



Mejor Tesis: Escuela de Biología
Mejor Tesis Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
Período 2002-2003.

DOI: <https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v17i1.219>

Licencia: CC-BY 4.0

**“VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Triatoma dimidiata* (LATREILLE 1811)
EN TRES POBLACIONES SILVESTRES DEL ATLÁNTICO Y TRES POBLACIONES DOMESTICAS DEL
PACÍFICO DE GUATEMALA, UTILIZANDO LA TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN ALEATORIA DE ADN
POLIMÓRFICO (RAPD)”**

¹Calderón, C.I., ²Monroy, M.C.

Genetic variability of *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811) in three wild populations of the Atlantic and three domestic populations of the Pacific of Guatemala, using the technique of random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

I. RESUMEN

Se compararon seis poblaciones de *Triatoma dimidiata*, utilizando la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) como marcador genético, para determinar la variabilidad genética entre y dentro de esas poblaciones. La chinche picuda, como se le conoce comúnmente a esta especie, tiene una gran importancia epidemiológica en América Latina y especialmente en la región centroamericana, por ser el principal vector de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas.

Para llevar a cabo este estudio, se seleccionaron seis sitios de muestreo en la República de Guatemala. Tres de ellos se localizaron en la vertiente Atlántica y los tres restantes en la vertiente Pacífica, correspondiendo a hábitat silvestre y doméstico respectivamente. Los sitios de muestreo en la vertiente Atlántica fueron: Alta Verapaz (Lachuá y Lanquín), El Petén (Sitio Arqueológico Yaxhá); y en la vertiente Pacífica: Escuintla (Puerto de San José), Santa Rosa (Santa María Ixwatán, Aguazarca) y Jutiapa (El Carrizal).

En estudios preliminares, se evaluaron 11 iniciadores de PCR. Cuatro de ellos, (H3, L1, L4 y L5 de la casa Operon), generaron bandas fuertes y reproducibles. Estos iniciadores o primers, fueron utilizados para amplificar el ADN de *T. dimidiata* en el presente estudio. Un total de 35 bandas polimórficas (loci) con frecuencias intermedias ($0.1 < p < 0.6$), fueron generadas con los cuatro pares de iniciadores, con un promedio de 8.75 bandas por iniciador.

Los resultados obtenidos muestran distancias genéticas (D'_N) que oscilan entre 0.040 y 0.254 entre las poblaciones *T. dimidiata* estudiadas. Asimismo, los índices de fijación (F_{st}) calculados, 0.246 (con Lanquín) y 0.171 (sin Lanquín), sugieren una subestructuración de las poblaciones. Éstas se encuentran diferenciadas entre sí, pero pertenecen aún a una misma especie. El quitar a Lanquín del análisis permitió poner en evidencia su carácter aislado y endogámico, constituyéndose en una población de poco interés para el control. Estos resultados reflejan la presencia de un flujo genético entre las poblaciones (excepto probablemente con la de Lanquín), que evita la fijación de alguno

de los alelos y el aislamiento reproductivo de las mismas. Esto último indica que se debe prestar una atención especial al control de la enfermedad, porque la presencia de flujo implica la incapacidad en la erradicación de la especie. Se debe dar una amplia cobertura al programa de erradicación del vector en las regiones donde las poblaciones se encuentran levemente diferenciadas genéticamente, es decir entre las cuales existe posiblemente un flujo migratorio, para evitar las reinfestaciones de las viviendas, a partir eventualmente de focos silvestres no tratados.

2. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, es una parasitosis incurable, a menudo mortal, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* que se transmite al ser humano por unos insectos hematófagos, los triatominos, y cuyo control se ha vuelto un reto para las autoridades de salud.

La ausencia de medidas que controlan la adaptación del vector a los hábitat domésticos le permitió ampliar su distribución geográfica, lo que conllevó a grandes consecuencias a nivel epidemiológico y económico.

Por las razones anteriores, los esfuerzos se están encaminando hacia el control de la enfermedad de Chagas por la eliminación física del vector. Ello ha impulsado el estudio de la biología y la genética de poblaciones de los triatominos, así como la caracterización de las cepas del parásito *T. cruzi*. Con la información generada por estos estudios, se están determinando y definiendo las fases operativas de erradicación del vector.

En nuestro país, el principal vector del parásito es *T. dimidiata*, se distribuye en 21 de los 22 departamentos y se conoce comúnmente como chinche picuda, taje o telepate. Se estima además que 8% de los guatemaltecos, en su mayoría de población rural con bajos ingresos, se encuentran actualmente infectados por el parásito.

Con el fin de aportar soluciones viables y eficaces al control de los vectores, es decir, a la enfermedad, se han venido realizando una serie de investigaciones, que se enmarcan dentro de los objetivos del laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), buscando comprender la biología del

1. Bióloga, autora.
2. Ph.D., Bióloga, asesora.

vector, su distribución, su variabilidad, sus adaptaciones al entorno humano y la estructura de sus poblaciones. Dentro de este contexto se incluye el presente estudio, que compara tres poblaciones domésticas y tres poblaciones silvestres de *Triatoma dimidiata* mediante la técnica de amplificación aleatoria del ADN polimórfico con el fin de llenar el vacío de información genética relacionada con las migraciones de dicha especie utilizando un análisis de la estructura genética de las poblaciones.

3. ANTECEDENTES

3.1 Planteamiento del problema

La enfermedad de Chagas, es la cuarta causa de mortalidad en América Latina (1). La prevalencia de la infección en el ser humano se asocia con el grado de adaptación de los vectores a la vivienda humana (2). En el ámbito nacional y latinoamericano se han realizado desde principios del siglo XX una serie de estudios sobre la biología del vector y su relación con el ser humano, con el fin de implementar campañas de control de las distintas especies de vectores y entender el proceso de domesticación, impidiendo que otras especies se conviertan en vectores. Las poblaciones domésticas en su mayoría han sido controladas satisfactoriamente sin embargo algunas especies con hábitos silvestres y peridomésticos reinvasen la vivienda después del rociamiento con insecticidas. Para Guatemala se ha comprobado que *Triatoma dimidiata*, reinfesta la vivienda después del rociamiento (3). Es por ello necesario estudiar los patrones de dispersión basados en las relaciones genéticas de esas poblaciones y poder orientar las estrategias de control.

Algunas de éstas se han limitado al rociamiento de casas infestadas, las cuales resultan poco exitosas, puesto que aproximadamente seis meses después de la aplicación del insecticida, se vuelve a encontrar el vector en las viviendas. Preguntas sobre el origen de las nuevas poblaciones surgen y no pueden ser resueltas sin la utilización de marcadores adecuados para ello. Se han puesto en marcha intensos programas cuyo fin es eliminar la transmisión de *T. cruzi*, (Ver figura 1).

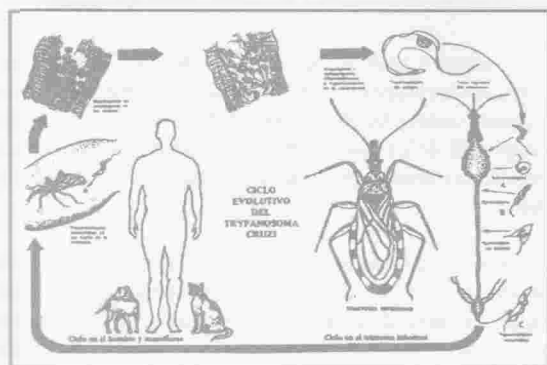


Fig. 1 Ciclo de vida de *T. cruzi* (tomado de Ayau 1999)

En 1991 dio inicio la Iniciativa del Cono Sur, su objetivo: eliminar todas las poblaciones domésticas de *T. infestans* en los siguientes países: Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Chile y Bolivia. Seis años más tarde se establece la Iniciativa del Pacto Andino (Colombia, Venezuela, Ecuador y parte del Perú) y la Iniciativa Centroamericana (4).

