

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

Diversidad genética de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), en zonas fronterizas e hiperendémicas de la enfermedad de Chagas, entre Guatemala y El Salvador.



Salvador Antonio Castellanos Murguía

Biólogo

Guatemala, Noviembre del 2017

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

Diversidad genética de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), en zonas fronterizas e hiperendémicas de la enfermedad de Chagas, entre Guatemala y El Salvador.



Guatemala, Noviembre del 2017

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

DEDICATORIA

A mis padres: Justo Salvador Castellanos de León y María Eugenia Murguía Ibarra por brindarme mi oportunidad de existir, crecer, jugar, estudiar. Por su sacrificio en algún tiempo incomprendido. Por su ejemplo de superación inalcanzable por su comprensión y confianza. Por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional. Les agradezco infinitamente por la persona que fui, soy y seré por ustedes.

A mis hermanos: Maru, Flor y David por estar siempre ahí, compartiendo todos esos momentos y experiencias a lo largo de mi vida. Por estar ahí en las buenas y en las malas, por brindarme de su cariño y por apoyarme a lo largo de esta carrera.

A mi sobrinos: Valentino y Rochelle por permitirme ser parte de sus vidas, por tener la dicha de compartir momentos inolvidables, por poder formar parte de sus actividades día a día. Por permitir preocuparme por ellos y tomar mis opiniones en consideración.

Adriana Martínez Por apoyarme a lo largo de toda mi carrera, por estar ahí conmigo en momentos buenos y malos, por hacer de mis problemas más sencillos de solucionar, por tu apoyo incondicional y tu cariño desmesurado.

A mis amigos: Ya sea riéndonos, molestando, discutiendo, estresados o de cualquier manera, gracias por las experiencias y recuerdos vividos.

A mi USAC: Por ser mi casa de estudio, por brindarme el tiempo necesario para culminar mi carrera profesional.

A mis catedráticos: Por compartir sus conocimientos, experiencias y ser ejemplos durante mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –LENAP-
Por ser la Unidad de Investigación que me permitió llevar a cabo gran parte mi
formación profesional.

A la Doctora Carlota Monroy y la Licenciada Antonieta Rodas.
Por el apoyo y confianza, por las experiencias y enseñanzas, por enseñarme a
expandir mi mente y a trabajar en equipo, como dice el dicho “Una golondrina
no hace el verano”.

A mi equipo de trabajo.
Por el tiempo compartido, por las pipetas inexactas, geles mal corridos,
reactivos dudosos y por mil anécdotas compartidas en un laboratorio que más
que eso se volvió una casa.

A mi asesor de tesis el Doctor Sergio Melgar.
Por el apoyo de principio y fin en la ejecución de este trabajo de investigación,
por el apoyo en otros temas de investigación y resolución de dudas en el
camino.

A mis revisores de tesis Doctor Enio Cano y Master Rosa Alicia Jimenez.

A las Doctoras Lori Stevens y Patricia Dorn al igual que los equipos de
investigación de las Universidades de Loyola y Vermont.

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
3.	ANTECEDENTES.....	4
3.1	Enfermedad de Chagas.....	4
3.1.1	Chagas en Guatemala.....	6
3.1.2	Chagas en El Salvador.....	7
3.2	Condiciones ambientales del territorio frontera Guatemala-El Salvador	9
3.3	Triatominae.....	10
3.3.1	<i>Triatoma dimidiata</i> (Latrielle, 1811).....	11
3.4	Estructuración génica de <i>T. dimidiata</i>	13
3.5	Estructuración genética a escala pequeña.....	14
3.6	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Euglenozoa: Trypanosomatidae).	15
3.7	Genotipificación por secuenciación para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido.....	17
4.	JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....	20
5.	OBJETIVOS.....	23
5.1	Objetivo principal.....	23
5.2	Objetivos específicos.....	23
6.	HIPÓTESIS.....	23
7.	PLAN DE DESARROLLO.....	24
7.1	Diseño experimental.....	24
7.2	Procedimiento y métodos.....	24
7.2.1	Colecta.....	25
7.2.2	Extracción de ADN y secuenciación.....	25
7.3	Análisis bioinformáticos.....	26
7.4	Análisis genéticos.....	27
7.5	Análisis de modelo de distribución potencial de la especie.....	28
7.6	Comparación entre localidades.....	30
7.7	Correlación distancias genéticas, geográficas y diferencias Bioclimáticas.....	31

7.7.1	F_{ST} vs Distancias geográficas.....	31
7.7.2	F_{ST} vs Variables bioclimaticas.....	32
8.	RESULTADOS	33
8.1	Análisis de diversidad y estructuración genética	33
8.2	Determinación de proteínas a partir de los SNP's del cuantil superior (Percentil 10)	36
8.3	Análisis de variables ambientales.....	37
8.4	Correlación distancias genéticas, geográficas y diferencias bioclimáticas.	40
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42
10.	CONCLUSIONES	48
11.	RECOMENDACIONES.....	49
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
13.	ANEXOS.....	58
	Anexo 1. Puntos de colecta de triatominos en aldeas de Jutiapa- Guatemala y Santa Ana, Ahuachapán y Sonsonate-El Salvador.	58
	Anexo 2. Coordenadas geográficas de puntos de muestreo según información de localidad obtenida en las bases de datos correspondientes a las muestras de triatominos utilizados.....	58
	Anexo 3. Distancias geográficas según promedio de puntos GPS por localidad.	59
	Anexo 4. Histograma de frecuencias de valores de heterocigosidad observada y esperada dentro de localidades.	59

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas también conocida como Tripanosomiasis americana, es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Se encuentra en su mayoría en zonas de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por medio de heces de chinches Reduviidae pertenecientes a la subfamilia Triatominae. El objetivo principal de este trabajo fue obtener información sobre la diversidad genética de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* de la zona fronteriza de Guatemala (Jutiapa y Chiquimula como grupo de comparación) y El Salvador (Ahuachapán, Sonsonate y Santa Ana). Esa región es un área hiperendémica de la enfermedad Chagas donde se han reportado varios casos agudos, de importancia para poder entender la dinámica de la enfermedad.

Para ello se utilizaron técnicas de Genotipificación por Secuencias de ADN extraído de patas y abdómenes de *Triatoma dimidiata*, resultando ser una técnica más sensible que técnicas convencionales de PCR utilizando marcadores nucleares y mitocondriales.

Se encontraron dos posibles grupos genéticos que dan estructuración a las poblaciones de dicho estudio, un grupo distinto para las localidades de El Salvador (Ahuachapán, Santa Ana y Sonsonate) y otro grupo presente en las localidades de Guatemala (Jutiapa, Chiquimula) conjuntamente con el grupo dominante en El Salvador; sin embargo, el valor de F_{ST} (0.037) indica que hay flujo génico entre nuestras poblaciones explicando lo heterogéneo que resultó Guatemala. Por otro lado, no se encontró relación entre la estructuración y las variables bioclimáticas o distancias geográficas, por lo que la razón de la variabilidad genética podría estar relacionada a otros factores no considerados en este trabajo.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (Euglenozoa: Trypanosomatidae). Se encuentra en su mayoría en América Latina donde se transmite a los seres humanos principalmente por medio de heces de chinches pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), conocidos también como chinches picudas.

Triatoma dimidiata (Latreille) es una especie hematófaga cuya distribución geográfica va desde México hasta el norte de Sudamérica (Guhl, 2009, pp. 229-230), y es considerada la principal amenaza que actúa como vector del parásito del mal de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) para Guatemala y El Salvador (Lent & Wygodzinsky, 1979, pp. 158).

Se estima que en el mundo hay entre 6 a 7 millones de personas infectadas, la mayoría originaria de América Latina, sin embargo, debido a la migración humana se calcula que la enfermedad se encuentra ahora en otros continentes como Europa y Pacífico Occidental, donde antes no estaba reportado ningún caso (OMS, 2016).

El Salvador es un país que ha presentado un elevado número de casos agudos de la enfermedad de Chagas, principalmente concentrados en los departamentos de Ahuachapán, Sonsonate y Santa Ana siendo 11 casos reportados para el año 2012 comparado con un aproximado de 5 casos para el resto de Centroamérica (Sasagawa, *et al.*, 2014, pp. 1-2). Estos 3

departamentos conforman la línea fronteriza entre El Salvador y Jutiapa, Guatemala.

Actualmente se conoce que *Triatoma dimidiata* presenta una amplia diferenciación genética y morfológica dependiendo de su ecotopo y otros factores influyentes (Dorn, *et al.*, 2009, pp. 8-9; Menes, 2004, pp. 60-63; Monteiro, *et al.*, 2013, pp. 9-11); lo cual para las localidades de interés en este estudio se clasificaron como el mismo grupo filogeográfico (Monteiro, *et al.*, 2013, pp. 9-11). Debido al uso exclusivo de ciertos marcadores moleculares se podría estar obviando diferenciación entre las poblaciones, por lo que el análisis de las diferencias por medio de la comparación de secuenciación masiva puede brindar información importante para el control de la enfermedad.

El objetivo principal de este trabajo es obtener información sobre la diversidad genética de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* de la zona fronteriza de Guatemala y El Salvador para poder entender mejor a los vectores de la enfermedad de Chagas en esa región.

3. ANTECEDENTES

3.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una antropozoonosis causada por un protozooario flagelado conocido como *Trypanosoma cruzi* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) y la cual inicialmente se consideraba endémica para América Latina; sin embargo, durante los últimos años la distribución de la enfermedad ha ido aumentando encontrándose ahora más casos en la parte norte de América y algunos países fuera del continente americano, esto principalmente debido a la migración humana (OMS, 2016).

Este parásito se desarrolla y reproduce en los tejidos de otros organismos, requiriendo así de un hospedero invertebrado en donde predomina la fase epimastigota y un hospedero vertebrado en donde predomina la fase tripomastigota para completar su ciclo de vida (Palacio, Urquijo, Nogueira, & Monteiro, 2010, pp. 10; Portus-Vinyeta, 2010, pp. 196).

Para el 2016 en América Latina se estimó un total de 6 a 7 millones de personas infectadas, 65 millones de personas expuestas a contraer la enfermedad y una incidencia anual de 25,000 casos nuevos, siendo los más afectados la población rural (OMS, 2016). Se transmite al ser humano mayoritariamente a través de chinches hematófagos de la familia Reduviidae; sin embargo, se han reportado algunos casos de transmisión por transfusión sanguínea, por vía congénita y más recientemente por vía oral debido a la ingestión de alimentos contaminados y transmisión sexual entre parejas (Araujo, *et al.*, 2017, pp. 1-3; Menes, 2004, pp. 5; OMS, 2016).

La infección se da cuando el tejido sanguíneo o las mucosidades entran en contacto con las heces infectadas del insecto debido generalmente a la generación de una herida cuando *T. dimidiata* se alimenta al romper la piel con su probóscide (Reyes-Novelo, Ruiz-Piña, Escobedo-Ortegon, & Barrera-Perez, 2011, pp. 11). Debido al alto número de personas que corren el riesgo de contraer la infección y a la amplia distribución geográfica de la misma, esta enfermedad puede considerarse de alta importancia en lo que concierne a las enfermedades tropicales.

La infección de Chagas en las personas por lo general pasa desapercibida en la fase aguda, esto principalmente debido a que los síntomas se pueden confundir con aquellos a los de una gripe común o inclusive no presentar síntomas algunos, sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la detección de casos de considerable gravedad clínica y una importante letalidad en la fase crónica (OMS, 2016).

Durante la fase aguda predomina el parásito circulante en la corriente sanguínea, en esta fase se manifiestan estadios febriles que pueden persistir hasta 12 semanas y es aquí donde se debe llevar el tratamiento para eliminar al parásito (Palacio, Urquijo, Nogueira, & Monteiro, 2010, pp. 11-12; OMS, 2016). Los síntomas de fiebre, mialgia, cefalea y signo de Romana (edema palpebral unilateral) suelen aparecer solamente en el 1 ó 2 % de las personas en este estado, y suelen desaparecer espontáneamente de forma que la enfermedad evolucionará hacia la fase crónica o puede progresar para formas

agudas graves con riesgo de llevar a la muerte (Palacio, Urquijo, Nogueira, & Monteiro, 2010, pp. 11-12; OMS, 2016; Sasagawa, *et al.*, 2014, pp. 1-2).

Si el parásito no es eliminado durante el episodio agudo por medio del tratamiento adecuado, se reduce la posibilidad de éxito en etapas posteriores y se considera que la persona va a permanecer infectada por el resto de la vida (Palacio, Urquijo, Nogueira, & Monteiro, 2010, pp. 11-12).

Durante la fase crónica, los parásitos se concentran en su mayoría en el músculo cardíaco y digestivo (OMS, 2016). Para Guatemala y El Salvador la mayoría de casos de fase crónica están relacionados a trastornos cardíacos; a diferencia de los casos reportados para América del Sur los cuales están asociados a trastornos digestivos (agrandamiento del esófago o del colon), neurológicos o mixtos (López - Vélez, 2017). A medida que avanza el tiempo la destrucción progresiva del músculo cardíaco puede llevar a la muerte o insuficiencia cardíaca de las personas (OMS, 2016; Palacio, Urquijo, Nogueira, & Monteiro, 2010, pp. 11-12).

