

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

Estructuración genética de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) en Guatemala y El Salvador, mediante secuenciación de nueva generación

INFORME FINAL DE TESIS

Presentado por

Daniel Penados Richter

Biologo

Guatemala, 24 de julio de 2020

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

Estructuración genética de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) en Guatemala y El Salvador, mediante secuenciación de nueva generación

INFORME FINAL DE TESIS

Presentado por

Daniel Penados Richter

Biologo

Guatemala, 24 de julio de 2020

Junta Directiva

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacias

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria Académica
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovani Rafael Funes Tobar	Vocal IV
Br. Carol Merarí Cáceres Castañeda	Vocal V

DEDICATORIA

- A mis padres: A mi papá Leonel Penados, por siempre ser una fuente de inspiración, en como el trabajo duro, honesto y sin excusas, puede engendrar cosas grandes, tanto para uno como para a todos los que te rodean. A mi mamá Carolina Richter por enseñarme a ser curioso, a nunca conformarme y siempre exigir más de mi mismo. Por su amor y apoyo incondicional en todas y cada una de las etapas de mi vida. Por enseñarme que hacer las cosas con pasión, alegría y amor, vale más que cualquier cosa para lograr tus metas.
- A mis hermanos: A Gaby y Estuardo por ser mis modelos a seguir, el cual, desde que tengo memoria, los he admirado y he querido ser. Por enseñarme que es posible lograr lo que mis padres han logrado. Por mostrarme que, si la familia va primero, siempre se lograrán cosas grandes, para uno y para los suyos.
- A mi abuelo: Tú, Federico Richter, tienes un espacio grande en mi formación profesional. Desde que tengo memoria he admirado tu trabajo, tu forma de ser, hablar y expresarte. Siempre me has parecido una persona digna de admirar, no solamente por mí, sino por todos aquellos que conozco. Tú me inspiras a seguir creciendo, estudiando y esforzándome, porque eres la viva imagen que el éxito es posible en todas y cada una de sus facciones.
- A Susan Lehr: Tú eres una de las personas más importantes en mi vida. Me has enseñado que la calma, perseverancia, optimismo y amor propio pueden más que cualquier conocimiento teórico. Que la inteligencia emocional es una de las facciones más

importantes que cualquier persona puede desarrollar. Más haya que la formación académica, me has aportado amor y apoyo incondicional como ninguna otra persona lo ha hecho. Crecimiento personal y espiritual, que me tienen donde estoy hoy en día.

A mis amigos: Todos y cada uno de ustedes a jugado un rol importante en mi personalidad. Gracias a ustedes ame estos últimos años de mi vida. Sin duda alguna, son la razón por la cual amo mi carrera y mi profesión. Con ustedes he crecido y más que mis amigos, son mi familia.

A la USAC: Por ser más que un centro de estudios. Fuiste, y estoy seguro que continuaras siendo, un centro de experiencia de vida donde están mis mejores recuerdos y experiencias. Gracias por enseñarme que aprender tiene un objetivo más grande que uno mismo, el cual es el de crecer todos juntos como sociedad.

Al Lenap: Sin duda alguna, un eje central en mi formación. Con ustedes he crecido más haya de lo académico, porque me han regañado hasta por comerme las uñas. Empezaron siendo una unidad académica donde empezar a formarme y terminaron siendo mi familia.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología – LENAP

Por ser la unidad de investigación que me permitió desarrollar no únicamente mi proceso de evaluación terminal de la carrera, sino más bien mi formación profesional.

A la Dra. María Carlota Monroy y la Licda. Antonieta Rodas.

Por la confianza, por enseñarme que la investigación es necesaria para nuestro país, para un desarrollo integral del conocimiento. Y que, aunque parezca difícil existen formas de realizar investigación de alto nivel en nuestro país. Por enseñarme a expandir mi mente y, que sin duda, el trabajo en equipo es el camino al éxito.

A mi equipo de trabajo

Gracias por el apoyo, por las lluvias de ideas y las risas, que siempre generaron un ambiente ameno, divertido y productivo.

A MSc. Elizabeth Solorzano.

Por la confianza, y constante asesoría aun años después de haber confiado en mi por primera vez en EDC.

Al Dr. Sergio Alejandro Melgar.

Por el apoyo constante durante todo el proyecto de investigación. Por no ser un catedrático más, sino más bien, ser un guía y apoyo y uso de técnicas novedosas, que me abrirán muchas puertas en un futuro.

A mi revisor de tesis MSc. Pedro Daniel Pardo

A la Dra. Lori Stevens y Patricia Dorn, al igual que los equipos de investigación en la Universidad de Vermont y Universidad de Loyola.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1. Enfermedad de Chagas	3
3.2. <i>Triatoma dimidiata</i>	4
3.3. Estructuración genética de <i>T. dimidiata</i>	5
3.4. Genotipificación por Secuenciación para la detección de variantes de Nucleótido simple.	6
3.5. Análisis bioinformáticos aplicados a la genética de poblaciones	7
4. Justificación	8
5. Objetivos	9
6. Hipótesis	9
7. Materiales y Métodos	9
7.1. Área de estudio	10
7.2. Muestreo	10
7.3. Extracción de ADN y Secuenciación	11
7.4. Análisis Bioinformático	13
7.5. Análisis de diversidad genética	14
7.6. Análisis de Aislamiento genético por distancia	16
8. Resultados	16
8.1. Estructuración genética	16
8.2. Análisis de diversidad genética	18

8.3. Aislamiento genético por distancia	21
9. Discusión	23
10. Conclusiones	30
11. Recomendaciones	30
12. Referencias	31
13. Anexos	42
13.1. Anexo 1. Detalle de las muestras utilizadas, según Disponibilidad en la base de datos del LENAP.	42

1. Resumen

Triatoma dimidiata es el principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Sus poblaciones presentan una alta variabilidad en hábitats, movilidad, y posibles fuentes alimenticias, las cuales le otorgan una alta posibilidad de adaptarse a nuevos ecotopos. El objetivo de este trabajo fue analizar la estructuración genética de *Triatoma dimidiata* y la distribución de su variabilidad genética en poblaciones de Guatemala y El Salvador. Para ello se realizó un análisis bioinformático de la colección de secuencias de *Triatoma dimidiata* del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP) de la Universidad de San Carlos de Guatemala, y La Universidad de Loyola y La Universidad de Vermont, Estados Unidos. Se observó una estructuración genética en las poblaciones analizadas de Guatemala y El Salvador, encontrándose dos grupos genéticos, evidenciados por el análisis de Structure ($K = 2$). Un grupo genético distribuido a lo largo de todas las poblaciones de estudio y otro grupo genético únicamente presente en las poblaciones de Huehuetenango y Chiquimula. La mayoría de las poblaciones sufren procesos de pérdida de diversidad genética ($H_o < H_e$), pero aun manteniendo una gran variabilidad genética intrínseca de cada una de las poblaciones (Varianza dentro de poblaciones = 60.4, Varianza entre poblaciones = 19.8). se observó que no existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas ($p = 0.21$), lo cual representa un proceso de estructuración y adaptación de las poblaciones de estudio, generado por posibles procesos de selección en las poblaciones. Los resultados evidencian una estructuración poblacional, y una constante variabilidad genética intrínseca en todas las poblaciones. Esto representa un mayor riesgo epidemiológico, debido a la capacidad de adaptación a nuevos hábitats domiciliarios.

2. Introducción

La enfermedad de Chagas es una enfermedad debilitante y potencialmente mortal que afecta órganos vitales, como el corazón y el sistema digestivo. Es una enfermedad endémica de Latino América, donde es la mayor causa de muertes por cardiopatías (Chatelain, 2015). Esta es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, donde los tratamientos son únicamente efectivos en la fase aguda, con fuertes efectos secundarios en algunas poblaciones humanas (Sales et al., 2017). *Triatoma dimidiata* es el principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala, en donde alrededor de un millón de personas viven en áreas endémicas de la enfermedad, correspondientes a 15 de los 22 departamentos del país (Peterson et al., 2019). Por lo cual, disminuir la invasión domiciliar de *Triatoma dimidiata* es uno de los principales objetivos de la Iniciativa para el control de Chagas en Centro América (IPCA) (Ponce, 2007). La transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas es compleja y depende de factores tanto biológicos como sociales y económicos (Bustamante et al. 2015). Generalmente es una enfermedad asociada a condiciones de pobreza, como la presencia de paredes realizadas a partir de material rústico; como adobe o bajareque (Monroy et al., 2009). Debido a la complejidad que presenta, tanto el tratamiento, como la dinámica de la transmisión de la enfermedad de Chagas, el control vectorial es el método más eficiente para el control de la enfermedad (Schofield, 1994).

El control vectorial presenta varias necesidades, como lo es comprender su distribución geográfica, potencial de dispersión, y flujo génico del vector (López, Jaramillo, & Guhl, 2007). Se ha encontrado una gran variabilidad en el comportamiento intradomiciliar, patrones de coloración y dimensiones corporales de *T. dimidiata*, a lo largo de su área de distribución (Zeledón & Rojas, 2006). En Guatemala, se ha observado que existe una diferencia tanto fenotípica como genotípica de las poblaciones de *T. dimidiata* a través de sus distintos ecotopos y distribución geográfica (Dorn et al., 2009; Menes, Monroy, Rodas, 2007). Aun así, el uso de un solo marcador (ITS2) no ha permitido una diferenciación más sensible de las poblaciones, especialmente para los grupos de Guatemala (P. L. Dorn et al.,

2009). Por otro lado, en las regiones hiperendémicas de la enfermedad de Chagas de Guatemala se ha encontrado diferenciación genética de las poblaciones de *T. dimidiata* (Castellanos, 2017).

Estas diferencias genéticas son importantes, debido a que permiten saber si existe un nivel de flujo génico entre las poblaciones y provee un acercamiento al riesgo epidemiológico, al cual está presente una población (Ramírez et al., 2005). Así mismo, comprender la distribución de la variabilidad genética resulta útil para comprender su potencial de dispersión (López et al., 2007), y su tasa de infección natural (Ramírez-Sierra & Dumonteil, 2016). En Guatemala es importante tomar en cuenta estas diferencias genéticas entre las poblaciones, debido a que ayuda a comprender las adaptaciones locales, y, por lo tanto, su ecología (Manel, Schwartz, Luikart, & Taberlet, 2003). De esta manera proporciona información ecológica del vector, la cual es necesaria para llevar a cabo un control vectorial con enfoque de EcoSalud, actualmente aplicado en Guatemala (Monroy et al., 2012). En el presente estudio se realizó un análisis de la estructuración genética de *T. dimidiata* en poblaciones de Guatemala y El Salvador. Para ello se realizaron análisis bioinformáticos de genética poblacional, utilizando las secuencias de individuos de distintas localidades de Guatemala y El Salvador de la colección de secuencias de *Triatoma dimidiata* generadas en el marco del proyecto EEID Chagas 2015, del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP) de la Universidad de San Carlos de Guatemala, La Universidad de Loyola y La Universidad de Vermont, Estados Unidos.

3. Antecedentes

3.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una enfermedad inicialmente discapacitante y potencialmente mortal, que con frecuencia genera lesiones en órganos vitales como el corazón, sistema nervioso, y tracto intestinal (Chatelain, 2015). Esta enfermedad es causada por el parásito *T. cruzi* y el principal mecanismo de transmisión es vía vectorial, al contacto con las heces de un Triatomino infectado, estos últimos son conocidos, según la zona geográfica, como

vinchuca, chinche picuda, chinche besucona, pito, chirimacha, etc. (Schofield, 1994; WHO, 2018). Sin embargo, existen otras vías de transmisión menos frecuentes, como las transfusiones sanguíneas, transmisión vertical, transmisión oral, entre otras (WHO, 2018).

La enfermedad de Chagas es la principal causa de muertes relacionadas con cardiopatías (Chatelain, 2015). Debido a la falta de una vacuna preventiva y a las limitaciones de tratamiento para la enfermedad, relacionado con los fuertes efectos secundarios y a que únicamente es efectivo en la fase aguda de la enfermedad, el control vectorial se ha vuelto la manera más efectiva para tratar la enfermedad de Chagas (OMS, 2018; Sales et al., 2017).