Se señala que para la implementación de programas de control de vectores, deben tomarse en cuenta los siguientes factores:

- la distribución geográfica de los vectores
- la densidad de las poblaciones domiciliadas y peridomiciliadas
- la producción de tripomastigotes metacíclicos infectantes
- la frecuencia de invasión de las especies
- la preferencia en la ingesta de sangre
- la frecuencia de toma de alimentos
- la susceptibilidad a la infección.

La transmisión de la enfermedad es interrumpida por el rociamiento de las casas con insecticidas residuales (como los compuestos peritroides) y por el monitoreo de las donaciones de sangre.

Sin embargo se debe asegurar una adecuada vigilancia entomológica para detectar rápidamente las eventuales reinfestaciones de los lugares previamente rociados con vectores silvestres de la misma especie, o con lo que se ha denominado como fenómeno de “vacío ecológico”, establecido por la eliminación del vector primario o por cambios climáticos y la subsiguiente re-invasión por vectores secundarios (1).

Otras campañas, por consiguiente, se han apoyado en nuevas alternativas científicas para hacer efectivo el control de dicha enfermedad (PCR, microsatélites, ITS...). Entre éstas se encuentran las técnicas moleculares, que analizan la estructura genética y los movimientos efectuados por los organismos bajo estudio, aportando información complementaria a otras técnicas, para resolver algunos de los problemas de control existentes.

3.2 Generalidades sobre la enfermedad de Chagas

Después de numerosas investigaciones serológicas y clínicas, llevadas a cabo en toda Latinoamérica, se han obtenido datos en los que aproximadamente 70% de los individuos positivos para la enfermedad de Chagas son asintomáticos, en 21% de las personas infectadas se desarrolla una cardiopatía crónica, en 6% lesiones digestivas y en 3% desórdenes neurológicos. En estos datos no se mencionan los casos que llegan hasta la muerte (5). La infección, puede ser mortal, y a menudo conduce a lesiones muy debilitantes de los órganos vitales, especialmente el corazón y el tracto intestinal. La infección es incurable, salvo durante las primeras fases y ya que no hay vacunas, el control depende mucho

de la eliminación de las poblaciones domésticas de los insectos vectores (6). Sin embargo, a pesar de su gran importancia epidemiológica, el conocimiento de la dinámica de sus poblaciones es aún limitado.

La enfermedad de Chagas constituye por lo tanto un serio problema de salud en el ámbito latinoamericano (7) porque su control depende de la erradicación de los vectores y de la educación sanitaria. Se debe tomar en cuenta por un lado, que existen distintas especies que transmiten el parásito, distribuidas ampliamente en toda Latinoamérica, capaces de ocupar distintos ambientes, y por el otro, que la educación sanitaria en las poblaciones rurales es escasa o inexistente. Dicha enfermedad es causada por un protozoo flagelado, *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Ver figura 1) y transmitida en Guatemala, por tres especies de chinches, entre las cuales la más importante por su amplia distribución y dificultad de control es *Triatoma dimidiata*. A esta enfermedad se le atribuye una alta tasa de morbilidad en distintas comunidades rurales de Guatemala (8).

Se estima que unas 330,000 personas viven en áreas de alto riesgo (3), que aproximadamente 39% de las chinches son positivas para *T. cruzi* (9) y como señalaba Zeledón (10), la presencia de esta chinche es un indicador de condiciones socioeconómicas bajas.

3.3. *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811)

Ubicación taxonómica

CLASE	Insecta
ORDEN	Hemiptera
SUBORDEN	Gynocerata
FAMILIA	Reduviidae
SUBFAMILIA	Triatominae
TRIBU	Triatomini
GRUPO	Rubrofasciata
SUBGRUPO	Rubrofasciata
COMPLEJO	Phyllosoma (11 y 12)

Los vectores de la enfermedad de Chagas pertenecen a la subfamilia Triatominae, que incluye 129 especies de insectos hematófagos, divididos en 5 tribus y 15 géneros. El género más numeroso es *Triatoma* con 70 especies (13). *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) es el principal vector de la enfermedad de Chagas en Guatemala, y es uno de los más importantes en México y el resto de Centro América. Puede asimismo estar involucrado en la transmisión de la enfermedad en algunas regiones de Colombia y Venezuela (6, 14, 15). Varios autores han agrupado a esta especie dentro del complejo de especies Phyllosoma (11, 16, 17), el cual incluye a las especies cuyo centro de origen se ha sugerido es el norte del continente americano (18).

Sin embargo, Carcavallo y colaboradores en 1999

presentaron recientemente la hipótesis (basado en estudios de caracteres plesiomórficos) que esta especie constituye un complejo distinto (junto con *T. hegneri*, *T. gomeznunezi* y *T. brailovskyi*) de origen Sudamericano. Los autores concluyen que estas cuatro especies originadas por ancestros que habitaban en Venezuela o Colombia, se fueron extendiendo hacia el subeste (Colombia-Ecuador-Perú), sudoeste (Venezuela-Guyana) y hacia el norte a través del istmo de Panamá (Colombia-Centro América-México), dando origen a *T. hegneri*, *T. gomeznunezi* y *T. brailovskyi* y a las distintas variantes morfológicas y/o cromáticas del *T. dimidiata* mesoamericano. Variaciones importantes en la coloración y en el comportamiento han sido observados en diferentes áreas geográficas (Whitlaw & Chaniotis 1978, Lent & Wygodzinsky 1979, Zeledón 1981, Schofield 2000) (18). La clasificación de *T. dimidiata*, reconoce varias divisiones subespecíficas, como las formas oscuras del norte denominadas *T.d. maculipennis*, las formas intermedias de Centroamérica *T.d. dimidiata*, y las formas del sur *T.d. capitata*. Lent y Wygodzinsky (14) consideraron estas tres formas sinónimas (19).

Actualmente no se han esclarecido los problemas taxonómicos. Quedan sin resolverse las teorías sobre el origen mono o polifilético de *T. dimidiata*, así como la relación entre las distintas especies anteriormente clasificadas dentro del complejo Phyllosoma (com. pers. Panzera 2002).

3.4 Biología

T. dimidiata es un insecto cuya duración de su ciclo es de un año y medio en condiciones de laboratorio. Este es mayor en condiciones naturales y puede aún reducirse variando la temperatura de incubación y la humedad relativa (20).

Después de una etapa de huevo de 25 a 30 días, pasan por 5 estadios ninfales antes de llegar a la etapa adulta. Todas las fases son hematófagas obligadas (21). (Ver figura 2).

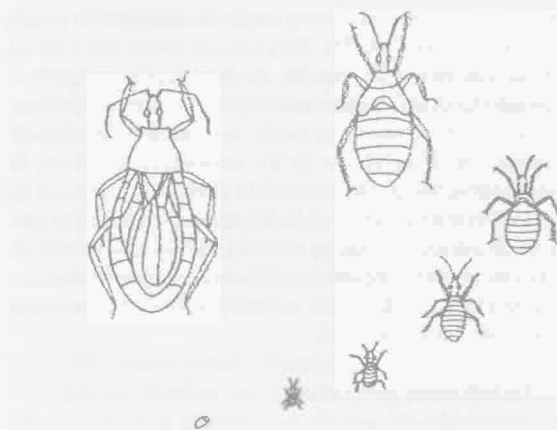


Fig. 2 Ciclo de vida de *Triatoma dimidiata*

Es decir que el paso de un estadio ninfal al siguiente se da únicamente luego de una ingestión de sangre, creándose así una estrecha relación entre el insecto y sus hospederos. *Triatoma dimidiata* se caracteriza por tener un bajo grado de especificidad hacia sus fuentes alimenticias, como lo comprueban varios estudios de Zeledón y colaboradores, en los que se ha puesto en evidencia la diversidad de sus fuentes alimenticias, entre las que se puede mencionar: conejo, armadillo (*Dasyus* sp.), tacuazín (*Didelphys marsupialis*), pizote, murciélago, ratas, ratones, perro, gato, gallina, ser humano... (10, 22). La competencia por comida estimula el vuelo de los adultos, en busca de nuevos hábitats. Atraídos por la luz, se han alejado de los ambientes silvestres, acercándose a los seres humanos, a sus animales domésticos y logrando adaptarse muy bien a ellos (10).

