estimación del N_m se basa en el modelo de islas de estructura poblacional, existen distintas formas para el calculo del N_m dependiendo del tipo de información del segmento de ADN utilizado, para este caso se utilizaron especificaciones de un organismo diploide, para un locus autosómico: $F_{st}, \gamma_{st}, N_{st} = 1 / (1 + 4N_m)$.

7.7.3.2.2. Análisis por pares de poblaciones (por sitio de muestreo)

Con base en los resultados obtenidos por el análisis de genética de poblaciones denominando como grupos a los especímenes por procedencia, posteriormente se realizo un análisis por pares de aquellas poblaciones que se deseaba obtener información más detallada.

7.7.4. Análisis de Genética de Poblaciones por grupos Filogeográficos

A partir de los resultados obtenidos en el análisis filogeográfico, se decidió realizar un análisis de genética de poblaciones para acceder a la información de flujo genético entre los grupos formados por el análisis de agrupamiento con los parámetros evolutivos de Kimura, así se realizó un análisis extra denominando como grupo a cada clado formado en el árbol de la siguiente manera:

Tabla 5: Distribución de Grupos Filogeográficos

Grupo Filogeográfico	Descripción de Grupo
Grupo Filogeográfico 1	Grupo formado por los siguientes especímenes pertenecientes a Quiché y Yaxja Petén (Quiché Guate 1, 2 y 3, Palmera San Luís Petén Guate 1 y 2).
Grupo Filogeográfico 2	Grupo formado por los siguientes especímenes pertenecientes a Costa Rica; Nicaragua; La Brea, Jutiapa y Los Amates Izabal Guatemala; Intibuca, Honduras; (HerediaCostaRica1, 2 y 3, RioSanJuanNicaragua, IntibucáHonduras 1, 2 y 3, PalmeraIzabalGuate 2 y 3, LaBreaJutiapaGuate1 y 2)
Grupo Filogeográfico 3	Grupo formado por los siguientes especímenes colectados en El Macho, Santa Fe Panamá (SantaFePanama 1, 2 y 3).
Grupo Filogeográfico 4	Especimen aislado colectado en Trampa de Luz, en Yaxjá, Petén, Guatemala (YaxhaGuate)*.
Grupo Filogeográfico 5	Especimen aislado colectado en palmera en Los Amates Izabal (PalmeraIzabalGuate 1)*.
Grupo Filogeográfico 6	Especimen aislado colectado en Copán Honduras (CopanHonduras)* .

Fuente: Datos experimentales obtenidos de una Análisis Filogeográfico con los parámetros de Kimura en el paquete de cómputo DNAMAN

Para estas agrupaciones se calcularon al igual que en el análisis por sitio de muestreo, estimadores e índices de diversidad genética y también se desarrollo un análisis de Flujo genético.

* Estos grupos fueron excluidos de los análisis por el software DnaSP, por no contar con el número mínimo de especímenes (secuencias) necesarias (dos secuencias).

7.7.4.1. Análisis por Pares (por Grupos Filogeográficos)

Al igual que en el análisis de genética poblacional por sitios de muestreo, en el análisis de genética poblacional de los grupos filogeográficos observados, se procedió a realizar un análisis por pares para los primeros tres grupos filogeográficos.

8. RESULTADOS

8.1. Obtención y Alineación de Secuencias

Se obtuvieron 22 secuencias de *Triatoma dimidiata* como se describe a continuación:

Tabla 6: Número de secuencias obtenidas del total de especímenes tratados

No	Nomenclatura de población	Departamento	Localidad	Ecotopo	Número Final de Secuencias Analizadas	Código de Espécimen en Colección de LENAP	Código de Secuencia de cada espécimen en Análisis
1	La Brea	Jutiapa, Guatemala	La Brea	Intradomiciliar	2	cA3429Br	LaBreaJutiapaGuate1
						cA3431Br	LaBreaJutiapaGuate2
2	Quiché	Quiché, Guatemala	San Andrés Sajcabajá	Domiciliar	3	cA2607Q	QuicheGuate1
						cA3615Q	QuicheGuate2
						cA4184Q	QuicheGuate3
3	Petén Palmera	Petén, Guatemala	San Luís	Silvestre, palmera	2	cA3559ppal	PalmeraSanLuisPetén1
						cA4250ppal	PalmeraSanLuisPetén2
4	Petén Luz	Petén, Guatemala	Sitio Arqueológico Yaxjá-Nakum-El Naranjo	Silvestre, Trampa de luz	1	cA5887pluz	
5	Izabal	Izabal, Guatemala	Los Amates	Silvestre, Palmera	3	cA5651I	PalmeraIzabalGuate1
						cA6041	PalmeraIzabalGuate2
						cA6043	PalmeraIzabalGuate3
6	Nicaragua	Río San Juan, Nicaragua	El Almendro	Intradomiciliar	1	cTNIC316	RioSanJuanNicargua
7	Honduras Intibucá	Sierra Intibucá, Honduras	El Lodo Negro San Marcos	Intradomiciliar	3	chNO4158I	IntibucaHonduras1
						chNO4160I	IntibucaHonduras2
						chNO4375 I	IntibucaHonduras3
8	Honduras Copán	San Antonio Copán, Honduras	El Masical	Intradomiciliar	1	chNO53102	CopanHoduras
9	Costa Rica	Heredia, Costa Rica	Cantón San Rafael y cantón Santo Domingo	Peridomiciliar	3	cA21CR	HerediaCostaRica1
						c25ACR	HerediaCostaRica2
						c57ACR	HerediaCostaRica3
10	Panamá	Santa Fé	Veraguas	Intradomiciliar	3	cSF027	SantaFePanama1
						cSF053	SantaFePanama2
						cSF059	SantaFePanama3
11	Grupo Externo <i>Triatoma nitida</i>	Obtenido del Gen bank			1	cT.nitida	Triatoma nitida

Fuente: Datos experimentales.

Además se obtuvieron secuencias de 3 especímenes de El Salvador, sin embargo estas secuencias carecían completamente de similitud con la secuencia de ITS2 registradas de otros especímenes de *Triatoma dimidiata*, por lo tanto no pudo realizarse la edición y posteriores análisis de estas secuencias. No pueden definirse las causas específicas de dicha variación, sin embargo la particularidad de dichas secuencias es importante de remarcar, como se detalla en la discusión de resultados.

8.1.1. Alineación de Secuencias

Después de la revisión, edición de secuencias y obtención de secuencias consenso se obtuvo la alineación de las secuencias consenso junto con la secuencia del grupo externo, como puede observarse en el **Anexo18**.

La longitud del segmento perteneciente al ITS-2 presentó una variación en los especímenes de *Triatoma dimidiata* analizados que va de 473 a 477 pares de bases (pb), sin embargo en la alineación sin el grupo externo, la secuencia final abarcó 479 sitios nucleotídicos.

8.2. Análisis Filogeográficos

Inicialmente se realizó un análisis de agrupamiento de las secuencias obtenidas de los especímenes estudiados, en este primer análisis de agrupamiento se utilizaron los dos parámetros evolutivos de Kimura (Kimura 2-Parameters):

Basado en dicho fundamento el programa DNAMAN se construyó el siguiente dendograma:

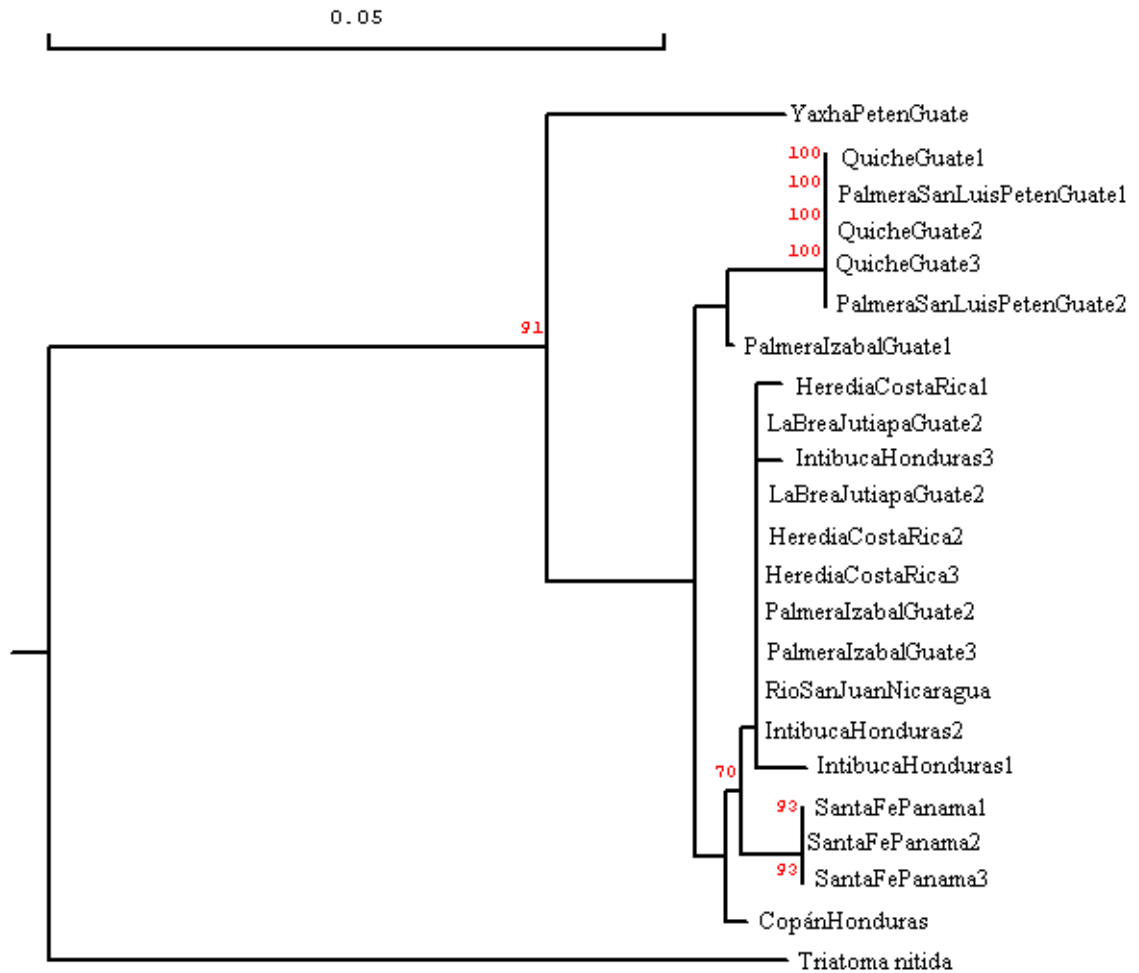


Figura 1: Árbol con raíz, construido con base en los parámetros de Kimura con 10,000 pseudorreplikaciones, en el software DNAMAN. En las ramas se muestran los porcentajes de aparición de cada uno de los grupos en todas las permutaciones del bootstraps.

Fuente: datos experimentales.

Como se mencionó en la sección de métodos, para fines de comparación se construyó un árbol de Máxima Probabilidad (Maximum Likelihood), y como también se mencionó antes, este método de agrupamiento busca una estimación de las distancia filogenéticos entre dos secuencias con rangos de mutación estimados de las secuencias actuales, y se basa en buscar el árbol más probable en base al modelo evolutivo aplicado, que en este caso es el de

Neighbor joining (Hasegawa et al, 1985), el árbol construido bajo este método en el software DNAMAN se muestra a continuación.