3.2 *Triatoma dimidiata*

Triatoma dimidiata pertenece a la subfamilia de hemípteros hematófagos, Triatominae, en los cuales se ha observado el parásito causante de la enfermedad de Chagas *T. cruzi* de forma natural (Schofield, 1994). Las chinches suelen ser atraídas por la luz de las viviendas, invadiendo los ecotopos domésticos. De igual manera, el mecanismo de transporte pasivo, a través de la leña cosechada es bastante común en las aldeas (Lent & Wygodzinsky, 1979). Las chinches habitualmente tienen hábitos crípticos, ocultándose en el polvo, y en las grietas de las paredes o debajo de cuadros u otros objetos acumulados. El intervalo entre generaciones tiende a ser prolongado, tardando por lo general más de un año en completar el desarrollo de huevo hasta adulto (Schofield, 1994).

T. dimidiata es el principal vector de la enfermedad de Chagas para Guatemala, es un vector nativo encontrado en ecotopos domiciliarios y silvestres. Esto dificulta el control vectorial por medio de insecticidas, debido a que meses después del tratamiento por rociado se han reportado reinfestaciones en las viviendas provenientes de poblaciones silvestres (Barbu, Dumonteil, & Gourbière, 2010; Dumonteil, Ramirez-sierra, & Herrera-aguilar, 2010; Nakagawa, Cordón-Rosales, Juárez, Itzep, & Nonami, 2003). Las poblaciones en las cuales los patrones de reinfestación son más abundantes, están predominantemente asociadas a viviendas precarias, realizadas a partir de material rústico y presencia de animales

domésticos dentro de las viviendas (Bustamante et al., 2009). Los trabajos de mejora de vivienda han presentado ser una mejor solución a los problemas de infestación de *T. dimidiata*, debido a que disminuyen los factores de riesgo mencionados, y disminuyen la probabilidad de infestación y colonización en las viviendas (Lucero et al., 2013; Monroy et al., 2009).

3.3 Estructuración genética de *T. dimidiata*

T. dimidiata puede ser encontrada en una alta diversidad de hábitats y ecosistemas, y puede ser encontrada desde hábitats silvestres hasta domiciliarios (P. L. Dorn, Monroy, & Curtis, 2006). Asimismo, la predicción de su distribución con base en variables climáticas es posible en áreas como Yucatán, mientras que para Guatemala no lo es, lo que es un reflejo de su alta variabilidad genética en esta zona (Bustamante, Monroy, Rodas, Juarez, & Malone, 2007).

Diversos estudios de su variabilidad, tanto morfológica como genética, se han realizado en la región. En estudios realizados con morfometría se ha observado que diferencias en la forma de la cabeza, especialmente en hembras, se correlacionan con las distancias geográficas, analizando tres distintos grupos: Norte, Central y Sur (Bustamante et al., 2004). Estudios genéticos, principalmente con el marcador ITS-2, ha permitido diferenciar cuatro grupos distintos a lo largo de toda su distribución. Por otro lado, este marcador es altamente conservador por lo cual, se ha recomendado utilizar otros marcadores para estudios posteriores (Bargues et al., 2008). Asimismo, Monteiro y colaboradores en 2013, encontraron resultados similares, en los cuales identificaron cuatro grupos principales a lo largo de su rango de distribución usando los marcadores de Citocromo B, lo cual, otorga mayor evidencia a la existencia de estos cuatro grupos (Monteiro, Peretolchina, Lazoski, Harris, Dotson, Abad-Franch, et al., 2013). En Guatemala se pueden encontrar los grupos I, II y III, de los cuales el grupo I es el más ampliamente distribuido desde el sur de México hasta Colombia, el grupo II se encuentra distribuido principalmente en México, encontrándose solamente una pequeña población al Norte de Guatemala, y el Grupo III se encuentra en Yucatán y el Norte de Guatemala (Monteiro, et al., 2013).

Recientemente se ha descrito una nueva especie del género *Triatoma* ubicada en el territorio de Guatemala, México y Honduras, denominada *T. huehuetenanguensis* (Lima-Cordon et al., 2019). Asimismo, se ha encontrado una diferenciación genética entre las poblaciones fronterizas de El Salvador y Jutiapa, utilizando información de GBS (Castellanos, 2017). Esto evidencia la variabilidad genética de *T. dimidiata*, no descrita en la zona central y sur del Territorio de Guatemala.

3.4 Genotipificación por Secuenciación para la detección de variantes de Nucleótido simple.

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP, Simple Nucleotide polymorphism) son el marcador genético más abundante, y su alta densidad los hace perfectos para estudios de herencia en regiones genómicas, especialmente para especies con alta variabilidad genética (Baird et al., 2008; Elshire et al., 2011). El método más comúnmente utilizado para la identificación de SNPs es a través de la selección de sitios adyacentes al corte por enzimas de restricción (Baird et al., 2008; Chuang et al., 2008).

En un principio, Miller y colaboradores (2007) desarrollaron la técnica de Análisis de SNP´s asociados a sitios de corte con enzimas de restricción. Esta técnica consiste en la digestión del ADN con enzimas de restricción y su posterior ligamiento a adaptadores especiales (Miller, Dunham, Amores, Cresko, & Johnson, 2007). Posteriormente, Baird y colaboradores en 2008 complementaron la técnica descrita por Miller, utilizando secuenciadores de nueva generación, denominada Radseq o Rad Sequencing. Lo cual facilita la identificación de miles de SNPs y un rendimiento alto del genotipado de poblaciones, debido a que permite utilizar un alto número de marcadores para el análisis (Baird et al., 2008).

Por último, la técnica de Genotificación por secuenciación (GBS, Genotyping by Sequencing), utiliza una estrategia de secuenciación múltiple, identificando los distintos fragmentos de ADN con un marcaje de código de barras. Esto permite incrementar la eficiencia del procedimiento, al igual que reduce los costos de la prueba. Esto debido a que la inclusión de los códigos barras, delante del sitio de restricción de la enzima de corte, elimina la necesidad de una segunda lectura por

secuenciación, facilitando la identificación de secuencias, por lo tanto la construcción de las bibliotecas de secuencias (Elshire et al., 2011).

3.5 Análisis Bioinformático aplicado a la genética de poblaciones.

La genética de poblaciones se describe como la rama de la genética encargada de describir la variación y distribución de la variabilidad genética en las poblaciones, con el objetivo de explicar los fenómenos evolutivos a los cuales se encuentran expuestas (Hartl & Clark, 1950). El análisis de secuenciación de nueva generación, utilizando marcadores de SNP's, es una herramienta útil en el análisis de la genética de poblaciones, especialmente para especies o poblaciones con alta variabilidad genética, debido a su abundancia y densidad de marcadores en todo el genoma (Baird et al., 2008; Elshire et al., 2011). Este tipo de estudios sobre el genoma completo de las especies es ya una realidad, y cada vez es más utilizado por investigadores en los trabajos de genética de poblaciones (Catchen, Hohenlohe, Bassham, & Amores, 2013). Para ello han surgido diferentes herramientas bioinformáticas, que permiten el manejo de gran cantidad de datos al igual que el ensamblaje de secuencias, agilizando los procesos de análisis, sin repercutir en la calidad de los resultados (Catchen, Hohenlohe, Bassham, & Amores, 2013; Pritchard & Wen, 2002).

De los análisis más importantes realizados en este trabajo se encuentra el ensamble de secuencias, a realizarse en el software STACKS; y el análisis de estructuración de las poblaciones, a realizarse en el software STRUCTURE. STACKS tiene la capacidad de utilizar secuencias cortas asociadas a enzimas de restricción y agruparlas en segmentos apilados, lo cual permite un ensamblaje de las secuencias de manera rápida y eficiente. También tiene la capacidad de ensamblar secuencias *de novo* o ensamblarlas ante un genoma de referencia (Catchen, Hohenlohe, Bassham, & Amores, 2013). Esto último resulta particularmente útil cuando se manejan secuencias mezcladas, como las obtenidas a partir del abdomen de los vectores, en los que se cuentan con ADN del vector, fuentes alimenticias y su microbiota (Castellanos, 2017). Por otro lado, STRUCTURE es capaz de inferir el número más probable de poblaciones genéticamente distintas utilizando estadística

bayesiana. En este método se analiza el genotipo de cada individuo, y encaja a cada uno de los individuos en los grupos con los cuales tiene una mayor similitud estadística (Pritchard & Wen, 2002). Este método es útil debido a que no parte de una suposición de número específico de grupos, sino más bien, calcula el número de grupos más probable de acuerdo a la entropía que demuestre cada grupo (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000; Pritchard & Wen, 2002).

4. Justificación

Como ya ha sido mencionado con anterioridad, la enfermedad de Chagas es una enfermedad discapacitante y potencialmente mortal, que afecta a órganos vitales como el corazón, sistema nervioso, y aparato digestivo (Chatelain, 2015). La enfermedad tiene una incidencia anual de 28,000 casos en América. Se estima que la enfermedad de Chagas afecta a unos seis millones de personas, con 30,000 casos nuevos y 14,000 muertes por años. Aproximadamente 65 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas. Toda la dinámica de la enfermedad se estima que genera un coste de 500 millones de dólares (OPS, 2018). Menos del 10% de las personas con la enfermedad han sido diagnosticadas y solamente el 1% ha recibido el tratamiento antiparasitario. Los medicamentos actuales son únicamente eficaces durante la fase aguda y al principio de la fase crónica de la enfermedad. Aun así, estos tratamientos pueden causar efectos secundarios indeseables, como reacciones en la piel, dolor de estómago, dolor de cabeza, cansancio, depresión, etc. (Montoya Araújo, 2000; OPS, 2018).

Por lo descrito con anterioridad, el control vectorial es la mejor manera para disminuir la incidencia de la enfermedad de Chagas. Para llevar a cabo un control vectorial adecuado es necesario entender las variables que lo pueden estar afectado, como la distribución del vector, y su variabilidad morfológica, ecológica y genética (López et al., 2007). Diversos estudios se han realizado en estas temáticas, y se ha encontrado que las poblaciones de *T. dimidiata* en Guatemala presentan un alto grado de dispersión y de adaptación a distintos hábitats (Bustamante et al., 2007; Bustamante et al., 2004). Asimismo, con el uso de marcadores mitocondriales y ribosomales se ha evidenciado la existencia de distintos grupos diferenciados en

el territorio guatemalteco, de los cuales la mayoría se encuentra en el norte del país. Por otro lado, el centro y sur de Guatemala se encuentra conformado por un único grupo distribuido por toda Centroamérica hasta Colombia (Monteiro, et al., 2013). Por otro lado, Castellanos (2017), utilizando más marcadores moleculares, evidenció una estructuración genética en la zona fronteriza entre Guatemala y El Salvador (Castellanos, 2017). Por lo cual se hace evidente que es necesario una reevaluación de la diversidad genética en la zona central y sur de Guatemala, de esta manera llevar a cabo mejores protocolos de control vectorial.

5. Objetivos

General

Identificar la estructuración genética existente entre distintas poblaciones de *T. dimidiata* de Guatemala y El Salvador

Específico

Describir la estructura y diferencias genéticas de las poblaciones de *T. dimidiata* de los departamentos de Chiquimula, Huehuetenango, Jutiapa y Quiché en Guatemala, y Sonsonate y Santa Ana en El Salvador.

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

Identificar la relación entre la distancia espacial y la distancia genética entre las distintas poblaciones de estudio

6. Hipótesis

Existe estructuración genética en las poblaciones de *T. dimidiata* de Guatemala y El Salvador, conformada por dos grupos principales; uno compuesto por las poblaciones de Huehuetenango y Quiché (Guatemala) y el segundo, por las poblaciones de Chiquimula, Jutiapa (Guatemala) y Ahuachapán, Santa Ana y Sonsonate (El Salvador).

7. Materiales y Métodos

Los métodos fueron diseñados con el objetivo de identificar la estructuración y diversidad genética de las poblaciones de *T. dimidiata* de Guatemala y El Salvador, realizando análisis bioinformáticos de las secuencias generadas a partir de la tecnología de secuenciación de nueva generación, aplicando marcadores de

polimorfismo de nucleótido simple (SNP) de la colección de secuencias de *T. dimidiata* generadas en el marco del proyecto EEID Chagas 2015 del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), La Universidad de Loyola y La Universidad de Vermont, Estados Unidos.

7.1 Área de Estudio.

Las poblaciones de estudio de *T. dimidiata* fueron obtenidas de ecotopos domiciliarios de aldeas en los departamentos de Jutiapa, Chiquimula, Huehuetenango y Quiché en Guatemala; y Santa Ana y Sonsonate, en El Salvador (Tabla 1; Figura 1). Jutiapa contó con tres localidades de colecta, Chiquimula una, Huehuetenango cinco, Quiché cuatro, Santa Ana tres y Sonsonate dos (Figura 1; Anexo 1). Todas las poblaciones seleccionadas son parte del grupo genético 1, identificado por Monteiro et al. (2013), el cual es el grupo con distribución más amplia desde la península de Yucatán hasta Colombia.