3.1.1 Chagas en Guatemala

Actualmente el principal vector para la transmisión de la enfermedad de Chagas para Guatemala es la chinche *Triatoma dimidiata*; la enfermedad fue reportada por primera vez en el año de 1932 (Monroy, *et al.*, 2003b, pp. 6).

Los departamentos que mayor riesgo reportan según el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social son Chiquimula, Santa Rosa, Jutiapa y Alta Verapaz (Noriega, 2001, pp. 8-9). A pesar de ser las áreas más afectadas y encontrarse

principalmente en el oriente del país, casi todo el territorio nacional tiene prevalencia de *T. dimidiata* y muchas de ellas se encuentran parasitadas por *T. cruzi* (Noriega, 2001, pp. 8-9).

Dado a la falta de una vacuna preventiva y a las limitaciones de tratamiento para la enfermedad, el control vectorial se ha vuelto la manera más efectiva para tratar la enfermedad de Chagas (OMS, 2016).

En el 2008 se declaró erradicado de Guatemala el triatomino *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859) de las viviendas, este vector se cree fue introducido accidentalmente a Centroamérica y el cual se considera exclusivamente domiciliar para esta región encontrándose predominantemente en los techos de palma de las viviendas o en casas de bajareque donde el material vegetal utilizado para la construcción de las paredes es abundante (Monroy, *et al.*, 2003b, pp. 6). A pesar de presentar una alta densidad poblacional, el control mediante intervenciones de fumigación fue suficiente para controlar las poblaciones de *R. prolixus* en las viviendas (Monroy, *et al.*, 2003b, pp. 6).

Por otro lado, *Triatoma dimidiata* es un vector nativo, el cual presenta una alta adaptación a diferentes entornos tanto selváticos como domésticos por lo que su control es más difícil dado que existe reinfestación posterior a los rociamientos (JICA, 2014, pp. 9,23).

3.1.2 Chagas en El Salvador

En El Salvador la enfermedad de Chagas es transmitida actualmente principalmente por *Triatoma dimidiata*; esta enfermedad se dio a conocer en el país después de que el doctor Juan Segovia descubriera el parásito

Trypanosoma cruzi en la sangre de una paciente con sospecha de paludismo (Cedillos, Romero, Ramos, & Sasagawa, 2011, pp. 16).

El Salvador es conocido por la alta incidencia de casos agudos para la enfermedad por varios años, reportando un aproximado de 731 casos del 2000 al 2012 y un total de 16 casos únicamente en el año 2012, en comparación con el resto de Centro América en el cual se reportan un promedio de 5 casos agudos anuales (Sasagawa, *et al.*, 2014, pp. 11-12).

Es de notar que la mayoría de los casos reportados desde el 2010 a la actualidad se han concentrado en la región Oeste del país, en los departamentos fronterizos con Guatemala, especialmente Jutiapa, departamento que a pesar de ser hiperendémica de la enfermedad al igual que El Salvador no presenta un alto número de casos agudos sintomáticos (Sasagawa, *et al.*, 2014, pp. 12). La mayor cantidad de casos agudos reportados se centran en su mayoría en los departamentos de Ahuachapán, Santa Ana y Sonsonate con un total de 296 casos de los 731 reportados para El Salvador durante el periodo del 2000 al 2012 (Sasagawa, *et al.*, 2014, pp. 12).

Las razones por las cuales se presenta este elevado y anómalo número de casos agudos para El Salvador todavía son inciertas. Una posible explicación podrían ser los resultados obtenidos por Solórzano (2015) en los cuales encontró estructuración genética del parásito entre las mismas regiones de El Salvador y Jutiapa y posibles eventos selectivos de la virulencia que se asocian a las diferencias en tasas de casos agudos (Solórzano, 2015, pp. 63-67)

3.2 Condiciones ambientales del territorio fronterizo Guatemala-El Salvador

Las zonas fronterizas entre Guatemala y El Salvador están conformadas principalmente por los departamentos de Jutiapa en Guatemala y Santa Ana, Ahuachapán y Sonsonate en El Salvador (Anexo1).

Según la clasificación de zonas de vida de Holdridge Jutiapa tiene dos zonas de vida, la primera de ellas es bosque húmedo subtropical templado conformado en su mayoría por las áreas al sur, este y oeste del territorio y la segunda es bosque seco subtropical en la parte central y norte del territorio (De La Cruz, 1982, pp. 17-19). El clima es cálido, seco en la parte central y templado en el área de montaña con una temperatura anual de 22.9°C y una precipitación media de 1295 mm al año (deGuate, 2016).

Los departamentos de El Salvador, Santa Ana, Sonsonate y Ahuachapán, presentan una temperatura anual media similar a la de Jutiapa, siendo de 23.5°, 23.2° y 25.2°C respectivamente y precipitaciones más elevadas de 1876, 1747 y 1939 mm al año respectivamente (CLIMATE-DATA, 2016). Según la clasificación de Holdridge Santa Ana se clasifica como bosque muy húmedo montano bajo y Sonsonate y Ahuachapán predominantemente como bosque húmedo tropical y subtropical y bosque de manglares en la parte sur (Comisión Europea & FAO, 2002, pp. 142-143; Alfaro, *et al.*, 2010, pp. 36-37).

Otras características ambientales propias son la vegetación y cobertura según cada área al igual que el material utilizado para la construcción de las viviendas.

Según Monroy (2016), Jutiapa presenta varias comunidades pobres y en las cuales las viviendas suelen ser construidas de adobe (a veces mezclado con material vegetal), pisos de tierra y techos de lámina, con las casas próximas entre ellas, formando núcleos familiares. Por otro lado las viviendas en El Salvador son construidas de mejor calidad a partir de adobe y/o ladrillo cocido y con techos de teja, lo que permite tenerlas en mejores condiciones en comparación a las de Jutiapa.

Los remanentes de bosque ubicados en los alrededores de las comunidades varían entre las localidades de estudio, predominando el bosque seco deciduo en Jutiapa y Santa Ana y bosque perenne en Ahuachapán y Sonsonate (Monroy-Escobar, comunicación personal, 2016).

La reforestación con árboles no nativos es más común en las localidades de El Salvador y se encuentran varios árboles próximos a las viviendas (Monroy-Escobar, comunicación personal, 2016).

3.3 Triatominae

La subfamilia Triatominae se encuentra incluida dentro de la familia: Reduviidae, del orden Hemiptera y de la clase Insecta, estos se caracterizan por poseer un hábito hematófago obligado (Lent & Wygodzinsky, 1979, pp. 125-126,175).

Los triatominos de la subfamilia Triatominae presentan un cuerpo, dorsiventralmente aplanado y es más grande en las hembras que en los machos. Como parte de su hábito alimenticio hematófago, presentan un

aparato succionador (probóscide) y el cual es utilizado como carácter para distinguir entre triatominos reduvidos y otras chinches con diferente conducta alimenticia (fitófagos y depredadores) (Calderón, 2008, pp. 13-14). Dentro de la subfamilia Triatominae podemos encontrar a los principales géneros comúnmente asociados a la enfermedad de Chagas: *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*; los cuales utilizando la cabeza y la inserción del tubérculo antenífero se pueden distinguir entre ellos. (Calderón, 2008, pp. 13-14).

En el desarrollo de estos insectos se observa una metamorfosis simple. Su ciclo de vida comprende los estados de huevo, 5 estadios ninfales en los cuales todavía no es posible detectar fenotípicamente el sexo, y la fase adulta (Bar, 2016). Tanto los estadios ninfales como los adultos se alimentan de sangre, teniendo así una amplia gama de posibles hospederos como el hombre, mamíferos, aves, anfibios y reptiles (Bar, 2016).

Existen alrededor de 130 especies de triatominos, las cuales se agrupan en 17 géneros y unas 5 tribus (Hernandez & Gonzalez, 2006, pp. 107-108; Schofield, Diotaiuti, Dujardin, 1999, pp. 375). Estas se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales, y más del 50% de estas especies ha sido natural o experimentalmente infectadas con *T. cruzi*, por lo que se les consideran vectores potenciales de la enfermedad de Chagas (Lent & Wygodzinsky, 1979, pp. 158).

3.3.1 *Triatoma dimidiata* (Latrielle, 1811)

Triatoma dimidiata es una especie hematófaga que está reportada desde México hasta el norte de Sudamérica, distribuyéndose con mayor amplitud en

México, Centroamérica, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Guhl, 2009, pp. 229-230). Es considerada como una de las principales vectores del parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas (Lent & Wygodzinsky, 1979, pp. 158).

Miden entre 2.5 y 3.5 cm de largo en su fase adulta y se encuentran diversos factores que influyen en su tamaño tales como sexo de los individuos (las hembras generalmente son de mayor tamaño), disposición de alimento, y, según estudios recientes adaptaciones locales al entorno (Lent & Wygodzinsky, 1979, pp. 223-225). Presentan una coloración café oscuro a negro en el pronoto y escutelo, mientras que el dorso del abdomen es anaranjado a café claro y se encuentra marcado por barras laterales de color negro (Calderón, 2008, pp. 16; Lent & Wygodzinsky, 1979, pp. 223-225). La cabeza es alargada y cilíndrica, el pronoto trapezoidal con dos lóbulos anterior y posterior, los hemiélitros se cruzan en forma plana sobre el dorso, y tienen de dos a tres celdas en la membrana (Adarme, 2010, pp. 24-27). Presentan una preferencia por temperaturas entre en el rango de 26° C a los 30° C (Marquardt, 2004, pp. 717).

Se ha observado que *T. dimidiata* es atraída por la luz, lo que podría explicar las altas tasas de infestación en viviendas cercanas a ambientes silvestres y comúnmente relacionado a poblaciones de áreas rurales con limitadas condiciones sociales, económicas y educativas (Lent & Wygodzinsky, 1979, pp. 225; Cedillos, Romero, Ramos, & Sasagawa, 2011).

Dada la alta variabilidad y adaptabilidad de esta especie a diferentes ambientes, se le puede encontrar en cuevas, montículos de piedra, viviendas agrietadas, ruinas, nidos y madrigueras de animales, palmeras, huecos de los árboles y cúmulos de leña (Schofield, 2000, pp.11). Estas poblaciones tienden a ser más numerosas en viviendas donde las posibles fuentes de alimento son mayores; sin embargo, se han encontrado otros factores que influyen en la dinámica poblacional tales como la construcción de las viviendas, el tipo de techado, y la limpieza y organización de las viviendas, entre otras (Schofield, 1994, pp. 2; Monroy, Bustamante, Rodas, Enriquez, & Rosales, 2003, pp. 801-802).

3.4 Estructuración génica de *T. dimidiata*

Triatoma dimidiata es un vector que presenta una alta variabilidad (morfológica, cromática y genética) y adaptabilidad a diferentes ambientes. Debido a esta alta variabilidad, estudios de la diversidad genética de esta chinche ha permitido discernir lo que aparentemente indica ser un complejo de especies (Bargues, *et al.*, 2008, pp.7-10). Por medio del estudio del marcador molecular ITS-2, se observaron diferentes agrupaciones de *Triatoma dimidiata* a lo largo de su distribución espacial, clasificándolos así en 4 grupos diferentes, pero dada la limitación de un solo marcador molecular y siendo este altamente conservado se recomendó realizar futuros estudios en donde se implementaran otro tipo de marcadores moleculares (Bargues, *et al.*, 2008, pp. 7-10; Monteiro, *et al.*, 2013, pp. 12-13).

Monteiro *et al.* (2013) llevaron a cabo otro estudio utilizando dos genes mitocondriales, el Citocromo B y el ND4, en *T. dimidiata* colectadas en diferentes localidades y encontraron resultados similares a los obtenidos por

Bargues *et al.* (2008) en cuanto a la existencia de 4 grupos bien diferenciados entre ellos y de los cuales se recomienda verificar su estatus taxonómico (Monteiro, *et al.*, 2013, pp.12).

El Grupo I abarca desde el sur de México, pasando por toda Centroamérica hasta Colombia; el Grupo II está conformado por poblaciones de la parte Oeste y Noroeste de México, así como también de Petén; el Grupo III incluye individuos de la península de Yucatán y el Grupo IV incluye muestras selváticas de Belice (Monteiro, *et al.*, 2013, pp. 12). Según Monteiro *et al.* (2013) los individuos pertenecientes a las localidades de El Salvador y Jutiapa pertenecen al Grupo I o Grupo 1A según Bargues *et al.* (2008).

3.5 Estructuración genética a escala pequeña.

Todos los organismos viven en ambientes que varían a lo largo del tiempo y espacio, y las influencias ambientales pueden ser un factor determinante para la variación y posible estructuración entre poblaciones (McGaughran, Morgan, & Sommer, 2014, pp. 1-2).

Dionne *et al.* (2008) demostraron la influencia que podían tener las variables ambientales en la estructuración genética del salmón *Salmo salar*. En sus estudios Dionne *et al.* (2008) evidenciaron que al igual que la distancia geográfica (interacción del flujo génico), los factores ambientales relacionados con la temperatura también jugaban un papel importante en la estructura genética de los peces.

Por otro lado McGaughran *et al.* (2014) demostraron cómo las variables ambientales (temperatura y precipitación) en el nemátodo *Pristionchus*

pacificus de la isla Reunión, implicaban una gran importancia en la estructuración genética en una escala pequeña, más influyentes inclusive que la propia distancia geográfica.