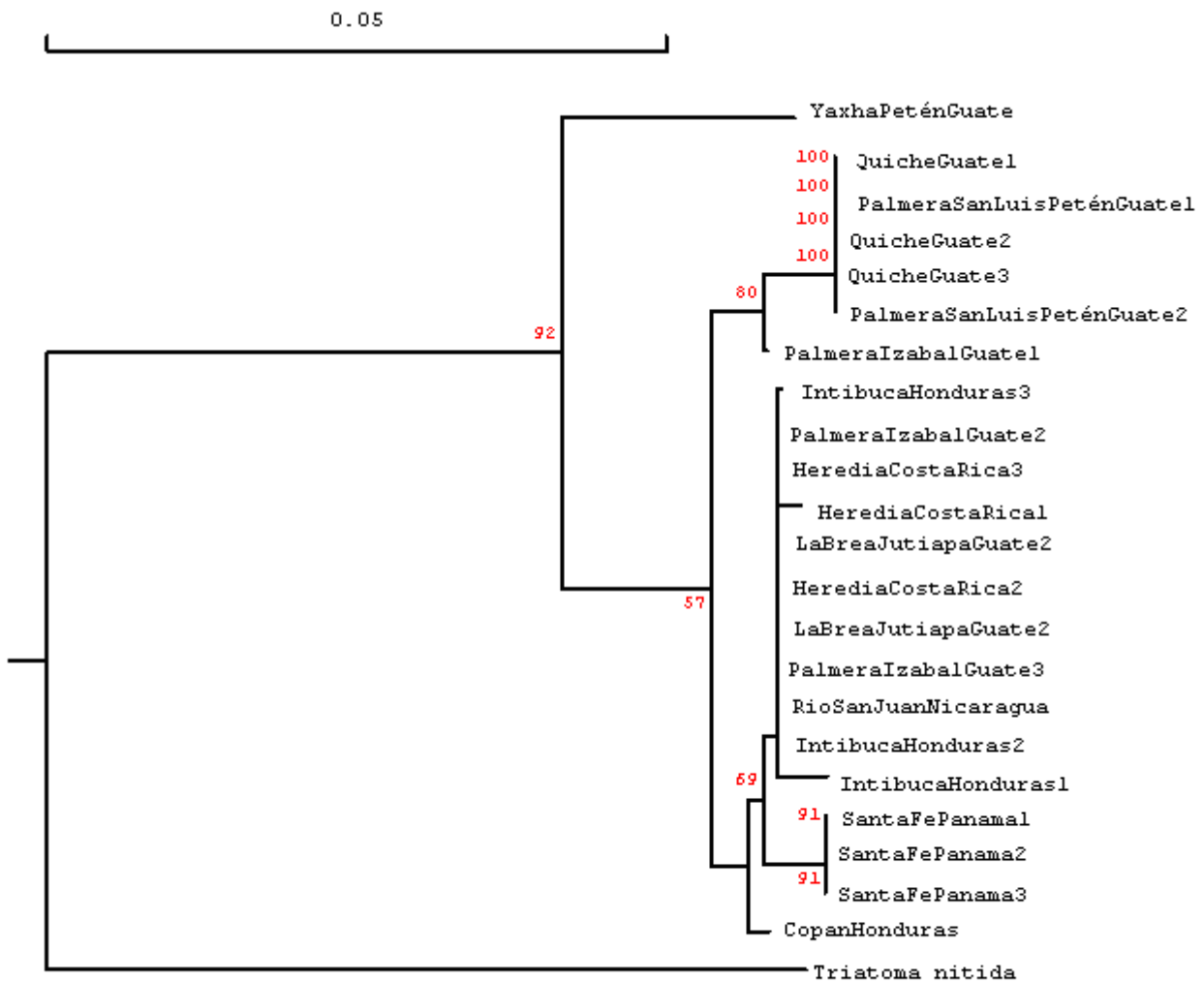
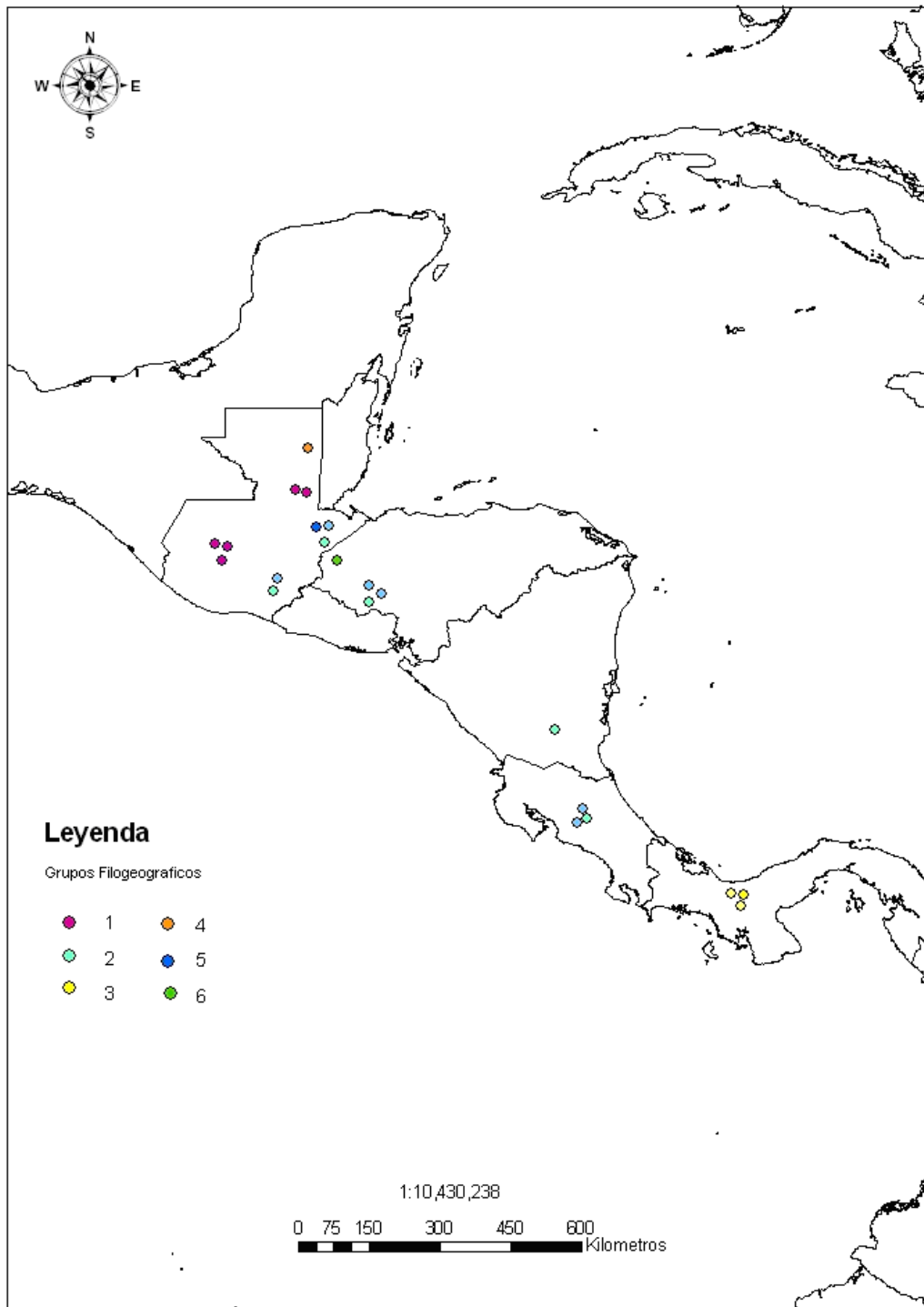


Figura 2: Árbol con raíz construido con base en los parámetros de Máxima similitud y Neighbor joining, en el programa DNAMAN. En las ramas de la figura se muestran los porcentajes de aparición obtenidos de cada uno de los grupos en todas las permutaciones del bootstraps.
Fuente: datos experimentales

8.2.1. Mapa de Distribución de Grupos Filogeográficos

Se superpusieron los puntos de colecta marcados según el clado de pertenencia, observado en el análisis de agrupamiento, sobre un mapa de Centroamérica.



Mapa1: Mapa de Centroamérica con distribución de grupos obtenidos en el análisis Filogeográfico. El Mapa fue realizado en el Sistema de Información Geográfico (SIG) (por Pavel García). La descripción de los grupos Filogeográficos es la que se encuentra arriba, a cada grupo se le asignó un color, cada punto en el mapa representa la secuencia de un espécimen. Fuente: datos experimentales.

8.3. Genética de Poblaciones

8.3.1. Análisis de Genética de Poblaciones Sin Asignación de Grupos

Se calcularon inicialmente índices de polimorfismo del ADN para datos intraespecíficos, este análisis incluyó a las 22 secuencias estudiadas, obteniendo los siguientes resultados:

Utilizando el software DnaSP se realizó un análisis de haplotipos:

Información del análisis:

Número de secuencias utilizadas: 22

Región seleccionada: 1- 479pb Número de sitios: 479

Número total de sitios (excluyendo sitios con grietas / datos perdidos): 472

No se consideraron los sitios con grietas alineadas (7)

Número de sitios variables: 26

Al igual que en estudios previos (Bargues, 2008) se encontró el microsatélite interrumpido $(AT)_{4-5}TTT(AT)_{5-7}$ detectado entre las posiciones 47 – 73, en todos los especímenes estudiados.

8.3.1.1 Análisis de Haplotipos

En el total de secuencias analizadas, excluyendo los sitios con grietas en la alineación (7), se encontró la existencia de nueve haplotipos diferentes y una diversidad haplotípica elevada de 0.8225, los haplotipos se distribuyeron de la siguiente forma:

Tabla 7: Distribución de Haplotipos

Haplotipo	Secuencias dentro del Haplotipo
Haplotipo 1	5 secuencias [Quiche Guate 1, 2 ,3; Palmera San Luis Petén Guate 1 y 2]
Haplotipo 2	1 secuencia [Palmera Izabal Guate 1]
Haplotipo 3	1 secuencia [Heredia Costa Rica 1]
Haplotipo 4	8 secuencias [Río San Juan Nicaragua; Palmera Izabal Guate 2 y 3; La Brea Jutiapa Guate 1 y 2; Heredia Costa Rica 2 y 3; Intibuca Honduras 2]
Haplotipo 5	1 secuencia [Intibuca Honduras 3]
Haplotipo 6	1 secuencia [Intibuca Honduras 1]
Haplotipo 7	1 secuencia [Copán Honduras]
Haplotipo 8	3 secuencias [Santa Fe Panamá 1, 2 y 3]
Haplotipo 9	1 secuencia [Yaxha Petén Guate (colectada con trampa de luz)]

Fuente: Datos experimentales obtenidos de una análisis de haplotipos en el paquete de computo DNASP

8.3.1.2. Distancia Genética

Utilizando el programa DNAMAN se construyó una matriz de las distancias genéticas entre cada espécimen analizado, a partir de la información provista por la secuencia del ITS 2, basada en los dos parametros evolutivos de Kimura

Matriz 1: Matriz de distancias Genéticas basado en los cálculos de los parámetros evolutivos de Kimura

	QuichéGuat e1	PalmeraSanL uisPetenGuat e1	QuichéGuat e2	QuichéGuat e3	PalmeraSanL uisPetenGuat e2	PalmeraIz abalGuate 1	SantaFe Panama 1	SantaFe Panama 2	SantaFe Panama 3	Heredia CostaRica 1	Intibuca Honduras 3
QuichéGuat 1	0										
PalmeraSanL uisPetenGuat e1	0	0									
QuichéGuat 2	0	0	0								
QuichéGuat 3	0	0	0	0							
PalmeraSanL uisPetenGuat e2	0	0	0	0	0						
PalmeraIzaba lGuate1	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0					
SantaFePana ma1	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.013	0				
SantaFePana ma2	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.013	0	0			
SantaFePana ma3	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.013	0	0	0		
HerediaCosta Rica1	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.013	0.008	0.008	0.008	0	
IntibucaHond uras3	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.013	0.008	0.008	0.008	0.004	0
RioSanJuanN icaragua	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002
PalmeraIzaba lGuate2	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002
PalmeraIzaba lGuate4	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002
LaBreaJutiap aGuate1	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002
LaBreaJutiap aGuate3	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002
HerediaCosta Rica2	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002
HerediaCosta Rica4	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002
IntibucaHond uras2	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.015	0.011	0.011	0.011	0.006	0.006
IntibucaHond uras2	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002
CopanHond uras	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.006	0.011	0.011	0.011	0.006	0.006
YaxhaPetenG uate	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.039	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037
cT.nitida	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117	0.115	0.122	0.122	0.122	0.122	0.122

	RioSanJuanNicaragua	PalmeraIzabalGuate2	PalmeraIzabalGuate4	LaBreaJutiapaGuate1	LaBreaJutiapaGuate3	HerediaCostaRica2	HerediaCostaRica4	IntibucaHonduras2	IntibucaHonduras2	CopanHonduras	YaxhaPetenguate	cT.nitida
QuichéGuat e1												
PalmeraSan LuisPetenguate1												
QuichéGuat e2												
QuichéGuat e3												
PalmeraSan LuisPetenguate2												
PalmeraIzabalGuate1												
SantaFePanama1												
SantaFePanama2												
SantaFePanama3												
HerediaCostaRica1												
IntibucaHonduras3												
RioSanJuanNicaragua	0											
PalmeraIzabalGuate2	0	0										
PalmeraIzabalGuate4	0	0	0									
LaBreaJutiapaGuate1	0	0	0	0								
LaBreaJutiapaGuate3	0	0	0	0	0							
HerediaCostaRica2	0	0	0	0	0	0						
HerediaCostaRica4	0	0	0	0	0	0	0					
IntibucaHonduras2	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0				
IntibucaHonduras2	0	0	0	0	0	0	0	0.004	0			
CopanHonduras	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.008	0.004	0		
YaxhaPetenguate	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.037	0.035	0.039	0	
cT.nitida	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.125	0.12	0.12	0.12	0

Los valores en negrita son los valores más altos y más bajos de similitud, los cuales se mencionan en la sección de discusión.

Fuente: Datos Experimentales

8.3.1.3. Estimadores e Índices de Diversidad Genética

8.3.1.3.1. Análisis de Polimorfismo de ADN

Análisis de Sitios Polimórficos

Utilizando el software DnaSP se identificaron los sitios con grietas alineadas, sitios invariables, polimórficos, número de mutaciones, sitios parsimonicamente informativos y sitios variables encontrados una sola vez; los resultados obtenidos se tabulan a continuación:

Tabla 8: Análisis de Sitios Polimórficos

Sitios con grietas alineadas o datos perdidos	7
Sitios Invariables (monomórficos)	446
Sitios Variables (polimórficos)	26
Número total de mutaciones	27
Sitios con variante de copia única (singleton sites)	18
Sitios de parsimonicamente informativos	8
Sitios con variante de copia única (singleton) (dos variantes)	17
Posición de los sitios	17 25 29 89 108 143 195 208 214 306 310 311 320 358 415 428 442
Sitios de parsimonicamente informativos (dos variantes)	8
Posición de sitios	24 43 150 194 274 394 398 401
Sitios con variante de copia única (tres variantes)	1
Posición del sitio	107
Sitios parsimonicamente informativos (tres variantes)	0
Sitios variables (cuatro variantes)	0

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

Análisis de Datos Intraespecíficos (Polimorfismo de ADN)

Utilizando el Software DnaSP, para la totalidad de los datos se identificaron, el número de pares de bases contenidas en el segmento analizado, el número de sitios analizados excluyendo las grietas, número total de sitios variables, número total de mutación, contenido de citosina guanina, la diversidad haplotípica y nucleotídica, su varianza y desviación estándar, el número de haplotipos, el número de mutaciones por secuencia y por sitio:

Tabla 9: Polimorfismo de ADN (datos intraespecíficos)

Número de secuencias	22
Número de secuencias utilizadas	22
Región seleccionada	1-479 pares de bases (pb)
Número de sitios	479
Número Total de sitios (excluyendo sitios con grieta / datos perdidos)	472
Número de sitios variables, S	26
Número Total de Mutaciones, Eta	27
Contenido de Guanina + Citosina, G+C	0.235 (de 472.00 sitios)*
Número de Haplotipos, h	9
Diversidad Haplotípica (gen), Hd	0.823
Varianza de la diversidad Haplotípica	0.00363
Desviación Estándar de la Diversidad Haplotípica	0.06
Diversidad Nucleotídica (por sitio), Pi	0.01067
Varianza de Muestreo de Pi	0.0000066
Desviación Estándar de Pi	0.00257
Número promedio de diferencias Nucleotídicas, k	5.03463
Theta (por secuencia) de Eta	7.40668
Theta (por sitio) de Eta	0.01569

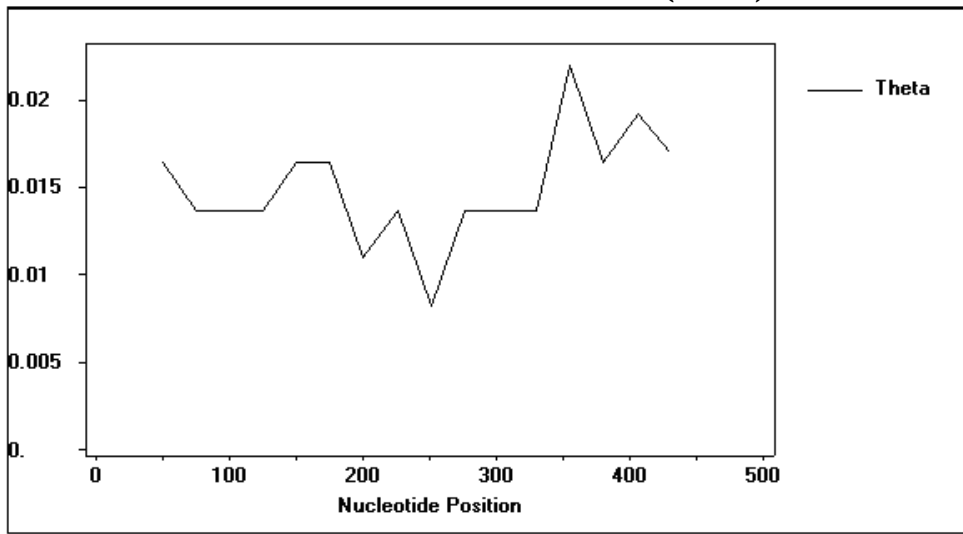
Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp. Este calculo se realizó usando el número total de mutaciones.