Se escogieron especímenes provenientes de sitios hiperendémicos para la enfermedad de Chagas, que incluyen los departamentos de Jutiapa y Huehuetenango en Guatemala, y los departamentos de Santa Ana y Sonsonate de El Salvador. Por otro lado, los departamentos de Chiquimula y Quiché de Guatemala son únicamente endémicos, debido a que los índices de infestación en estos sitios son sustancialmente menores (Castellanos, 2017; Tabaru, Monroy, Rodas, Mejía, & Rosales, 1999). Se seleccionaron estas localidades debido a su importancia en relación a la enfermedad de Chagas, y porque al conocer las diferencias genéticas existentes entre las poblaciones de *T. dimidiata*, podría llevar a un control más adecuado de la enfermedad de Chagas en la región (López et al., 2007).

7.2 Muestras utilizadas.

Las secuencias seleccionadas para el análisis pertenecen a especímenes provenientes de dos proyectos principales. El proyecto de colecta en las aldeas de Chaperno y Carrizal del año 2011, de donde provienen las chinches de Jutiapa. Por otro lado, las chinches colectadas en El Salvador y Chiquimula pertenecen al proyecto “Tres países” efectuado en el año 2013. Por último, los especímenes de

las localidades de Quiché y Huehuetenango fueron colectados en distintas actividades de muestreo entre 2010 y el 2014. Todos los individuos fueron secuenciados bajo el proyecto EEID Chagas en el 2015. El muestreo fue realizado en el intradomicilio de las viviendas, para lo cual se utilizó el método de muestreo hombre-hora. Este consiste en la búsqueda activa de los Triatominos dentro de las viviendas por un técnico durante una hora. La búsqueda activa consiste en la búsqueda de los Triatominos con pinzas y linternas dentro de las viviendas, poniendo especial atención en las grietas de las paredes de la vivienda, debajo de colchones, en leña, nidos de animales o espacios donde duerman los mismos, como gallineros o corrales, acúmulos de materiales de construcción, leña, entre otros. Para el caso de Guatemala, los muestreos fueron realizados por el equipo del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología – LENAP, de La Universidad de San Carlos de Guatemala y el departamento de vectores del Ministerio de Salud y Asistencia Social de Guatemala. En el caso del Salvador fueron realizados por el Centro de Desarrollo en Salud de la Universidad de El Salvador y El Ministerio de Salud de El Salvador. Todos los especímenes, una vez capturados, fueron almacenados en una solución de alcohol y glicerina al 5% (según especificaciones de la metodología de Solórzano, 2015).

Tabla1. Resumen de secuencias seleccionadas por país y por departamento. *Secuencias seleccionadas a partir de la disponibilidad en las bases de datos.*

Guatemala	62	El Salvador	34
Chiquimula	17	Santa Ana	22
Huehuetenango	20	Sonsonate	12
Jutiapa	20		
Quiché	5		

7.3 Extracción de ADN y Secuenciación

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de las patas, abdómenes y rectos, de los triatominos. Utilizando el kit comercial Quiagen® (DNeasy 96 Blood & Tissue Kit).

Únicamente se secuenciaron los individuos en los cuales se obtuvieron concentraciones de ADN no degradado entre 10 – 30 ng/μl, para esto se utilizó el equipo Nanodrop (Thermo Scientific ®), Qubit® Fluometric Quantitation (Life Technologies). La elaboración de bibliotecas de ADN y secuenciación se llevó a cabo por la técnica “Genotyping by Sequencing” (GBS). Esta consistió en el corte del ADN por la enzima de restricción PstI, la cual generó los siguientes cortes de secuencias:

5'-C TGCA↓G-3' 3'-G↑ACGT C-5.

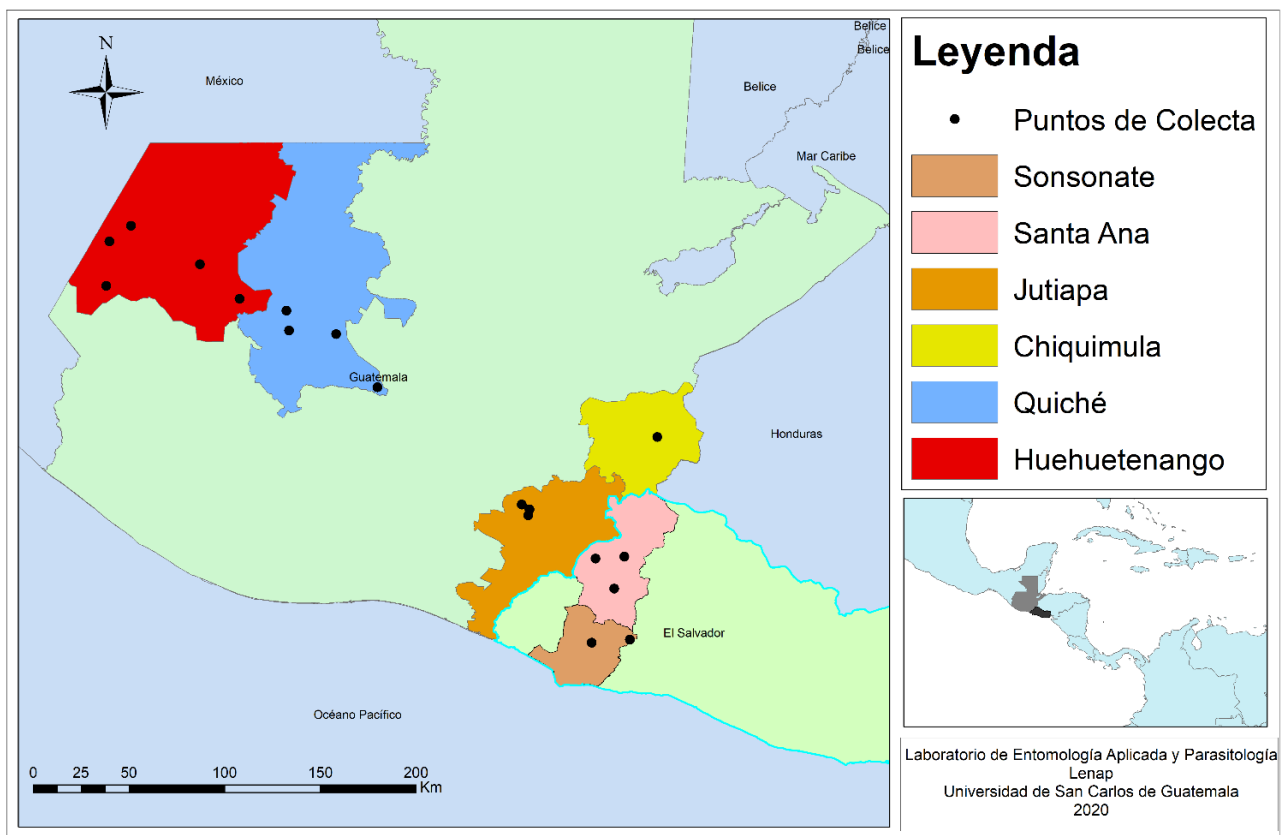


Figura 1. Área de estudio y resumen de secuencias seleccionadas por país y por departamento.

Posteriormente se adicionaron los adaptadores a los segmentos de ADN generados, a los cuales se unió la ADN polimerasa y generó las nuevas hebras,

usadas para el análisis de secuencia a regiones adyacentes al sitio de corte por la enzima de restricción (Según especificaciones de Solórzano, 2015).

El presente proyecto de secuenciación de ADN de Triatomíneos fue una colaboración internacional entre distintas Universidades. La colecta fue realizada por la Universidad de San Carlos de Guatemala, la extracción de ADN de las muestras fue realizada por personal del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP) y la Universidad de Vermont. El análisis de secuenciación se realizó en la Universidad de Cornell, a través del apoyo de la Universidad de Loyola Parte del marco de investigación de del proyecto EEID Chagas del 2015, en el cual colaboraron las tres instituciones mencionadas.

7.4 Análisis Bioinformático

El análisis bioinformático realizado en este trabajo consistió en dos procedimientos generales: El ensamble de las secuencias cortas obtenidas a partir de la secuenciación de nueva generación, por medio del software STACKS (Catchen, Hohenlohe, Bassham, Amores, & Cresko, 2013), y el análisis de grupos genéticos utilizando el software STRUCTURE V. 2.3 (Pritchard et al., 2000).

Al estar utilizando ADN provenientes no únicamente de patas, sino también del abdomen (Anexo 1), fue necesario filtrar las secuencias generadas a partir de abdomen contra un catálogo de secuencias de patas. Esto con el objetivo de filtrar todas aquellas secuencias que no pertenezcan a *T. dimidiata*, tales como fuentes alimenticias, parásitos, bacterias, etc. Para la realización del ensamble de las secuencias cortas y generar los distintos marcadores genéticos se utilizó el software STACKS. STACKS es un software basado en el análisis de haplotipos, por lo cual los resultados de este análisis son los distintos haplotipos presentes en la población analizada. Para ello se utilizó la línea de comando *ref_map.pl*, el cual trabaja con archivos previamente alineados. El comando *ref_map.pl* es la manera más sencilla para generar la línea de comandos para secuencias previamente alineadas. Para ensamblar los loci de las muestras, el programa primero generó los loci de cero a partir de nuestras secuencias, generó un catálogo de loci, y los ensambló. Por último, se generó un análisis de poblaciones, en el cual identificó los distintos haplotipos

presentes en cada población (Catchen, Hohenlohe, Bassham, Amores, et al., 2013). En el análisis de poblaciones de STRUCTURE se decidió trabajar únicamente con los loci presentes en el 80% de las muestras como mínimo, con el objetivo de disminuir los errores de lectura en las muestras, loci muy específicos o no descritos, y aumentar así el nivel de polimorfismo en las muestras.

Con el software STACKS se generó un archivo de salida en formato STRUCTURE, el cual fue cargado en el software Structure V 2.3, para obtener el número más probable de grupos genéticamente distintos (K). Este método consiste en un análisis multiloci basado en estadística bayesiana, el cual analiza el conjunto de loci de cada muestra y encaja probabilísticamente cada individuo de las distintas muestras en grupos genéticamente distintos si el grupo de loci analizados es distinto, o en un mismo grupo si el grupo de loci es similar. Esto resulta en un análisis adecuado para estudiar la estructuración genética debido a que no toma en cuenta el origen de la muestra, sino únicamente la diversidad de loci del conjunto de muestras (Pritchard et al., 2000). Para esto se utilizó 10 repeticiones por grupo, lo que significa que el sistema analizó la probabilidad de la existencia de K grupos 10 veces, desde un mínimo de un grupo hasta un máximo de siete grupos genéticamente distintos. El programa Structure Harvest (Earl & Bridgett, 2012) resumió y analizó los resultados de Structure, describiendo la probabilidad de que K sea real ($IL''[K]I$). Por último, se utilizó el software online CLUMPAK (Kopelman, Mayzel, Jacobsson, & Rosenberg, 2018), el cual toma los resultados del STRCUCTURE y graficó los resultados para cada uno de los distintos conjuntos de poblaciones probables a existir.

7.5 Análisis de diversidad genética

El software STACKS generó un archivo resumen de análisis de poblaciones, el cual calculó los valores de porcentaje de loci polimórficos (P), la heterocigosidad esperada (H_e) y (H_o). Stacks permitió generar un archivo de salida en formato .genpop.txt, este archivo fue utilizado para calcular las desviaciones de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) y el índice de fijación F_{st} en Genepop (Raymond & Rousset, 1995), utilizando el paquete genepop 1.1.7 bajo el soporte del CRAN del software R V.3.6.3 (R Core Team, 2020).

El mismo archivo .genpop.txt fue convertido a un formato .arp, utilizando el software PGDSpider 2.1.1.5 (Lischer & Excoffier, 2012). El formato .arp fue utilizado con el software arlequín 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010), en donde se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), para observar la variación entre grupos, entre poblaciones del mismo grupo y entre poblaciones. Con el objetivo de la operativización de los comandos en Arlequín y disminuir el sesgo en el análisis de los datos, se decidió generar dos AMOVA con dos distintas agrupaciones:

AMOVA 1. Se formaron tres grupos según su cercanía geográfica Grupo 1. Huehuetenango y Quiché, Grupo 2. Chiquimula y Jutiapa, Grupo 3. Santa Ana y Sonsonate.

AMOVA 2. Según su similitud en la estructuración genética generada por STRUCTURE. 1. Huehuetenango y Chimaltenango 2. Jutiapa, Santa Ana, Sonsonate y Quiché (Tabla 2).