El ambiente artificial doméstico es muy estable, lo cual ofrece numerosos refugios (establos, gallineros, camas, cúmulos de piedra o leña, paredes, techos, suelo de casas) y comida abundante durante todo el año, sin necesidad de desplazamientos. *T. dimidiata*, es un insecto tímido que prefiere alimentarse de animales que se encuentran durmiendo y puesto que su mordida no es dolorosa, esto lo convierte en un vector exitoso. También han sido introducidos a ambientes antropogénicos de forma pasiva (trasladados conjuntamente con la leña a áreas peridomiciliares) (21, 23).

3.5 Morfología

Triatoma dimidiata como insecto perteneciente a la familia Reduviidae, cuyos miembros se caracterizan por presentar cabeza elongada, región postocular en forma de cuello, probóscide corta y trisegmentada. Los reduviidos pueden presentar hábitos depredadores (se alimentan de otros insectos) ó hematófagos (se alimentan de sangre de vertebrados) (24). Morfológicamente es un insecto bastante grande (el macho mide entre 24.5 a 32.0 mm de largo, y la hembra de 24.5 a 35.0 mm), de colorido distintivo (desde píceo a negro, con conexivo y corium desde amarillo pálido hasta amarillo naranja) (14, 25). Esta especie posee una extensa variación morfológica a lo largo de su distribución geográfica: varía el tamaño total, las medidas relativas de la cabeza y los ojos, el tamaño de la mancha oscura en medio del corium, y el grado de oscurecimiento de la membrana de los *hemelitra* (25). Sobre la base de la información que se tiene sobre *T. dimidiata*, a pesar de ser una especie con una alta variabilidad en sus proporciones corporales y en su coloración, aún no se ha segregado en poblaciones alopatricas claramente definidas: las diferencias observables son de naturaleza clinal, es decir que su tamaño total se incrementa gradualmente de norte a sur (14).

3.6 Distribución geográfica

El grupo de los reduviidos, básicamente tropical y subtropical, se encuentra restringido al hemisferio oeste y a la región

oriental, está completamente ausente en las regiones Paleárticas y Etiopes aunque sí entra parcialmente en la región Australiana. El centro de diversidad de la subfamilia Triatominae es Sudamérica tropical y subtropical. Los representantes de la Tribu Triomini se distribuyen a lo largo del ámbito de la subfamilia: es un grupo del nuevo mundo pero se encuentran asimismo en la región oriental. El género *Triatoma* es el que más especies incluye y cuya distribución es la más amplia, desde los Estados Unidos hasta la Patagonia (14). (Ver figura 3). Más precisamente, *T. dimidiata* se distribuye desde México hasta la región norte de Sudamérica (Colombia, Venezuela, Ecuador y norte del Perú) pasando por Centroamérica (12, 26). (Ver figura 3). Su distribución es discontinua, interrumpida en la región costera del Pacífico colombiano, en donde la cordillera Andina podría estar actuando como barrera ecológica (18). En la región Mesoamericana existen numerosas variantes morfológicas y cromáticas de este individuo.



Figura 3. Distribución de 6 especies del género *Triatoma*. En punteado (Centro América y norte de Sur América) se encuentra la distribución de *T. dimidiata* (27).

Dentro de los hábitat naturales, se encuentran en cuevas de mamíferos tales como zarigüeyas, murciélagos, armadillos y otros, así como en montículos de piedra, de adobe, ruinas antiguas, en la corteza y tronco de árboles viejos y secos, en la base de hojas de palmeras y de algunas epifitas (26). En el ámbito nacional, *T. dimidiata* es el principal vector de la enfermedad de Chagas, se encuentra en 21 de los 22 departamentos del país. Hasta 1995, se había señalado la presencia de este vector en 18 de los 22 departamentos del país (3, 26, 28), pero en 1999, a raíz de las búsquedas hechas por el Ministerio de Salud, se determinó que únicamente en Totonicapán no es posible encontrar *T. dimidiata* (com. pers. Abraham Juárez, Ministerio de Salud, 2002). *T. dimidiata* se localizan no solamente en ambientes domésticos sino

también en selváticos (bosques, cuevas, nidos de animales silvestres) y peridomiciliares (gallineros, cúmulos de leña) (3). Ver figura 4.



Figura 4. Departamentos en riesgo de infección de la enfermedad de Chagas en Guatemala en base al porcentaje de personas con riesgo de infección (3).

En Guatemala parece tener predilección por ambientes secos en los departamentos orientales del país, pero también se le encuentra en zonas húmedas. Es raro en regiones cálidas y prefiere climas templados (23-25°C) desde 200-300 hasta unos 1800 metros. En Colombia se ha encontrado en altitudes hasta de 2700 metros, sin embargo prefiere las altitudes que oscilan entre 801 y 1000 metros (93, 26, 28).

3.7 Hábitat

Según se ha reportado, *T. dimidiata* es una especie que puede ocupar ambientes silvestres (biotopos naturales), domésticos (vivienda humana) y peridomésticos (ambientes que rodean el domicilio).

• Biotopos Naturales

Habita cuevas de tacuazín (*Didelphis* sp.) y otros animales, montículos de piedra y adobe en ruinas, cuevas de murciélagos, árboles huecos que sirven de albergue a otros animales, en brácteas de palmeras, por citar algunos ejemplos (26). En Guatemala, *Triatoma dimidiata* se ha encontrado en cuevas, palmeras y vestigios de los Mayas (en El Petén); en cúmulos de piedra y bosques (en Izabal), en cuevas (Alta Verapaz) (22).

• Relación con el domicilio humano

Paulatinamente, *T. dimidiata* se fue adaptando a los ambientes antropogénicos a lo largo de su ámbito de distribución,

pudiendo colonizar casas tanto en el área rural como urbana y logrando un gran éxito en su relación con el humano (18, 29).

T. dimidiata es capaz de colonizar viviendas humanas, especialmente aquellas construidas con adobe, caña, bajareque, techo de palma, donde se resguarda dentro de las grietas, pero también en los pisos de tierra donde se camuflaje. Las colonias domésticas tienden a ser relativamente pequeñas (6, 26, 28).

Se cree que el transporte pasivo de leña desde el campo hacia el interior de las viviendas es un medio importante en la entrada de *T. dimidiata* al ambiente humano, así como también la atracción por la luz artificial; esta especie se caracteriza por su gran capacidad de vuelo (28).

Dentro de las casas tiene preferencia por las camas de tablas o varillas, petates, bajo los colchones, cajones, tientos acumulados bajo las camas o rincones del cuarto, detrás de los cuadros o papeles colgados en las paredes y entre la leña (26).