3.6 *Trypanosoma cruzi* (Chagas)(Euglenozoa:Trypanosomatidae)

El parásito fue descubierto en 1909 por Carlos Chagas en Brasil; es el causante de la tripanosomiasis americana también conocida como enfermedad de Chagas (Steverding, 2014, pp. 1-4). La distribución de la infección se encuentra relacionada con la distribución de los vectores, hematófagos de la familia Reduviidae; sin embargo, actualmente se sabe que la enfermedad no se encuentra limitada únicamente a América sino que dada la migración humana esta se puede encontrar ahora en algunos países de Europa y en menor cantidad en el Pacífico Occidental (OMS, 2016; Cazzulo & Segura, 2016).

El ciclo de vida del parásito incluye a dos hospederos, un invertebrado vector y un mamífero. En el hospedero mamífero el *T. cruzi* se encuentra en su mayoría en la sangre como tripomastigotes (formas celulares no divisibles) y en las células como amastigotes (formas replicativas) (García, González, & Azambuja, 1999, pp. 213-214). Cuando el triatomino hematófago ingiere la sangre de un organismo infectado este ingiere los tripomastigotes (The center for food security and public health & Institute for international cooperation in animal biologics, 2010, pp. 1-2). Dentro del insecto pasadas de 2 a 4 semanas este parásito migra hacia el intestino posterior en donde sufre una transformación a tripomastigote metacíclico infeccioso, al momento de alimentarse el insecto de un mamífero y defecar lleva en las heces el parásito infectivo el cual puede entrar por contacto en una herida o por membranas

mucosas, repitiendo así el ciclo del parásito (The center for food security and public health & Institute for international cooperation in animal biologics, 2010, pp. 1-2).

Trypanosoma cruzi se ha convertido en un modelo de estudio para epidemiólogos moleculares y genéticos de poblaciones y, debido a esto es uno de los protozoos más estudiados en cuanto a evolución y estructura poblacional (Zingales, *et al.*, 2012, pp. 240).

Este parásito se ha clasificado en 6 Unidades Discretas de Tipificación (DTU por sus siglas en inglés “Discrete Typing Unit”) (Tibayrenc, 2003, pp. 1). Inicialmente se creía que *T. cruzi* tenía una reproducción meramente clonal, pero recientemente se ha evidenciado eventos de introgresión mitocondrial, intercambio genético e hibridación, obteniendo así en *T. cruzi* un grupo monofilético pero genéticamente heterogéneo con al menos seis linajes filogenéticos diferentes o DTU (Muñoz, *et al.*, 2013, pp. 6-7). Los DTU son grupos genéticamente distinguibles, y son identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes llamados etiquetas “tags” (Zingales, 2009, pp. 1051).

Las 6 unidades descritas son *T. cruzi* I, *T. cruzi* II, *T. cruzi* III, *T. cruzi* IV, *T. cruzi* V y *T. cruzi* VI (abreviados por sus siglas como TCI a TCVI) (Tibayrenc, 2003, pp. 1). Existen diferencias entre los DTU’s en cuanto a su distribución geográfica, vectores, hospederos e incluso en la tasa de parasitismo (Zingales, *et al.*, 2012, pp. 243; Sales-Campso, *et al.*, 2015, pp. 435).

Representando las áreas de El Salvador y Guatemala está el TCI que parece presentar la mayor distribución geográfica en comparación con los otros DTU (Zingales, *et al.* 2012, pp. 243). Posteriores estudios han tenido como objetivo encontrar los patrones de estructuración génica dentro de los mismos DTU, esto debido a que según algunos trabajos citados por Messenger & Miles (2015) existen eventos los cuales en el ciclo de vida del parásito hay intercambio genético o introgresión mitocondrial. Uno de estos estudios fue el realizado por Solórzano (2015) quien encontró estructuración genética en el parásito dentro del DTU TC1 entre muestras colectadas en El Salvador y Guatemala.

3.7 Genotipificación por Secuenciación (GBS por sus siglas en inglés “Genotyping by Sequencing”) para la detección de Polimorfismos de un solo Nucleótido (SNP por sus siglas en inglés “Single Nucleotide Polymorphism”).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son variantes nucleotídicas comunes que se pueden encontrar en el genoma. Son los marcadores moleculares más abundantes, y debido a esto los podemos encontrar en prácticamente cualquier parte del ADN y pueden presentar implicaciones sobre la expresión de los genes. (Baird, *et al.*, 2008, pp. 1; Ramirez-Bello, Vargas-Alarcon, Tovilla-Zarate, & Fragoso, 2013, pp. 220).

El método para la obtención de secuencias colindantes a sitios de restricción de ADN genómico para el descubrimiento de SNP y genotipificación fue inicialmente demostrado por Miller *et al.* (2007). Este método se denomina ADN Asociado a Sitios de Restricción (RAD por sus siglas en inglés “Restricted Site Associated DNA”) en el cual ADN genómico es digerido mediante una enzima

de restricción particular y los fragmentos obtenidos son ligados a enlazadores biotinilados (Miller, Dunham, Amores, Cresko, & Johnson, 2007, pp. 241).

El ADN después es cortado al azar en fragmentos más pequeños que la distancia media entre sitios de restricción, dejando pegados en los enlazadores solo los fragmentos colindantes directamente a los sitios de restricción (Miller, Dunham, Amores, Cresko, & Johnson, 2007, pp. 241). Estos fragmentos son inmovilizados usando cuentas de streptavidina mientras el resto del ADN es removido (Miller, Dunham, Amores, Cresko, & Johnson, 2007, pp. 241).

Una nueva estrategia de secuenciación múltiple la cual utiliza un código de barras, permitió que la eficacia incrementara, al igual que se redujeran los costos de la realización de la prueba, principalmente ya que los códigos de barras están incluidos en una de las secuencias del adaptador, haciendo que los costos del reactivo para construir las bibliotecas de secuencias fueran menores (Elshire, *et al.*, 2011, pp. 2). La posición del código de barras, justo por delante del sitio de corte de la enzima de restricción en el ADN genómico elimina la necesidad de una segunda lectura de secuenciación (Elshire, *et al.*, 2011, pp. 2).

La Genotipificación por Secuenciación (GBS por sus siglas en inglés "Genotyping by Sequencing") también conocido como Genotipificación de Nueva Generación, es un método de análisis genético que permite identificar SNP's al igual que hacer estudios de genotipificación. Entre algunas de sus aplicaciones, tales como la detección de genotipos y mapeo genético, la genotipificación basada en la secuencia provee una alternativa menos costosa para el estudio de la variación genética (Illumina, 2016).

La estrategia de código de barras en el GBS es similar a la de RADseq pero la modulación del código de barras de la composición y largo de los nucleótidos resulta en menores errores de ajuste de secuencias (Elshire, *et al.*, 2011, pp. 2).

La generación de los fragmentos de restricción propuesto por Elshire *et al.* (2011) es más corto que el RADseq además de las diferencias en presentar un solo paso de digestión del ADN en comparación con los dos pasos en el RAD, el ligado de los adaptadores produce que se reduzca la manipulación de las muestras y de esta manera, que existan menos pasos de purificación y los fragmentos no son seleccionados por tamaño.

4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La enfermedad de Chagas es causada por una infección parasitaria del protozooario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido a los humanos y animales, principalmente por chinches hematófagas Reduviidae de la subfamilia Triatominae. Esta enfermedad es común en áreas rurales en donde las comunidades son de muy escasos recursos y las viviendas por lo general están construidas a partir de materia orgánica, adobe, lodo y otros materiales fáciles de acceder (CDC, 2010; Castillo & Wolff, 2000, pp. 59-60); siendo el ladrillo rojo y adobe el material predominante para las paredes de El Salvador y el palopique y bajareque para las viviendas de Guatemala (Bustamante, *et al.*, 2015, pp. 6-7).

Triatoma dimidiata uno de los principales vectores para la enfermedad de Chagas en las Américas. Es una especie nativa que frecuentemente invade las viviendas y que se ha observado en diferentes ecotopos bajo diferentes condiciones ecológicas (Zeledon & Rojas, 2006, pp. 381-382). Su distribución actual resulta ser una de las más amplias entre otros triatominos hematófagos, siendo esta desde el Sur de México hasta la parte Norte de Sudamérica, por lo que se le considera un vector de suma importancia de la enfermedad de Chagas (Calderón, *et al.*, 2004, pp. 882).

Dada las intervenciones que se han dado con fines de controlar el vector de la enfermedad, entre ellas rociamientos de insecticida y mejoramiento de viviendas, para Centroamérica el número total de personas infectadas ha disminuido de 1.8 millones de personas en el año 2000 a 0.4 millones en el año 2010 (JICA, 2014, pp. 5-6). Para Guatemala se ha observado una disminución

considerable en cuanto a la prevalencia e incidencia de casos agudos de la enfermedad desde el 2000 al 2010 (JICA, 2014, pp. 5-10).

Sin embargo, El Salvador no ha logrado disminuir tan efectivamente la prevalencia e incidencia de la enfermedad y se ha reportado una considerable cantidad de casos agudos nuevos cada año, concentrándose en su mayoría en los departamentos de Santa Ana, Sonsonate y Ahuachapán (JICA, 2014, pp. 5-10; Sasagawa, *et al.*, 2014, pp. 256-257). Por lo que resulta en un área de interés para poder entender la enfermedad de Chagas mediante el estudio de la composición genética de las poblaciones.

Diversos trabajos se han enfocado en estudiar las diferencias entre poblaciones de *Triatoma dimidiata*. Dorn *et al.* (2009) encontraron una amplia estructuración genética en las poblaciones mediante el estudio del marcador molecular ITS2, separando así a la especie *Triatoma dimidiata* en 4 grupos diferentes distribuidos a lo largo del Sur de México hasta Panamá, siendo el Grupo 1A el de mayor distribución y abundancia. Ese mismo Grupo 1A que representa a los *Triatoma dimidiata* colectados en Jutiapa, Sonsonate, Ahuachapán y Santa Ana. Sin embargo debido al uso exclusivo del marcador molecular de ITS2, no se logró hacer una diferenciación más detallada de las poblaciones (Dorn *et al.*, 2009, pp. 1-13).

De igual manera es importante conocer las potenciales asociaciones y diferencias que pueden existir entre las tasas de infección entre *Triatoma dimidiata* según sus diferencias genéticas, entre ellas lo observado por Ramírez y Dumontiel (2015), quienes demostraron que la tasa de infección en *T. dimidiata* híbridos (entre Grupos 2 y 3 de ITS2) de Yucatán, México era

considerablemente mayor en comparación a triatominos de los Grupos 2 y 3 de ITS2.

Es por ello que el presente trabajo pretende llevar a cabo el análisis de la diversidad genética de *Triatoma dimidiata* en zonas fronterizas e hiperendémicas de la enfermedad entre Guatemala y El Salvador mediante la secuenciación de nueva generación.

Por otro lado, la determinación de los fragmentos que presentan mayor diferenciación entre Guatemala y El Salvador y su identificación en el banco de genes al igual que la existencia de relación con proteínas asociadas a la infección de *Triatoma dimidiata* como aquellas encontradas por Diaz, *et al.* (2016) nos ayudaría a relacionar entre los triatominos infectados y la cantidad de casos agudos presentes en las áreas de Guatemala y El Salvador.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo principal

Estudiar la diversidad genética de *Triatoma dimidiata* en las zonas fronterizas de Guatemala y El Salvador.

5.2 Objetivos específicos

Determinar los índices de diversidad de *Triatoma dimidiata* en las zonas fronterizas de Guatemala y El Salvador.

Determinar la distribución espacial de la diversidad genética de *Triatoma dimidiata*.

Determinar si los fragmentos que tienen valores mayores de F_{ST} entre Guatemala y El Salvador corresponden a proteínas previamente identificadas en el banco de genes.

Identificar si existe asociación entre índices de similitud genética entre puntos de colecta y condiciones ambientales y distancias geográficas.

6. HIPÓTESIS

Existe estructuración genética en *Triatoma dimidiata* en la zona fronteriza de Guatemala y El Salvador, dada las diferentes condiciones ambientales.

7. PLAN DE DESARROLLO

7.1 Diseño experimental

El universo de trabajo fue constituido por las chinches de *T. dimidiata* presentes en las localidades fronterizas de Guatemala y El Salvador.

La muestra consistió de los triatominos colectados en viviendas humanas colonizadas por el vector *T. dimidiata* situadas en las localidades de Jutiapa en Guatemala y Santa Ana, Sonsonate y Ahuachapán en El Salvador. En esas localidades la incidencia de infestación vectorial y parasitaria es mayor con relación al resto de otros departamentos de los respectivos países (Solorzano, 2015, pp. 9-12). Se agregó la localidad de Chiquimula en Guatemala como grupo de comparación, la cual no presenta una alta incidencia de casos agudos de la enfermedad de Chagas como en las demás localidades de estudio; sin embargo, esta se encuentra colindante con la localidad de Santa Ana (Anexo 1). Se utilizaron un total de 62 individuos (22 de Jutiapa, 21 de Santa Ana, 2 de Ahuachapán, 11 de Sonsonate y 6 de Chiquimula). La muestra estuvo sujeta a la disponibilidad de *T. dimidiata* a los cuales se logró secuenciar y obtener las bases de datos genéticas.