* El contenido de Guanina + Citosina encontrado en este estudio para la región del ADN analizada es muy similar al encontrado para este marcador en estudios previos (Bargues, 2008), presentando un sesgo de Adenina-Timina.

Graficas de Polimorfismo de ADN

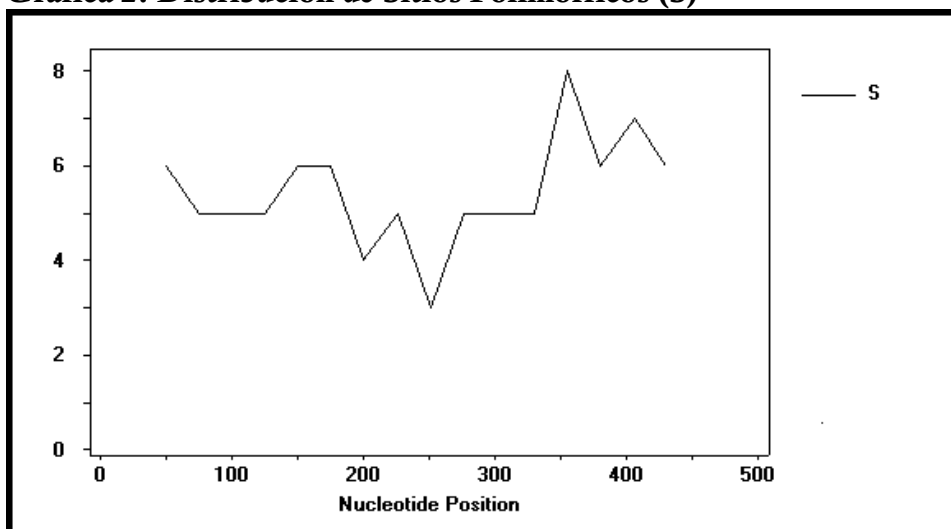
A partir de los datos del polimorfismo del ADN para la totalidad de las secuencias se plotearon gráficas para la distribución de las mutaciones, sitios polimórficos y diversidad nucleotídica a través de las posiciones nucleotídicas.

Gráfica 1: Distribución de Mutaciones Totales (Theta)



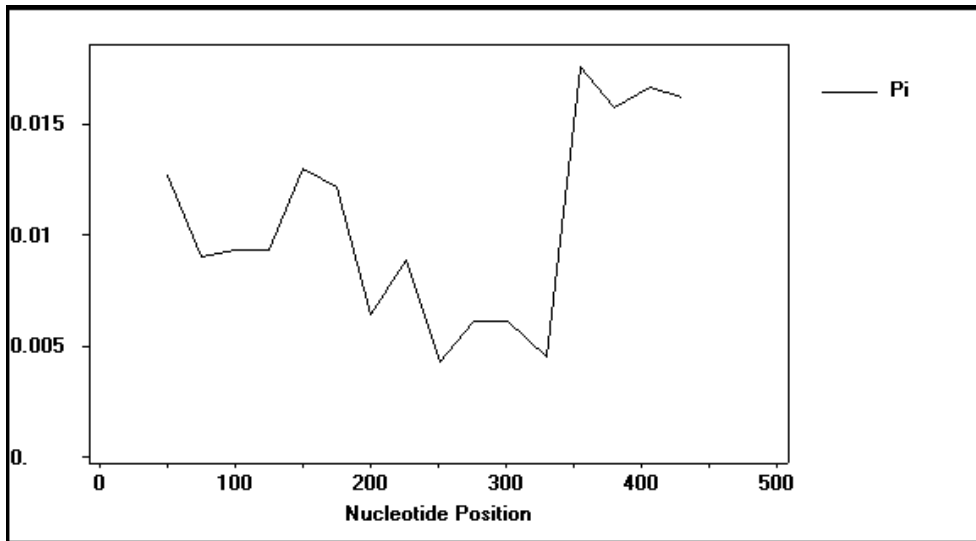
Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAMAN.

Gráfica 2: Distribución de Sitios Polimórficos (S)



Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAMAN.

Gráfica 3: Distribución de la Diversidad Nucleotídica



Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAMAN

8.4.2. Análisis de Genética de Poblaciones por Sitio de Muestreo

8.4.2.1. Análisis de Flujo Genético

Flujo Genético y Diferenciación Genética

Como se especificó en la sección de métodos, en el análisis de flujo genético se requirió la exclusión de algunas poblaciones por no contar con el número mínimo de secuencias requerido por el programa DNAsp (dos secuencias).

Número de poblaciones incluidas: 7

Región seleccionada: 1-479 Número de sitios: 479

Los sitios con grietas en el alineamiento fueron: Excluidos

Total de sitios (excluyendo las grietas): 472

Diferenciación Genética

Tabla 10: Diferenciación Genética (análisis por sitio de muestreo)

Índice/Población	Quiché, Guate	Petén, Palmera, Guate	Izabal, Guate	Heredia, Costa Rica	Intibuca, Honduras	La Brea, Jut, Guate	Santa Fe, Panamá
Número de secuencias:	3	2	3	3	3	2	3
Número de sitios segregados, S:	0	0	5	1	3	0	0
Número de haplotipos, h:	1	1	2	2	3	1	1
Diversidad Haplotípica, Hd:	0.00000	0.00000	0.66667	0.66667	1.00000	0.00000	0.00000
Promedio en el número de diferencias nucleotídicas, K:	0.00000	0.00000	3.33333	0.66667	2.00000	0.00000	0.00000
Diversidad Nucleotídica, Pi:	0.00000	0.00000	0.007	0.0014	0.0042	0.00000	0.00000
Diversidad Nucleotídica de Jukes and Cantor JC, PiJC:	0.00000	0.00000	0.00705	0.0014	0.00422	0.00000	0.00000

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

Flujo Genético

Tabla 11 Flujo Genético (análisis por sitio de muestreo)

Información/ Índices	Nm	Fst	Nst
Información de datos de Haplotipos			
Nei 1973	0.22		
Información de datos de Secuencia			
Nei 1982	0.04		
Lynch and Crease 1990 (con las correcciones de Jukes and Cantor)	0.05		0.82205
Hudson, Slatkin y Maddison 1992	0.005	0.82119	

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

Total de Datos Estimados para las 7 Poblaciones Analizadas

Número total de secuencias: 19

Número de sitios segregados, S: 13

Número de haplotipos, h: 7

Diversidad Haplotípica, Hd: 0.80117

Promedio en el número de diferencias nucleotídicas, Kt: 4.38596

Diversidad Nucleotídica, PiT: 0.00921

8.4.2.2. Análisis por Pares de Poblaciones (por sitio de muestreo)

Se realizó una comparación entre las poblaciones designadas por sitio de muestreo a partir de un análisis de divergencia de ADN por pares de poblaciones, de aquellas poblaciones que se deseaba tener información respecto a su diversidad genética por casos particularmente interesantes:

Para contribuir a la información provista por los análisis filogeográficos se procedió a realizar un análisis por pares de poblaciones entre las secuencias de los especímenes provenientes de Quiché y Petén, debido a que estas poblaciones formaron la agrupación más reciente en el análisis filogeográfico, mostrando valores de diversidad nucleotídica y de promedio de diferencias nucleotídicas de cero.

Tabla 12: Divergencia de ADN (análisis por pares de poblaciones, Petén Palmera y Quiché)

Índice/población	Quiché	Petén Palmera	Datos totales	Entre Poblaciones
Número de secuencias	3	2	5	
Número de sitios polimórficos	0	0	0	
Número total de mutaciones	0	0	0	
Promedio de las diferencias nucleotídicas, k:	0	0	0	
Diversidad Nucleotídica, Pi(1)	0	0	0	
Diversidad Nucleotídica de Jukes y Cantor, Pi(1)JC	0	0		
Desviación Estándar de Pi(1)JC	0	0		
Número de diferencias fijadas:				0
Mutaciones polimórficas en la población 1, pero monomórficas en la población 2:				0
Mutaciones polimórficas en la población 2, pero monomórficas en la población 1:				0
Mutaciones Compartidas:				0

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

También se compararon las poblaciones de La Brea, Jutiapa correspondiente al grupo filogeográfico 2 y Petén Palmera, correspondiente al grupo filogeográfico 1, debido a que estas se encontraban en diferentes grupos de los dos clado mayores de las poblaciones analizadas, mostrando que entre dichas secuencias existe una diferencia de ocho sitios polimórficos, con una diversidad nucleotídica baja 0.00112, pero con un valor promedio de diferencia nucleotídicas alta (5.33).

Tabla 13: Divergencia de ADN (análisis por pares de poblaciones, Petén Palmera y La Brea, Jutiapa)

Índice/Población	La Brea, Jutiapa, Guatemala	Petén Palmera	Datos totales	Entre Poblaciones
Número de secuencias	2	2	4	
Número de sitios polimórficos	0	0	8	
Número total de mutaciones	0	0	8	
Promedio de las diferencias nucleotídicas, k:	0	0	5.333	
Diversidad Nucleotídica, Pi(1)	0	0	0.0112	
Diversidad Nucleotídica de Jukes y Cantor, Pi(1)JC	0	0		
Desviación Estándar de Pi(1)JC	0	0		
Número de diferencias fijadas:				8
Mutaciones polimórficas en la población 1, pero monomórficas en la población 2:				0
Mutaciones polimórficas en la población 2, pero monomórficas en la población 1:				0
Mutaciones Compartidas:				0

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

En cuanto a la comparación entre la población del grupo filogeográfico 2 (La Brea, Jutiapa) y la población tomada del grupo filogeográfico 3 (Santa Fe, Panamá), las cuales pertenecen a la misma bifurcación pero que se diferencian más recientemente, tanto el valor de diversidad nucleotídica (0.00378), como el promedio de diferencias nucleotídicas (1.8), fue menor que para la comparación grupo 1 con 2.

Tabla 14: Divergencia de ADN (análisis por pares de poblaciones, La Brea, Jutiapa y Santa Fe, Panamá)

Índice/Población	La Brea, Jutiapa, Guatemala	Santa Fe, Panamá	Datos totales	Entre Poblaciones
Número de secuencias	2	3	5	
Número de sitios polimórficos	0	0	3	
Número total de mutaciones	0	0	3	
Promedio de las diferencias nucleotídicas, k:	0	0	1.8	
Diversidad Nucleotídica, Pi(1)	0	0	0.00378	
Diversidad Nucleotídica de Jukes y Cantor, Pi(1)JC	0	0		
Desviación Estándar de Pi(1)JC	0	0		
Número de diferencias fijadas:				3
Mutaciones polimórficas en la población 1, pero monomórficas en la población 2:				0
Mutaciones polimórficas en la población 2, pero monomórficas en la población 1:				0
Mutaciones Compartidas:				0

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

Tabla 15: Flujo Genético entre pares de Poblaciones

Población 1	Población 2	Nst	Fst
Quiché	Petén Palmera	0.00000	0.00000
Quiché	Izabal	0.73767	0.73684
Quiché	Costa Rica	0.96041	0.96000
Quiché	Intibucá Honduras	0.88995	0.88889
Quiché	La Brea Jutiapa	1.00000	1.00000
Quiché	Santa Fe Panamá	1.00000	1.00000
Palmera de Petén	Izabal	0.73767	0.73684
Palmera de Petén	Costa Rica	0.96041	0.96000
Palmera de Petén	Intibucá Honduras	0.88995	0.88889
Palmera de Petén	La Brea Jutiapa	1.00000	1.00000
Palmera de Petén	Santa Fe Panamá	1.00000	1.00000
Izabal	Costa Rica	0.00079	0.00000
Izabal	Intibucá Honduras	0.00142	0.00000
Izabal	La Brea Jutiapa	0.00000	0.00000
Izabal	Santa Fe Panamá	0.58304	0.58333
Costa Rica	Intibuca Honduras	0.00000	0.00000
Costa Rica	La Brea Jutiapa	0.00000	0.00000
Costa Rica	Santa Fe Panamá	0.90034	0.90000
Intibucá Honduras	La Brea Jutiapa	-0.00094	0.00000
Intibucá Honduras	Santa Fe Panamá	0.75067	0.75000
La Brea Jutiapa	Santa Fe Panamá	1.00000	1.00000

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

8.4.3. Análisis de Genética de Poblaciones por Grupos Filogeográficos

Número de Poblaciones Incluidas: 3

Región seleccionada: 1-479 Número de sitios: 479

Los sitios con grietas alineadas fueron: Excluidos

Sitios totales (excluyendo grietas alineadas): 476

8.4.3.1. Análisis de Flujo Genético

Flujo Genético y Diferenciación Genética entre Grupos Filogeográficos

Diferenciación Genética entre Grupos Filogeográficos

Tabla 16: Diferenciación Genética Grupo filogeografico1

Grupo 1 (Haplotipo1)	
Número de secuencias	5
Número de sitios segregados, S	0
Número de haplotipos, h	1
Diversidad Haplotípica, Hd	0
Promedio de las diferencias, K	0.0000
Diversidad Nucleotídica, Pi	0.0000
Diversidad Nucleotídica con JC, PiJC	0.0000

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

Tabla 17: Diferenciación Genética Grupo Filogeográfico 2

Grupo 2 (haplotipos 3,5,6)	
Número de secuencias	11
Número de sitios segregados, S	4
Número de haplotipos, h	4
Diversidad Haplotípica, Hd	0.49091
Promedio de las diferencias, K	0.72727
Diversidad Nucleotídica, Pi	0.00153
Diversidad Nucleotídica con JC, PiJC	0.00153

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

Tabla 18: Diferenciación Genética Grupo Filogeográfico 3

Grupo 3 (haplotipo 8)	
Número de secuencias	3
Número de sitios segregados, S	0
Número de haplotipos, h	1
Diversidad Haplotípica, Hd	0
Promedio de las diferencias, K	0
Diversidad Nucleotídica, Pi	0
Diversidad Nucleotídica con JC, PiJC	0