Por último, el índice de diversidad genética H , y el número medio de alelos para cada locus por población fue realizado en Arlequín. El índice H de diversidad ilustra una medida del grado de diversidad genética en una población (Piñero et al., 2008). Por otro lado, el número medio de alelos por loci, es una medida del polimorfismo encontrado en las poblaciones (Aranguren-Méndez, Román-Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2005). En ambos índices, un valor mayor expresa una mayor diversidad genética dentro de la población.

Tabla 2. Agrupaciones generadas para el análisis de varianza molecular (AMOVA).

AMOVA 1. Criterio: Cercanía geográfica			AMOVA 2 Criterio: Resultados de estructuración	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2
Huehuetenango y Quiché	Jutiapa y Chiquimula	Santa Ana y Sonsonate	Huehuetenango y Chiquimula	Quiché, Jutiapa, Santa Ana y Sonsonate.

7.6 Análisis de aislamiento genético por distancia.

Para analizar la influencia del aislamiento geográfico sobre la variabilidad genética de las poblaciones, se inició evaluando las distancias genéticas (F_{st}) entre las distintas poblaciones de estudio (Nodarse, 2009). Como se mencionó previamente, el índice de F_{st} fue realizado en el software R con el paquete Genepop. Por último, estos valores de F_{st} obtenidos fueron utilizados para obtener un árbol utilizando en comando *hclust* del paquete *stat* v.3.6.2 del software R.

Para el análisis de aislamiento por distancia es posible usar la prueba de Mantel en el Software R Studio acoplado a R. 3.6.0, utilizando el paquete *vegan* V. 2.5-6. El input de esta prueba son los valores de distancias genéticas dadas por los valores de F_{st} obtenidos en Genepop, y los valores de las distancias geográficas obtenidos a partir de la distancia lineal del centroide de los puntos de colecta por departamento, utilizando el software ArcMap 10.3. La prueba de mantel es un test de correlación entre dos matrices de distancia, y evidencia la relación entre ambos valores. De esta manera, es posible analizar si los valores de las distancias genéticas y geográficas están relacionados, evidenciando si existe un proceso de diferenciación genética azaroso o seleccionado (Hernández, Ruiz-García, Munstermann, & Ferro, 2008; Lent & Wygodzinsky, 1979).

8 Resultados

El análisis de Stacks generó un archivo de salida con 7103 loci, el cual posterior de ser filtrado a únicamente los loci presentes en el 80% de las muestras se generó un archivo de salida con 4193 loci. Estos loci 4193 loci identificados, fueron los utilizados en los análisis de estructuración y diversidad genética.

8.1 Estructuración genética

Se realizaron los análisis de estructuración genética en STRUCTURE con el objetivo de identificar distintos grupos genéticos, sin tomar en cuenta su distribución geográfica. Bajo este objetivo se realizó el análisis de la tasa de cambio sobre la distribución de la probabilidad (eje y) sobre los distintos valores de K (eje x) (Figura

2). Se observó los resultados en donde $K = 2$, por mucho, es el número de grupos genéticos más probables de ser reales para nuestras poblaciones de estudio.

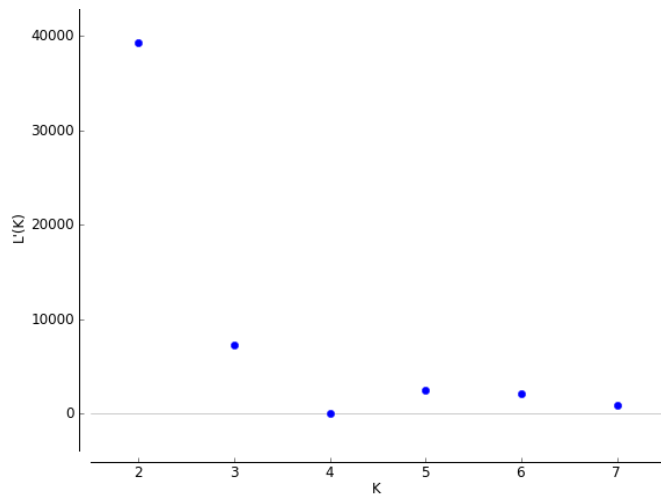


Figura 2. Tasa de cambio de la distribución de probabilidad para los distintos valores de K . En donde se observó que $K = 2$ presenta el valor de probabilidad ($L'[K]$) más alto. Lo que significa que dos poblaciones genéticamente distintas son las más probables de existir en nuestras poblaciones de estudio.

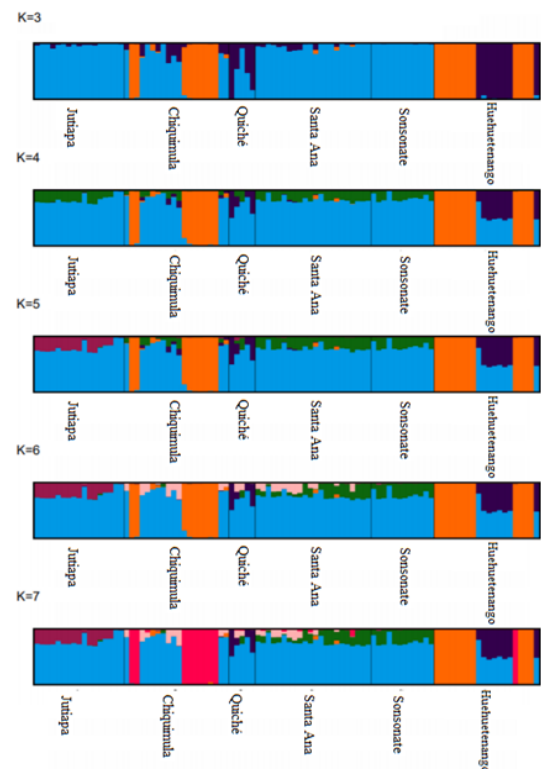
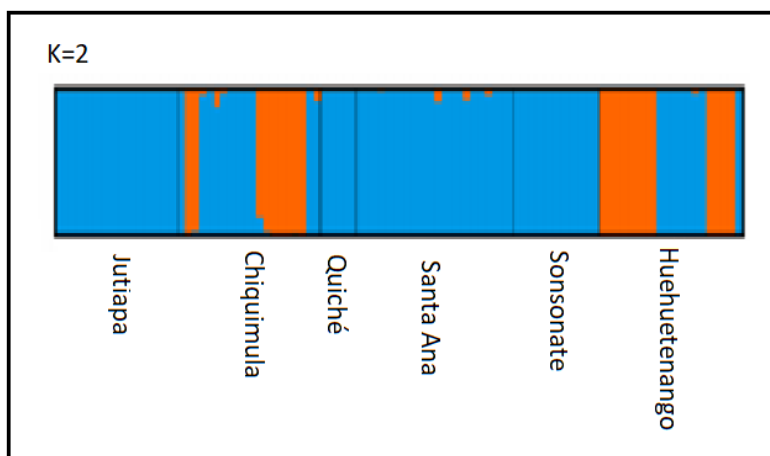


Figura 3. Distribución de los grupos genéticos encontrados en el análisis de STRUCTURE, para los distintos valores de K . Cada color en la gráfica representa

un grupo genético en la población. Para $K=2$, se observó en grupo genético azul, distribuido en todas las poblaciones y el grupo genético naranja únicamente distribuido en las poblaciones de Chiquimula y Huehuetenango.

En la figura 3 se observó la distribución de los grupos genéticos para distintos valores de K , en todas las poblaciones de estudio. Como ya se había discutido, $K = 2$ es el número de grupos genéticos más probable para nuestras poblaciones de estudio. Para este se observó dos grupos genéticos (azul y anaranjado), donde el azul se distribuye en todas las poblaciones de estudio y el anaranjado solamente en las poblaciones de Chiquimula y Huehuetenango. La distribución de las poblaciones genéticas, evidencia dos poblaciones diferentes genéticamente entre sí con poco flujo genético entre ellas. Posteriormente en $K = 3$, se añade un grupo distinto en morado distribuido mayormente en Quiché y Huehuetenango. Para $K = 4$ se añade el grupo genético en rojo, el cual se distribuye de manera homogénea en todas las poblaciones, exceptuando Huehuetenango. Por último, para $K = 6$ y $K = 7$ se observa que se añade pequeñas proporciones de nuevos grupos distribuidos principalmente en Chiquimula, Quiché y Sonsonate. Asimismo, obtuvimos un valor de $F_{st} = 0.13$ con un valor de $p < 0.05$ lo que indica un ligero grado de estructuración genética entre las poblaciones de estudio.

8.2 Análisis de la diversidad genética

Se observa en los resultados de diversidad genética que todas las poblaciones tienen patrones de diversidad genética poblacional distintos, haciéndose más notorio entre la población de Chiquimula con índices que identifican a una población con baja diversidad genética. En primer lugar, en la tabla 3 se observa los valores de porcentaje de loci polimórficos en cada una de las poblaciones, en donde se encuentra a Jutiapa con el valor más alto ($P = 0.31$), seguido por Huehuetenango ($P = 0.28$) y a Chiquimula con en valor más bajo ($P = 0.013$). Por otro lado, se encuentra a las poblaciones de El Salvador, Santa Ana y Sonsonate con valores similares entre sí, de $P = 0.12$ y $P = 0.14$ respectivamente.

Para todas las poblaciones de estudio existen valores de heterocigocidad observada menores a la esperada, lo que indica procesos de endogamia que

disminuyen la heterocigocidad en todas las poblaciones. Este fenómeno es más evidente en las poblaciones de Chiquimula ($H_o = 0.07$, $H_e = 0.39$) y en Huehuetenango ($H_o = 0.07$, $H_e = 0.29$). En caso contrario, en donde la diferencia entre ambos valores es menor fue en Santa Ana ($H_o = 0.12$, $H_e = 0.17$). En el coeficiente de endogamia se observó un patrón similar a los valores de heterocigocidad, en donde todas las poblaciones son predominantemente homocigóticas, especialmente la población de Chiquimula ($F_{is} = 0.811$), y la población menos homocigótica es Jutiapa ($F_{is} = 0.27$). Al igual que los índices anteriores, Chiquimula resultó ser la población con menor índice de diversidad genética (H) y los índices mayores se encuentran en Quiché y Huehuetenango. Por último, el índice de número medio de alelos por locus, donde Chiquimula resultó tener el menor número de variantes (0.036) y Huehuetenango y Quiché son las poblaciones con mayor variación media en cada locus (1.182 y 1.003, respectivamente).

Tabla 3. Análisis de diversidad genética de las poblaciones de estudio. *Muestra los valores de % de loci polimórficos (P), Heterocigocidad observada y esperada, índice de fijación (Fis), índice de diversidad genética (H) y el número medio de alelos por locus (A)*

Población	P	Heterocigocidad		Fis	H	A
		Observada	Esperada			
Jutiapa	0.3106	0.15464	0.21156	0.2748	0.07633	1.03
Chiquimula	0.01384	0.07688	0.39891	0.8118	0.00516	0.036
Quiché	0.23354	0.21638	0.38017	0.4637	0.10793	1.003
Huehuetenango	0.28173	0.07599	0.29365	0.2841	0.07629	1.182
Santa Ana	0.12373	0.12373	0.17238	0.3258	0.08467	0.965
Sonsonate	0.1462	0.1462	0.21473	0.7476	0.06912	0.631

locus (A)

En general, se observa que Chiquimula presentó los valores más bajos de diversidad genética en la mayoría de los índices, lo cual genera evidencia de procesos de pérdida de diversidad genética en esta población. En las poblaciones de Quiché y Huehuetenango se observa el caso contrario, donde los valores de loci polimórficos, endogamia, y diversidad genética evidencian que son poblaciones con

una alta diversidad genética, al compararlas con el resto de las poblaciones de estudio.

En la tabla 4 se observa los resultados del análisis de equilibrio de HW, en esta se observan resultados similares para todas las poblaciones, donde estas presentan una alta probabilidad ($p < 0.005$) de no estar en equilibrio HW. Lo que significa procesos de pérdida de diversidad genética en todas las poblaciones. Estos resultados son similares a los valores de Heterocigocidad, ambos índices expresan que son poblaciones bajo procesos de pérdida de diversidad genética.

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA), en donde se observa que en todos los AMOVA realizados la fuente de variación molecular principal se encuentra dentro de todas las poblaciones. Lo cual indica una cierta variabilidad genética dentro de las poblaciones a pesar de la alta diferencia de heterocigocidad esperada y observada, o la falta de equilibrio HW. Se observa una mayor variación genética entre grupos al utilizar los grupos formados por el análisis de Structure, lo cual genera evidencia que la distancia geográfica no juega un rol importante en la diferenciación genética de nuestras poblaciones de estudio.