Las condiciones de las viviendas rurales en Guatemala son propicias para la colonización por triatominos: 85% de las casas mantienen animales domésticos adentro, 77% tienen cocinas de leña adentro, la mayoría de camas se localizan en esquinas oscuras y sin ventanas, un 60% de las casas en áreas rurales están construidas con paredes de lodo (adobe) (3, 30). De un total de 2,749 casas encuestadas en Guatemala en el período de 1995 a 1997, 6.5% fueron positivas para los vectores de la enfermedad de Chagas, y de 1,131 insectos colectados, 64.65 fueron *Triatoma dimidiata*, 30.7% *Rhodnius prolixus* y 4.7% *Triatoma nitida*.

Existe una mayor proporción de chinches en el Este, por ejemplo los departamentos con mayor índice de infestación son: Jutiapa, seguida de Alta Verapaz, Chiquimula, Santa Rosa y el Quiché (3).

• Peridomicilio

T. dimidiata también coloniza los ambientes que rodean al domicilio (peridomicilio) tales como establos, gallineros, perreras y cochiqueras (26).

Las poblaciones de insectos que se encuentran dentro de la casa así como en su periferia, sugieren un desplazamiento constante de los insectos hacia adentro o hacia fuera del domicilio (26) complicando la erradicación mediante rociamientos intradomiciliares únicamente.

El interés portado últimamente en la determinación del origen de las chinches que invaden las viviendas, se debe al deseo de esclarecer la procedencia de las chinches reinfestantes y controlar la enfermedad de Chagas. Se ha visto el fenómeno de reinfestación de las viviendas tratadas con insecticida a partir de las

fuentes selváticas o peridomésticas antes mencionadas, pocos meses después del rociamiento. Sin embargo la pregunta ¿De dónde provienen las reinfestaciones? no ha sido hasta ahora respondida. ¿Será que provienen de fuentes silvestres o bien de fuentes más cercanas como del peridomicilio, o incluso de insectos que sobrevivieron a la fumigación? Un estudio de la genética de poblaciones antes y después de los rociamientos puede dar la respuesta.

3.8 Marcadores Fenéticos y Genéticos.

3.8.1 Morfometría

La morfometría es una rama de la biometría que agrupa un conjunto de métodos para la descripción cuantitativa, análisis e interpretación de la forma biológica y de su variación (31).

La comparación de las formas se utilizó en un principio básicamente en estudios taxonómicos, en los que se clasificaban las especies en base a su apariencia fenotípica. Posteriormente, la morfometría se fue aplicando en estudios de variación morfológica, en donde se desean analizar los efectos ambientales en los organismos, los cambios a lo largo del desarrollo de un organismo los procesos de adaptación (12).

El primer paso en un estudio morfométrico es representar la forma biológica de interés por medio de cantidades matemáticas que son asignadas en base a localizaciones geométricas. La forma de un espécimen pasa a ser representada por un punto ubicado en un espacio multivariado, cuyos ejes son los conjuntos de distancias o coordenadas (31).

Los métodos estadísticos multivariados representan el medio más común de análisis de los conjuntos de variables representando formas biológicas. La aplicación de dichos métodos se denomina Morfometría Tradicional o Multivariada. Sin embargo existen métodos que toman en cuenta la relaciones geométricas de las variables. Su aplicación se denomina Morfometría Geométrica (31).

Distintas caracterizaciones morfométricas han sido utilizadas para detectar diferenciación geográfica de los triatominos, para representar relaciones filogenéticas entre especies, medir la variación métrica asociada a algún proceso (12).

Aplicados a *Triatominae*, comparaciones morfométricas entre poblaciones silvestres y domésticas de *Panstrongylus*, mostraron que el dimorfismo sexual era más marcado en los especímenes silvestres que en los domésticos. Las dimensiones de la cabeza, indican una reducción general de tamaño de los insectos domésticos.

Otros estudios con *T. infestans*, *R. prolixus* y *R. domesticus* (32) han asimismo demostrado una reducción en cuanto al

dimorfismo sexual de triatominos asociados con la transición de habitat natural a artificial. Se ha propuesto a la morfometría como un marcador de las especies de triatominos que se están adaptando a ecotopos domésticos (33).

3.8.2 Isoenzimas

La electroforesis de isoenzimas permite detectar especies biológicas inseparables morfológicamente -especies gemelas o isomorfas-, estimar las relaciones filogenéticas entre especies o de apreciar los flujos génicos entre poblaciones locales de una misma especie. Comparada a los métodos que utilizan directamente el ADN, presenta la ventaja del reducido costo, de la gran cantidad de genes que pueden estudiarse al mismo tiempo y de la simplicidad de la interpretación (12). Desde hace más de dos décadas, la electroforesis de isoenzimas ha sido la técnica estándar para analizar la variación geográfica y la estructura de las poblaciones. Dujardin, Schofield y Panzera (12) estiman que esta técnica no tiene todavía rival, debido a su capacidad para generar datos para múltiples loci y muestras numerosas, de manera rápida y con costos reducidos. Su desventaja teórica es sin embargo el ser una técnica indirecta de lectura del ADN. Recordemos que la variación isoenzimática es un indicador de la variación nucleotídica, pero dos isoenzimas con la misma tasa de migración es el gel pueden ser producto de distintos alelos (34).

La electroforesis de isoenzimas ha sido aplicada para comparar poblaciones geográficas al interior de una especie (Dujardin & Tibareyrenc 1985, Frias & Kattan 1989, Dujardin et al 1987, 1988, 1990, 1998; Harry et al 1992; Lopez & Moreno 1995, García et al 1995; Breniere 1998; Noireau 1999) (12).

3.8.3 Patrones de sensillas

Otro marcador morfológico utilizado como método de apoyo para diferenciar poblaciones de triatominos ha sido el estudio de patrones sensoriales, como el análisis de antenas. Éste establece el "patrón desensilla", constituido por el número, tipo y distribución de receptores. En dicho patrón está involucrada la herencia, como las necesidades particulares de cada especie. En el laboratorio de Referencia para patrones desensilla en triatominos (Red ECLAT), se presta especial atención a la variación de patrones de sensilla en función de la adaptación a los distintos hábitats y particularmente, en función de la domiciliación de los triatominos. Existen varios tipos de sensilla:

1º Grupo:

- Tricobotria: pelos largos y delgados, cara superior del pedicelo, función mecanoreceptora.
- Bristles: cerdas quimiorreceptoras y mecanoreceptoras.
- Campaniforme: propioreceptores, monitores de tensión cuticular, sensación direccional.

2º Grupo:

- Celoniconica: termohigroreceptores.

3º Grupo:

- Basiconica: poroso, responden a temperatura, humedad y ácidos.
- TPF: Tricoide de pared fina: poroso, olfatorios, responden a la respiración humana.
- TPG: Tricoide de pared gruesa: no porosos, probablemente solo responden a las feromonas.

4º Grupo:

- Poros y Organo cueva: termoreceptores. (15)

3.8.4 Perfiles de la composición proteína de la saliva

La utilización de los componentes proteínicos de la saliva por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida ha demostrado ser una herramienta más en la diferenciación de poblaciones. Por ejemplo Barbosa et. al (34) ha trabajado con el triatomino vector de la enfermedad de *Chagas Panstrongylus megistus*, en Brazil, encontrando diferencias en la composición salivar de tres poblaciones. Los datos obtenidos sugieren que en triatomos la composición salivar pudiera estar relacionada con el tipo de hospedero que la chinche encuentra (35).

3.8.5 Marcadores de ADN

Los avances de la biología molecular durante la década de los 80, han aportado una clase nueva de marcadores genéticos que permiten visualizar las diferencias tangibles en el ADN de los organismos. El problema para manipular las bases moleculares de la herencia era la necesidad de grandes cantidades de ADN, millones o miles de millones de copias (36).