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

Estimaciones Totales

Número de secuencias: 19

Número de sitios segregados, S: 13

Número de haplotipos, h: 6

Diversidad Haplotípica, Hd: 0.76023

Promedio de las diferencias, Kt: 4.18713

Diversidad Nucleotídica, PiT: 0.00880

Flujo Genético entre Grupos Filogeográficos

Tabla 19 Flujo Genético (entre grupos Filogeográficos)

Información/ Índices	Nm	Fst	Nst
Información de datos de Haplotipos			
Nei 1973	0.16		
Información de datos de Secuencia			
Nei 1982	0.03		
Lynch and Crease 1990 (con las correcciones de Jukes and Cantor)	0.01		0.96145
Hudson, Slatkin y Maddison 1992	0.01	0.96117	

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

8.4.3.2. Análisis por Pares de Poblaciones (por Grupo Filogeográfico)

Tabla 20: Divergencia de ADN (entre grupos filogeográficos)

Índice/Población	Grupo 1: Haplotipo1	Grupo 2: Haplotipos3,4,5,6	Grupo 3: Haplotipo8
Número de secuencias:	5	11	3
Número de sitios segregados, S:	0	4	0
Número de haplotipos, h:	1	4	1
Diversidad Haplotípica, Hd:	0	0.49091	0
Promedio de diferencias nucleotídicas, K:	0	0.72727	0
Diversidad Nucleotídica, Pi:	0	0.00153	0
Diversidad Nucleotídica de Jukes and Cantor JC, PiJC:	0	0.00153	0

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

Flujo Genético entre pares de Grupos Filogeográficos

Tabla 21: Flujo Genético (entre pares de grupos filogeográficos)

Población 1	Población 2	Nst	Fst
Grupo filogeográfico 1 (haplotipo 1)	Grupo filogeográfico 2 (haplotipos 3,4,5,6)	0.95693	0.95652
Grupo filogeográfico 1 (haplotipo 1)	Grupo filogeográfico 3 (haplotipo 8)	1.00000	1.00000
Grupo filogeográfico 2 (haplotipos 3,4,5,6)	Grupo filogeográfico 3 (haplotipo 8)	0.89216	0.89189

Fuente: Datos Experimentales obtenidos del programa DNAsp.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

9.1. Análisis Filogeográficos (Análisis de Agrupamiento)

9.1.1. Tres Agrupaciones Principales y Distribución Geográfica de Grupos observados en el Análisis de Agrupamiento:

El análisis de agrupamiento utilizando los parámetros de agrupación del Vecino más cercano, con el modelo evolutivo de Kimura (Kimura, 1980), a partir de la información provista por las secuencias del segmento del Segundo Espaciador Interno Trascrito del ADN ribosomal - ITS 2 -, mostró la existencia de diferenciación de las muestras en tres grandes grupos, el soporte de las ramas fue provisto por el análisis de permutación con 10,000 replicaciones de la prueba (bootstrap), los valores encontrados van desde el 57 al 100% de aparición (ver figura 1).

Al sobreponer las agrupaciones en un mapa de Centro América (**Ver Mapa 1**), se observó una clara coincidencia con las características fisiográficas de Centroamérica. Centroamérica nuclear es convenientemente dividida en dos bloques: El Maya (también llamado Yucatán) y el Chortí (Donnelly *et al.*, 1990).

La división entre ambos bloques es la zona de sutura del Motagua, que sigue el río Motagua en el este y centro de Guatemala, pero cuya extensión oeste se encuentra enterrada por una cubierta volcánica de origen Terciario en el oeste de Guatemala. El bloque Maya incluye a Guatemala al norte de la zona de sutura del Motagua, Belice, la Península de Yucatán y México al oeste del Istmo de Tehuantepec. El bloque Chortí incluye el sur de Guatemala, El Salvador, Honduras y una parte indeterminada al norte de Nicaragua y en la región cubierta por agua de la plataforma de Nicaragua (Donnelly *et al.*, 1990)

De las agrupaciones formadas el primer grupo (grupo filogeográfico 1), se encuentra formado por los especímenes de la población domiciliar de San Andrés Sajcabaja, Quiché y la población silvestre colectada en palmeras de San Luís Petén (haplotipo 1, ver tabla 5 y 7), su distribución geográfica corresponde a la región norte de Centroamérica; al ser sobrepuesta en

un mapa tectónico presenta una coincidencia con la existencia del Bloque Maya de la placa de Norteamérica (Ver Anexo 19, Mapa tectónico) recién mencionado y cuya división del Bloque Chortí es evidente por la falla Polochic-Motagua y cuyas rocas cristalinas de origen Paleozoico conforman las sierras de Cuchumatanes, Chamá, Chuacús, de las Minas y del Mico (Marshall, 2006; Méndez, 2001)

Relacionado con el grupo uno también pudo notarse que el análisis colocó al espécimen proveniente de Yaxjá, Petén (colectado con trampa de luz) como el más lejano, como si se tratara de un grupo externo.

Debido a lo anteriormente mencionado y a la gran variación genética y fenética de especímenes en la región norte de Guatemala (bloque Maya) y la Península de Yucatán, que se ha encontrado en estudios previos (Bargues, 2002; Bargues, 2007; Bargues, 2008), se sospecha que esta región puede tratarse del centro de origen, diferenciación y dispersión de la especie, y debido a que la falla Polochic-Motagua representa un aislamiento geográfico para el flujo genético, se presume que la dispersión sur del insecto se dio por transporte pasivo, es decir que fue transportado probablemente por el hombre o los hospederos del *T. dimidiata* de los bosques de la Península de Yucatán y la región norte de Guatemala (bloque maya) atravesando la Falla Polochic-Motagua en cargas como la madera o en animales hospederos.

Otra evidencia de esta hipótesis es la escasa variación genética observada (en este análisis) en el segundo grupo que describiré (y al cual llamare grupo filogeográfico 2), que pertenece a la región que comprende al sur de la Falla Polochic-Motagua; en este grupo se observó una uniformidad (con ligeras variaciones, graduales) en las secuencias de los especímenes provenientes de la región de Guatemala al sur de la Falla (poblaciones domiciliarias de Honduras (a excepción de Copán); población de Río San Juan, Nicaragua y peridomiciliar de Heredia, Costa Rica (haplotipos 3, 4,5 y 6)) hasta la región del Cinturón Deformado del Centro de Costa Rica (CCDB, Marshall, 2006); este segundo grupo, el grupo correspondiente a la región central de Centroamérica presenta variaciones graduales que de no

haber sido considerados varios puntos de muestreo la diferencias genéticas podrían haber sido sobreestimadas (efecto Wahlund¹).

Se sospecha que dicho Cinturón (CCDB) también ha funcionado como una barrera geográfica a la dispersión de *T. dimidiata* al sur del cinturón al igual que la Falla Polochíc-Motagua para el grupo uno. Sin embargo como en el caso anterior el hombre y los hospederos del insecto pueden haber jugado un papel de dispersores, permitiendo la llegada del insecto a Panamá (grupo tres, ver tabla 7), cuyos especímenes provenientes de la región de El Macho, Santa Fe, formaron un grupo que fue muy bien diferenciado en el análisis de agrupamiento. Ya que los tres especímenes provenientes de la región presentaban exactamente el mismo haplotipo (haplotipo 8, ver tabla 7), el grupo formado por los especímenes de Santa Fe, Panamá, se encontró muy bien diferenciado de los demás grupos en el análisis evolutivo, pero con mayor cercanía a los especímenes del grupo dos (región media de Centroamérica) apoyando una vez más la hipótesis de dispersión propuesta.

Es importante además recalcar que la uniformidad en las secuencias del grupo tres es probablemente debida a que aunque *Triatoma dimidiata* también se ha encontrado en la costa del Pacífico de Colombia y la Costa Atlántica de Perú, El Canal de Panamá probablemente ha provisto de una barrera para el flujo genético entre estos especímenes y los de Panamá, lo cuál indicaría que al carecer de flujo genético de los especímenes al norte y sur de Panamá, esta se trata de una población altamente endogámica y vulnerable, debido a la escasez de variación genética, lo cual tiene implicaciones importantísimas en el control vectorial, como se explica más adelante.

Existen diversos modelos de flujo génico para explicar la diferenciación genética entre poblaciones que básicamente se diferencian por grado de proximidad geográfica, como es el caso observado para nuestras poblaciones (Vera, 2006).

Entre 1943 y 1969 Wright propuso los modelos de isla y el de aislamiento por distancia más conocido como IBD (por sus siglas en ingles, isolation -by- distance model), en el primer

¹ Efecto Wahlund: Reducción de la heterocigocidad debido a la mezcla de individuos de diferentes fuentes genéticas (Jonson and Black, 1984).

modelo la población original se divide en grupos locales separados, o islas, dentro de los cuales los individuos se cruzan aleatoriamente, ocurriendo solo una pequeña cantidad de inmigración al azar desde cualquier otra isla; en el segundo modelo las poblaciones se encuentran uniformemente repartidas en el espacio y la diferenciación entre ellas depende de la capacidad de dispersión de los individuos, haciendo que el intercambio de individuos sea inversamente proporcional a su distancia geográfica (Wright 1943, 1969 en Vera 2006). Un tercer modelo intermedio fue propuesto por Kimura en 1953, el cuál se denomina “stepping stone”, en este las poblaciones se encuentran separadas pero linealmente ordenadas, de manera que básicamente la migración se produce entre poblaciones contiguas (Kimura, 1953 en Vera 2006).

Por lo anterior expuesto se considera que la dispersión de las poblaciones de *T. dimidiata* analizadas más que responder estrictamente al modelo de islas de Wright, presentan diferentes tipos de dispersión dependiendo de la escala a la cual se analizan. De manera que al analizar las trece poblaciones como un continuo, se podría decir que se encuentran distribuidas de acuerdo a un modelo de islas, con poblaciones estructuradas y limitadas por las características fisiográficas del área, como la existencia de barreras geográficas como la Falla Polochic-Motagua, el Cinturón deformado del Centro de Costa Rica y El Canal de Panamá, las cuales han funcionado como barreras para el flujo genético. Pero si se analiza a una escala menor, al observar las características e interacciones de las secuencias de los especímenes del grupo Filogeográfico dos, podría decirse que este responde más fielmente al modelo “stepping stone” propuesto por Kimura, como lo evidencia el cambio gradual de haplotipos en la región media de Centroamérica.

9.2. Análisis de Genética de Poblaciones

9.2.1. Análisis de Haplotipos

9.2.1.1. Distribución de Haplotipos

En el análisis de distribución de haplotipos, se encontraron nueve haplotipos diferentes, como se describió en la tabla 7. Cada haplotipo es una secuencia diferente encontrada, éstas pueden variar de tan solo uno a cientos de nucleótidos, los especímenes (secuencias) que se

encuentran dentro del mismo haplotipo cuentan con las mismas secuencias, como es el caso de las siguientes agrupaciones: haplotipo 1 (Quiché y San Luís Petén palmeras), haplotipo 4 (Carazo Nicaragua, Izabal Palmera (dos de los tres especímenes), La Brea Jutiapa, Costa Rica (dos de los tres especímenes y uno de los tres especímenes de Intibucá Honduras), haplotipo 8 (todos los especímenes de Santa Fe Panamá).

Por otro lado se encontraron 5 haplotipos aislados (2, 3, 5, 6, 7 y 9, ver tabla 7), sin embargo estos haplotipos pueden encontrarse más o menos cercanos de otros haplotipos (número de variaciones de nucleótidos, y también las relaciones dependen del tipo de cambio encontrado (inserciones-delecciones, transiciones o transversiones) y esas relaciones fueron evaluadas como se discutió en la sección anterior por los análisis de agrupamiento, pero además por análisis de diferenciación genética.

Para esta investigación se consideraron dos tipos de estadísticos para medir la diferenciación y flujo genético, los primeros se denominan “estadísticos de secuencias”, que no toman en cuenta solo la información de variación de haplotipos, sino, también la información cuantitativa y cualitativa de los cambios nucleotídicos en que varían unos de otros (Hudson, 1992a), por esta razón se realizaron análisis de estadísticos de secuencias (F_{st} , N_{st} y N_m) agrupando poblaciones establecidas por su procedencia geográfica y otro análisis se realizó para detectar la variación entre los grupos formados por los clados del análisis filogeográfico.

El segundo tipo de estadísticos estimados se denominan “estadísticos de haplotipos” los cuales se basan en las frecuencias haplotípicas en la muestra como la diversidad haplotípica, para estos estadísticos no importa si dos haplotipos difieren por uno o por cientos de nucleótidos (Hudson, 1992a), y para este segundo tipo de estadísticos también se realizó por aparte análisis por procedencia geográfica como por grupos filogeográficos.

9.2.2. Distancia Genética

En la sección de resultados se muestra la matriz de distancia genética. La información provista por la matriz de distancias genéticas es un soporte cuantitativo a las agrupaciones formadas por el análisis de Kimura y ML.

Los valores de distancia genética van de cero a uno, entre más cercano es el valor a uno, son más lejanas evolutivamente las secuencias, en la tabla se destacan los ceros los cuales indican que las secuencias son iguales o que las diferencias entre estas son despreciables (según los parámetros evolutivos de Kimura, 1980) y también se destacan los valores de distancia genética más altos encontrados.

Se presume que los especímenes colectados en Yaxja con trampa de luz, provienen de cúmulos de piedras del sitio arqueológico y/o de madrigueras de animales de la región (comunicación personal Ph.D. Carlota Monroy, Licda Marianela Menes, Licda Bárbara Moguel). Por lo cuál los altos índices distancia genética observados durante el análisis podrían contribuir a la formulación de una de dos hipótesis:

-La primera es que al encontrarse en estos sitios con características particulares se han aislado de otros especímenes de regiones cercanas pero de diferentes “ecotopos”, y que esto esté provocando un proceso de especiación.

-La segunda hipótesis es que se trata de organismos de origen primitivo y que el aislamiento dado por sus refugios ha permitido la permanencia de su acervo genético.

Por si solos los resultados del análisis de distancias genéticas del ITS 2 no puede contribuir al esclarecimiento de estas dos hipótesis, sin embargo los análisis filogeográficos nos muestran que una vez aplicados los parámetros evolutivos existe una mayor relación entre el espécimen de trampa de luz con el grupo externo.

9.2.3. Distribución de Polimorfismo de ADN

Al analizar las gráficas de polimorfismo de ADN pudo observarse que existe una concordancia entre los tres tipos de polimorfismos ploteados (mutaciones, diversidad nucleotídica y número de sitios polimórficos), en cuanto a la distribución de éstos en las posiciones nucleotídicas del ITS 2, observándose un pico de polimorfismo en las secuencias, aproximadamente entre las posiciones 360 a 400, como se muestra en las gráficas 1, 2 y 3, indicando que es esta región la que aporta la mayor cantidad de diferenciación genética entre los especímenes, lo cual es evidente al observar la alineación de las secuencias.