7.2 Procedimiento y Métodos

Se utilizaron secuencias de nucleótidos de *T. dimidiata* previamente muestreados en regiones fronterizas entre Guatemala y El Salvador. Las chinches de las aldeas de Jutiapa fueron colectadas por personal del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), mientras que para El Salvador la colecta se llevó a cabo por el personal del Ministerio de Salud de El Salvador (MINSAL).

7.2.1 Colecta

La colecta de *T. dimidiata* se llevó a cabo en aldeas donde se ha registrado alta infestación vectorial y parasitaria; en los departamentos de Jutiapa en Guatemala y Santa Ana, Ahuachapán y Sonsonate en El Salvador (Anexo 2).

7.2.2 Extracción de ADN y Secuenciación

Los *T. dimidiata* recolectados se almacenaron en alcohol-glicerina. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de ADN a partir de una de las extremidades (patas) o del abdomen de las chinches, utilizando el kit de extracción de ADN EZNA Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek, Inc) bajo las especificaciones de la compañía.

La secuenciación se llevó a cabo por la técnica de Nueva Generación “Genotyping by sequencing” (GBS). La técnica consiste en cortar el ADN por medio de la enzima de restricción PstI, la cual genera cortes en las secuencias 5'-C TGCA↓G-3' 3'-G↑ACGT C-5'. Posteriormente se adicionan adaptadores a los cuales se unen los cebadores donde iniciará la polimerasa de ADN a generar una nueva hebra usada en la secuenciación de las regiones adyacentes al sitio de restricción. Los parámetros utilizados para la secuenciación están detallados en los trabajo de Solórzano (2015, pp. 34-36) y Davey & Blaxter (2011, pp. 416-423).

El presente es un proyecto internacional con la colaboración de varias instituciones. La extracción de ADN de las muestras fue hecha por personal de la Universidad de Vermont. La secuenciación fue hecha en la Universidad de Cornell, a través del apoyo de la Universidad de Loyola.

7.3 Análisis Bioinformático

Para el análisis de las secuencias de ADN se utilizó el programa Stacks (Catchen, Amores, Hohenlohe, Cresko, & Postlethwait, 2011, pp. 172-175), el cual permitió ensamblar grandes cantidades de secuencias cortas de diversas muestras y obtener de esta manera el genotipo de todos los individuos.

Dada la utilización del abdomen como fuente de ADN para algunos especímenes de *T. dimidiata*, fue necesario tener cuidado con secuencias de ADN externo procedentes de residuos alimenticios, parásitos, bacterias, etc. Así, previo a utilizarlo se filtraron las secuencias de ADN no propias de la chinche mediante la utilización de un catálogo de referencia obtenido del ADN extraído de patas. Solo se consideró el material genético propio de *T. dimidiata*.

Se utilizaron loci presentes en el 80% de los individuos, descartando aquellos que no cumplían con este requisito. A partir del análisis en Stacks se obtuvo un archivo de salida con formato del software "Structure", el cual se corrió en el software Structure v 2.3 para obtener el número más probable de grupos genéticos (k) mediante análisis bayesiano (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000, pp. 945-959), implementado para complementar los análisis de genética de poblaciones y poder detectar la estructuración genética. Para ello se empleó un número de repeticiones igual a 10.

Con el programa en línea Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012, pp. 359-361) se analizaron los resultados de Structure para determinar el valor más probable de grupos genéticos (K). Posteriormente se utilizó el programa CLUMPP v 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007, pp. 1801-1806) para resumir los resultados de las 10 repeticiones de Structure y obtener un único resultado

integral. A partir de lo obtenido en el resumen de CLUMPP se sacaron los valores de pertenencia de cada uno de los individuos y se graficaron para detallar la separación de grupos genéticos (K).

Utilizando el paquete del software Stacks, se obtuvieron los Índices de Fijación de Wright (F_{ST} por sus siglas en inglés “Fixation Index Statistics”) para cada uno de los marcadores genéticos entre países. Estos índices de fijación (F_{ST}) nos permiten medir las diferencias en una población dada la estructuración genética (Piñero, *et al.*, 2016, pp. 420-421). Luego se seleccionaron aquellos marcadores cuyos valores que se encontraban por arriba del percentil 10 de todos los resultados. Con base en la secuencia de dichos marcadores, se realizó una búsqueda BLAST en la base de datos de proteínas (blastx) (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990, pp. 404-407) utilizando los parámetros de restricción: Organismo Insecta y valor de “e” = 10^{-05} .

Las desviaciones de equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento fueron evaluados utilizando el software GENEPOP 1.2 (Raymond & Rousset, 1995, pp. 248-249).

7.4 Análisis Genéticos

El archivo de salida generado en GENEPOP se transformó al formato Arlequin utilizando el programa GENEPOP en su versión en línea (Raymond & Rousset, 1995, pp. 248-249). Posteriormente se cambió la extensión “.txt” a “.arp” para permitir que el programa Arlequin (Excoffier & Lischer, 2010, pp. 564-567) abriera el archivo. Utilizando Arlequin v 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010, pp. 564-567) se estimó el índice de fijación F de Wright (F_{ST}) entre las poblaciones de Chiquimula, Jutiapa, Santa Ana y Sonsonate/Ahuchapan

(Sonsonate y Ahuachapan se unieron debido a la poca cantidad de muestra y su cercanía geográfica). Esto nos permitió analizar el coeficiente de endogamia debido a apareamientos no aleatorios dentro y entre las poblaciones, ya sea por cruza entre parientes dentro de una población o por el balance entre deriva y flujo génico. Luego con el programa Arlequin se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con las muestras clasificadas con base a las poblaciones anteriores divididas en países, al igual que se estimaron los índices de heterocigosidad esperada y observada como medidas de diversidad genética.

7.5 Análisis de Modelo de Distribución potencial de la especie.

Para la realización del modelo de distribución potencial de la especie *T. dimidiata* se obtuvieron, durante la colecta en Guatemala, las coordenadas geográficas utilizando un sistema de posicionamiento global (GPS por sus siglas en inglés "Global Positioning System"). Para los *T. dimidiata* de El Salvador las coordenadas se obtuvieron haciendo búsquedas por referencia a los poblados usando Google Earth 7.1.7.2600. Posteriormente se preparó una tabla separando las localidades de muestreo según país, localidad, longitud y latitud (Anexo 2). La cantidad de puntos georreferenciados estuvo limitada a la información recopilada del GPS y referencias geográficas de las aldeas.

Los datos ambientales para las localidades de interés (en Guatemala y El Salvador) fueron descargadas del sitio de internet WorldClim (<http://www.worldclim.org/>). Los datos de las capas incluyen temperatura y precipitación, y son creadas mediante la interpolación de datos climáticos observados alrededor del mundo con una resolución de 1km durante un

periodo de 50 años (1950-2000) (Cuadro 1) (Hijmans, Cameron, Parra, Jones, & Jarvis, 2005, pp. 1965).

Cuadro 1. Variables Bioclimáticas obtenidas de Worldclim v1.4.

Código	Variable Climática
BIO1	Temperatura media anual
BIO2	Rango diurno medio (Media de la T mensual (T máx -T mín)
BIO3	Isotermia (BIO2 / BIO7) (* 100)
BIO4	Estacionalidad de la temperatura (σ de la temperatura * 100)
BIO5	Temperatura máxima del mes más cálido
BIO6	Temperatura mínima del mes más frío
BIO7	Rango anual de temperatura (BIO5- BIO6)
BIO8	Temperatura media del trimestre más húmedo
BIO9	Temperatura media del trimestre más seco
BIO10	Temperatura media del trimestre más cálido
BIO11	Temperatura media del trimestre más frío
BIO12	Precipitación anual
BIO13	Precipitación del mes más húmedo
BIO14	Precipitación del mes más seco
BIO15	Estacionalidad de precipitación (Coeficiente de variación)
BIO16	Precipitación del trimestre más húmedo
BIO17	Precipitación del cuarto más seco
BIO18	Precipitación del trimestre más cálido
BIO19	Precipitación del trimestre más frío

Fuente de datos. (WorldClim v1.4, Enero 2017; <http://www.worldclim.org/>).

El programa MAXENT v3.3.3 (Phillips, Dudik, & Schapire, 2004, pp. 655; Phillips, Anderson, & Schapire, 2006, pp. 231) fue utilizado para modelar la distribución potencial geográfica de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* de Guatemala y El Salvador, utilizando los parámetros por defecto (máximo de iteraciones de 5000, umbral de convergencia 0.00001, prevalencia por defecto 0.5). El programa emplea un enfoque de máxima entropía, tomando las capas ambientales como formato de entrada al igual que georreferencias de los especímenes muestra (Phillips, Dudik, & Schapire, 2004, pp. 655; Phillips, Anderson, & Schapire, 2006, pp. 231).

Esto produce un archivo ascii el cual posteriormente se utilizó en el SIG (por sus siglas “Sistema de Información Geográfica”) QGIS v2.14.3-Essen, para editar las capas del ámbito de dicha especie, interponiendo las capas obtenidas sobre mapas de Guatemala y El Salvador. A través de las propiedades de cada capa se cambiaron los colores a rojo para representar la distribución potencial de Guatemala y a verde para la distribución de El Salvador.

Entre otros archivos de salida obtenidos por Maxent están las tablas de Jackknife que nos indica la relación y contribución de cada una de las variables ambientales al modelo generado.

7.6 Comparación entre localidades

Utilizando el programa de QGIS se introdujeron las coordenadas geográficas (Anexo 2) sobre las capas ráster de condiciones bioclimáticas para realizar una comparación entre las localidades. Los ráster se componen de una matriz de píxeles denominadas celdas, cada celda con un valor o atributo que representa las condiciones de la zona de dicho pixel (QGIS, 2017). Se ubicó el pixel correspondiente a cada punto de georreferencia y se obtuvieron los atributos (valores de densidad de cada pixel) para las 19 condiciones bioclimáticas por localidad (Cuadro 2).

A partir de la matriz se realizó un Análisis de Componentes Principales utilizando el programa PAST v3.12 (Hammer, Harper, & Ryan, 2001, pp. 1-9) para determinar las correlaciones entre las localidades.

Cuadro 2. Matriz de atributos según georeferencias de localidad de las 19 variables Bioclimáticas.

	Chiquimula (14.7, -89.2833)	Jutiapa (14.33207, -89.9376)	Santa Ana (14.25928, -89.4324)	Sonsonate (13.73313, -89.5705)	Ahuachapán (13.9667, -89.8167)
Bio1	203	225	234	231	246
Bio2	106	115	125	124	113
Bio3	67	72	75	77	76
Bio4	1351	1062.5	825	661	698
Bio5	287	304	320	313	321
Bio6	129	145	154	152	174
Bio7	158	159	166	161	147
Bio8	210	230	233	230	245
Bio9	195	210.5	225	231	245
Bio10	219	236	246	240	256
Bio11	184	209.5	224	223	238
Bio12	1436	1376.5	1854	1938	1763
Bio13	251	284	342	393	337
Bio14	32	2	4	2	3
Bio15	66	90.5	90	93	92
Bio16	627	669.5	965	1034	942
Bio17	109	11	20	14	15
Bio18	445	230.5	296	235	240
Bio19	146	31	50	65	46

Fuente de datos experimentales. QGIS v2.14.3-Essen (QGIS, 2017).

7.7 Correlación entre distancias genéticas y geográficas y variables bioclimáticas.

7.7.1 Fst vs Distancias Geográficas.

A partir de los resultados obtenidos por el archivo de salida de Arlequin, se tomó la matriz de valores de F_{ST} por pares de poblaciones. De la misma manera se generó una matriz de distancias geográficas basadas en las distancias lineales entre los puntos GPS (Anexo 3). Utilizando el programa R 3.3.1 (R Development Core Team, 2008), se realizó una prueba de Mantel de las matrices para ver si existía una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas entre localidades (aislamiento por distancia).

7.7.2 F_{ST} vs Variables Bioclimáticas.

Por último se realizó una prueba de Mantel utilizando la misma matriz de F_{ST} entre pares de poblaciones y una matriz global de correlaciones entre pares de localidades con todas las variables bioclimáticas, al igual que por cada variable bioclimática individual (Bio1 a Bio19 del cuadro 2).

8. RESULTADOS

8.1 Análisis de Diversidad y Estructuración Genética

A partir de las muestras de *Triatoma dimidiata* se realizó un catálogo de secuencias para poder ser utilizado como referencia en la detección de SNP's, obteniendo así un total por arriba de los 22600 loci de los cuales fueron filtrados y seleccionados aquellos que cumplieron con estar presentes en un 80% de las muestras. A partir de esto se construyeron los genotipos utilizando 9468 loci aceptados para el análisis.

Con el programa Arlequin, se obtuvieron los valores de heterocigosidad para comparar la diversidad genética entre las localidades de estudio (Cuadro 3) y se representó gráficamente utilizando la opción de Histogramas en Excel ® mostrando la frecuencia de valores de heterocigosidades entre localidades (Anexo 4).

Cuadro 3. Valores de Diversidad Genética.