Sin embargo este problema se vio resuelto por Kary Mullis, quien obtuvo por su trabajo el Premio Nobel en 1993. Su invención es el hoy ya ampliamente conocido proceso, "Reacción en Cadena de la Polimerasa" o PCR. Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN (36, 37).

Las secuencias iniciadoras pueden ser aleatorias, semialeatorias o específicas, según la metodología utilizada: **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA O Amplificación aleatoria del ADN polimórfico), **AP-PCR** (Arbitrarily Primed PCR o Reacción en cadena de la polimerasa iniciada aleatoriamente), **DAF** (DNA Amplification Fingerprinting o Amplificación de huellas genómicas de ADN), **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism o Amplificación de la longitud de los fragmentos de restricción polimórficos) (35).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento de síntesis y duplicación *in vitro* mediante el cual fragmentos de ADN mayores de 15 kilobases de longitud pueden amplificarse alrededor de 10^8 veces. Se utilizan oligonucleótidos sintéticos de 10 a 30 bases de longitud complementarios a la secuencia nucleotídica de los dos extremos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. Cantidades en exceso de esos dos nucleótidos se mezclan con ADN genómico y se calientan para la desnaturalización de los duplos. Durante el subsiguiente decremento de la temperatura, los iniciadores podrán alinearse a las secuencias genómicas homólogas y extenderse por acción de la enzima ADN polimerasa. Es necesario para ello una forma termoestable de la polimerasa, porque el PCR involucra pasos de calentamiento que inactivarían a las formas termolábiles de la polimerasa (38). Esta secuencia de desnaturalización, alineamiento de iniciadores y extensión se repite 30 veces. Durante el segundo ciclo, el fragmento de ADN blanco reconocido por los dos iniciadores está presente entre los productos de reacción y sirve como molde para las siguientes reacciones. De este modo, los ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, resultan en un incremento exponencial (en cantidad) de copias de la secuencia blanco.

El uso de ADN polimerasas termoestables, provenientes de bacterias termófilas (ADN pol de *Thermus aquaticus*, ADN pol de Pfu, ADN pol VentTM) evitan la necesidad de adicionar nueva polimerasa en cada ciclo. Con 25 ciclos de amplificación aproximadamente se incrementa la cantidad de la secuencia blanco seleccionada y exponencial en un promedio de 10^6 veces. La última fase indeseable de un ciclo de amplificación puede ser la acumulación de productos extendidos de manera incompleta (36). (Ver figura 5).



Fig. 5 Mecanismo de PCR

La amplificación aleatoria del ADN polimórfico (**RAPD**) consiste en un incremento del número de copias de cualquier segmento de ADN que haya sido amplificado con la técnica de PCR usando un pequeño oligonucleótido iniciador de secuencia aleatoria (amplímero).

Este iniciador tiene las características de estar formado por 10 pares de bases, lo que aumenta la probabilidad de unión del mismo a la secuencia base, así como tiene además la característica de tener de 60-70% de las bases nitrogenadas complementarias C y G. Estos se pegan a distintos sitios en un genoma. La unión es reconocida por la enzima ADN polimerasa, que inicia el alargamiento del iniciador a partir de extremo 3'. El producto de la amplificación se acumulará en un gran número de copias (aprox. 10^6). Los fragmentos se separan por electroforesis en geles de agarosa y se visualizan por tinción con bromuro de etidio. (Ver figura 6) (39, 40).

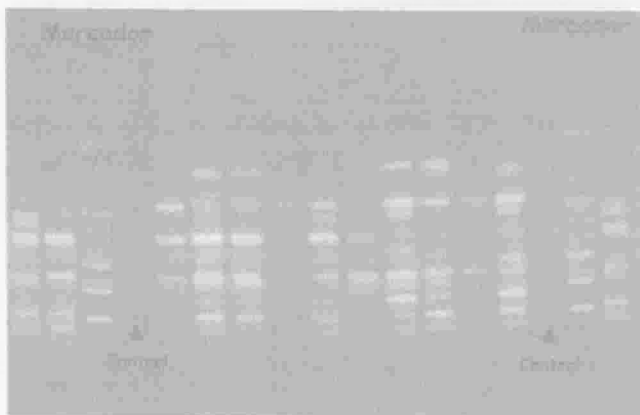


Figura 6. Gel de agarosa visto en transiluminador con patrones de RAPD de *T. dimidiata*, producidos con el primer L1.

Si los patrones de amplificación de dos organismos relacionados se comparan, ellos pueden exhibir polimorfismo en sus longitudes. Los polimorfismos detectados pueden usarse como marcadores genéticos para construir mapas genéticos (36, 41).

Por otro lado también se han desarrollado técnicas con ADN **microsatélite**, que consisten en secuencias muy cortas y repetitivas dentro del genoma (GTGTGTGT), generalmente situadas en las regiones no codificantes del genoma. El polimorfismo reside en el cambio del número de repeticiones y puede analizarse por PCR o con sondas específicas (12). Al respecto, se ha estado trabajando en la identificación y caracterización de microsatélites para *T. dimidiata*, basados en especímenes de México, Guatemala y Honduras. Se encontró que ocho primers o cebadores amplificaban

adecuadamente, mismos que podrán en un futuro ser utilizados para brindar respuestas más precisas a problemas de dispersión y reinfestación de viviendas con los vectores de la enfermedad de Chagas (42).

Los microsatélites son buenos marcadores porque son: codominantes, altamente multialélicos, con valores de heterocigocidad mayores a 0.7, abundantes (43).

Otro tipo de marcador molecular muy utilizado es el de **ADN extranuclear**, que comprende al **ADN mitocondrial** (ADNm) y al **ADN ribosomal** (ADNr). El ADNr contiene numerosas unidades de transcripción (de aproximadamente 13 kb), cada una separada de la siguiente por un espaciador no transcrito (de unos 30 kb) y denominadas **ITS** (Espaciador de transcripción interno, por sus siglas en inglés) (44). Usualmente los ITS presentan secuencias repetidas y en tandem o microsatélites, que son muy buenos marcadores moleculares para diferenciar poblaciones dentro de una misma especie, pero también han sido utilizados para resolver relaciones entre taxones de reciente divergencia (<50 millones de años) (45). Cabe mencionar en particular al segmento más variable del ADNr, el ITS-2 que presenta mayor diferencia entre las poblaciones geográficas de *T. dimidiata*, que entre las otras especies del complejo Phyllosoma (12). El estudio de Marcilla y colaboradores (45) indica que el ITS-2 es un buen marcador para determinar relaciones supraspecíficas, específicas y subespecíficas en Triatomíneos. Concluyen que *T. dimidiata* es una especie claramente diferenciada del complejo Phyllosoma. Incluye varias poblaciones que ya muestran divergencias evolutivas en las cuales el aislamiento geográfico pareciera ser el factor de mayor relevancia (45).

Por otro lado, el ADNm constituye otro marcador molecular para genética de poblaciones. Una característica es que es heredado en vía materna, en donde no hay recombinación entre distintos clones maternos, mismos que sirven para caracterizar poblaciones locales. La presencia de dichos clones en sitios alejados de su ámbito espacial sugiere la idea de dispersión y de flujo genético. Asimismo pueden servir para detectar efectos fundadores en una población (46).

Debido a esta sensibilidad, es posible trazar en mapas la distribución de la población y su estructuración (34).

3.8.6 Utilización de marcadores en estudios en genética de poblaciones.

Ejemplos de estudios taxonómicos pueden citarse, como el de Ana L. García y colaboradores (47), quienes compararon 3 pares de especies muy cercanas y morfológicamente similares, mediante la técnica de RAPD. En ese trabajo se examinó el potencial de los protocolos para RAPD's en estudios taxonómicos y epidemiológicos de poblaciones de insectos triatomíneos. Los perfiles de RAPD obtenidos permitieron diferenciar dichos pares

de especies, por lo que se puede señalar que separan caracteres especie-específicos. Asimismo detectaron poliformismos entre poblaciones domésticas y silvestres de *T. infestans*, y sugieren que puede la técnica estudiar migraciones e incluso establecer fuentes de reinfestación.