9.2.4. Análisis de Genética de Poblaciones por Sitio de Muestreo

Para los análisis de diversidad haplotípica, y nucleotídica por sitio de muestreo tuvo que dejarse de lado las poblaciones de Yaxja, Petén, Guatemala y Copán, Honduras; debido a que estas carecían del número mínimo de secuencias necesarias para el desarrollo de estas pruebas (2).

Respecto a la diversidad haplotípica, esta se presentó en el análisis por sitios muestreados, desde cero en las muestras monomórficas (Quiché; Petén, palmera, Guatemala; La Brea, Jutiapa, Guatemala y Santa Fe, Veraguas Panamá), hasta valores moderadamente altos (0.667) en el caso de Izabal y Heredia Costa Rica, y muy altos para Intibuca Honduras (1), en el cuál las tres muestras del sitio presentaron todas diferentes haplotipos (ver tabla 7 y 10).

En cuanto a la diversidad nucleotídica, esta, al igual que la haplotípica se presentó desde cero para las muestras monomórficas, pero en este caso el siguiente valor (0.0014) fue para Heredia Costa Rica que contaba con tres secuencias y dos haplotipos al igual que Izabal pero solamente presentó dos sitios segregados, seguido de este valor se encontró el de Honduras (0.0042) que presentó tres muestras con tres haplotipos diferentes y tres sitios segregados, y el valor más alto lo presentó Izabal Guatemala que contó con tres muestras, dos haplotipos diferentes y cinco sitios segregados, fue esto último lo que elevó el valor de diversidad nucleotídica con respecto a las muestras de Heredia, Costa Rica. Izabal, Guatemala también presentó el mayor valor de K (promedio en el Número de diferencias nucleotídicas), dejando a este como el sitio muestreado y analizado más variable de todos, seguido de Intibucá Honduras y Heredia Costa Rica (ver tabla 7 y 10).

Aunque esta información es importante como fue mencionado antes es un tanto artificial ya que las divisiones políticas no son correspondientes necesariamente con las barreras biológicas y por ello se decidió realizar un análisis de los mismos estimadores, esta vez con base en el análisis de agrupamiento obtenido y de haplotipos.

Sin embargo es importante remarcar que el anterior análisis de haplotipos indica que diferentes países pueden compartir los mismos haplotipos, lo cual es evidencia de flujo genético y alertante respecto a la creación de estrategias de control regionales.

9.2.5. Análisis de Genética de Poblaciones por agrupación Filogeográfica

Al realizar un nuevo análisis de diversidad haplotípica y nucleotídica, esta vez designando grupos de acuerdo a las principales agrupaciones observadas en el dendograma, éste mostró valores desde cero en diversidad haplotípica y nucleotídica para los grupos monomórficos 1 y 3, hasta un valor medio de diversidad haplotípica (0.49) para el grupo dos o central, el cual contó con once secuencias, cuatro sitios segregados, cuatro haplotipos una diversidad haplotípica baja de 0.00153, sin embargo el promedio de las diferencias nucleotídicas K, si fue elevado (0.727) (ver tablas 16, 17 y 18).

9.2.5.1. Diferenciación Genética entre Grupos Filogeográficos

El valor de F_{st} encontrado para la totalidad de los grupos filogeográficos es de 0.96 (ver tabla 19), indicando que existe una diferenciación genética muy grande, y que la totalidad de especímenes analizados se encuentran formando una población genéticamente estructurada.

Al subdividir estos valores para encontrar cuanto aporta cada comparación se obtuvo la información que se discute a continuación: al denominar a las poblaciones por su sitio de muestreo no se consideran las relaciones genéticas reales de los especímenes. Esto solo aporta información que confirmaba que en efecto, se trata de una especie que presenta una distribución en el Istmo centroamericano, que se encuentra subdividida (estructurada).

Sin embargo no apporto mayor información respecto a la dinámica y conformación de grupos; en contraste el utilizar las agrupaciones mostradas por el análisis filogeográfico, esta apporto información que apoya el patrón de dispersión de *T. dimidiata* propuesto en este estudio, y la correspondencia de la dinámica genética de los grupos, con el modelo de flujo génico de “stepping stone”, ya que se encontró una mayor diferenciación genética (F_{st} y $N_{st}=1$) entre los grupos filogeográficos 1 y 3, seguido de un menor valor (0.956) aunque

igualmente indicativo de diferenciación genética muy grande, entre los grupos filogeográficos 1 y 2, y por ultimo el menor valor obtenido para los F_{st} y N_{st} (0.89, ver tabla 21) siempre dentro del rango de diferenciación genética muy grande), para la comparación entre los grupos 2 y 3, ya que estos son los de dispersión más reciente.

9.2.6. Análisis por Pares de Poblaciones (Comparación de análisis por pares de sitios de muestreo y por grupos filogeográficos)

La información más relevante provista en el análisis por pares de poblaciones denominadas por sitio de colecta, es que los especímenes analizados del grupo Filogeográfico 1 (ver tabla 5), presentan valores de diversidad nucleotídica correspondientes a poblaciones monomórficas.

Por otro lado al comparar dos poblaciones correspondientes al grupo Filogeográfico 1 y 2 (ver tabla 5) estas mostraron valores de diversidad nucleotídica baja, pero el valor promedio de diferencias nucleotídicas fue alto, esto debido a que las mutaciones encontradas no son compartidas.

Mientras que para la comparación entre la población del grupo Filogeográfico 2 y 3, los valores obtenidos de diversidad nucleotídica y de promedio de diferencias nucleotídicas fue menor que para la comparación del grupo 1 con el 2, lo cual indica que las poblaciones del grupo 2 y 3 se encuentran genéticamente más cercanas, es decir que aunque estas se encontraron en el análisis Filogeográfico en diferentes clados, han divergido de manera más reciente que con el grupo 1.

9.2.6.1. Diferenciación Genética entre Pares de Poblaciones

En el análisis por pares de poblaciones se encontraron valores de F_{st} y N_{st} desde cero (y valores negativos para el caso de los N_{st}) (ver tabla 15), para las poblaciones monomórficas como lo es el caso de Quiché con Petén Palmera, Costa Rica con Intibuca de Honduras, Costa Rica con Izabal, Izabal con La Brea de Jutiapa, Costa Rica con La Brea de Jutiapa, y esta última con Intibuca de Honduras; lo cuál nos indica que no existe diferenciación genética

entre estas poblaciones; el primer par de estas se encuentra formando el grupo filogeográfico 1 y el resto el grupo filogeográfico dos. El resto de comparaciones de F_{st} se encontró en el rango mayor a 0.25, (ver tabla 12) indicador de diferenciación genética muy grande, como era de esperarse ya que se trata de comparaciones entre poblaciones pertenecientes a diferentes agrupaciones filogeográficas.

9.2.7. Estadísticos de Secuencia

9.2.7.1. Flujo Genético y Diferenciación Genética

9.2.7.1.1. Estimación de Flujo Genético

Se realizaron análisis de los Estadísticos de secuencia N_m , F_{st} y N_{st} , al igual que para el resto de análisis de genética de poblaciones, primero designando como poblaciones a los sitios de muestreo y luego por las principales agrupaciones filogeográficas.

En cuanto al primer tipo de análisis (por sitios de muestreo) se encontraron valores de F_{st} y N_{st} (0.82) que se encuentran en el rango indicativos de una diferenciación genética muy grande. Lo cual indica que al considerar como un todo, todas las secuencias analizadas, existe estructuración de poblaciones. Sin embargo para no sobreestimar la diferenciación genética, al obviar los cambios graduales, es importante ir a una escala de análisis menor.

En cuanto al segundo tipo de análisis, el de agrupaciones filogeográficas, los valores de N_m (menores a 1) y de F_{st} y N_{st} (0.96), mostraron un patrón similar para el análisis de todos los especímenes como era de esperarse, indicando una vez más que se trata de poblaciones estructuradas (ver tablas 16, 17 y 18).

9.3. Implicaciones de Resultados en Dinámica de Poblaciones, Análisis de Ecotopos, Secuencias particulares y Control Vectorial

9.3. 1. Análisis de Ecotopos

La denominación de ecotopos fue adjudicada inicialmente por Lent & Wygodzinsky 1979 a los especímenes de *Triatoma dimidiata* ya que como se mencionó se trata de una

especie que puede ser encontrada en una variedad de ambientes, sin embargo se trata de una denominación artificial, con fines de clasificación, dependiendo de la asociación de los especímenes con las viviendas humanas, y para fines de control vectorial los estudios poblacionales de *T. dimidiata* han intentado dilucidar si biológicamente existen diferencias entre los especímenes colectados en diferentes ecotopos de la misma región, sin embargo las conclusiones en cuanto a las relaciones entre ecotopos no pueden ser generalizadas, debido a que son dependientes de las características específicas de la región estudiada.

Para este estudio se cuenta con los datos de ecotopo de cada uno de los especímenes analizados, sin embargo el análisis genético de las poblaciones no mostró ningún patrón de agrupamiento asociado a la clasificación de ecotopos, pero como ya se mencionó antes esto solo puede ser analizado para casos particulares, por ejemplo para regiones como Yaxjá, Petén, cuyas poblaciones silvestres aún se encuentran relativamente aisladas de las viviendas humanas se puede notar una diferencia entre especímenes silvestres de esta región y las poblaciones domiciliarias de otras regiones, sin embargo en otras regiones que se encuentran más deforestadas, como lo es el caso de Jutiapa, al ser desprovistas de su hábitat primario los especímenes de *T. dimidiata* se han domiciliarizado conformando poblaciones panmicticas.

9.3.1.1. Especímenes provenientes de Palmeras

El análisis filogeográfico de estos especímenes los colocó en tres grupos diferenciados, uno donde se encontraban los especímenes de Petén de palmera, que es grupo formado por la región norte de Guatemala (grupo filogeográfico 1, tabla 5), y respecto al análisis de haplotipos ambos especímenes presentaron el haplotipo 1, en otro grupo se encontraron los especímenes provenientes de Izabal de palmera, dos especímenes fueron agrupados con el resto de especímenes provenientes de la región media de Centroamérica (grupo filogeográfico 2, tabla 5), y ambos especímenes presentaron el haplotipo número 4, una división más se presentó para uno de los especímenes provenientes de Izabal, el cual fue aislado en los análisis filogenéticos y este espécimen fue el único representante del haplotipo 2 (tabla 7).

Tanto los análisis filogenéticos como los análisis de haplotipos, sugieren que las palmeras no funcionan como un microhábitat que diferencie a los organismos que en ellas se

encuentran, es decir que la utilización de palmeras por las chinches no limita el flujo genético, indicando que probablemente dicho lugar solo funciona como un refugio temporal durante la época de lluvia y de paso durante la dispersión de estas, en la época seca (comunicación personal Ph.D. Carlota Monroy, Licda Marianela Menes, Licda Bárbara Moguel).

9.3.2. Secuencias Particulares

9.3.2.1. El Salvador

En el caso de los especímenes provenientes de Santa Ana, El Salvador es importante remarcar que aunque la particularidad de las secuencias obtenidas de la amplificación con los cebadores para el ITS2 de *Triatoma dimidiata*, no permitió realizar una edición del segmento de interés y como consecuencia no pudieron alinearse las secuencias de sus individuos para que estas fueran analizadas como el resto de secuencias obtenidas; el mismo hecho de la gran diferencia presentada en sus secuencias, es en sí un resultado relevante, ya que esta información provista por un marcador molecular (segmento de ADN útil para diferenciación de poblaciones), puede extrapolarse con la información epidemiológica conocida de los especímenes provenientes de dicha región, se sabe que en esta región centroamericana durante los últimos años se han presentado casos agudos de la enfermedad de Chagas, hecho desconocido para otras regiones (comunicación personal Ph.D. Carlos Ponce).

El tan particular caso de los especímenes de El Salvador, en cuanto a sus características moleculares y epidemiológicas, hace necesaria la elaboración de más análisis de estos especímenes para llegar a una explicación concluyente respecto a la taxonomía y características epidemiológicas de estos especímenes

9.3.3. Implicaciones en el Control Vectorial

Las implicaciones de dichos resultados repercuten directamente en el control vectorial de *Triatoma dimidiata*, pues como antes se explicó la estructuración de las poblaciones puede ser una ayuda en el control vectorial.

9.3.3.1. Grupo Filogeográfico 3

Respecto al grupo formado por los especímenes de Santa Fe, Panamá esto implicaría una forma fácil de control ya que la población se encuentran aislada geográficamente, y como

antes se mencionó, probablemente se trate de una población altamente endogámica y por lo tanto vulnerable, esto indicaría una eliminación fácil del vector por rociamiento domiciliario, como ya pudo comprobarse recientemente, ya que después de aplicaciones del insecticida no existió reinfestación en la localidad de El Macho, Santa Fe, Veraguas, Panamá (Comunicación personal: Ph.D. Carlota Monroy).

9.3.3.2. Grupos Filogeográficos 2 y 1

Diferente es el caso para la agrupación perteneciente a la región media de Centroamérica, representada por especímenes de Honduras, Nicaragua, Costa Rica y la región sureste de Guatemala, pues en el caso de esta región, el control vectorial supone un reto mayor, ya que la existencia de un alto flujo genético en esta región lo que implica migración, exige el establecimiento de estrategias de control regionales.

Mayor es el reto aun para el control vectorial en el caso particular de Guatemala, pues la gran diversidad de haplotipos presentes en el país indica que se trata de una zona de diferenciación y la reinfestación puede ser dada por varias fuentes, en el caso particular de Petén es importante resaltar que en una región limitada se encontró al espécimen más ancestral del árbol (Yaxja) y a su vez a los más recientes, los de palmera de San Luís Petén (según los parámetros evolutivos de Kimura). Lo cual indicaría que probablemente esta región particular responde a las características de un modelo de islas, en lugar del de “stepping stone” de Kimura propuesto para el resto de poblaciones (Vera 2006).

Como ya se mencionó se pudo notar además la gran diferenciación del espécimen colectado en Yaxjá Petén, que se presentó aislado como un grupo externo, pudiéndose tratar esta de una población simpátrica, es decir que presenta diferenciación genética aun en ausencia de aislamiento geográfico (Vera, 2006); los patrones de dispersión en esta región ya fueron estudiados por Monroy *et al.* en el 2003, el estudio entonces mostró la dispersión de *Triatoma dimidiata* hacia gallineros experimentales, la estacionalidad en dicha dispersión y la presencia de *Trypanosoma cruzi* en los especímenes colectados, de manera que ambos estudios alertan acerca de los peligros que implica la deforestación en dicho lugar, ya que al verse desprovisto el vector de su hábitat natural migrara a los domicilios en búsqueda de alimento y refugio, y ya que *Triatoma dimidiata* de esta región parece tratarse de otra especie, esta puede

presentar características especiales en cuanto a su carga de parásito, capacidad de infestación y domiciliación y resistencia a insecticidas, características que se recomienda estudiar posteriormente.