Localidad	Heterocigosidad Observada (HO)	Desviación Estándar (σ)	Heterocigosidad esperada (HE)	Desviación Estándar (σ)
Chiquimula	0.29674	0.24854	0.39100	0.18225
Jutiapa	0.15507	0.14856	0.24546	0.15300
Santa Ana	0.13551	0.14548	0.17544	0.14389
Sonsonate_Ahuachapán	0.16183	0.15842	0.22325	0.14848

Fuente de datos experimentales obtenidos mediante el programa Arlequin ver 3.5.2.2.

Utilizando el programa Arlequin se llevó a cabo un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) encontrando así que la mayor variación se encontró dentro de las poblaciones (96.28%) seguido por entre poblaciones dentro de grupos (3.15%) y finalmente entre grupos (0.57%)(Cuadro 4). De igual manera se

obtuvo el valor de F_{ST} global de 0.037, separando las poblaciones según grupos.

Cuadro 4. Valores de Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para la determinación de la mayor fuente de variación, entre grupos, entre poblaciones dentro de grupo y dentro de poblaciones.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre grupos	1	56.058	0.13629 Va	0.57
Entre poblaciones dentro de grupos	2	83.88	0.75219 Vb	3.15
Dentro de poblaciones	114	2622.054	23.00047 Vc	96.28
Total	117	2761.992	23.88896	100

Fuente de datos experimentales obtenidos mediante el programa Arlequin ver 3.5.2.2.

Los resultados obtenidos mediante el programa Structure demostraron estructuración génica obtenida entre las localidades de estudio, mostrando la diversidad genética asociada a la distribución espacial; el número de grupos genéticos (K) más probable resultó ser de 2. El programa separó claramente al grupo de *T. dimidiata* de El Salvador (Santa Ana, Sonsonate y Ahuachapán) en un grupo más homogéneo, mientras que las poblaciones de Jutiapa y Chiquimula resultan ser un grupo más heterogénea (Figura 1). Mediante el análisis de los F_{ST} entre pares de localidades se obtuvieron valores cercanos a 0; sin embargo, los valores más bajos se encontraron entre las localidades de El Salvador (Santa Ana y Sonsonate_Ahuachapán) y entre Chiquimula y Santa Ana (Cuadro 5).

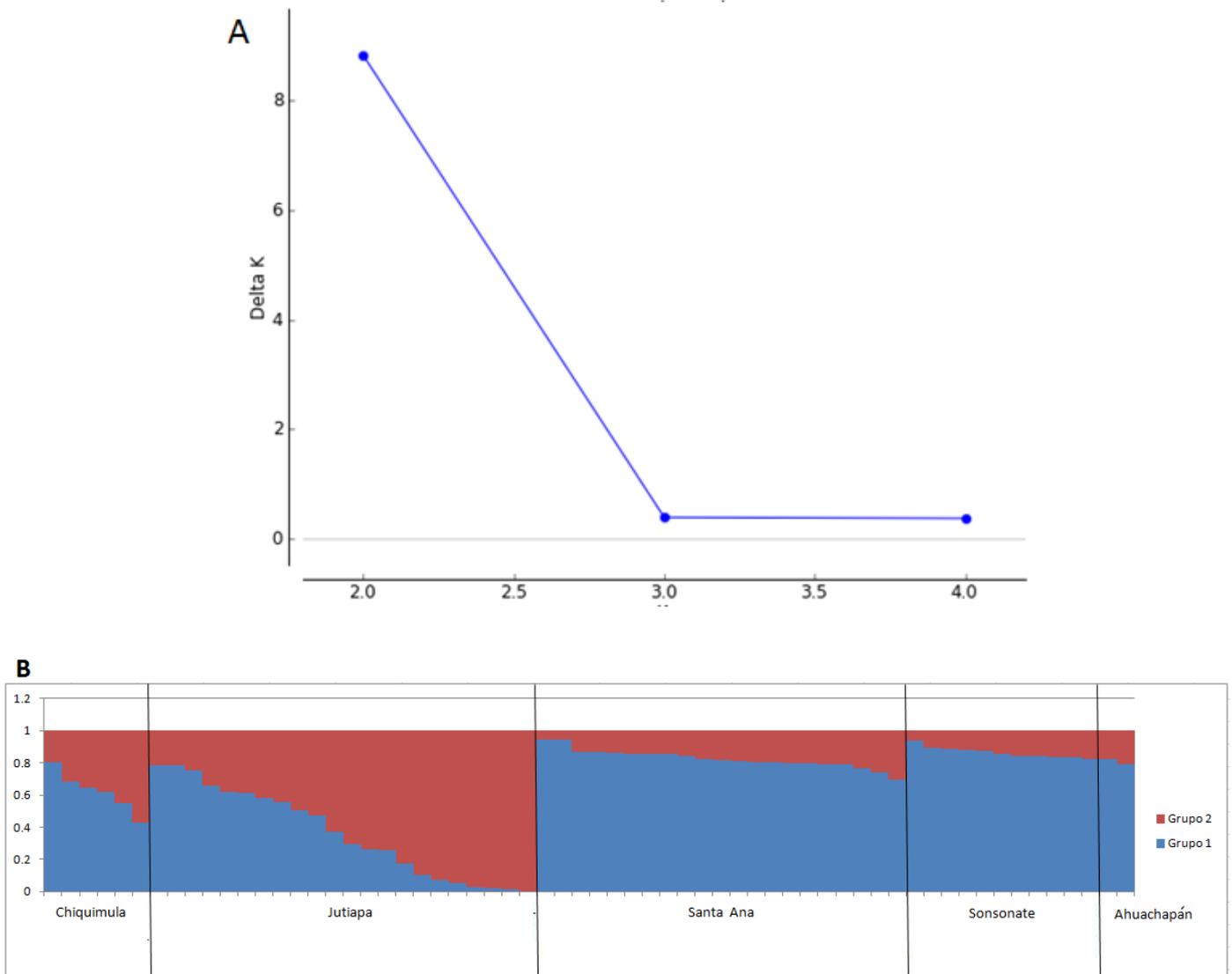


Figura 1. Análisis de Estructuración Genética. A) Cambio en el valor de K. B) Grafico de pertenencia de grupo. Fuente de datos experimentales obtenidos a partir de Structure V2.3, Structure Harvester y Clumpp V1.1.2.

Cuadro 5. F_{ST} entre pares de localidades de estudio.

	Chiquimula	Jutiapa	Santa Ana	Sonsonate_Ahuachapán
Chiquimula	0			
Jutiapa	0.05886	0		
Santa Ana	0.01632	0.04018	0	
Sonsonate_Ahuachapán	0.03796	0.04511	0.01689	0

Fuente de datos experimentales obtenidos mediante el programa Arlequin ver 3.5.2.2.

8.2 Determinación de proteínas a partir de los SNP's del cuantil superior (Percentil 10)

A partir de las secuencias de marcadores genéticos cuyo valor de F_{ST} entre países se encontraban por arriba del cuantil superior 90-100%, se separaron 586 secuencias. Utilizando los filtros descritos en la metodología, se encontraron 21 proteínas (Cuadro 6). Entre las proteínas se encontraron 20 pertenecientes al Orden *Hemiptera* y 1 al orden *Isoptera*. De las 20 anotaciones 18 de ellas pertenecían a la familia de los redúvidos, la mayoría indicando ser de *Triatoma infestans*.

Cuadro 6. Identificación de proteínas mediante similitud de secuencias utilizando búsquedas blastx.

Nombre de Secuencia	Nombre Proteína y descripción	Valor de e
2725_20091	proteasomal atpase-associated factor 1-like protein [Triatoma infestans]	1.00E-12
2725_20091	putative wd40 domain protein [Triatoma dimidiata]	3.00E-12
4605_4871	putative biotin—protein ligase [Panstrongylus megistus]	9.00E-12
2963_20991	Pikachurin [Zootermopsis nevadensis]	2.00E-11
5011_6179	putative nuclear transport receptor exportin 4 importin beta superfamily [Triatoma infestans]	6.00E-11
4961_6044	putative nuclear transport receptor exportin 4 importin beta superfamily [Triatoma infestans]	7.00E-11
5053_6271	putative pol polyprotein [Triatoma infestans]	2.00E-10
2850_20534	putative pol polyprotein [Triatoma infestans]	1.00E-08
5080_6357	putative lian-aa1 retrotransposon protein [Panstrongylus megistus]	1.00E-08
341_11175	zinc finger protein 845-like protein [Triatoma infestans]	5.00E-08
5331_7110	putative glutamate/aspartate and neutral amino acid transporter [Triatoma infestans]	6.00E-08
1930_17289	putative c2h2-type zn-finger protein [Triatoma infestans]	6.00E-08
5035_6221	putative dystrophin-like protein [Panstrongylus megistus]	2.00E-07
5035_6221	putative beta-spectrin [Triatoma infestans]	2.00E-07
4411_4388	putative glutamate/aspartate and neutral amino acid transporter [Triatoma infestans]	3.00E-07
4051_3677	hypothetical protein [Triatoma infestans] similar a "PREDICTED: tetratricopeptide repeat protein 5-like [Cimex lectularius] e value=7e-	4.00E-07

	94, #Acceso=XP_014255434.1”	
2250_18338	putative lian-aa1 retrotransposon protein [Panstrongylus megistus] hypothetical protein [Triatoma infestans] similar a “PREDICTED: uncharacterized protein LOC106677766 [Halyomorpha halys] e	6.00E-07
3186_21902	value=2e-48, #Acceso=XP_014271763.1”	1.00E-06
4905_583	cuticular protein RR-2 motif [Triatoma infestans] PREDICTED: uncharacterized protein LOC106685224 [Halyomorpha	3.00E-06
3349_22610	halys]	3.00E-05
2889_20708	PREDICTED: protein sax-3-like isoform X1 [Cimex lectularius]	7.00E-05

Fuente de datos experimentales obtenidos mediante blastx con base a los datos de trabajo. (NCBI).

8.3 Análisis de Variables Ambientales.

Se realizó un modelo de distribución potencial de la especie *Triatoma dimidiata* según las variables ambientales y las poblaciones georreferenciadas en los departamentos de Guatemala y El Salvador, mediante el programa Maxent 3.3.3 (Phillips, Dudik, & Schapire, 2004, pp. 655). La figura 2 muestra las áreas de distribución potencial de la especie según las 19 variables ambientales de WorldClim en las localidades de Guatemala y El Salvador (Figura 2A y 2B).

En la Figura 2C se traslapan ambos modelos para observar las diferencias en cuanto a la distribución potencial de los *T. dimidiata* de Guatemala y El Salvador. Las áreas de coloración más intensa (rojo para Guatemala y verde para El Salvador) indican sitios con alta probabilidad de condiciones favorables para *T. dimidiata*, a medida que se disminuye la intensidad del color indica las áreas con una baja probabilidad de condiciones favorables para la especie. Mostrando de esta manera áreas de mayor probabilidad diferentes entre la población de Guatemala y El Salvador, aunque también sugiere traslape.

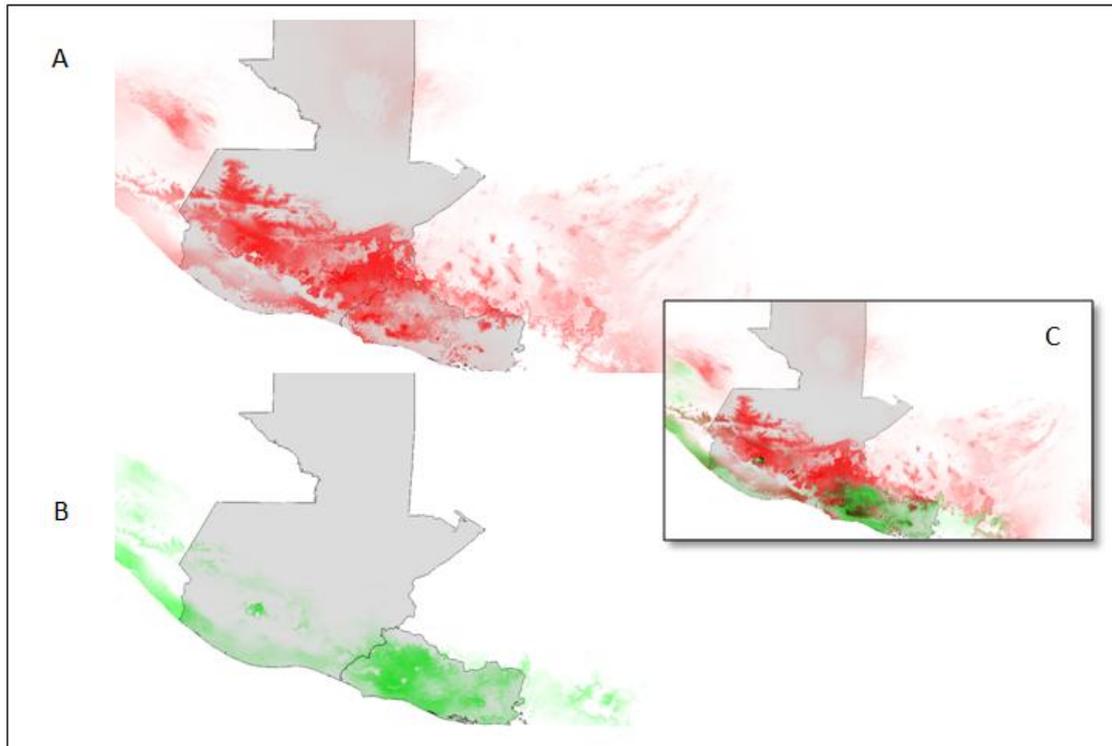


Figura 2. Modelo de distribución potencial de la especie de estudio. A) Distribución potencial de *Triatoma dimidiata* colectados en Guatemala (Jutiapa y Chiquimula), B) Distribución potencial de *Triatoma dimidiata* colectados en El Salvador (Santa Ana, Ahuachapán, Sonsonate), C) Distribución potencial sobrepuesto de *Triatoma dimidiata* colectados entre Guatemala y El Salvador. Guatemala=rojo, El Salvador=verde. Fuente de datos experimentales empleando el programa Maxent, y utilizando las variables Bioclimáticas de WorldClim.