Tabla 4. Análisis del Equilibrio de Hardy – Weinberg (HW), para las seis poblaciones de estudio. *Se observa que las seis poblaciones presentan una alta probabilidad de no estar en equilibrio HW.*

Población	Chi2	df	Prob
	>		
Jutiapa	3059.4082	1950	$p < 0.05$
Chiquimula	> 761.9312	96	$p < 0.05$
Quiché	1656.8792	1238	$p < 0.05$
	>		
Huehuetenango	9434.4756	1602	$p < 0.05$
	>		
Santa Ana	4715.8613	2346	$p < 0.05$
Sonsonate	2748.31	1532	$p < 0.05$

Tabla 5. Análisis de Varianzas Molecular (AMOVA) para las seis poblaciones de estudio agrupadas de 2 maneras distintas (Resumen de los grupos formados en Anexo 2).

Fuente de variación	Porcentaje de Variación	
	AMOVA 1	AMOVA 2
Entre Grupos	9.22	19.72
Dentro poblaciones de un mismo grupo	29.41	19.84
Dentro poblaciones	61.37	60.42

8.3 Aislamiento genético por distancia

Con el objetivo de evidenciar cómo varían los patrones genéticos de las poblaciones con respecto a su distribución genética se trabajó con un análisis de F_{st} . En la tabla 6 se observó los resultados del análisis de F_{st} , donde se evidencian las distancias genéticas existentes entre cada población de estudio. Se observa que el valor más bajo se encuentra entre las poblaciones de Santa Ana y Sonsonate (0.0052) y el valor más alto entre las poblaciones de Chiquimula y Jutiapa (0.4153). En la figura 4, se observan los resultados generados, a partir de un análisis de los valores de F_{st} entre las distintas poblaciones. En esta figura se observan resultados similares a los que obtuvimos por el análisis de estructuración genética en STRUCTURE. En este se encontró dos clusters principales uno formado por Chiquimula y Huehuetenango, y otro por el resto de las poblaciones. Se observó a Jutiapa como la población de Guatemala más cercana a Santa Ana y Sonsonate, poblaciones de El Salvador. Cabe aclarar que el árbol expuesto en la figura 4, no es un árbol filogenético, únicamente es una representación gráfica de las distancias genéticas expresadas por los valores de F_{st} .

Tabla 6. Valores del índice de fijación (F_{st}), que representan las distancias genéticas existentes entre cada población de estudio.

	Jutiapa	Chiquimula	Quiché	Santa Ana	Sonsonate	Huehuetenango
Jutiapa	0	0.4153	0.05886	0.03562	0.05236	0.3657
Chiquimula	0.4153	0	0.2824	0.4087	0.3636	0.3321
Quiché	0.05886	0.2824	0	0.04205	0.05953	0.262
Santa Ana	0.03562	0.4087	0.04205	0	0.005174	0.3557
Sonsonate	0.05236	0.3636	0.05953	0.005174	0	0.3614
Huehuetenango	0.3657	0.3321	0.262	0.3557	0.3614	0

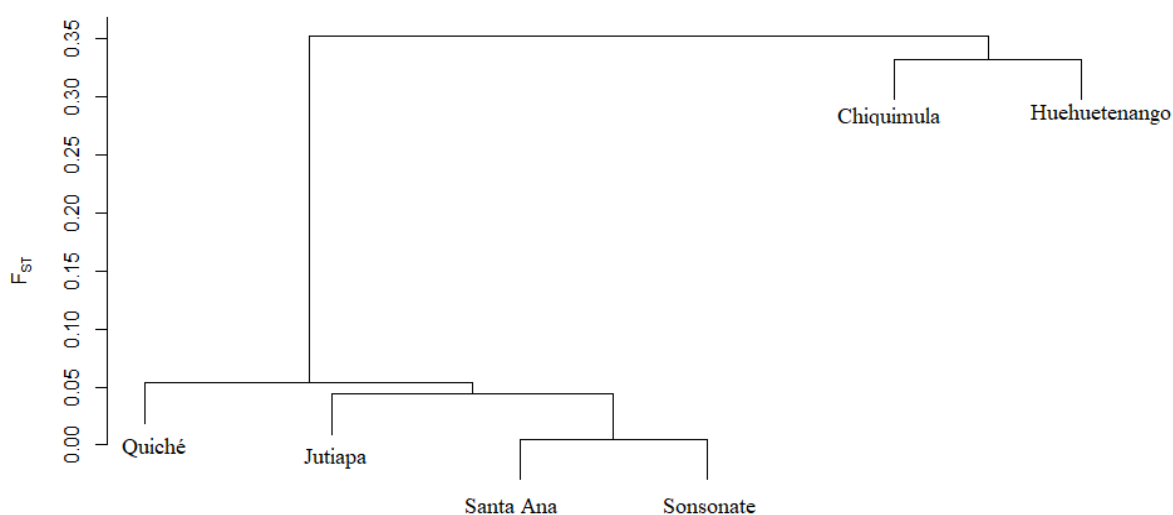


Figura 4. Dendrograma generado a partir de los valores de F_{st} entre cada una de las poblaciones de estudio.

Para evidenciar la influencia del aislamiento geográfico sobre la diferenciación genética entre las poblaciones de estudio, se realizó una prueba de mantel. En la figura 5 se puede observar los resultados del análisis, en el cual es evidente que no existe asociación entre ambas variables. Esto se confirma con el coeficiente de determinación ($r^2 = 0.24$), el cual significa que la variable de distancia geográfica únicamente explica un 24% del comportamiento de la variable distancia genética. Asimismo, se obtuvo un valor de $p = 0.21$ lo cual significa que solamente presenta un 21% de probabilidad de equivocarse al rechazar la hipótesis nula. Esto quiere decir que el modelo no presenta evidencia para sustentar la hipótesis de sobre la

influencia de la distancia geográfica sobre el aislamiento genético. Por lo cual es posible que otras variables tengan un mayor efecto sobre el aislamiento genético, en comparación a las distancias geográficas.

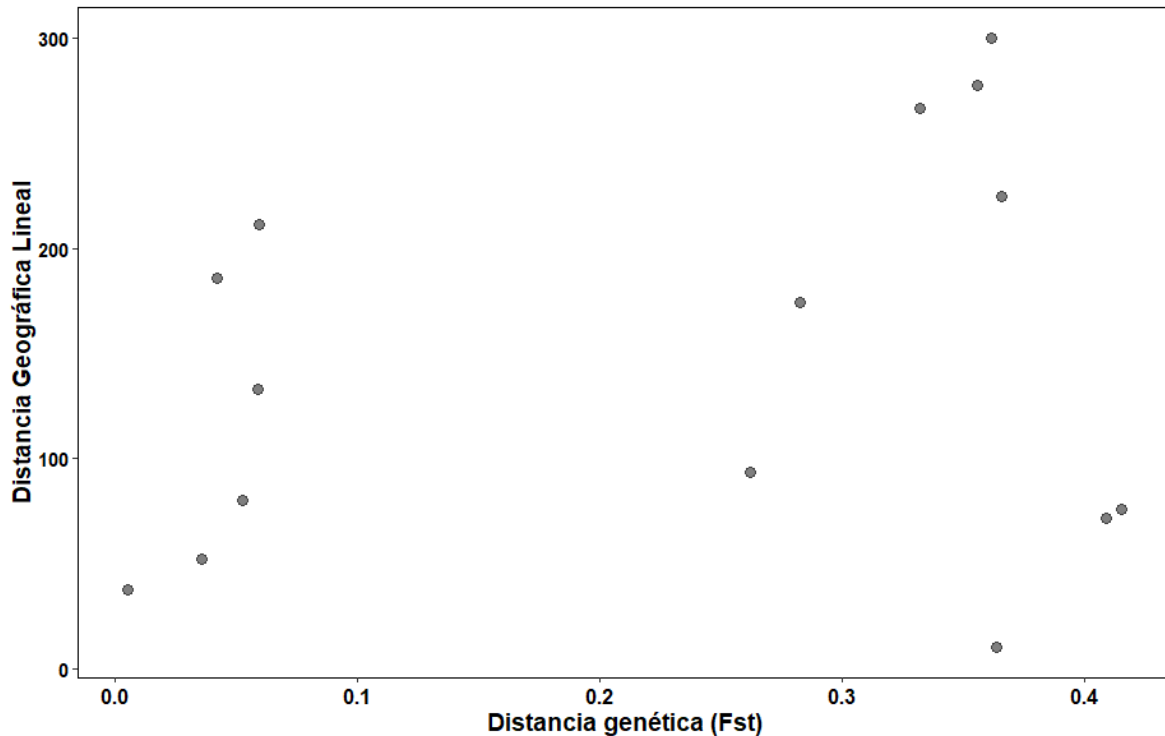


Figura 5. Análisis de aislamiento genético por distancias. *Resultado de la prueba de Mantel realizado entre las matrices de distancia geográfica línea y la matriz de distancia genética. El modelo presentó un coeficiente de determinación de $r^2= 0.24$. Asimismo, no existe evidencia que permita rechazar la hipótesis nula ($p = 0.21$). Por lo cual el modelo evidencia que no existe una relación de diferenciación genética ligada al aislamiento geográfico.*

9. Discusión

Se observa estructuración genética, con dos grupos genéticos, altamente diferenciados y aislados uno del otro (Figura 2 y 3, $K = 2$). El grupo genético azul se distribuye en todas las poblaciones, mientras que el grupo genético naranja únicamente se encuentra en las poblaciones de Huehuetenango y Chiquimula. Asimismo, se observa que ambos grupos se encuentran altamente aislados uno del otro debido a que muy poco individuos forman parte de ambos grupos genéticos.

Esto es contrastante con los de Monteiro y otros (2013), donde se identifica a toda el área y grupos de estudio como parte de un solo grupo genético utilizando marcadores basados en microsatélites. En contraposición, Castellanos (2017) presentó resultados similares para *T. dimidiata* utilizando SNPs, como marcadores genéticos, en la zona fronteriza de Guatemala y El Salvador, donde se encontró una estructuración genética en la zona. Este patrón contrastante entre los resultados obtenidos por Monteiro, et al., (2013) y de Castellanos, (2017) y los resultados de este trabajo, es probablemente debido a la capacidad de los SNPs en la detección de estructura en las poblaciones, principalmente debido uso de gran cantidad de marcadores genéticos que es capaz de generar la técnica de SNPs en comparación a otros marcadores (Garke et al., 2011; Reitzel, Herrera, Layden, Martindale, & Shank, 2013).

En contraparte a lo descrito con anterioridad, recientemente ha sido descrito qué análisis genéticos en la historia evolutiva de *T. dimidiata* presentan resultados similares independientemente de la técnica y marcadores utilizados (microsatélites o SNPs) (Justi et al., 2018). Por lo que es posible que las diferencias en los resultados se deban principalmente a la escala del análisis. Mientras los trabajos generados por Monteiro et al., (2013), BARGUES et al., (2008), y Justi et al., (2018), se enfocan en un área geográfica mayor (Mesoamérica), este trabajo se enfoca a una escala más pequeña como lo es poblaciones de Guatemala y parte de El Salvador, lo que puede permitir un mayor detalle a la hora de los análisis moleculares y de estructuración genética (Landry & Bernatchez, 2001). Tomar en cuenta la dimensión espacial de los análisis de estructuración genética es importante, debido a que, según la escala a la cual esta se analice se tendrá mayor o menor detalle de la estructuración (Landry & Bernatchez, 2001). Diversos estudios han demostrado que sí existe una estructuración de la diversidad genética a pequeña escala, lo cual se encuentra estrechamente relacionado con una alta relación a variables microclimáticas, como es el caso de *Plethodon albagula*, en el cual variables como la temperatura y humedad del suelo presentan una mayor relación en la abundancia de estas salamandras, en comparación a variables macroclimáticas (Peterman & Semlitsch, 2013). Asimismo, variables de manejo forestal

influyen predominantemente en la estructura de diferentes especies de *Quercus* (Lind-Riehl & Gailing, 2015). Un fenómeno similar podría estar ocurriendo en las poblaciones de *T. dimidiata*, donde no se ha observado una relación fuerte entre variables climáticas (Dulce Bustamante, Monroy, Rodas, Juarez, & Malone, 2007; Castellanos, 2017), pero si una alta relación con variables de pequeña escala como pueden ser variables domiciliarias (Bustamante et al., 2015). Por lo cual, una adaptación a variables del ecotopo y hábitat podría generar una estructura a menor escala que trabajos como el de Monteiro, et al., (2013) no detectan por la escala utilizada (Bustamante et al., 2004).