Asimismo, Panzera y colaboradores (13) utilizaron marcadores isoenzimáticos y cromosómicos para diferenciar tres especies del género *Triatoma* (*sordida*, *guasayana* y *patagonica*). Sin embargo, los análisis isoenzimáticos no lograron detectar ninguna evidencia de especiación entre poblaciones selváticas y domésticas de *T. infestans* (47).

Uno de los primeros marcadores utilizados para realizar estudios de genética de poblaciones fueron las **isoenzimas**. Mediante esta técnica, Noireau y colaboradores (49) estudiaron la estructura genética de *Triatoma sordida*. Se confirmó una variabilidad genética muy baja (tasa de poliformismo: 0.20). Las distancias genéticas entre las poblaciones de *T. sordida* se correlacionan con las distancias geográficas. Esto está estrechamente relacionado a su vez con el flujo genético entre las poblaciones y las estrategias de control y de vigilancia entomológica (49).

Por otro lado, existen numerosos estudios en los que se compara la variabilidad genética dentro y entre dos o más poblaciones, mediante distintas técnicas aplicadas simultáneamente. En este caso se puede citar el trabajo de investigación de Borges y colaboradores (50) en el que 3 poblaciones de *T. brasiliensis* del norte de Brasil fueron comparadas con isoenzimas, RAPD y morfometría. Los perfiles isoenzimáticos fueron idénticos para las tres poblaciones, sin embargo los patrones de RAPD y los análisis morfométricos fueron capaces de discriminar dichas poblaciones. Este estudio sugiere que la separación debida a distancias geográficas puede ser un factor influyente en la estructuración genética de las poblaciones de *T. brasiliensis* (lo cual ya ha sido comprobado con *T. infestans*). Esta estructuración puede derivar de una serie de eventos de domesticación a partir de distintas subpoblaciones silvestres (50). En otro estudio, realizado por Jaramillo y colaboradores, (50), se lograron diferenciar dos especies de Rhodnini (*Rhodnius prolixus* y *Rhodnius colombiensis*) mediante la técnica de RAPD. Sin embargo no se han logrado diferenciar demes o subpoblaciones de la misma especie, específicamente silvestres y domésticas de *T. dimidiata*, utilizando la técnica de RAPD.

En Guatemala, la Universidad de San Carlos de Guatemala, a través del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP), se ha dedicado a la investigación de los vectores de la enfermedad de Chagas, incluyendo entre las metodologías de análisis la de RAPD-PCR. En colaboración con la Universidad de Loyola, Nueva Orleans, ha publicado una serie de artículos en donde se hacen comparaciones entre distintas poblaciones de

chinchés (41). En el último trabajo de investigación realizado, se comparó la diversidad genética de especímenes de 3 pueblos vecinos en el departamento de Santa Rosa, se encontraron distancias genéticas muy pequeñas entre las casas muestreadas ($D = 0.013 - 0.022$) y entre los dos pueblos ($D = 0.0199$).

El **índice de Fijación**, F_{st} , también resultó muy bajo, 0.019 ± 0.033 , y el número de migrantes $N_m = 9.7$ y 12 , entre casas y entre pueblos respectivamente. Estos datos sugieren que las subpoblaciones en las casas y en los pueblos adyacentes no se encuentran reproductivamente aislados, sino que constituyen más bien una población panmictica (DORN 2002 com. pers. 9).

Otros estudios de este tipo se pueden encontrar en artículos de Anopheles, como el de Manguin et. al en 1999, donde mediante isoenzimas, RAPD, ITS y marcadores morfométricos analizaron la estructura de la población del vector malárico. Se encontraron diferencias genéticas entre los 124 individuos estudiados, provenientes de 13 poblaciones, lográndolos clasificar en dos grupos: *Anopheles darlingi* y *Anopheles nuneztovari*. Sin embargo, marcadores moleculares más precisos que el RAPD no han sido utilizados extensamente en triatominos, como ITS, **ADN mitocondrial o microsátélites**. Por ejemplo, no es sino hasta el año en curso (42) que se publicó un artículo acerca de una serie de primers o cebadores específicos para *T. dimidiata* basados en especímenes colectados en Guatemala, Honduras y México (42).

Por otro lado existe también la técnica de **mapeo citogenético**, que provee una forma de determinar la localización de los genes mediante el examen microscópico de los cromosomas. Estos pueden diferenciarse por su tamaño y la posición del centrómero. Posteriormente se tratan las preparaciones cromosómicas con colorantes específicos, que permiten la observación de patrones de bandas para cada cromosoma (38). Los estudios citogenéticos de *T. dimidiata*, han presentado resultados conflictivos, como el de los múltiples cromosomas X que fueron reportados por Panzera et. al (52) pero que no fueron confirmados por Schreiber & Pellegrino (53).

3.9 Genética de poblaciones

3.9.1 Definición

La genética de poblaciones estudia la variación genética en poblaciones naturales y los factores que la influyen. La genética de poblaciones es indispensable para el estudio de la biología de los vectores, porque provee las bases para comprender el papel del vector en la epidemiología de la enfermedad y los factores que modifican su variación genética (34).

3.9.2 Diversidad genética

Se refiere a la diversidad de la composición genética de

grupos de organismos, que depende de la mutación, selección, deriva génica y migración.

La caracterización de la diversidad genética puede ser analizada a nivel individual, poblacional o específico. Dentro de poblaciones puede describirse utilizando las frecuencias alélicas o las frecuencias genotípicas. Se puede calcular la heterocigocidad de un locus o la heterocigocidad media de distintos loci, que se denomina diversidad génica. Cuando se analizan varias poblaciones se recomienda utilizar el estadístico F. Si las poblaciones son pequeñas y no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (HW), el uso del estadístico F no es recomendable (54).

Para medir la cantidad de variación genética para un locus específico en una población, Godfrey Hardy, un matemático inglés y Wilhelm Weinberg, un físico alemán, respondieron a esta interrogante a través de un modelo matemático concluyendo que la herencia por sí sola no modifica las frecuencias génicas.

Por lo tanto, si no hay mecanismos evolutivos actuando sobre la población, las frecuencias genéticas no cambiarán y ello se denomina Equilibrio Hardy-Weinberg. Sin embargo como es prácticamente imposible que se cumplan todas las condiciones, la evolución es un resultado inevitable. Podemos concluir que el **Equilibrio Hardy-Weinberg** es un balance genético hipotético que ocurre cuando las frecuencias alélicas permanecen constantes de generación en generación como ausencia de mecanismos evolutivos. La fórmula matemática es $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ y se explica más adelante (55, 56).

Mediante el análisis de los geles, es posible conocer la frecuencia del genotipo recesivo, es decir de q^2 puesto que no presentan banda. Aquellos loci en los que haya presencia de una banda, pueden corresponder al genotipo dominante - p^2 -, o al heterotipo - $2pq$ -. Con la ecuación de Hardy-Weinberg, presentada más arriba es posible calcular entonces las frecuencias alélicas. Una vez obtenidas las frecuencias alélicas - p - y - q -, se puede proceder al cálculo de las distancias y similitudes genéticas. Estas describen las diferencias genéticas entre individuos o entre poblaciones utilizando un solo número que tiene un valor entre 0 y 1, en donde 0 significa que no hay diferencia y 1 equivale a la máxima diferencia (54).