La prueba de Jackknife (Figura 3) se utilizó para explicar la contribución e importancia de las variables ambientales sobre el modelo del ámbito de distribución potencial de la especie. Como se observa en los modelos (Figura 2A, 2B), la distribución no es la misma para ambas localidades (Guatemala y El Salvador). Comparando los ámbitos de los modelos junto con la prueba de Jackknife (Figura 3) se asoció qué variables bioclimáticas influyeron más en la distribución potencial de las poblaciones de *T. dimidiata*. Para Guatemala la variable ambiental con mayor ganancia en cuanto a su importancia está

explicada por la precipitación del trimestre más frío (BIO19) mientras que para El Salvador es la precipitación del mes más seco (BIO14), las cuales aparentan presentar la información más útil por su cuenta. Por otro lado las variables ambientales que disminuyen la ganancia cuando se omiten son, la precipitación del trimestre más cálido (BIO18) para Guatemala y la estacionalidad de la temperatura (BIO4) para El Salvador, por lo que parece tener la mayor información que no está presente en las otras variables.

Se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales para comparar las variables ambientales entre las localidades, empleando los atributos obtenidos por cada uno de los puntos geográficos. En la Figura 4 se observa la correlación (positiva) entre las localidades de El Salvador, mientras que las localidades de Guatemala se encuentran poco correlacionadas. Esto podría contrastarse de igual manera con los modelos de distribución potencial obtenidos por Maxent (Figura 2).

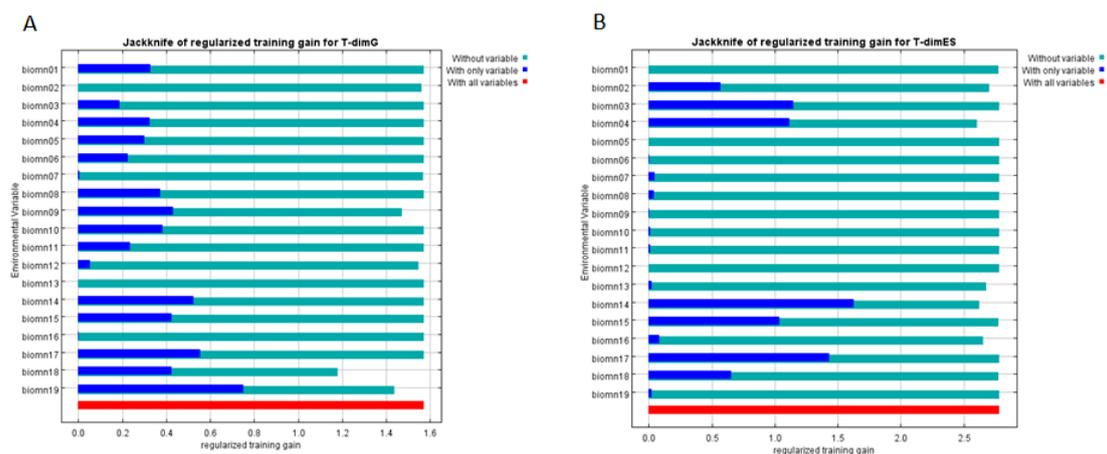


Figura 3. Prueba de Jackknife de la importancia de las variables. A) Contribución de ganancia para la población de Guatemala. B) Contribución de ganancia para la población de El Salvador. Celeste: sin la variable, Azul: como única variable, Rojo: con todas las variables. Fuente de datos experimentales empleando el programa Maxent, y utilizando las variables Bioclimáticas de WorldClim.

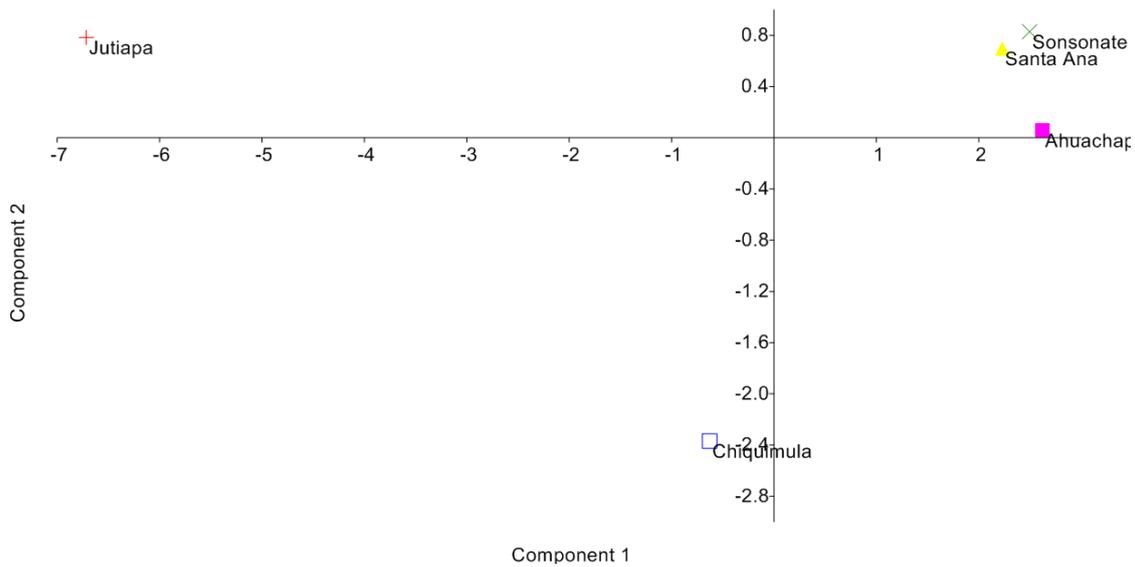


Figura 4. Análisis de Componentes Principales empleando los atributos de las variables ambientales por localidad. Contribución: Componente 1=83.632, Componente 2=9.7337. Fuente de datos experimentales obtenidos a partir de PAST V3.12.

8.4 Correlación entre distancias genéticas y geográficas y diferencias bioclimáticas.

Se emplearon pruebas de Mantel con el fin de darle una explicación a la estructuración obtenida (Figura 1B). A pesar de presentar distancias relativamente cortas entre localidades y más aun entre grupos (Guatemala y El Salvador), los resultados obtenidos indican que no hay correlación significativa entre la estructuración (F_{ST} 's) obtenidas y la distancia geográfica presente entre localidades, es decir que no se encontró aislamiento por distancia. De igual manera tampoco hubo correlación con las variables Bioclimáticas analizadas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Prueba de Mantel realizado para correlacionar variables bioclimáticas, distancias geográficas y distancias genéticas. DistGeo=Distancia geográfica, Fst=Distancia genética, VAG=Variables ambientales Global, B1-B19=Variables Bioclim.

Prueba	p	Prueba	p	Prueba	p	Prueba	p
DistGeo.-F_{ST}	0.208	F_{ST} -BIO5	0.625	F_{ST} -BIO11	0.625	F_{ST} -BIO17	0.375
F_{ST} -VAG	0.542	F_{ST} -BIO6	0.625	F_{ST} -BIO12	0.542	F_{ST} -BIO18	0.375
F_{ST} -BIO1	0.625	F_{ST} -BIO7	1.000	F_{ST} -BIO13	0.792	F_{ST} -BIO19	0.417
F_{ST} -BIO2	0.875	F_{ST} -BIO8	0.833	F_{ST} -BIO14	0.417		
F_{ST} -BIO3	0.583	F_{ST} -BIO9	0.625	F_{ST} -BIO15	0.500		
F_{ST} -BIO4	0.625	F_{ST} -Bio10	0.833	F_{ST} -BIO16	0.792		

Fuente de datos experimentales a partir de la prueba de Mantel del paquete R V3.3.1.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La técnica de GBS para determinar la diversidad genética de *T. dimidiata* en zonas fronterizas, presentó nuevos resultados en la organización genética que se planteaba previamente para este organismo. Estudios previos por Bargues *et al.* (2008) y Monteiro *et al.* (2013), los cuales por medio de marcadores nucleares y mitocondriales respectivamente y la técnica de PCR, agrupaban a los triatomíneos de Guatemala y El Salvador como un mismo grupo genético. Por otro lado lo obtenido en este trabajo utilizando las técnicas de GBS y SNP's indican ser más sensibles e informativas para el estudio de la diversidad genética por abarcar una mayor cantidad de material genético en la comparación, tomando en consideración loci neutrales y loci sujetos a selección (Reitzel, *et al.*, 2013, pp. 2-6).

De acuerdo a los resultados obtenidos para el estudio de la diversidad genética entre las localidades (Cuadro 3, Anexo 4), se observa presencia de un grado de endogamia entre los individuos de todas las localidades, debido a menores valores de la heterocigosidad observada comparado con la esperada (Hamilton, 2009, pp. 31-33). Esto indica una mayor probabilidad de apareamiento entre individuos con mayor grado de parentesco que el esperado por el azar, algo similar a lo encontrado por Landaverde (2004) en *T. dimidiata* y Perez, *et al.* (2013) en *T. infestans*.

Por otro lado los análisis de varianza molecular demostraron que la mayor variación se encontró dentro de las poblaciones (96.28%), lo que nos indica que a pesar de presentar cierto grado de endogamia entre las localidades, la

presencia de alelos diferentes que brindan mayor variación se encuentran dentro de las mismas poblaciones a diferencia de entre las poblaciones, al igual que presentar un valor de F_{ST} global de 0.037 equivalente a un número de migrantes (Nm) de 0.25, lo que nos indica presencia de poca estructuración genética (Yang, *et al.*, 2011, pp. 3,4).

Diversos estudios han demostrado la existencia de estructuración genética entre poblaciones a escala pequeña. Esto se encuentra estrechamente relacionado a factores que pueden diferir de la distancia geográfica. McGaughran, *et al.* (2014) mostraron cómo los factores y variación ambiental influyen en la variabilidad genética y estructuración del nemátodo *Pristionchus pacificus*. Trabajos similares por Temunovic, *et al.*(2012) con el fresno *Fraxinus angustifolia* y Dionne, *et al.*(2008) con el salmón, *Salmo salar*, son otros ejemplos de estructuración genética en escala pequeña.

El valor de K óptimo obtenido a partir de Structure Harvester, fue dos grupos genéticos (Figura 1A), de los cuales los individuos colectados en las áreas de El Salvador (Ahuachapán, Santa Ana y Sonsonate) pertenecen casi exclusivamente al Grupo 1, mientras que los *T. dimidiata* pertenecientes a Guatemala (Jutiapa y Chiquimula), presentaron una mezcla entre ambos grupos genéticos (Figura 1B).

El valor pequeño obtenido de F_{ST} global (0.037), entre localidades, sugiere un alto flujo genético y poca deriva génica (Eguiarte, Aguirre-Planter, Scheinvar, Gonzalez, & Souza, 2010, pp. 6,7).

Los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones son una medida de distancias genéticas (Cuadro 5). Se observó que Chiquimula y Santa Ana al igual que Santa Ana y Sonsonate_Ahuachapán presentaron las distancias más pequeñas (0.01632 y 0.01689 respectivamente). Para los casos de las localidades de El Salvador esto tiene sentido si lo comparamos con lo que se obtuvo en la Figura 1B, en donde estas localidades presentaron individuos predominantemente del Grupo 1. Por otro lado Chiquimula a pesar de estar presente en Guatemala, los *T. dimidiata* presentaron un predominio leve del Grupo 1, esto podría explicar su cercanía genética (F_{ST}) con los *T. dimidiata* de Santa Ana en comparación con los de Jutiapa.

Diversos estudios se han centrado en la determinación de proteínas relacionadas a la infección de los triatomíneos hematófagos con el fin de rastrear posibles factores que ayuden en el control de la enfermedad. Algunas de las familias de proteínas relacionadas con la tasa de infección de los triatomíneos hematófagos son las infestinas, defensinas y lipocainas (Díaz, *et al.*, 2016, pp. 806-807; Escobar, 2009, pp. 18-20). Por otro lado el trabajo de Buarque *et al.* (2013) muestra las diferencias entre la regulación (positiva o negativa) de diversas proteínas no directamente asociadas con la tasa de infección de *Triatoma infestans* sin embargo presentan una relación con el estado infectivo del mismo.