10. CONCLUSIONES

10.1 Con base en la información provista por análisis del locus del ITS 2, puede evidenciarse la existencia de tres grupos diferentes de *T. dimidiata* de Centroamérica, grupos cuya división es coincidente con las características fisiográficas del istmo centroamericano. Siendo estas tres grandes barreras: La Falla Polochíc-Motagua, El Cinturón Deformado de Costa Rica Central y El Canal de Panamá.

10.2 El análisis de flujo genético para el total de los especímenes estudiados, muestra que a lo largo del rango de distribución muestreado, *T. dimidiata* presenta poblaciones estructuradas, con índices de fijación (0.96) que indican una diferenciación genética muy grande, que se está tendiendo a la pérdida de heterocigocidad.

10.3 El análisis de flujo genético, para cada grupo formado en el análisis Filogeográfico, indico que existen tres agrupaciones principales y que estas se encuentran entre sí más o menos relacionadas de la siguiente forma: el grupo uno se encuentra más relacionado con el grupo dos que con el tres, el grupo dos se encuentra más cercano al tres que al uno. Por lo tanto el grupo uno se encuentra más diferenciado de los demás grupos.

10.4 Se sospecha que el Centro de Origen de *Triatoma dimidiata* se encuentra en la región que comprende desde la Falla Polochíc-Motagua, hacia el norte de su distribución y que la dispersión desde el centro de origen hacia el sur se ha dado por transporte pasivo en las tres grandes barreras observadas (La Falla Polochíc-Motagua, El Cinturón Deformado de Costa Rica Central y El Canal de Panamá) y que en la totalidad de la distribución analizada el modelo de dispersión que se ha dado es un modelo de islas y analizando a una escala menor, para el interior del grupo Filogeográfico dos, este coincide con el modelo de dispersión descrito por Kimura en 1953 y al cual denominó “stepping-stone”.

10.5 El grupo de la región central de Centro América es el que presenta mayor número de haplotipos diferentes, sin embargo los cambios en estas secuencias son menores que en comparación con las otras dos regiones y además estos cambios son graduales, debido a que

estas poblaciones se encuentran en constante flujo genético al carecer de barreras geográficas prominentes.

10.6 La población de El Macho Panamá se encuentra en la actualidad, aislada genéticamente de otras poblaciones, como lo mostró el análisis filogeográfico y de genética poblacional, lo suficiente como para que las poblaciones circundantes no representen un peligro en cuanto al control vectorial, sin embargo estas relaciones pueden ser alteradas por actividades antropogénicas.

10.7 La gran diferencia encontrada en los especímenes colectados con trampa de luz en Yaxja advierten sobre la particularidad de éstos y las amenazas que representa la deforestación en esta región ya que estudios previos mostraron la capacidad de migración hacia gallineros experimentales de los especímenes silvestres de esta región, y al ser desconocidas las características epidemiológicas de estos especímenes, la alteración de sus hábitats primarios podría representar un riesgo importante en cuanto a la transmisión de la enfermedad en esta región del país.

10.8 Se pudieron observar particularidades en las secuencias obtenidas para el espécimen de Yaxja Petén y los especímenes de El Salvador, sin embargo en este análisis no se puede llegar a conclusiones sobre su status taxonómico.

10.9 El análisis no presentó ningún patrón que pueda generalizarse para el estudio de ecotopos, sin embargo las conclusiones respecto a la dinámica de los ecotopos debe ser analizada con las consideraciones específicas de la región estudiada.

10.10 El análisis de especímenes provenientes de palmeras sugiere que estas constituyen un refugio temporal durante la época de lluvia y de paso durante la época seca (época de dispersión), para *Triatoma dimidiata*, sin constituir un refugio permanente que represente un aislamiento reproductivo y por lo tanto genético.

10.11 El análisis de la distribución de polimorfismo de ADN mostró concordancia entre los tres tipos de polimorfismo ploteados (mutaciones, diversidad nucleotídica y número de

sitios polimórficos), observándose un pico de polimorfismo en las secuencias, aproximadamente entre las posiciones 360 a 400, lo que indica que es esta región más variable, la que aporta la mayor cantidad de diferenciación genética entre los especímenes.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Se recomienda constante flujo de información entre las instituciones encargadas de la prevención de la infección del Mal de Chagas en Centroamérica, en cuanto a estudios de la Biología y Epidemiología de los especímenes de *Triatoma dimidiata*, sobre todo en los países que pertenecen al grupo descrito como grupo Filogeográfico dos (Guatemala, Nicaragua, Honduras, Costa Rica), ya que es entre los especímenes colectados en esa región de Centroamérica que se encontró el mayor flujo genético; y las estrategias de control en los países que pertenecen a esta región, deben ser establecidas en forma regional para evitar la reinfestación de las fuentes cercanas.

11.2 Se recomienda el estudio de especímenes provenientes de más localidades centroamericanas utilizando el marcador molecular utilizado en este estudio, y otros marcadores moleculares que provean de diferente información como lo es el caso de los microsatélites, para evitar que se sobreestime la variación genética encontrada (“efecto Wahlund”), cuando solo se consideran poblaciones lejanas.

11.3 Para la población de El Macho Panamá, se recomienda monitorear la dinámica de las poblaciones, ya que aunque sus condiciones actuales la hacen un vector de fácil control, cambios en las características del entorno podrían provocar cambios en la dinámica poblacional de esta población.

11.4 Se recomienda el monitoreo de la dinámica poblacional de los especímenes de *Triatoma dimidiata* a lo largo de su rango de distribución, ya que estos pueden ser alterados por cambios en las características del paisaje, así como por efectos antropogénicos.

11.5 Dada la particularidad de las secuencias observadas para el espécimen de Yaxja Petén y de El Salvador, se recomienda el estudio exhaustivo de estos especímenes, en cuanto a sus características epidemiológicas, fenética y genéticas ya que podrían tratarse de otra especie.

11.6 Las poblaciones de Petén merecen especial atención por la diversidad mostrada en una breve extensión geográfica, ya que en este trabajo aunque se quiso trabajar con mayor número de especímenes, la limitación de recursos no lo permitió.

11.7 Para poder realizar conclusiones generalizadas del sistema que constituyen las palmeras para *T.dimidiata*, se recomienda el estudio de un mayor número de especímenes colectados en palmeras de más localidades.

12. REFERENCIAS

- 12.1. Aguilar, F. Parasitología Médica. 3era ed. 1997. Guatemala.
- 12.2. Almeida CE, Vinhaes MC, Almeida JR, Silveira AC, Costa J 2000. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasión process of *Triatoma rubrovaria* in the state of Río Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz.
- 12.3 Almeyda-Artigas, R.J., Bargues. M.D. and Mas-Coma. S. (2000). ITS-2 rDNA sequencing of Gnathostoma species (Nematoda) and elucidation of the species causing humans gnathostomiasis in the Americas. J. Parasitol.
- 12.4 Audesirk T., Audesirk G. 1997. Biología, La Vida en la Tierra. 4ta ed. Prentice Hall. México.
- 12.5 Atlas Geográfico Universal y de El Salvador. Editorial Océano. Edición 1995 ISBN 84-494-0135-6
- 12.6 Bargues Md, Marcilla A, Ramsey, Dujardin, Schofield Cj., Mas-Coma. 2000. Nuclear rDNA based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae), vectors of Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- 12.7 Bargues Md, Marcilla A, Dujardin, Schofield Cj., Mas-Coma. 2002. Triatominae vectors of *Trypanosoma cruzi* a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers, Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.
- 12.8 Bargues M. D., Klisiowiez D. R., Panzera F., Noireau F., Marcilla A., Perez R., Rojas M. G., O'Connor J.E., González-Candelas F., Galvão C., Junberg J., Carcavallo R.U., Dujardin J. P., Mas-Coma S. 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. Infection, Genetics and Evolution. 46-62.

- 12.9 Barges M. D., Klisiowiez D. R., Gonzáles-Candelas F., Ramsey J., Monroy C., Ponce C., Salazar-Schetino P., Panzera F., Abad F., Sousa O., Schofield C., Dujardin J. P., Guhl., R.U., Mas-Coma S. 2008. Ribosomal DNA Characterization of *Triatoma* Species, with Emphasis on Population Genetics and Phylogeography of the Main Chagas Disease Vector *T.dimidiata*.
- 12.10 Beckingham, K. (1982). Insect rDNA. In "The Cell Nucleus. X" (H. Busch and L. Thotblum. Eds.), pp 205-263, academia Press, New Cork.
- 12.11 Calderón, C. 2002. Variabilidad Genética de *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811) en tres poblaciones silvestres del Atlántico y tres poblaciones domésticas del Pacífico de Guatemala, utilizando la técnica de amplificación aleatoria de AND polimórfico (RADP) (Tesis de Graduación, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala). 74 p
- 12.12 Chromas Pro Version 1.41 Copyright, 2003-2007 Technelysium Pty Ltd.
- 12.13 Coates A., The Forging of Central America.
- 12.14 Collins, F.H., Porter, C.H., and Cope S.E. Comparison of rDNA and mtDNA in the sibling species *Anopheles freeborni* and *A. hermsi*. 1990. Am. J. Med. Hyg. 42(5). Pp. 417-423 (89-276).
- 12.15 Cordon-Rosales C., P. Pennington, E. Palencia, y C. Beard. 1999. Population Dynamics of *Triatoma dimidiata* and *Rhodnius prolixus* in response to insecticide spraying of domiciles, PP. 436, American Society for Tropical Medicine and Hygiene, Washington DC.
- 12.16 DNA MAN version 5.3.9., Lynnon Bio Soft. Copyright, 1994-2001. All Rights Reserved.

- 12.17 Dawn M., Wesson, Charles H., Porter, y Frank H. Collins. Sequence and Secondary Structure Comparisons of ITS r DNA in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). 1992. Molecular Phylogenetics and Evolution.
- 12.18 Donnelly T., Horne G., López-Ramos E. 1990. Northern Central América; Te Maya and Chortis blocks. Geological Society of América. V. H.
- 12.19 Dorn P., Melgar S., Rouzier V., Gutierrez C., Rosales R., Rodas A., Kott S., Salvia D., Monroy C. 2003. The Chagas Vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:Reduviidae), is Panmictic within and Among Adjacent Villages in Guatemala. Population Biology/ Genetics.
- 12.20 Dumonteil E, Gourbiere S, Barrera-Perez M, Rodríguez- Ferlix E, Ruiz.Piña H, Baños-Lopez O, Ramirez-Sierra MJ, Menu F, Rabinovich JE 2002. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmisión dynamics of *Tripanosoma cruzi* in the Yucatán península, México. Am J Tropa Med Hyg 67.
- 12.21 Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783
- 12.22 Gómez- Zurita, J., Juan, C., y Petitpierre, E. Sequences, secondary structure and phylogenetic analisis of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in the Timarcha feaf beetles (Coleoptera: Chysomelidae). 2000. Insect Molecular Biology.
- 12.23 Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol., 22. 160.
- 12.24 Hartl D. Clark A. 1989 Principles of Population Genetics 2da edición. Sinauer associates INC Publishers. Suderland Massachusetts.
- 12.25 Hedrick P. 1983 Genetics of Populations Universidad de Kansas. Science Books. International. USA.

- 12.26 Higgins,D.G. and Sharp,P.M. (1989) Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* 5,151-153.
- 12.27 Higgins,D.G. and Sharp,P.M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73,237-244.
- 12.28 Hudson R.R., Slatkin M., Maddison W. 1992. Estimation of Levels of Gene Flow From DNA Sequence Data. *Genetics Society of America*. 583-589.
- 12.29 Hudson R.R., Boos D., Kaplan N. 1992. A Statistical Test for Detecting Geographic Subdivision. *Mol. Biol. Evol.* 9 (1): 138-151.
- 12.30 Hudson R. R. 2000. A New Statistic for Detecting Differentiation. *Genetics* 155: 2011-2014,
- 12.31 Jarne. P., and Lagoda. P. J. L. (1996). Microsatellites from molecules to population and back. *Trends Ecol. Evol.*
- 12.32 Jhonson M., Black R. (1984). The Wahlund effect and geographic scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria sp.* *Marine Biology* 79, 295-302.
- 12.33 Jukes, T. H. and C. R. Cantor. (1969). Evolution of protein molecules, pp.21-132. *In* H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.
- 12.34 Kimura M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16, 111--120
- 12.35 Lynch M., Crease T. 1990. The Analysis of Population Survey Data on DNA Sequence Variation. *Mol. Biol. Evol.* 7 (4): 377-394.

- 12.36 Lynch, M. and B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: p 91-99.
- 12.37 Marshall, J. S. Geomorphology and Physiographic Province of Central America; in Bundschuh, J. and Alvarado, G., eds., *Central America: Geology, Resources, and Hazards*, Taylor and Francis; 2006, London, p75-122.
- 12.38 Marcilla A., BARGUES M., Ramsey J., Magallon-Gastelum E., Salazar-Schettino P., Abad-Franch F., Dujardin, J., Schofield C., Mas-Coma S. 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, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro.
- 12.39 Méndez C. 2001. *Biogeografía de Guatemala*.
- 12.40 Moncayo, A. 1999. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.
- 12.41 Monroy M. C., Bustamante D. M., Rodas A. G., Enriquez M., Rosales R.G. 2003. Habitats, Dispersión and Invasión of Sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) in Petén, Guatemala. *Entomological Society of America*.
- 12.42 Nakagawa J., Córdón-Rosales C., Juárez J., Itzep C., Nonami T. 2003. Impact of Residual Spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the Department of Zacapa in Guatemala *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 98(2): 277-281
- 12.43 Nei M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations, *Nat. Acad. Sci. USA*. Vol. 70, No. 12, Part I, pp. 3321-3323.
- 12.44 Obiols Gomez A. 1999. *Diccionario Geográfico de Guatemala*. Instituto Geográfico de Guatemala

12.45 Organización Mundial de la Salud (OMS), sección de Chagas
http://www.who.int/topics/chagas_disease/es/index.html.

12.46 Panamá en Cifras: Años 2000-2004, La Dirección de Estadística y Censo de la Contraloría General de la República.

12.47 Paz –Bailey G., Monroy C., Rodas A., Rosales R., Tabaru R., Davies C., Lines J. 2002. Incidence of *Trypanosoma cruzi* in two Guatemalan communities. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

12.48 Peterson A., Sánchez-Cordero V., Ben Beard C., and Janine M. Ramsey. 2002. Ecologic Niche Modeling and Potential Reservoirs for Chagas Disease, Mexico. Emerging Infectious Diseases • Vol. 8, No. 7.