Al pasar los datos numéricos en una matriz binaria, se logra de manera sencilla presentar los datos y constituir una poderosa herramienta para analizar la diversidad genética de los individuos y de las poblaciones. Específicamente, cuando se analizan los patrones de bandas obtenidos por la técnica de RAPD-PCR, las diferentes bandas producidas por los individuos serán comparadas, en donde la presencia será notada como 1 y la ausencia como 0. (54).

La variación genética revelada por la técnica de RAPD's se

debe a 4 tipos de mutaciones: (a) mutaciones puntuales en los sitios de unión, (b) inversión en uno de los sitios de unión, (c) inserciones y (d) deleciones dentro de la región amplificada (51).

Para medir la variación genética, se utilizan medidas de distancia y de identidad que ayudan a manejar los datos más fácilmente y a visualizar las relaciones generales existentes entre los grupos. Las medidas de distancia son análogas a las distancias geométricas, es decir una distancia nula equivale a tener grupos iguales.

Las medidas de identidad son el complemento de las medidas anteriores, el que no haya diferencia entre los grupos da como resultado un valor unitario y viceversa (57).

La medida de distancia genética más empleada es seguramente la de Nei. Para múltiples alelos, como en el presente caso, se realizan los cálculos sumando los alelos de todos los loci incluidos en el estudio. El valor promedio por locus se calcula dividiendo estas sumas por el número de loci. Los valores promedios J'_{xy} ($\sum P_{ix} P_{iy}$), J'_x ($\sum P_{ix}^2$) y J'_y ($\sum P_{iy}^2$) se utilizan para calcular la **identidad** (I'_N) y la **distancia genética** (D'_N) como sigue:

$$I'_N = \frac{J'_{xy}}{(J'_x + J'_y)^{1/2}} \quad D'_N = -\ln (I'_N)$$

I'_N tiene un ámbito que va desde cero (donde ningún alelo es compartido entre las poblaciones) a uno (donde las poblaciones tienen frecuencias idénticas).

D'_N tiene un ámbito que va desde cero (para las poblaciones con frecuencias alélicas idénticas) al infinito (para poblaciones que no comparten ningún alelo) (57).

El siguiente paso corresponde al análisis de los índices con el fin de agrupar individuos genéticamente relacionados. La **técnica de Agrupamiento** (Cluster Análisis) con el método **UPGMA** (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), es el método más sencillo para la construcción de dendrogramas, que son la forma visual para identificar la similitud y la relación entre individuos o entre poblaciones. Originalmente fueron desarrollados para construir fenogramas taxonómicos, es decir árboles que reflejan similitudes fenotípicas entre OTU's (Unidad Taxonómica Operacional), pero pueden también ser utilizados para construir árboles filogenéticos. Para este fin, se usa el número de cambios nucleotídicos. El método de UPGMA, emplea un algoritmo de agrupamiento secuencial.

Se identifica en primera instancia entre todas las OTU's las dos con mayor similitud entre sí (los que tienen la menor distancia) y posteriormente se tratan éstas como una sola OTU.

Subsiguientemente, entre el nuevo grupo de OTU's se identifica el par con máxima similitud, y así sucesivamente hasta quedar con solo dos OTU's. Si la distancia mínima aparece entre unidades que ya han formado grupos entonces se toma el promedio aritmético no ponderado entre todos los posibles pares (58).

Otra forma de medir la variación genética, es mediante el cálculo de los estadísticos F de Wright. El fundamento de este estadístico es la estructuración de la población en niveles jerárquicos y la medición de la varianza en los distintos niveles (TCHABARNICK & BLACK 1996). Una población subdividida tiene tres niveles distintos de complejidad: los organismos individuales (I), las subpoblaciones (S) y la población total (T) (59).

Se tiene entonces que:

HI = la heterocigocidad de un individuo en una subpoblación (o la heterocigocidad promedio de todos los genes de un individuo).

Hs = la heterocigocidad esperada de un individuo en una sub-población con reproducción aleatoria (Hs sería el nivel de heterocigocidad encontrado en una subpoblación si la misma está con reproducción aleatoria).

Ht = la heterocigocidad esperada de un individuo en una población total con reproducción aleatoria (este Ht representa lo que sería la heterocigocidad si se reunieran todas las subpoblaciones y se reprodujeran al azar), (59).

A partir de las heterocigocidades se puede proceder a calcular los coeficientes de endogamia. Fis mide la reducción de la heterocigocidad de un individuo debido a apareamiento no aleatorio dentro de una sub-población. Los efectos de la división de la subpoblación se miden con el Índice de Fijación (simbolizado Fst) que mide la reducción de la heterocigocidad de una subpoblación debido a deriva génica. El coeficiente de endogamia de un individuo (denotada Fit) incluye una contribución debido a la reproducción no aleatoria dentro de las subpoblaciones (Fis) y otra contribución debido a la subdivisión misma (Fst) (59).

A partir del estadístico Fst se puede estimar la migración (m). Fst se relaciona con m con la siguiente fórmula: $Fst = 1 / (1 + 4Nm)$ ó $Nm = (1 - Fst) / 4Fst$ (60).

4. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas ha demostrado tener un gran impacto médico, social y económico a nivel latinoamericano. En Guatemala, 8% de la población está infectada con *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la enfermedad. Asimismo, más de 300,000 personas viven en áreas de alto riesgo, sin tomar en cuenta las

transmisiones congénita y por transfusión sanguínea. El problema reside en que se trata de una afección básicamente asintomática, el 70% de los individuos positivos son asintomáticos, su tratamiento es costoso, difícil y con serios efectos secundarios, resultando efectivo únicamente en los primeros estadidos de la enfermedad. Por otro lado, los efectos de la enfermedad son severos, en un 21% de las personas infectadas se desarrolla una cardiopatía crónica, en 6% lesiones digestivas y en 3% desórdenes neurológicos, sin mencionar los casos que llegan hasta la muerte (5). El Banco Mundial, definió el mal de Chagas como la enfermedad parasitaria de mayor impacto social negativo en América Latina en términos de años potenciales de vida perdidos, superando al de la malaria.

Una forma de combatir la enfermedad es controlando a los vectores del parásito. Esto hace necesario el estudio de su comportamiento y de la estructura de sus poblaciones. En Guatemala *Triatoma dimidiata* es el vector de mayor importancia epidemiológica, por los problemas que presenta su erradicación. Esta especie consta con reservorios silvestres y ha logrado adaptarse adecuadamente a los hábitat domésticos y peridomésticos. Esto requiere de la puesta en marcha de estrategias de control diseñadas de acuerdo a las características del vector y de las comunidades, para realizar un control más efectivo.

Es por ello que los distintos países latinoamericanos se congregaron para hacerle frente a la enfermedad mediante iniciativas de control regionales (Cono Sur, Pacto Andino, Centroamericana) (4), que generaron la necesidad de investigar los movimientos poblacionales de los triatominos, la interacción entre sus poblaciones silvestres, domésticas y peridomésticas, así como su estructura genética, para sugerir mejores formas de control e identificar el origen de las reinfestaciones.

La caracterización de las poblaciones de triatominos, ha cobrado gran importancia en el seno de las instancias de salud, por lo que se ha buscado comprender la estructuración de las poblaciones, con la ayuda de distintos tipos de marcadores, entre los cuales están los marcadores moleculares. Estos, mediante estudios de la estructura genética de las poblaciones, determinan la presencia o ausencia de flujo genético. Se revela importante analizar la presencia de dicho flujo entre poblaciones silvestres y domésticas, debido a que las primeras pueden constituir el origen potencial de las reinfestaciones. El conocimiento de la estructura poblacional permitiría finalmente el diseño de programas de aplicación efectiva de los insecticidas en las comunidades afectadas por la enfermedad (dónde rociar, en qué época, con qué frecuencia, cómo mejorar las viviendas) para erradicar al vector.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Comparar la variabilidad genética existente dentro y entre

seis poblaciones, tres domésticas del Pacífico y tres silvestres del Atlántico de la República de Guatemala, con el fin de comprender mejor la dinámica migratoria y la estructura poblacional de *Triatoma dimidiata*.