Otra posibilidad a lo observado en la estructuración del grupo es la existencia de dos especies crípticas, con aislamiento reproductivo entre ellas. Esto se apoyaría por la coexistencia de dos variantes genéticas, con poco flujo genético entre ellas en las poblaciones de Huehuetenango y Chiquimula. Esto es un proceso que ha sido evidenciado previamente, con dos taxa distintos de *T. dimidiata* conviviendo en un mismo espacio geográfico y aislamiento reproductivo (Dorn et al., 2009). De igual manera, la descripción de una reciente nueva especie en Huehuetenango, diferenciada de *T. dimidiata* por leves caracteres morfológicos y principalmente por caracteres moleculares (Lima-Cordon et al., 2019), clarifican que son procesos recurrentes en la diversidad poblacional del grupo. Por lo tanto, *T. dimidiata* se ha caracterizado por ser una especie con una historia evolutiva complicada de dilucidar, separándose en distintas especies y volviéndose a juntar desde su descripción en 1811 (Dorn, Monroy, & Curtis, 2006).

Al analizar los resultados de diversidad genética (Tabla 3), se observó que todas las poblaciones han presentado cierto grado de pérdida de variabilidad genética y es especialmente notorio en los bajos valores de heterocigocidad. Este fenómeno ha sido previamente documentado para *T. dimidiata*, donde las poblaciones tienden a mantener una dinámica de baja heterocigocidad (Castellanos, 2017; Landaverde, 2004), y de igual manera para poblaciones de *T. infestans* en Argentina (Belisário et al., 2017; Piccinali & Gürtler, 2015). Resultados similares se observan para el análisis de equilibrio de HW (Tabla 4). En ambos casos, estos patrones de pérdida

de diversidad genética podrían deberse a procesos de endogamia dentro de las poblaciones (Hedrick, 2011), o también debido a procesos de selección de alelos a ambientes domiciliarios como ha sido evidenciado para *T. infestans* (Piccinalli & Gürtler, 2015). Esto podría ser el caso para las poblaciones de *T. dimidiata* en Guatemala, debido a que trabajos con morfometría evidencian una alta diferenciación entre poblaciones silvestres y domiciliarias (D. Bustamante et al., 2004). Aun así, con los resultados obtenidos en este análisis es difícil discernir sobre si es un proceso de endogamia o selección, por lo cual se debe seguir trabajando en este patrón de pérdida de diversidad genética documentado en las poblaciones de *T. dimidiata*.

Aunque todas las poblaciones presentaron cierto grado de pérdida de diversidad genética, Chiquimula fue la población con mayor evidencia de una fuerte pérdida de diversidad. Esto se evidencia con los menores valores de loci polimórficos, la mayor diferencia entre la heterocigocidad esperada y observada, el mayor índice de endogamia, y los menores valores de diversidad alélica y promedio de alelos por locus. Esto podría deberse a muchos factores, como lo puede ser la baja distribución de localidades de colecta en Chiquimula, donde todas pertenecen a un mismo municipio (Figura 1), aunque en contraste, las colectas de Jutiapa también fueron cercanas unas de otras y los valores de diversidad genética no presentaron un patrón similar al de Chiquimula. Esto desde otro punto de vista, la baja diversidad genética pudo deberse a una reciente competencia de nicho con el vector *Rhodnius prolixus*. Chiquimula fue, por mucho, el departamento con mayor infestación asociada a este vector introducido, *R. prolixus*. El cual fue el principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala, hasta la certificación de la eliminación de la transmisión de la enfermedad asociada a *R. prolixus* en 2008 (Cedillos, Romero, & Sasagawa, 2012; Hashimoto et al., 2012; OPS, 2008). Asimismo, la competencia de especies que comparte un nicho tiende a generar patrones de diferenciación y reducción de la diversidad genética de las poblaciones en competencia (Vellend, 2006). Por lo tanto, según la información descrita es posible que se discuta sobre una posible reducción de la diversidad genética de *T. dimidiata* debido a la fuerte competencia que existió entre este y *R. prolixus* en la región de Chiquimula.

Todas las poblaciones presentan cierto grado de pérdida de variación genética, probablemente debido a endogamia, selección y/o competencia como es el caso de Chiquimula. Sin embargo, los resultados de AMOVA (Tabla 5), indican que la mayor fuente de variación genética proviene de dentro de las poblaciones. Lo mismo fue observado en poblaciones fronterizas de Guatemala y El Salvador (Castellanos, 2017) y previamente descrito para poblaciones de Guatemala y México (Landaverde, 2004). Igualmente, *T. dimidiata* siempre ha sido descrito como un grupo con alta variabilidad genética, donde el grupo se ha dividido y juntado en distintas especies y subespecies desde su descripción en 1811 (P. L. Dorn et al., 2006). También ha sido descrita su gran capacidad de infestar gran cantidad de distintos ecotopos desde domiciliarios hasta silvestre (M. Menes, C. Monroy, A. Rodas, 2007). Por lo cual, aunque son poblaciones bajo procesos de pérdida de diversidad genética, estas a su vez mantiene cierta variabilidad genética dentro de la población.

Al comparar ambos países, se observa que las poblaciones de Guatemala, Jutiapa, Quiché, y Huehuetenango, presentan una mayor diversidad genética que las poblaciones de El Salvador (exceptuando Chiquimula por lo discutido con anterioridad). Esto se observa principalmente en los índices de loci polimórficos (P), diversidad genética (H) y número de alelos por locus (A). Esto tiene congruencia con lo descrito por Barges et al., (2008), donde identifica que la región de Guatemala y México como la región con la presencia de más grupos genéticos para la distribución de *T. dimidiata*. Por otro lado, esta zona ha sido como un área de divergencia de especies y grupos de Triatomíneos (S. A. Justi et al., 2018). Por último, la descripción de dos nuevas especies en la región de Guatemala, México y Belice (P. Dorn et al., 2018; Lima-Cordon et al., 2019), caracterizan a la región como una región de alta diversidad para el grupo de Triatomíneos y para *T. dimidiata*. Recientemente han sido descrito que esta gran variabilidad genética descrita para el grupo *T. dimidiata*, se encuentre posiblemente relacionado con una compleja historia geológica que presenta el territorio de Guatemala en comparación al territorio del El Salvador (Landaverde-González, Menes, Melgar, Bustamante, & Monroy, 2020).

Es importante manejar esta alta diversidad genética dentro de las poblaciones. Una mayor diversidad genética presenta una mayor probabilidad de adaptación a distintos ecotopos (M. Menes, C. Monroy, A. Rodas, 2007), por lo cual esto podría llevar a una mejor comprensión de la dinámica de las poblaciones, asimismo, comprender su capacidad de infestación y colonización (Waleckx, Gourbière, & Dumonteil, 2015). Una alta diversidad en poblaciones de vectores suele ser peligroso cuando se trabaja con rociamiento de insecticida, debido a que puede generar poblaciones resilientes que se adapten y generen resistencia con mayor facilidad (Mougabure-Cueto & Picollo, 2015). Por último, comprender la variabilidad genética dentro de una población facilita el entendimiento de su potencial de dispersión (López et al., 2007), y de infección por el parásito *Trypanosoma cruzi* (Ramirez-Sierra & Dumonteil, 2016), lo cual son variables que determinan el riesgo epidemiológico al cual está expuesto una población.

Al analizar los resultados de distancias genéticas F_{st} , (Tabla 6), se observa que la población de Chiquimula es la que más distanciada de todas. Esto es probable que se deba a que Chiquimula ha manejado una dinámica de competición con *R. prolixus*, muy diferente al resto de poblaciones de estudio, lo cual ha disminuido su variabilidad genética (Hashimoto et al., 2012; Vellend, 2006). Por otra parte, si examinamos el cladograma generado a partir de estas distancias de F_{st} (Figura 4), se observa que se forman dos grupos principales uno formado por las poblaciones de Huehuetenango y Chiquimula, y el otro formado por el resto de las poblaciones. Esto es un resultado comparable con lo observado en la estructuración de las poblaciones, donde Huehuetenango y Chiquimula son los únicos en presentar el grupo genético 2. Los resultados obtenidos son contradictorios a los obtenidos por Castellanos (2017), donde evidencia a Chiquimula como la población más cercana a las poblaciones de El Salvador. Esto resultados contradictorios pueden estar generados por la escala geográfica del análisis; mientras Castellanos (2017) únicamente trabaja en la zona fronteriza, este estudio se amplió a más poblaciones de Guatemala. El aumentar la escala del análisis aumenta la variabilidad en el análisis, lo que disminuye la probabilidad de detección de microestructuración

Por último, al observar los valores de F_{st} entre las distintas poblaciones (Tabla 6; Figura 4) y como estos se correlacionan con las distancias geográficas (Figura 5) se observa claramente que no existe un patrón sobre la influencia del aislamiento geográfico sobre la variación genética. Esto es un resultado recurrente observado en poblaciones de Guatemala (Calderon et al., 2005; Castellanos, 2017). Aunque, en contraparte, estudios realizados con anterioridad utilizando morfometría sí han observado una influencia del aislamiento genético sobre la variación morfológica de *T. dimidiata* (D. Bustamante et al., 2004), se prefirió otorgar una mayor importancia a los resultados obtenidos por marcadores genéticos, debido a que diferentes variables fenotípicas han dado resultados distintos (P. L. Dorn et al., 2006). El poco efecto que presenta el aislamiento geográfico sobre la diversidad genética también fue evidenciado en estudios previos para *T. dimidiata* al igual que para el parásito *Trypanosoma cruzi* encontrados dentro del vector *T. dimidiata* (Castellanos, 2017; Solórzano, 2015). De esta manera se evidencian procesos de selección, los cuales pueden ser dados por una alta adaptación su hábitat y nicho (D. Bustamante et al., 2004; Gómez-Palacio, Arboleda, Dumonteil, & Townsend Peterson, 2015) o deriva génica, debido a la pérdida de variantes genéticas de manera aleatoria (Wright, 1980). Lo cual podría ser generado por un efecto de cuello de botella y posterior subdivisión de las poblaciones, debido a un rápido proceso de pérdida de hábitat. Proceso evidenciado previamente, donde en área de alta deforestación no se encontró evidencia de poblaciones silvestres del vector de Chagas en zonas endémicas de la enfermedad de Chagas en Brasil (Sarquis et al., 2004).

Los resultados de estructuración genética coinciden con lo hipotetizado sobre el número de grupos genéticos, mas no con la distribución de los mismos. Esto es debido a que la hipótesis fue basada en una estructuración generada por aislamiento geográfico, y como se observaron en la mayoría de los resultados, las poblaciones no presentan estructuración basada en aislamiento geográfico. Esto se debe posiblemente a procesos de selección a variables del hábitat y ecotopos (D. M. Bustamante et al., 2004; Piccinali & Gürtler, 2015).

10. Conclusiones

1. Los resultados analizados demuestran una clara estructuración genética en las poblaciones de estudio. En donde se encuentra dos grupos genéticos claramente diferenciados ($K=2$). Los grupos genéticos se encuentra distribuidos, uno a lo largo de todas las poblaciones y otro encontrado únicamente en Chiquimula y Huehuetenango. Esta estructuración genética es confirmada por los resultados de distancias genéticas, donde se observan a las poblaciones de Chiquimula y Huehuetenango como un grupo distinto al resto de poblaciones, probablemente siendo un reflejo de la estructuración genética existente en estos grupos o a la presencia de especies crípticas.

2. Para todas las poblaciones se observaron patrones de diversidad genética similar, exceptuando a Chiquimula en la cual se observó un patrón de menor diversidad genética, respecto al resto de poblaciones de estudio (Tabla 3). Posiblemente dado por los procesos de competencia con otro vector de la enfermedad de Chagas, *R. prolixus*.

3. No se observó una relación entre el aislamiento y la variabilidad genética ($p = 0.21$). Por lo cual, es posible asumir la existencia de patrones de selección que no determinen un aislamiento genético azaroso.

11. Recomendaciones

Los resultados demuestran una clara estructura en las poblaciones de *T. dimidiata*, a diferencia de lo descrito en la literatura. Por ende, se plantea la necesidad de seguir clarificando la diversidad genética del grupo *T. dimidiata*, con el objetivo de generar estrategias de control más efectivas, adaptadas y diseñadas para cada población en Guatemala.