12.49 Pérez R., Hernández M., Rose V., Calleros L., y Panzera F. 2003. Citotaxonomía y Evolución Cromosómica en Triatominae, Insectos Vectores de la Enfermedad de Chagas (Heteróptero – Reduviidae). II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Veterinaria, Entomol. Vect.

12.50 Ramírez C., Jaramillo, C., Delgado, M., Pinto, N., Aguilera, G., Guhl, F., 2004. Genetic structure of sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from an endemic zone of Boyaca, Colombia. Acta Tropica. P 199 (1- 7).

12.51 Rozas, J., J. C. Sanchez- Del bario, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. Dna SP, DNA Polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics 19: 2496-2497.

12.52 Saitou, N. and Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406.

12.53 Schofield CJ. 1991 Vector population responses to control interventions. Ann Soc Belg Med Trop 71 (Suppl.1): 201-217.

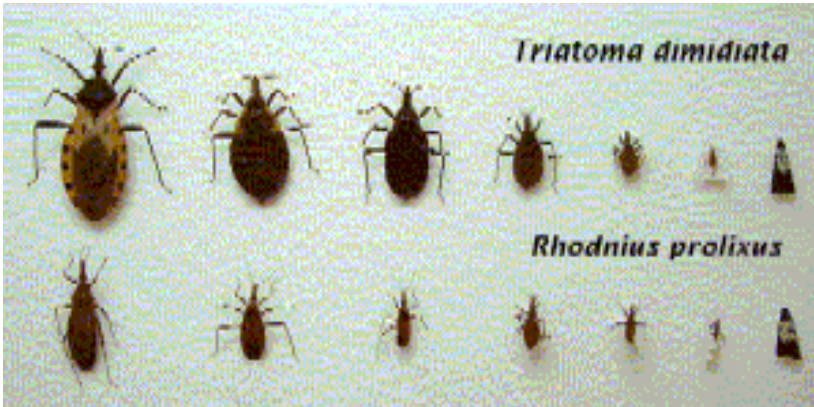
- 12.54 Silveira A, Vinhaes m 1999. Elimination of vector-borne trasmisión of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 94: 405-411.
- 12.55 Slatkin, M and Maddison, W. (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA Sequence data. Genetics.
- 12.56 Stewart, M. A., Hall, L. M. C., and Maden. B. E. H: (1983). Multiple heterogeneities in the transcribed spacers of ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. Nucleic Acids Res. 11: 629-646.
- 12.57 Tabaru, Monroy, .Rodas. Mejía and Rosales "The geographical distribution of vectors of Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala" Med. Entomol. Zool. Vol. 50 No. 1 p. 9-17 1999.
- 12.58 Tamura & Nei, 1993, Mol. Biol. Evol. 10:512
- 12.59 Thompson, J. D., Gibson, T.J., Higgins, D. G. (1997) The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 4876-4882.
- 12.60 Vera R., M. 2006. Estudio de las Variaciones Espaciales y Temporales de la Diversidad Genética de la Trucha Común, *Salmo trutta*, en ríos de la Península Ibérica. España. 196 pp. Tesis Doctorado. Universidad de Gerona. Laboratorio de Ictiología Genética.
- 12.61 Wright S. 1969. Evolution and the Genetics of Populations. Volumen 2. The Theory of Genes Frequencies. Chicago. University of Chicago. Press.
- 12.62 Young I. Coleman A. W. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationship of insects: a *Drosophila* example. 2004. Mol. Phylogenetics and evolution.

12.63 Zeledón R., Rojas J. 2006. Environmental management for the control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), (Hemiptera: Reduviidae) in Costa Rica: a pilot project. Mem. inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101(4): 379-386.

12.64 Comunicación Personal: Ph.D. Carlota Monroy, Ph.D. Carlos Ponce, Licda Marianela Menes, Licda Barbara Moguel.

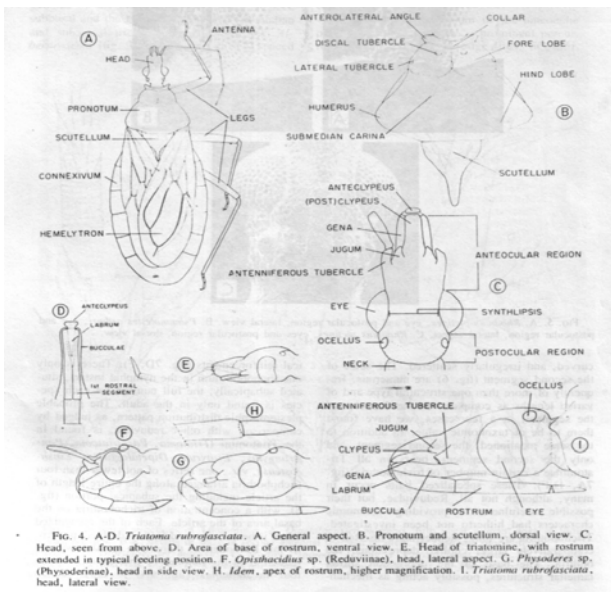
13. ANEXOS

Anexo 1: Ciclo de vida *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius Prolixus*



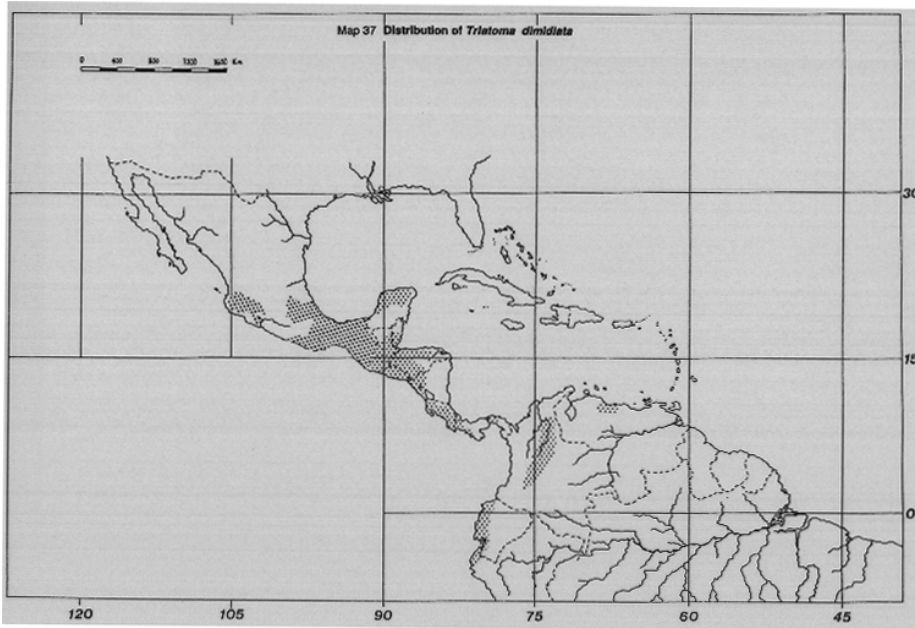
Fuente: OPS

Anexo 2: Estructuras de *Triatominos*



Fuente: Lent & Wygdozinski (1979)

Anexo 3: Distribución de *Triatoma dimidiata*.



Fuente: WHO 1989.

Anexo 4: Mapa de la Republica de Guatemala



Fuente: Google maps.

Anexo 5: Mapa de la Republica de Honduras



Fuente: Google maps

Anexo 6: División Política de la Republica de Honduras

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1. Atlántida | 10. Intibucá |
| 2. Choluteca | 11. Islas de la Bahía |
| 3. Colón | 12. La Paz |
| 4. Comayagua | 13. Lempira |
| 5. Copán | 14. Ocotepeque |
| 6. Cortés | 15. Olancho |
| 7. El Paraíso | 16. Santa Bárbara |
| 8. Francisco Morazán | 17. Valle |
| 9. Gracias a Dios | 18. Yoro |



Fuente: [http: Universia.net](http://Universia.net), Latinoamérica.

Anexo 7: Mapa de la Republica de El Salvador



Fuente: Google Maps

Anexo 8: Mapa de la Republica de Nicaragua



Fuente: Google Maps

Anexo 9: División Política de Nicaragua



Departamentos (cabeceras):

- 1 Boaco (Boaco)
- 2 Carazo (Jinotepe)
- 3 Chinandega (Chinandega)
- 4 Chontales (Juigalpa)
- 5 Estelí (Estelí)
- 6 Granada (Granada)
- 7 Jinotega (Jinotega)
- 8 León (León)
- 9 Madriz (Somoto)
- 10 Managua (Managua)
- 11 Masaya (Masaya)
- 12 Matagalpa (Matagalpa)
- 13 Nueva Segovia (Ocotal)
- 14 Rivas (Rivas)
- 15 Río San Juan (San Carlos)

Regiones Autónomas

- 16 Atlántico Norte (Bilwi)
- 17 Atlántico Sur (Bluefields)


Fuente: <http://Universia.net>, Latinoamérica.


Anexo 10: Mapa de la Republica de Costa Rica



Fuente: Google Maps

Anexo 11: División Política de Costa Rica

	Provincia	Capital
	1	Alajuela
2	Cartago	Cartago
3	Guanacaste	Liberia
4	Heredia	Heredia
5	Limón	Limón
6	Puntarenas	Puntarenas

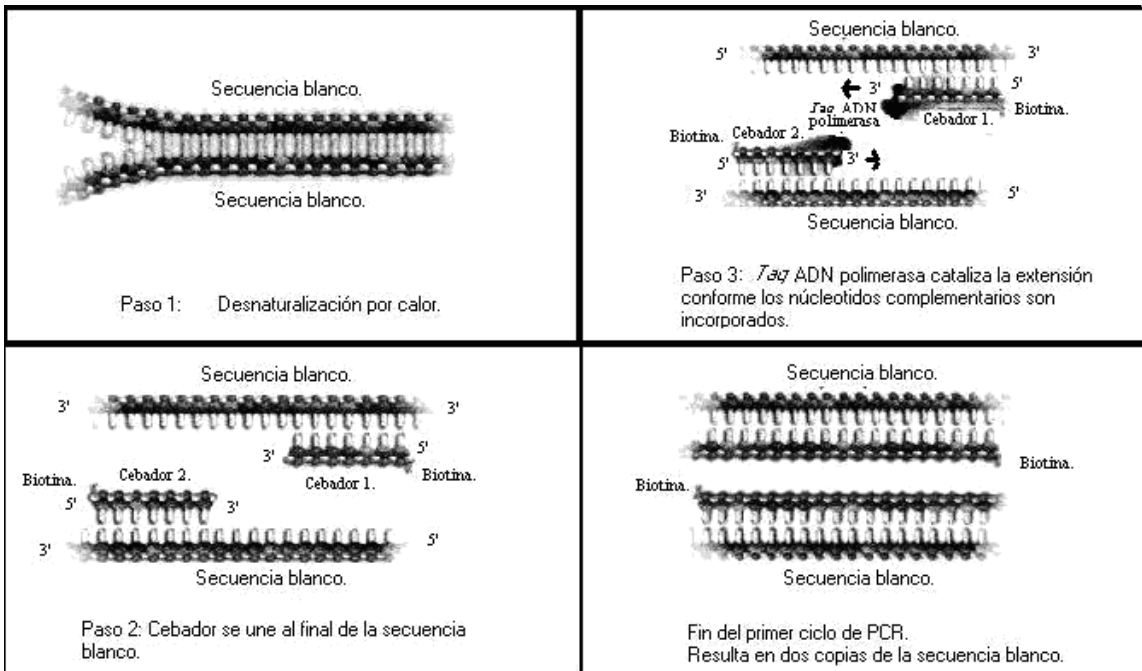

Provincias de Costa Rica

Anexo 12: Mapa de la Republica de Panamá



Fuente: Google Maps

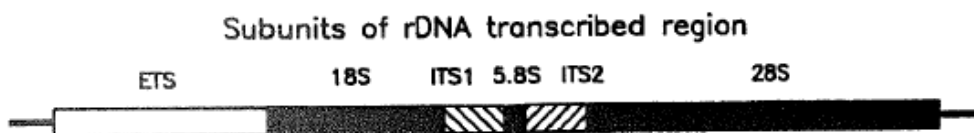
Anexo13: Ciclo de la Reacción en Cadena de La Polimerasa



Ciclo de PCR.

Fuente: Roche, 2003.

Anexo 14: Esquema de Organización de Genes y Espaciadores del ADN ribosomal



Fuente: Collins 1990

Anexo 15: Instrumento de Registro de Observaciones de Amplificación

Hoja para datos de Amplificación

No de corrida de PCR en el termociclador: ----- **Fecha:**-----
Técnico:----- **Taq utilizada:**-----
Nombre del programa: ITS2 **Cebador:**-----
Especie y Población:----- **No de corrida:**-----

No de Muestra	1	2	3	4	5	6
Identificación del ADN						
Cebador						
No de Muestra	19	20	21	22	23	24
Identificación del ADN						
Cebador						
No de Muestra	7	8	9	10	11	12
Identificación del ADN						
Cebador						
No de Muestra	13	14	15	16	17	18
Identificación del ADN						
Cebador						

Observaciones:

Anexo 16: Preparación de Reactivos

Preparación de Soluciones

NaCl 5M (15 ml)

4.38g de NaCl de peso fórmula 58.44 g/mol, se aforan con agua destilada estéril en un balón de 15ml. para obtener una concentración final de 5M. El reactivo se disuelve en el agua destilada estéril con ayuda de un mezclador, calor y un magneto.

EDTA 0.5M, pH 8 (50ml)

9.31 gramos de EDTA de peso fórmula 372.2g/mol, se aforan en un balón de 50 ml. El reactivo se disuelve en una cantidad menor de agua destilada estéril, se mide el pH con ayuda de un pHmetro y se lleva al pH buscado con ayuda de NaOH si la solución está muy ácida, o de HCl si la solución está muy básica, y se mezcla utilizando un mezclador y un magneto, por último se afora al volumen deseado con agua estéril.

Tris- HCl 1 M, pH 8 (50 ml)

7.9 gramos de Tris de peso formula 157g/mol, se aforan en un balón de 50 ml. El reactivo es disuelto en una cantidad menor a la buscada de agua destilada estéril, se mide el pH de la solución con un pHmetro y se lleva al pH buscado con HCl y utilizando de un mezclador magnético, luego la solución se lleva al volumen deseado con agua estéril.