A partir de la búsqueda en blastx se encontraron 21 anotaciones de proteínas funcionales pertenecientes al Orden *Insecta*, aunque no se logró encontrar alguna proteína relacionada a la tasa de infección directa o indirectamente, este estudio permite determinar cuáles fueron las proteínas que presentaron

distinciones entre los *T. dimidiata* de Guatemala y El Salvador. De las 21 proteínas 20 de ellas pertenecían al Orden Hemiptera y 1 al Orden Isoptera (proteína Pikachurina), de las 20 anotaciones de proteínas 18 de ellas pertenecían a la Familia de los Redúvidos, mientras que las otras dos pertenecían a la familia Cimidae, otro grupo de chinches hematófagas, y a la familia Pentatomidae, grupo de chinches apestosas o fitófagas.

Cabe recalcar que las anotaciones para las proteínas de la Familia Reduviidae fueron en su mayoría de *Triatoma infestans*, seguido de *Pastrongylus megistus* y una única semejanza a *Triatoma dimidiata*, lo cual podría estar asociado a la poca información de secuencias genéticas reportadas para la última especie.

En la estructuración obtenida, entre los *T. dimidiata* pertenecientes a Guatemala y El Salvador se esperaría determinar la razón por la cual existe este comportamiento de diferenciación entre las poblaciones. A partir de Maxent se mostró cómo al colocar por separado las poblaciones de El Salvador y de Guatemala el comportamiento en cuanto al modelo de distribución potencial de la especie no es el mismo, a pesar de compartir varias áreas de traslape (Figura 2) se logra observar claramente áreas diferentes entre las poblaciones donde los individuos se concentran más (áreas de color más intenso).

De la misma forma se logra observar un mayor ámbito de distribución potencial de los *T. dimidiata* colectados en Guatemala en comparación con los de El Salvador. Esto se contrasta con las diferencias en cuanto a la influencia de variables ambientales sobre la distribución de la especie, siendo las variables climáticas precipitación del trimestre más frío (B19) y precipitación del trimestre

más cálido (B18), ambas relacionadas a la precipitación, las variables con mayor contribución al modelo de distribución de los *T. dimidiata* pertenecientes a Guatemala (Figura 3A). Las variables precipitación del mes más seco (B14) y estacionalidad de la temperatura (B4), relacionadas a precipitación y temperatura respectivamente, las que mayor contribuían a la distribución potencial de los *T. dimidiata* de El Salvador (Figura 3B).

Las localidades Santa Ana, Ahuachapán, Sonsonate, Chiquimula y Jutiapa se compararon entre ellas utilizando los atributos de las variables ambientales y se encontró correlación entre las localidades pertenecientes a El Salvador, de forma contraria para las localidades de Guatemala la cual no presentó correlación entre Jutiapa y Chiquimula (Figura 4). Estas diferencias tanto en el modelo de distribución, como en la distinción entre localidades, esperaríamos que explicaran la existencia de estructuración a pequeña escala de *T. dimidiata*. La muestra colectada en Guatemala es más heterogénea genéticamente, lo cual podría indicar que se están adaptando a ambientes más variables (Hamilton, 2009, pp. 25-40); sin embargo, a partir de las pruebas de Mantel se demostró que no existe ninguna relación entre las variables bioclimáticas y las distancias genéticas obtenidas (F_{ST}), de la misma manera que no se encontró relación con las distancias geográficas (aislamiento por distancia) (Cuadro 7).

Triatoma dimidiata es una especie altamente adaptable por lo que la falta de estructuración relacionada a las variables bioclimáticas o a la distribución geográfica no es del todo raro, aunque podrían existir otras variables que no se tomaron en consideración para explicar la estructuración. Todos los individuos

de *T. dimidiata* fueron colectados en el intradomicilio de las viviendas por lo que posiblemente no se consideró este microambiente como una variable explicativa de estructuración. Dentro de las viviendas las condiciones de vida son diferentes a aquellas de los ambientes selváticos; de la misma manera el tipo de construcción entre las localidades de Guatemala y El Salvador son diferentes como bien se mencionó previamente, siendo las viviendas de EL Salvador mejores construcciones y con mejores materiales en comparación a Guatemala (Monroy-Escobar, comunicación personal, 2016; Bustamante, *et al.*, 2015, pp. 101-103).

Otra variable no considerada fue la presencia o tipo de vegetación de los alrededores de las viviendas. Jutiapa y Chiquimula son áreas en las cuales los alrededores de las casas aun preservan remanentes boscosos nativos los cuales podrían actuar como una barrera o nicho ecológico para que habiten los *T. dimidiata* y no migren con tanta frecuencia hacia las viviendas. Para El Salvador la mayoría de los bosques nativos fueron talados y reemplazados por bosques no nativos próximos a las viviendas, esto podría explicar una migración hacia las viviendas por parte de *T. dimidiata* al no conservar ningún remanente de nicho (bosque nativo) (Monroy-Escobar, comunicación personal, 2016; Bustamante, *et al.*, 2015, pp. 13-25). Sin embargo se trata solo de hipótesis no comprobadas.

10. CONCLUSIONES

Se encontraron dos posibles grupos genéticos que dan estructuración de pequeña escala a las poblaciones del estudio: un grupo claramente distinguiendo a las localidades de El Salvador (Ahuachapán, Santa Ana y Sonsonate) y otro, encontrado en las localidades de Guatemala (Jutiapa, Chiquimula) además de compartir también el grupo de El Salvador.

Existe diferencia en cuanto a la distribución espacial potencial del grupo de El Salvador, cuyo ámbito es más reducido, a diferencia de la distribución espacial del grupo de *T. dimidiata* perteneciente a Guatemala, más ampliamente distribuido, lo cual sugiere una mayor adaptación a diferentes condiciones ambientales en Guatemala.

Las variables bioclimáticas que mayor influencia tuvieron para la distribución espacial potencial fueron la precipitación para Guatemala, y la precipitación y temperatura para El Salvador.

Existe una correlación entre las poblaciones de *T. dimidiata* de El Salvador, en relación a las condiciones bioclimáticas, mientras que para Guatemala, no están correlacionadas en relación a las condiciones bioclimáticas.

La estructuración a pequeña escala de *Triatoma dimidiata* en áreas colindantes consideradas hiperendémicas de la enfermedad de Chagas, no está asociada a las distancias geográficas entre localidades ni a las variables bioclimáticas, por lo que la exploración de nuevas variables es una necesidad para la comprensión de dicha variabilidad genética.

11. RECOMENDACIONES

Aumentar el número de individuos y sub poblaciones para las localidades, especialmente para Ahuachapán y Chiquimula.

Incluir otras variables que puedan influir en la estructuración de las poblaciones, tales como el tipo de vegetación en las localidades, la cercanía de remanentes boscosos a las aldeas y los tipos de construcción de las viviendas.

Probar con diferente porcentaje de individuos en los que están presentes los loci aceptados para los análisis de Stacks.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adarme, L. (2010). Variabilidad morfológica entre poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), procedentes de cuatro departamentos de Colombia (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, 24-27.
- Alfaro, M., Romero, J., Ponce, R. (2010). Caracterización y zonificación de áreas potenciales para el cultivo de cacao en El Salvador. (Seminario de Investigación de Ingeniería). *Universidad Dr. José Matías Delgado. Facultad de agricultura e investigación agrícola*, 36-37.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Molecular Biology*, 403-410.
- Araujo, P., Almeida, A., Pimentel, C., da Silva, A., Sousa, A., Valente, S., . . . Texeira, A. (2017). Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1-10.
- Baird, N., Etter, P., Atwood, T., Currey, M., Shiver, A., Lewis, Z., . . . Johnson, E. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *Plos One*, 1-7.
- Bar, M. (2016, 04 04). Orden *Hemiptera*, Biología de los Artropodos 2009. Recuperado de Exa.unne: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/artropodos/Orden%20Hemiptera.pdf>
- Barges, M., Klisiowicz, D., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J., Monroy, C., Ponce, C., . . . Mas-Coma, S. (2008). Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *Plos Neglected Tropical disease*, 1-17.
- Buarque, D., Braz, G., Martins, R., Tanaka-Acevedo, A., Gomes, C., Oliveira, F., . . . Tanaka, A. (2013). Differential expression profiles in the midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLOS one*, 1-9.
- Bustamante, D., Menes, M., Torres, N., Zuñiga, C., Sosa, W., Abrego, V., & Monroy, M. (2015). Information to act: household characteristics are predictors of domestic infestation with the Chagas vector *Triatoma dimidiata* in Central America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1-26.
- Calderón, C., Dorn, P., Melgar, S., Chavez, J., Rodas, A., Rosales, R., & Monroy, C. (2004). A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (*Hemiptera: Reduviidae*) in Guatemala by random

amplification of polymorphic DNA-Polymerase chain reaction. *Medical Entomology*, 882-887.

- Calderón, G. (2008). Hidrocarburos cuticulares de triatominos: su aplicación como marcadores taxonómicos (Tesis doctoral). 1-168. Argentina.: *Universidad Nacional de La Plata*.
- Castillo, D., & Wolff, M. (2000). Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera:Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Biomedica*, 59-64.
- Catchen, J., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 171-182.
- Cazzulo, J., & Segura, E. (2016, 05 10). *Trypanosoma cruzi*. Recuperado de PAHO: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/018882-II/018882-II-19.pdf>
- CDC. (2010, Noviembre 02). *Centro para el Control y la Prevencion de Enfermedades*. Recuperado de CDC: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/informativa/detallada.html>
- Cedillos, R., Romero, J., Ramos, H., & Sasagawa, E. (2011). La enfermedad de Chagas en El Salvador, Evolucion historica y desafios para el control. El Salvador: OPS.
- CLIMATE-DATA. (2016, 07 13). *CLIMATE-DATA.ORG*. Recuperado de CLIMA: <http://es.climate-data.org/location/5775/ /3797/ /3964/ /764317/>
- Comision europea, FAO. (2002). Estado de la informacion forestal en El Salvador. *Santiago Chile*, 142-143.
- Craig, D., Pearson, J., Szelinger, S., Sekar, A., Margot, R., Corneveaux, J., . . . Huentelman, M. (2008). Identification of genetic variants using barcoded multiplexed sequencing. *Nat Methods.*, 887-893.
- Davey, J., & Blaxter, M. (2011). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in functional genomics.*, 416-423.
- deGuate. (2016, 07 13). *deGuate*. Recuperado de Recursos Naturales de Jutiapa: <http://www.deguate.com/municipios/pages/jutiapa/jutiapa/recursos-naturales.php#.V4ViBPkrLIX>
- De La Cruz, J. (1982). Clasificación de zonas de vida de Guatemala a nivel de reconocimiento. Ministerio de agricultura, ganadería y alimentación, Sector publico agropecuario y de alimentación, Instituto nacional forestal,

Unidad de evaluación y promoción, Dirección general de servicios agrícolas, 17-19.

- Diaz, P., Santacruz, E., Martinez, I., de la Torre, P., Laclette, J., & Espinoza, B. (2016). Identificación de dos defensinas en el genoma de *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemíptera: Reduviidae) y una lisozima en su hemolinfa. *Fisiología, toxicología y biología molecular*, 805-809.
- Dionne, M., Caron, F., Dodson, J., & Bernatchez, L. (2008). Landscape genetics and hierarchical genetic structure in Atlantic salmon: the interaction of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology*, 2382-2396.
- Dorn, P., Calderón, C., Melgar, S., Moguel, B., Solórzano, E., Dumonteil, E., . . . Monroy, C. (2009). Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 1-13.
- Earl, D., & vonHoldt, B. (2012). Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources vol. 4 (2)* , 359-361.
- Eguiarte, L., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., Gonzalez, A., & Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. *Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.*, 1-30.
- Elshire, R., Glaubitz, J., Sun, Q., Poland, J., Kawamoto, K., Buckler, E., & Mitchell, S. (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *Plos One*, 1-10.
- Escobar, C. (2009). Respuesta inmune humoral del roedor degus (*Octodon degus*) frente a la picada de *Mepraia spinolai*, vector silvestre de la enfermedad de Chagas (Tesis de pregrado). *Universidad de Chile, facultad de ciencias veterinarias y pecuarias, escuela de ciencias veterinarias; Santiago, Chile.*, 1-53.
- Excoffier, L., & Lischer, H. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.10:* 564-567.
- Foll, M., & Gaggiotti, O. (2006). Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of Populations. *Genetics*, 875-891.

- Garcia, E., Gonzalez, M., & Azambuja, P. (1999). Biological Factors Involving *Trypanosoma cruzi* Life Cycle in the Invertebrate Vector, *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 213-216.
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. *Biomed*, 228-234.
- Hamilton, M. (2009). *Population Genetics*. United Kingdom: Wiley-Blackwell.
- Hammer, O., Harper, D., & Ryan, P. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1), 1-9.
- Hernandez, Y., & Gonzalez, R. (2006). Revisión de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Cuba. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 107-114.
- Hijmans, R., Cameron, S., Parra, J., Jones, P., & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 1965-1978.
- Illumina. (2016, 05 09). Introduction to Genotyping by Sequencing. Recuperado de Illumina: <http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/targeted-resequencing/genotyping-by-sequencing.html>
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23, 1801-1806.
- JICA. (2014). Buenas practicas en el control de la enfermedad de Chagas en Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua. 1-290.
- Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., & Rubel, F. (2006). World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift*, 259-263.
- Landaverde, P. (2004). Comparación de poblaciones silvestres y domésticas de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) de México y Centroamérica por medio de la técnica de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR)(Tesis de pregrado). Guatemala: Universidad de San Carlos.
- Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. New York.