Será necesario generar mayor evidencia sobre los procesos que han generado esa pérdida de diversidad genética generalizada para todas las poblaciones de estudio. La cual podría estar relacionada con procesos de selección que generen la estructuración observada en este trabajo. Asimismo, podría estar relacionada con

una baja movilidad del vector, aumentando la probabilidad de endogamia de las poblaciones.

Por último, se observan poblaciones de *T. dimidiata* con una cierta variabilidad genética intrínseca, por lo cual su capacidad de adaptación a nuevos ambientes y alta probabilidad de infestación generan un problema epidemiológico. Trabajar de forma multidisciplinaria, tomando en cuenta la genética del grupo, será necesario para llevar a cabo controles poblacionales que aseguren la eliminación de la transmisión de la enfermedad de Chagas en Guatemala.

12. Referencias

- Aranguren-Méndez, Román-Bravo, Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. *Arch. Latinoam. Prod. Anim. Recibido Octubre Aceptado: Diciembre*, 13(11), 30–42.
- Baird, N., Etter, P., Atwood, T., Curry, M., Shiver, A., Lewis, Z., ... Johnson, E. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE*, 3(10), e3376.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Barbu, C., Dumonteil, E., & Gourbière, S. (2010). Characterization of the dispersal of non-domiciliated *Triatoma dimidiata* Through the selection of spatially explicit models. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000777>
- Bargues, M. D., Klisiowicz, D. R., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J. M., 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 Diseases*, 2(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000233>
- Belisário, C. J., Pessoa, G. C. D., Silva, E. M., Rosa, A. C. L., Ferreira, R. E., Bedin, C., ... Diotaiuti, L. (2017). Genetic characterization of residual *Triatoma*

infestans populations from Brazil by microsatellite. *Genetica*, 145(1), 105–114.
<https://doi.org/10.1007/s10709-017-9949-y>

Bustamante, D. M., Hernández, M. M., Torres, N., Zúniga, C., Sosa, W., De Abrego, V., & Escobar, M. C. 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*, 93(1), 97–107. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0596>

Bustamante, D. M., Monroy, C., Menes, M., Salazar-schettino, P. M., Rojas, G., Pinto, N., ... Dujardin, J. P. (2004). Metric Variation Among Geographic Populations of the Chagas Vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae) and Related Species Metric Variation Among Geographic Populations of the Chagas Vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera : Reduviid. *Morphology, Systematics, Evolution*, 41(3), 296–301.

Bustamante, D. M., Monroy, M. C., Rodas, A. G., Juarez, J. A., & Malone, J. B. (2007). *Environmental determinants of the distribution of Chagas disease vectors in south-eastern Guatemala*. 199–211.

Bustamante, D., Monroy, C., Menes, M., Salazar-schettino, P. M., Rojas, G., Pinto, N., ... Dujardin, J. P. (2004). *Metric Variation Among Geographic Populations of the Chagas Vector Triatoma dimidiata (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae) and Related Species Metric Variation Among Geographic Populations of the Chagas Vector Triatoma dimidiata (Hemiptera : Reduviid.*

Bustamante, D., Monroy, C., Pineda, S., Rodas, A., Castro, X., Ayala, V., ... Trampe, R. (2009). Risk factors for intradomiciliary infestation by the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* in Jutiapa, Guatemala Factores de riesgo para la infestación intradomiciliaria por el vector de la enfermedad de Chagas,. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 1, 83–92.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300008>

Caldero, G., Ferna, N., Ndez, M. P., Rez, J., Monroy, M. C., Menes, M., ... S. Mijailovsky. (2005). Intraspecific Variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:

- Reduviidae) Populations from Guatemala Based on Chemical and Morphometric Analyses. *Journal of Medical Entomology*, 42(6), 1045–1056. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2005\)042](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2005)042)
- Castellanos, S. A. (2017). *Diversidad genética de Triatoma dimidiata (Lateille, 1811), en zona fornterizas e hiperendémicas de la enfermedad de Chagas, entre Guatemala y El Salvador*. (Tesis de pregrado). Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala.
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., & Amores, A. (2013). Stacks : an analysis tool set for population genomics. *Molecular Biology*, 22, 3124–3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- Cedillos, R. A., Romero, J. E., & Sasagawa, E. (2012). Elimination of *Rhodnius prolixus* in El Salvador, Central America. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(8), 1068–1069. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000800018>
- Chatelain, E. (2015). Chagas disease drug discovery: Toward a new era. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(1), 22–35. <https://doi.org/10.1177/1087057114550585>
- Chuang, L. Y., Yang, C. H., Tsui, K. H., Cheng, Y. H., Chang, P. L., Wen, C. H., & Chang, H. W. (2008). Restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *Anticancer Research*, 28(4 A), 2001–2007. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-30>
- Dorn, P., Justi, S., Carolina, D., Stevens, L., Galvao, C., Lima-Cordon, R., & Monroy, C. (2018). Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, 775, 69–95. <https://doi.org/10.3897/zookeys.775.22553>
- Dorn, P. L., Calderon, C., Melgar, S., Moguel, B., Solorzano, 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*, Vol. 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000393>

- Dorn, P. L., Monroy, C., & Curtis, A. (2006). *Triatoma dimidiata* (Latreille , 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.10.001>
- Dumonteil, E., Ramirez-sierra, M. J., & Herrera-aguilar, M. (2010). Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation in rural villages and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine and International Health*, 15(1), 77–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02422.x>
- Earl, D. A., & Bridgett, M. (2012). *STRUCTURE HARVESTER : a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method*. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Garke, C., Ytournal, F., Bed’hom, B., Gut, I., Lathrop, M., Weigend§, S., & Simianer, H. (2011). Comparison of SNPs and microsatellite for assessing genetic structure of Chicken populations. *Animal Genetics*, 85, 84–92.
- Gómez-Palacio, A., Arboleda, S., Dumonteil, E., & Townsend Peterson, A. (2015). Ecological niche and geographic distribution of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata* (Reduviidae: Triatominae): Evidence for niche differentiation among cryptic species. *Infection, Genetics and Evolution*, 36, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.035>
- Hartl, D., & Clark, A. (1950). *Principles of population Genetics* (McGraw-Hill, Ed.). Retrieved from

https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/28139957/183030028.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1559094261&Signature=jOTF4O6Arn6YT%2B%2F%2F323D%2FytEEyE%3D&response-content-disposition=inline%3B filename%3DPrinciples_of_population_gen

Hashimoto, K., Álvarez, H., Nakagawa, J., Juarez, J., Monroy, C., Cordón-Rosales, C., & Gil, E. (2012). Vector control intervention towards interruption of transmission of Chagas disease by *Rhodnius prolixus*, main vector in Guatemala. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *107*(7), 877–887. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000700007>

Hedrick, P. (2011). *Genetics Of Populations* (Cuarta Ed.; J. & B. Learning, Ed.). Sudbury, MA.

Hernández, C., Ruiz-García, M., Munstermann, L., & Ferro, C. (2008). Estructura genética en cinco especies de flebótomos (*Lutzomyia* spp.) de la serie townsendi, grupo verrucarum, en Colombia (Diptera: Ptrychodidae). *Revista de Biología Tropical*, *56*(4), 1717–1739.

Justi, S. A., Cahan, S., Stevens, L., Monroy, C., Lima-Cordón, R., & Dorn, P. L. (2018). Vectors of diversity: Genome wide diversity across the geographic range of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* sensu lato (Hemiptera: Reduviidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *120*, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.12.016>

Kopelman, K., Mayzel, J., Jacobsson, M., & Rosenberg, N. (2018). CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, *15*(5), 1179–1191. <https://doi.org/doi: 10.1111/1755-0998.12387>

Landaverde-González, P., Menes, M., Melgar, S., Bustamante, D., & Monroy, C. (2020). Common pattern of distribution for Mesoamerican *Triatoma dimidiata* suggest geological and ecological association. *Acta Tropica*, *204*(December 2019), 105329. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105329>

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).

Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Landry, C., & Bernatchez, L. (2001). Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology*, 10(10), 2525–2539. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01383.x>
- Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the triatominae (hemiptera , reduviidae), and their significance as vectors of Chagas ' disease of the American Museum of Natural History New York : 1979. 163.
- Lima-Cordon, R., Monroy, C., Stevens, L., Rodas, A., Rodas, G., Dorn, P., & Justi, S. (2019). Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, 820, 51–70. <https://doi.org/10.3897/zookeys.820.27258>
- Lind-Riehl, J., & Gailing, O. (2015). Fine-scale spatial genetic structure of two red oak species, *Quercus rubra* and *Quercus ellipsoidalis*. *Plant Systematics and Evolution*, 301(6), 1601–1612. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1173-y>
- Lischer, H. E. L., & Excoffier, L. (2012). PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), 298–299. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642>
- López, D. C., Jaramillo, C., & Guhl, F. (2007). Estructura poblacional y variabilidad genética de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de diferentes áreas geográficas de Colombia. *Biomédica*, 27(1), 28–39. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.246>
- Lucero, D. E., Morrissey, L. A., Rizzo, D. M., Rodas, A., Garnica, R., Stevens, L., ... Monroy, M. C. (2013). Ecohealth interventions limit triatomine reinfestation following insecticide spraying in La Brea, Guatemala. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 630–637.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0448>

- Menes, M., Monroy, C., Rodas, A., J. G. (2007). Determinación de hábitats y variabilidad fenotípica de poblaciones silvestres de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera : Reduviidae) , asociadas a comunidades rurales en la región norte de Guatemala. *DIGI*.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 18, pp. 189–197). [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00008-9)
- Miller, M. R., Dunham, J. P., Amores, A., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2007). Rapid and Cost-Effective Polymorphisms identification and genotyping using Restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*, 17, 240–248. <https://doi.org/10.1101/gr.5681207.high-throughput>
- Monroy, C., Bustamante, D. M., Pineda, S., Rodas, A., Castro, X., Ayala, V., ... Moguel, B. (2009). House improvements and community participation in the control of *Triatoma dimidiata* re-infestation in Jutiapa, Guatemala. *Cadernos de Saude Publica / Ministerio Da Saude, Fundacao Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saude Publica*, 25 Suppl 1, S168–S178. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2009001300016>
- Monroy, C., Castro, X., Bustamante, D. M., Pineda, S., Rodas, A., Moguel, B., ... Quiñonez, J. (2012). An Ecosystem approach for prevention of chagas disease in rural Guatemala. In Springer (Ed.), *Ecohealth research in practice* (pp. 153–171). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0517-7>
- Monteiro, F. A., Peretolchina, T., Lazoski, C., Harris, K., Dotson, E. M., Abadfranch, F., ... Marcet, P. L. (2013). *Phylogeographic Pattern and Extensive Mitochondrial DNA Divergence Disclose a Species Complex within the Chagas Disease Vector Triatoma dimidiata*. 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070974>
- Montoya-Araújo, R. (2000). Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Revista*

Medicina., 22(2(53)), 134–140. <https://doi.org/10.4067/S0716-07201999000300007>

- Mougabure-Cueto, G., & Picollo, M. I. (2015). Insecticide resistance in vector Chagas disease: Evolution, mechanisms and management. *Acta Tropica*, 149, 70–85. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.014>
- Nakagawa, J., Cerdón-Rosales, C., Juárez, J., Itzep, C., & Nonami, T. (2003). Impact of Residual Spraying on *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in the Department of Zacapa in Guatemala. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(2), 277–281. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000200019>
- Nodarse, J. F. (2009). (Hemiptera : Reduviidae) en la península de Guanahacabibes. *Instituto de Medicina Tropical*, 61(1), 88–96.
- OMS. (2018). Vigilancia de los vectores. Retrieved from http://www.who.int/denguecontrol/monitoring/vector_surveillance/es/
- OPS. (2008). Guatemala interrumpe la transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas por *Rhodnius prolixus*. Retrieved from OPS Guatemala website: https://www.paho.org/gut/index.php?option=com_content&view=article&id=86:guatemala-interrumpe-transmision-vectorial-de-enfermedad-de-chagas-por-rhodnius-prolixus&Itemid=247
- OPS. (2018). *Guía para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas*. Washington D.C.
- Peterman, W. E., & Semlitsch, R. D. (2013). Fine-Scale Habitat Associations of a Terrestrial Salamander: The Role of Environmental Gradients and Implications for Population Dynamics. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062184>
- Peterson, J. K., Hashimoto, K., Yoshioka, K., Dorn, P. L., Gottdenker, N. L., Caranci, A., ... Monroy, C. (2019). Chagas Disease in Central America: Recent Findings and Current Challenges in Vector Ecology and Control. *Current Tropical Medicine Reports*. <https://doi.org/10.1007/s40475-019-00175->