SDS 10%

Se mezclan 10 gramos de dodecil sulfato de sodio con 100 ml de agua destilada estéril.

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

Para la preparación del buffer de extracción se mezclan las soluciones que se describen a continuación en las cantidades indicadas

Buffer de Extracción:	Para 100 ml	Solución patrón
0.1 M NaCl	2 ml	5M NaCl
0.2 M sacarosa	6.9 g	342.3 g/mol
50 mM EDTA	10 ml	0.5 M EDTA pH 8
100 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0	10 ml	1M Tris-HCl pH 8.0
0.05% SDS	500ul	SDS 10%

Usando agua estéril se afora la solución a 100 ml, luego es filtrada a través de un filtro de 0.2 μm y se calienta a 65 °C por 1 hora. Posteriormente se preparan alícuotas de 1 ml. que deben mantenerse a -20 °C en condiciones estériles.

TBE al 5X (1 litro)

54g TRIZMA Base

27.5g Ácido Bórico.

20ml de 0.5M EDTA (pH 8.0)

Agregar agua tridestilada para llegar a 1 litro.

Mezclar bien y disolver todo el sólido en el líquido.

1 Unidad de ARNasa en 50 ul TE

327.86 ul de ARNasa (3,050 u/ml) deben añadirse a 50 ml de TE para una concentración final de 1 u de ARNasa por cada 50 ul de TE.

Bromuro de Etidio. (10mg/ml)

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

Disolver 200mg de Bromuro de Etidio en 20ml de H₂O. Mezclar bien y mantener a 4°C en oscuridad.

Preparación Mezcla Maestra:

Dilución de Cebadores

Se necesita diluir los cebadores a una concentración de 100 pico moles/ ml

P1 "Forward"

6.158 g/mol; 84.1 nano moles

$$84.1 \text{ nmoles} * 1000 \text{ pmoles} / 1 \text{ nanomol} = \frac{84,100 \text{ pmol}}{100 \text{ pmol} / \text{ul}} = 841 \text{ ul de Agua Estéril}$$

P2 "Reverse"

6,657.4 g/mol;

74.3 nmol

$$74.3 \text{ nanomol} * 1000 \text{ pmol} / 1 \text{ nanomol} = \frac{74,3000 \text{ pmol}}{100 \text{ pmol} / \text{ul}} = 743 \text{ ul}$$

Cantidad de Cebadores Necesaria para la Mezcla Maestra

100pmol/ul concentración inicial

Son necesarios 10 pmol por reacción
Cada reacción presenta un volumen de 25 ul

$$10 \text{ pmol} / 25 \text{ ul} = 0.4 \text{ pmol} / \text{ul}$$

$$0.4 \text{ pmol} / \text{ul} * 0.25 \text{ pmol} = 0.1 \text{ ul por reacción}$$

$$0.1 \text{ ul} * 14 \text{ reacciones} = 1.4 \text{ ul de cada cebador para 14 reacciones}$$

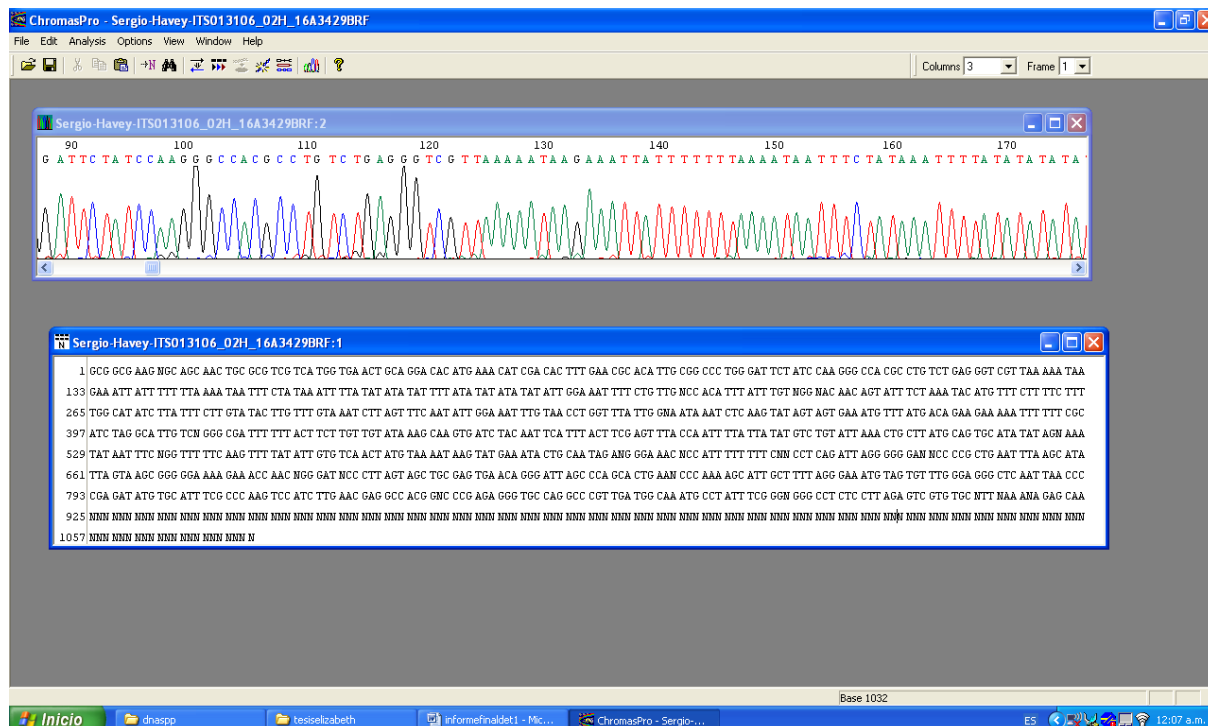
Cantidad de Taq Necesaria para la Mezcla Maestra

A partir de una solución de concentración 5 U/ul

Se necesita 1U por reacción

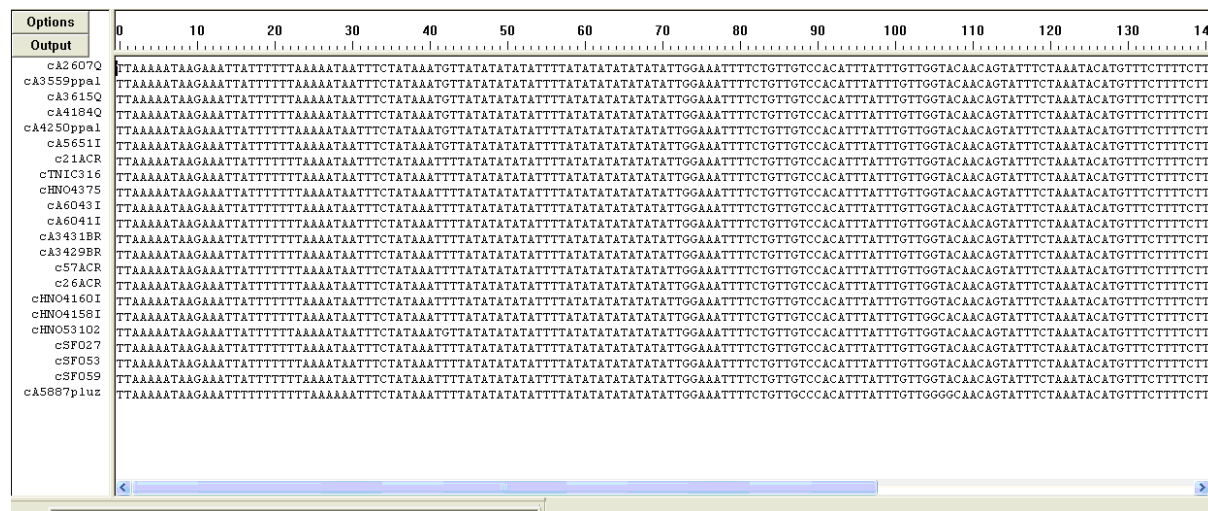
$$1 \text{ U} = 0.2 \text{ ul por reacción; por 14 reacciones} = 2.8 \text{ ul}$$

Anexo 17: Cromatograma



Fuente: datos experimentales en el Programa ChromasPro

Anexo 18: Alineación de secuencias en formato de ClustalX



Pares de bases de la 1 a la 140

Options	80	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420
Output														
cA2607Q	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA3559ppal	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA3615Q	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA4184Q	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA4250ppal	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA5651I	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
c21ACR	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cTNIC316	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cHNO4375	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA6043I	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA6041I	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA3431BR	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA3429BR	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
c57ACR	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
c26ACR	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cHNO4160I	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cHNO4158I	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cHNO53102	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cSF027	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cSF053	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cSF059	GCATTGCTGGGGGATTTTT. ACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														
cA5887pluz	GCATTGCTGGGGGATTTTT. TACTTCTGGTGTATAAAGCAAGTGATCTACAATTCATTACTTCGAGTTTACCAATTTTATATATGCTGTATTTAACTGCT. ATGCAGTTCATGTACAGTAAATATAATTCAGGTT														

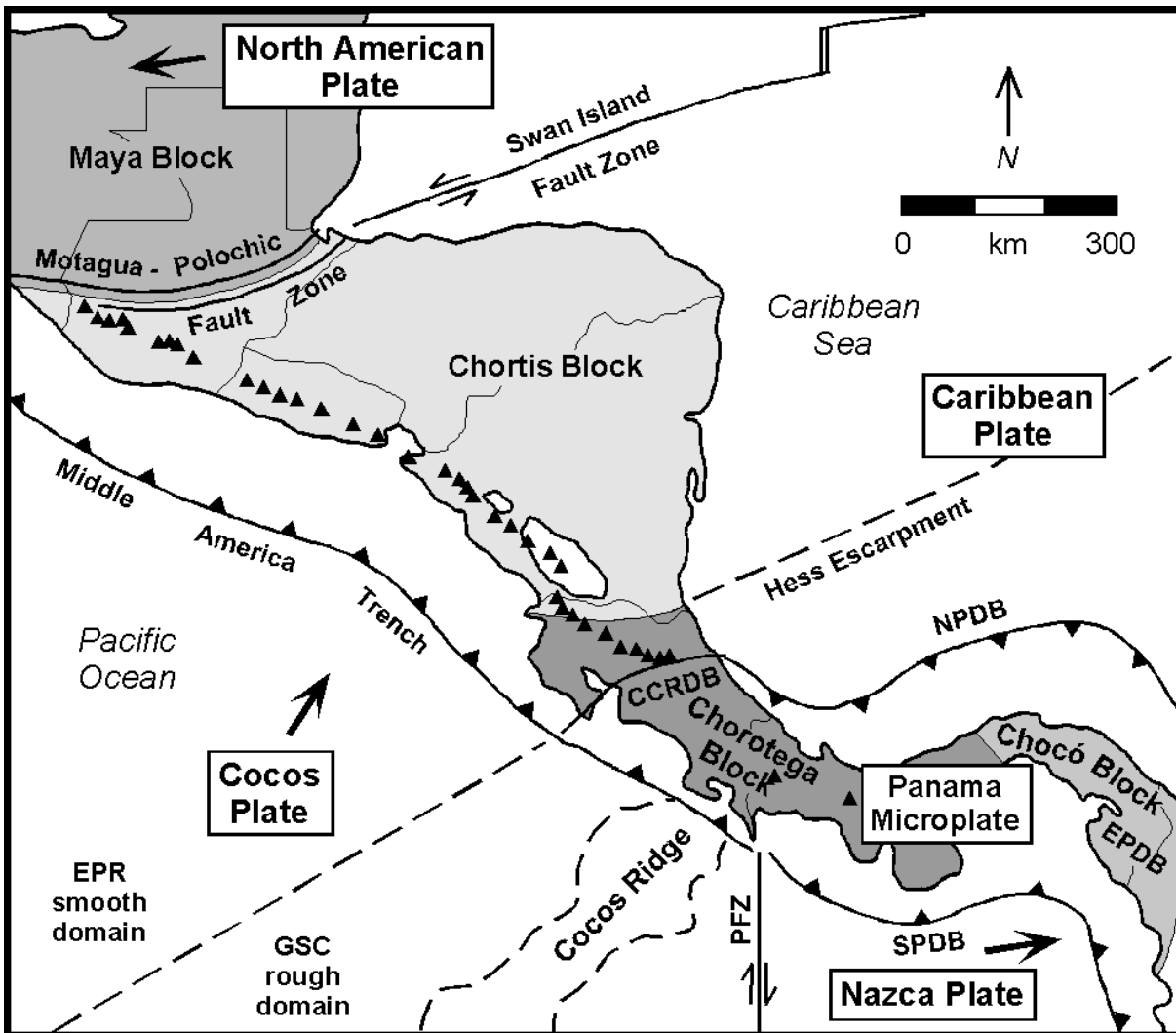
Pares de bases de la 180 a la 420

Options	20	430	440	450	460	470	480
Output						
cA2607Q	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA3559ppal	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA3615Q	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA4184Q	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA4250ppal	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA5651I	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
c21ACR	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cTNIC316	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cHNO4375	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA6043I	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA6041I	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA3431BR	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA3429BR	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
c57ACR	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
c26ACR	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cHNO4160I	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cHNO4158I	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cHNO53102	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cSF027	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cSF053	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cSF059	TTTTCAAGTTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATAC. TGCAATAGAA						
cA5887pluz	TTTTCAAAATTTTATATTGTGTCAACTATGTA AAAATAAGTATGAAATACCTGCAATAGAA						

Pares de bases del 420 a la 478

Fuente: datos experimentales en el Programa Clustal X.

Anexo 19: Mapa tectónico de Centroamérica



Mapa tectónico de Centro América, muestra la geometría regional de las placas tectónicas y los bloques de basamento. Los nombres en inglés de las placas se encuentran en las cajas blancas (North American, Norte América; Caribbean, Caribe; Cocos;

Nazca, y Panamá). Las flechas grandes muestran el movimiento relativo a la placa del Caribe. Los bordes activos de las placas se muestran como líneas sólidas (con dientes en la placa superior de márgenes convergentes, y flechas opuestas indicando los movimientos de transformación). Las áreas sombreadas muestran los basamentos de los bloques (Maya, Chortis, Chorotega, y Chocó). Las líneas punteadas muestran las mayores características batimétricas.

EPR: Elevación Este-Pacífica; GSC: Centro de Extensión de Galápagos; PFZ: Zona de Fractura de Panamá; CCRDB: Cinturón deformado de Costa Rica central; NPDB: Cinturón deformado del Norte de Panamá; SPDB: Cinturón deformado del Sur de Panamá; EPDB: Cinturón deformado del Este de Panamá.

Fuente: Marshall, et al. 2006.