- López - Vélez, R. (2017 06 20) Chagas gastrointestinal disease. Recuperado de Uptodate: <http://www.uptodate.com/contents/chagas-gastrointestinal-disease>
- Marquardt, W. (2004). *Biology of Disease Vectors*. USA: Elsevier Academic Press.
- McGaughran, A., Morgan, K., & Sommer, R. (2014). Environmental variables explain genetic structure in a beetle-associated nematode. *PLOS One*, 1-15.
- Menes, M. (2004). Diferencias métricas entre poblaciones de *Triatoma dimidiata* Latreille (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) de México, Centro América y Colombia: Efecto de la procedencia geográfica y el ecotopo. (Tesis de pregrado) *Universidad de San Carlos de Guatemala*, 1-90.
- Messenger, L., & Miles, M. (2015). Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Elsevier*, 150-155.
- Miller, M., Dunham, J., Amores, A., Cresko, W., & Johnson, E. (2007). Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 240-248.
- Monroy, C., Bustamante, D., Rodas, A., Enriquez, M., & Rosales, R. (2003a). Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Peten, Guatemala. *Journal of Medical Entomology*, 800-806.
- Monroy, C., Rodas, A., Menes, M., Herrera, F., Bustamante, D., Enriquez, M., . . . Nakagawa, J. (2003b). *Pre certificación de la erradicación de Rhodnius prolixus en Guatemala*. Guatemala: Instituto de investigaciones químicas y biológicas.
- Monteiro, F., Peretolchina, T., Lazoski, C., Harris, K., Dotson, E., Abad-Franch, F., . . . Marcet, P. (2013). Phylogeographic pattern and extensive mitochondrial DNA divergence disclose a species complex within the Chagas Disease vector *Triatoma dimidiata*. *Plos One*, 1-15.
- Muñoz, C., Solari, A., Apt, W., Zulantay, I. (2013). Caracterización de las unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Ibero-Latinoam. Parasitol.* 72(1): 6-7.

- Noriega, J. (2001). *Prevalencia de seropositividad anti-chagas en seis aldeas del municipio de Aguacatán – Huehuetenango* (Tesis de pregrado). Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala.
- OMS. (2016, 04). *La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)*. Recuperado de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- Palacio, D., Urquijo, L., Nogueira, A., & Monteiro, T. (2010). Guía de Atención Clínica de la enfermedad de Chagas 2010 (Documento Actualizado de Versión Convenio 256/09). OPS/OMS-MPS, 10-14.
- Perez, A., Segura, E., Fusco, O., Bareiro, A., & Garcia, B. (2013). Fine-scale genetic structure in populations of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). *Genetica*, 107-117.
- Phillips, S., Anderson, R., & Schapire, R. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 231-259.
- Phillips, S., Dudik, M., & Schapire, R. (2004). A maximum entropy approach to species distribution modeling. *In Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning*, 655-662.
- Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Rocha, A., Salas, R. (2016). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital natural de México*, 420-421. Recuperado de El conocimiento de la variabilidad genética: http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/114_Lavariabilidadgen.pdf
- Portus-Vinyeta, M. (2010). La enfermedad de Chagas en España. *ARS Pharmaceutica*, 195-204.
- Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics Society of America*, 945-959.
- QGIS. (2017, 03 22). Recuperado de User Guide/Manual. Datos Raster: http://docs.qgis.org/2.6/es/docs/gentle_gis_introduction/raster_data.html
- R Development Core Team. (2008, May 7). Recuperado de R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.: <http://www.R-project.org>.

- Ramirez, M., & Dumontiel, E. (2015). Infection Rate by *Trypanosoma cruzi* and Biased Vertebrate Host Selection in the *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) Species Complex. *Journal of Medical Entomology*, 1-6.
- Ramirez-Bello, J., Vargas-Alarcon, G., Tovilla-Zarate, C., & Fragoso, J. (2013). Polimorfismos de un solo Nucleotido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Medica de Mexico*, 220-228.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Heredity*, 86, 248-249.
- Reitzel, A., Herrera, S., Layden, M., Martindale, M., Shank, T. (2013). Going where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Mol Ecol*.22 (11), 1-6.
- Reyes-Novelo, E., Ruiz-Piña, H., Escobedo-Ortegon, J., & Barrera-Perez, M. (2011). Biología y ecología de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), algunos aspectos de estudio. *Dugesiana*, 11-16.
- Sales-Campos, H., Borges, H., Pontes, C., Pereira, T., Castilho, A., Ramirez, L., & Lages-Silva, E. (2015). *Trypanosoma cruzi* DTU TcII presents higher blood parasitism than DTU TcI in an experimental model of mixed infection. *de Gruyter*, 435-441.
- Sasagawa, E., Guevara, A., Hernandez, M., Romero, J., Nakagawa, J., Cedillos, R., & Kita, K. (2014). Acute Chagas disease in El Salvador 2000-2012 - Need for surveillance and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 256-258.
- Schofield, C. (1994). *Triatominae: biology & control*. Wisconsin - Madison: Eurocommunica, 2.
- Schofield, C.J., Diotaiuti, L., Dujardin, JP. (1999) The process of domestication in *Triatominae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 94(1): 375.
- Schofield, C. (2000). Challenges of Chagas disease vector control in Central America. WHO, 11.
- Solórzano, E. (2015). Estructuración genética del parásito *Trypanosoma cruzi* en su hospedero *Triatoma dimidiata* en zonas geográficas con tasas de infección contrastantes (Tesis de Maestría). *Universidad Austral de Chile*, 1-68.
- Steverding, D.(2014). The history of Chagas disease. *Steverding parasites and vectors*, 7, 1-4.

- Temunovic, M., Franjic, J., Satovic, Z., Grgurev, M., Frascaria, N. & Fernandez, J. (2012) Environmental heterogeneity explains the genetic structure of continental and mediterranean populations of *Fraxinus angustifolia* Vahl. (2012). *PLOS one*, 7(8), 1-13.
- The Center for Food Security and Public Health & Institute for International Cooperation in Animal Biologics. (2010). Enfermedad de Chagas. Iowa state university. College of veterinary medicine, 1-2.
- Tibayrenc, M. (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Biomed Central*, 1-6.
- Veness, C. (2017, 03 22). *Movable Type Scripts*. Recuperado de Calculate distance, bearing and more between Latitude/Longitude points.: <http://www.movable-type.co.uk/scripts/latlong.html>
- WorldClim. (2016, 07 14). *BioClim*. Recuperado de WorldClim: <http://www.worldclim.org/version1>
- Yang, J., Zhang, Z., Shen, F., Yang, X., Zhang, L., Chen, L., . . . Hou, R. (2011). Microsatellite variability reveals high genetic diversity and low genetic differentiation in a critical giant panda population. *Current Zoology*, 1-11.
- Zeledon, 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*, 379-386.
- Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., . . . Shijman, A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TCI to TCVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(7): 1051-1052.
- Zingales, B., Miles, M., Campbell, D., Tibayrenc, M., Macedo, A., Teixeira, M., . . . Sturm, N. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Elsevier*, 240-253.

13. ANEXOS



(Fuente. Google Earth 7.1.7.2600)

Anexo 1. Puntos de colecta de *T. dimidiata* en aldeas de Jutiapa-Guatemala y Santa Ana, Ahuachapán y Sonsonate-El Salvador. Puntos marcados indican localidades en las cuales se tiene muestra de *T. dimidiata*, cada localidad presenta un color que los distingue. Verde=Jutiapa, Rojo=Santa Ana, Azul=Ahuachapán, Amarillo=Sonsonate, Morado=Chiquimula.

Anexo 2. Coordenadas geográficas de puntos de muestreo según información de localidad obtenida en las bases de datos correspondientes a las muestras de *T. dimidiata* utilizados (T-dimG=*T. dimidiata* Guatemala, T-dimES=*T. dimidiata* El Salvador).

Pais	Localidad	Longitud	Latitud
T-dimG	Jutiapa	-89.9559	14.35000
T-dimG	Jutiapa	-89.9833	14.38330
T-dimG	Jutiapa	-89.9461	14.34455
T-dimG	Jutiapa	-89.9463	14.34090
T-dimG	Jutiapa	-89.9462	14.34015
T-dimG	Jutiapa	-89.9466	14.34455
T-dimG	Jutiapa	-89.9462	14.34071
T-dimG	Jutiapa	-89.8795	14.26291
T-dimG	Jutiapa	-89.9474	14.35994
T-dimG	Jutiapa	-89.9464	14.34494
T-dimG	Jutiapa	-89.9473	14.34818
T-dimG	Jutiapa	-89.9474	14.34467
T-dimG	Chiquimula	-89.2833	14.70000
T-dimES	Sonsonate	-89.6149	13.70319
T-dimES	Sonsonate	-89.5262	13.76307

T-dimES	Ahuachapán	-89.8167	13.96670
T-dimES	Santa Ana	-89.5639	13.97783
T-dimES	Santa Ana	-89.4500	14.10000
T-dimES	Santa Ana	-89.4598	14.09527
T-dimES	Santa Ana	-89.4604	14.09531
T-dimES	Santa Ana	-89.4610	14.09526

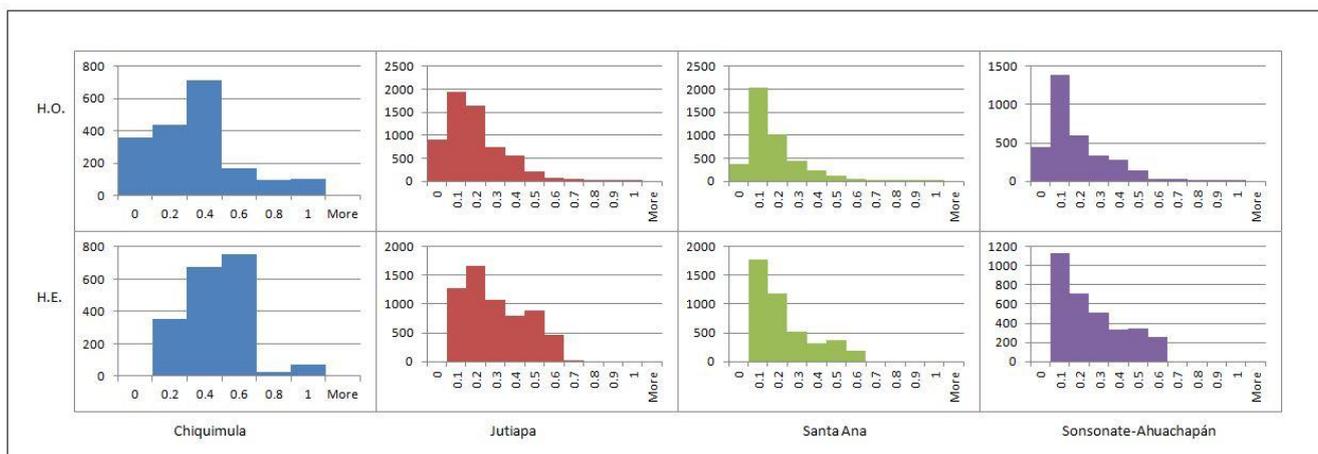
Fuente de datos experimentales. Debido a la falta de información en las bases de datos la cantidad de información geográfica varía según localidad.

Anexo 3. Distancias Geográficas según promedio de puntos GPS por localidad.

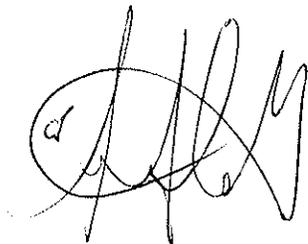
Localidad	Chiquimula	Jutiapa	Santa Ana	Sonsonate	Ahuachapán
Chiquimula	0.00000				
Jutiapa	81.64000	0.00000			
Santa Ana	69.09000	60.64000	0.00000		
Sonsonate	107.40000	79.68000	38.36000	0.00000	
Ahuachapán	99.75000	44.98000	42.24000	38.68000	0.00000

Fuente de datos. Las distancias fueron calculadas utilizando un calculador web de distancias a partir de puntos GPS (Veness, 2017).

Anexo 4. Histograma de frecuencias de valores de heterocigosidad observada y esperada dentro de localidades.



Fuente de datos experimentales obtenidos por medio del programa Arlequin y graficados utilizando la función Histograma en Excel ®.



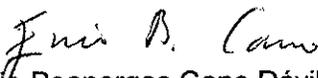
Salvador Antonio Castellanos Murguía

Autor



Sergio Alejandro Melgar Valladares, PhD.

Asesor



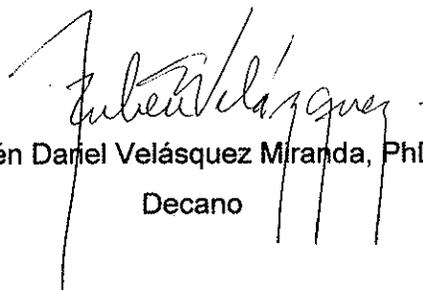
Enio Boanerges Cano Dávila, PhD.

Revisor



Licda. Ana Rosalito Barrios de Rodas

Directora



Rubén Daniel Velásquez Miranda, PhD.

Decano