0

- Piccinali, R. V., & Gürtler, R. E. (2015). Fine-scale genetic structure of *Triatoma infestans* in the Argentine Chaco. *Infection, Genetics and Evolution*, 34(May), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.030>
- Piñero, D., Caballero-Mellado, Jesús Cabrera-Toledo, Dánae Canteros, Cristina Elena Casas, A., Castañeda Sortibrán, América Castillo, A., Cerritos, R., Chassin-Noria, O., Colunga-GarcíaMarín, Patricia Delgado, P., ... Wegier, A. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital Natural de México, I*, 437–494. Retrieved from http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/VolI/I15_Ladiversidadgen.pdf
- Ponce, C. (2007). Current situation of Chagas disease in Central America. *Mem Inst Oswaldo Cruz, 102 Suppl (Neiva 1915)*, 41–44. <https://doi.org/S0074-02762007005000082> [pii]
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data*.
- Pritchard, J. K., & Wen, W. (2002). *Documentation for structure software: Version 2*. (p. 29). p. 29.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2020. <https://www.r-project.org/>.
- Ramirez-Sierra, M. J., & Dumonteil, E. (2016). Infection rate by *Trypanosoma cruzi* and biased vertebrate host selection in the *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) species complex. *Journal of Medical Entomology*, 53(1), 20–25. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv157>
- Ramírez, C. J., Jaramillo, C. A., Delgado, M. D. P., Pinto, N. A., Aguilera, G., & Guhl, F. (2005). Genetic structure of sylvatic, peridomestic and domestic

- populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from an endemic zone of Boyaca, Colombia. *Acta Tropica*, 93(1), 23–29.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.001>
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). Genpop 1.2 Population genetics software for exact test and ecumenicism. *Computer Notes*, 248–249.
- Reitzel, A. M., Herrera, S., Layden, M. J., Martindale, M. Q., & Shank, T. M. (2013). Going where traditional markers have not gone before: Utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 2953–2970.
<https://doi.org/10.1111/mec.12228>
- Sales, P. A., Molina, I., Murta, S. M. F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., & Carneiro, C. M. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>
- Schofield, C. J. (1994). Triatominae Biology and Control. *Zeneca Pub. Health*, 88(5), 606.
- Solórzano, E. (2015). *Estructuración Genética del parásito Typanosoma cruzi en su hospedero Triatoma dimidiata en zonas geográfica con asa de infección contrastantes*. (Tesis de Maestría) Chile: Universida Autral de Chile.
- Tabaru, Y., Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M., & Rosales, R. (1999). The geographical distribution of vector of Chagas disease and population at risk of infection in Guatemala. *The Japa Society of Medical Entomology and Zoology*, 50(1), 9–17.
- Vellend, M. (2006). The consequences of genetic diversity in competitive communities. *Ecology*, 87(2), 304–311.
- Waleckx, E., Gourbière, S., & Dumonteil, E. (2015). Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 324–338.

<https://doi.org/10.1590/0074-02760140409>

WHO. (2018). Chagas disease (American trypanosomiasis). Retrieved from [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

Zeledón, R., & Rojas, J. C. (2006). Environmental management for the control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), (Hemiptera: Reduviidae) in Costa Rica: A pilot project. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4), 379–386.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000400006>

13. Anexos

Anexo 1. Detalle de muestras utilizadas, según la disponibilidad en la base de datos del LENAP

Código	Fecha de Colecta	Aldea, Municipio	Departamento	País	Latitud	Longitud	Material Utilizado
TPG324	31/08/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG1017	17/10/2013	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Patas+Adomen
TPG198	24/08/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG1239	25/11/2013	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TP891	22/01/2012	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Patas+Adomen
TP892	22/01/2012	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Patas+Adomen
TP896	20/01/2012	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Patas+Adomen
TP1247	27/05/2013	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Patas+Adomen
TPG154	6/09/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG487	5/09/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG488	5/09/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG489	5/09/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG511	5/09/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG715	6/09/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG761	27/09/2011	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Abdomen
TPG1217	14/11/2013	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Patas+Adomen
TPG1218	14/11/2013	Olopa	Chiquimula	Guatemala	14.691111	-89.349722	Patas+Adomen
A10083	25/03/2014	Barrio La Unión, La Democracia	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Patas+Adomen
A10056	4/01/2014	Barrio Nueva Providencia, La Democracia	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Abdomen
A10067	25/03/2014	Buenos Aires, Santa Ana Huista	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Patas+Adomen
A10307	4/02/2015	Caserío los Uvales, La Democracia	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Patas+Adomen
A10055	3/31/2014	Caserío Ojo de Agua, La Democracia	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Abdomen
A10308	28/03/2015	Chamuxú, La Democracia	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Patas+Adomen
A10071	4/02/2014	El Rosario	Huehuetenango	Guatemala	15.503333	-91.4975	Patas+Adomen
A10238	12/10/2014	Exchima, Aguacatán	Huehuetenango	Guatemala	15.340278	-91.311667	Patas+Adomen
A10226	1/09/2014	Exchimal, Aguacatán	Huehuetenango	Guatemala	15.340278	-91.311667	Patas+Adomen
A10235	12/10/2014	Exchimal, Aguacatán	Huehuetenango	Guatemala	15.340278	-91.311667	Patas+Adomen
A10247	12/10/2014	Exchimal, Aguacatán	Huehuetenango	Guatemala	15.340278	-91.311667	Patas+Adomen

A10248	12/10/2014	Exchimal, Aguacatán	Huehuetenango	Guatemala	15.340278	-91.311667	Patas+Adomen
A10249	12/10/2014	Exchimal, Aguacatán	Huehuetenango	Guatemala	15.340278	-91.311667	Patas+Adomen
A10250	12/10/2014	Exchimal, Aguacatán	Huehuetenango	Guatemala	15.340278	-91.311667	Patas+Adomen
A10054	4/03/2014	La Mesilla, La Democracia	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Abdomen
A10305	3/10/2015	Los Chucles, La Democracia	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Patas+Adomen
A10304	3/06/2015	Los Tavayes, La Democracia	Huehuetenango	Guatemala	15.610556	-91.923056	Patas+Adomen
A10229	28/07/2014	Patzalán, Aguacatan	Huehuetenango	Guatemala	15.340278	-91.311667	Patas+Adomen
A10309	13/03/2015	Sabener, Cuilco	Huehuetenango	Guatemala	15.401667	-91.938056	Patas+Adomen
A10310	13/03/2015	Sabener, Cuilco	Huehuetenango	Guatemala	15.401667	-91.938056	Patas+Adomen
CHJ801	6/01/2014	El Carrizal, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.375	-89.986389	Patas+Adomen
CHJ795	6/01/2014	El Carrizal, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.375	-89.986389	Patas+Thorax
CHJ952	29/04/2015	El Carrizal, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.375	-89.986389	Patas+Thorax
CHJ802	6/01/2014	El Carrizal, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.375	-89.986389	Patas+Adomen
CHJ803	6/01/2014	El Carrizal, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.375	-89.986389	Patas+Adomen
CHJ804	6/01/2014	El Carrizal, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.375	-89.986389	Patas+Adomen
CHJ082	1/10/2012	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ087	1/10/2012	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ187	1/10/2012	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ663	16/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ667	16/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ683	16/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ695	16/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ699	16/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ704	16/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ708	16/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ592	15/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	<u>-89.950278</u>	<u>Patas+Thorax</u>
CHJ593	15/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
CHJ594	15/07/2013	El Chaperno, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.351389	-89.950278	Patas+Thorax
A9944	8/05/2013	Llano Santa María, Jutiapa	Jutiapa	Guatemala	14.323889	-89.955278	Abdomen
A8256	2/10/2010	Carrón, Pachalún	Quiché	Guatemala	14.924722	-90.664167	Patas+Adomen

A8974	10/02/2010	Pachalún, Cimarrón	Quiché	Guatemala	14.924722	-90.664167	Patas+Adomen
A292	11/06/1998	Sacapulas	Quiché	Guatemala	15.285	-91.091111	Patas
A8981	5/10/2010	San Bartolomé, Jocotenango	Quiché	Guatemala	15.191944	-91.078889	Patas+Adomen
A8260	17/02/2010	Tuxtuenep, Canilla	Quiché	Guatemala	15.175	-90.858333	Patas+Adomen
TPS0053	Sin Fecha	Chilguyo, Texistepeque	Santa Ana	El Salvador	14.129444	-89.504444	Abdomen
TPS0068	Sin Fecha	Chilguyo, Texistepeque	Santa Ana	El Salvador	14.129444	-89.504444	Abdomen
S238	28/11/2009	Chilguyo, Texistepeque	Santa Ana	El Salvador	14.129444	-89.504444	Patas+Adomen
TPS0215	Sin Fecha	El Jute	Santa Ana	El Salvador	14.120278	-89.64	Abdomen
TPS0225	Sin Fecha	El Jute	Santa Ana	El Salvador	14.120278	-89.64	Abdomen
TPS0330	Sin Fecha	El Jute	Santa Ana	El Salvador	14.120278	-89.64	Abdomen
TPS0400	Sin Fecha	El Jute	Santa Ana	El Salvador	14.120278	-89.64	Abdomen
TPS0180	Sin Fecha	El Jute	Santa Ana	El Salvador	14.120278	-89.64	Abdomen
S476	1/09/2009	El Zacatal, Santa Ana	Santa Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Patas+Adomen
S478	1/09/2009	El Zacatal, Santa Ana	Santa Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Patas+Adomen
S487	1/09/2009	El Zacatal, Santa Ana	Santa Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Patas+Adomen
S507a	1/09/2009	El Zacatal, Santa Ana	Santa Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Patas+Adomen
S507b	1/09/2009	El Zacatal, Santa Ana	Santa Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Patas+Adomen
TEX0023		Santa Ana	Santa Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Patas
TEX0010		Santa Ana	Santa Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Patas
S649	1/09/2009	Santa Ana	Santa Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Patas+Adomen
S333	20/11/2009	Santa Ana	Santa_Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Abdomen
S336	20/11/2009	Santa Ana	Santa_Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Abdomen
S234	25/11/2009	Chilguyo, Texistepeque	Santa_Ana	El Salvador	14.129444	-89.504444	Patas+Adomen
S236	26/11/2009	Chilguyo, Texistepeque	Santa_Ana	El Salvador	14.129444	-89.504444	Patas+Adomen
S239	27/11/2009	Chilguyo, Texistepeque	Santa_Ana	El Salvador	14.129444	-89.504444	<u>Patas+Adomen</u>
S486	1/09/2009	El Zacatal, Santa Ana	Santa_Ana	El Salvador	13.979444	-89.551389	Abdomen

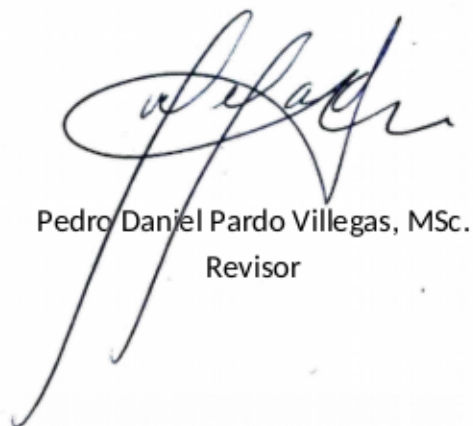
S354	11/05/2009	Cantón Las Flores Cerro Alto, Municipio Caluco	Sonsonate	El Salvador	13.726111	-89.657778	Abdomen
S358	11/05/2009	Cantón Las Flores Cerro Alto, Municipio Caluco	Sonsonate	El Salvador	13.726111	-89.657778	Abdomen
S359	1/09/2009	Cantón Las Flores Cerro Alto, Municipio Caluco	Sonsonate	El Salvador	13.726111	-89.657778	Abdomen
S443	1/09/2009	El Aguacate, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen
S445	1/09/2009	El Aguacate, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen
S446	1/09/2009	El Aguacate, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen
S447	1/09/2009	El Aguacate, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen
S448	1/09/2009	El Aguacate, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen
S451	1/09/2009	El Aguacate, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen
S453	1/09/2009	El Aguacate, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen
S455	1/09/2009	El Aguacate, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen
S388	1/09/2009	San Raymundo, Armenia	Sonsonate	El Salvador	13.740278	-89.478333	Abdomen



Daniel Penados Richter
Autor



Sergio Alejandro Melgar Valladares, PhD.
Asesor



Pedro Daniel Pardo Villegas, MSc.
Revisor



Sergio Alejandro Melgar Valladares, PhD.
Director



Pablo Ernesto Oliva Soto, PhD.
Decano