5.2 Específicos

5.2.1 Determinar la variabilidad genética de *T. dimidiata* en las poblaciones muestreadas utilizando la técnica de PCR-RAPD.

5.2.2. Calcular las frecuencias alélicas y las distancias génicas entre las distintas poblaciones muestreadas de *T. dimidiata* de Guatemala en base al índice de Nei, infiriendo su estructura y movilización.

5.2.3 Evaluar el flujo genético entre las seis poblaciones de *T. dimidiata* analizadas mediante el cálculo de F_{st} y de N_m .

5.2.4 Analizar los componentes de la varianza en los tres niveles jerárquicos siguientes: sub-población (localidad muestreada), vertiente (Atlántico-Pacífico) y población total.

5.2.5. Profundizar acerca del conocimiento de la dinámica migratoria y la estructura poblacional de *Triatoma dimidiata* para contribuir en el programa de control de la enfermedad de Chagas.

RECURSOS MATERIALES

A. PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

Suministros

Tubos eppendorf de 1.5 mL	Pistilos	Baño María (65°C)
Centrifugadora	Duroport	Gradillas para tubos
Hieleras con hielo picado	Micropipetas	Congelador a -20°C
Máquina para hacer hielo	Mechero	Fósforos
Papel mayordomo	Recipientes plásticos	Material de disección.

Reactivos

NaCl libre de ADN	Sacarosa libre de ADN	EDTA libre de ADN
Tris-HCl libre de ADN	SDS libre de ADN	Agua tridestilada estéril
Agua destilada	K-Acetato	Etanol al 70%
Etanol absoluto	Ácido Clorhídrico	Agua jabonosa
ARN asa	TE	Cloro

B. PARA LA AMPLIFICACIÓN

Reactivos

Termo Buffer 10x	MgCl ₂	H ₂ O para PCR
Primers	Oligonucleótidos	Taq polimerasa

6. HIPÓTESIS

Las seis poblaciones de *Triatoma dimidiata* estudiadas en la República de Guatemala (Yaxhá, Lanquín, Lachuá, Escuintla, Santa Rosa y Jutiapa) son diferentes respecto a los alelos analizados mediante la técnica molecular de PCR-RAPD (Amplificación aleatoria del ADN polimórfico con la técnica de PCR), debido al aislamiento geográfico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSO DE TRABAJO:

Se trabajó con una muestra de 78 chinches de la especie *Triatoma dimidiata*, de seis poblaciones (silvestres, domésticas y peridomésticas) de la República de Guatemala.

RECURSOS HUMANOS

Investigadora principal: Claudia Irene CALDERÓN

Asesores: MSc. Carlota MONROY y Lic. Juan J. CHAVEZ

Supervisor: MSc. Sergio Melgar

Colaboradores: personal del laboratorio LENAP

Equipo

Micropipetas	Tubos eppendorf de 200 µl	Hieleras
Congelador -20°C.	Termociclador.	

C. PARA EL CORRI-MIENTO DE GELES**Reactivos**

Loading gel (loading dye)	Agua destilada	Agarosa
TBE 0.5X	Bromuro de Etidio	Marcadores moleculares

D. PARA EL ANÁLISIS DE DATOS

Programa de análisis de geles, paquetes estadísticos (RFLP sean, PHYLIP, RAPDFST, RAPDBIOS, BIOSYS-2)

MÉTODOS

Se trabajó con 8 chinches de Lachuá (Alta Verapaz), 15 de Yaxhá (Petén) y 15 de Lanquín (Alta Verapaz), obteniendo un total de 38 individuos para la población silvestre de la vertiente Atlántica. Por otro lado, se trabajó con 15 chinches de Escuintla, 10 de Jutiapa y 15 de Santa Rosa, obteniendo de esta forma 40 individuos para la población doméstica de la vertiente Pacífica. El diseño del experimento consiste en: tres poblaciones silvestres, localizadas en la vertiente Atlántica de Guatemala y tres poblaciones domésticas de la vertiente Pacífica, que fueron comparadas genéticamente entre sí. El trabajo de campo consistió en alcanzar un número mínimo de $n = 30$ chinches para cada una de las vertientes, lo que correspondía a un número de 10 a 15 individuos, por sitio de muestreo. Cada espécimen fue colectado e identificado adecuadamente ingresándolo a la colección de referencia del LENAP. Las muestras se preservaron en alcohol al 95% con 5% de glicerol a 4°C.

Debido a las diferencias de tamaño según el estadio en que se encontraban las chinches, se tomó el siguiente patrón para la extracción de ADN de las patas, mismo que ya ha sido utilizado en las investigaciones anteriores del laboratorio.

ESTADIO	CANTIDAD DE PATAS A USAR
Adulto hembra o macho	2
Quinto estadio	2
Cuarto estadio	2
Tercer estadio	3
Segundo estadio	6
Primer estadio	Todo el insecto

Setenta y ocho especímenes fueron colectados ya sea en casas o en regiones silvestres, en las seis localidades de interés (Lachuá, Yaxhá, Lanquín; Puerto de San José, Aguazarca y El

Carrizal). Los especímenes vivientes fueron colocados en recipientes plásticos y transportados al laboratorio LENAP de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Las patas de las chinches fueron removidas, colocadas en tubos eppendorf con etanol, previa identificación. Luego fueron colocadas en un nuevo tubo, al que se le agregaron 100 µL. de buffer de extracción. Se escogieron las patas de las chinches para aislar el ADN porque proveen muestras libres de ADN contaminantes (parásitos o simbioses).

Extracción del ADN

Las patas de las chinches fueron procesadas para la extracción de ADN conforme al proceso RAPD-PCR (61) y amplificación con 4 primers de la casa Operon: L1 (5'CGG CCC CTG G 3'), L4 (5'GTG GAT GCG A 3'), L5 (5' AAG AGC CCG 5 3'), H3 (5' CAT CCC CCT G 3').

El ADN se extrajo de las patas mediante maceración, utilizando un pistilo y 100 µl de buffer de extracción (0.1 M NaCl, 0.2 M sacarosa, 50 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl [pH 8.0-9.0], 0.05 % SDS). Se utilizó un pistilo por muestra de ADN. Los pistilos contaminados se remojaron en ácido clorhídrico 1M, se lavaron con jabón, enjuagaron con agua destilada y autoclavearon antes de utilizarlos de nuevo. Los tubos eppendorf donde se maceraron las muestras fueron centrifugados brevemente a 14,000 rpm. Inmediatamente se pusieron a incubar en baño maría las muestras por 30 minutos a 65°C. Se agregaron catorce microlitros de acetato de potasio 8M para obtener una concentración final de 1M.

Las muestras se pusieron a incubar por quince minutos en hielo, para precipitar el SDS (detergente utilizado para romper la membrana celular). Las muestras se centrifugaron en frío (4°C) a máxima velocidad por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo con 200 µl de etanol frío para precipitar el ADN. Las muestras se incubaron en hielo al menos 10 minutos y se centrifugaron durante 20 minutos más (14,000 rpm a 4°C). La pastilla de ADN resultante fue lavada con etanol al 70%, y luego

al 100%. Se dejó secar para re-suspenderla en 50 µl de TE estéril (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 8.0) con IU ARNasa. Las muestras fueron por último almacenadas a -20°C hasta su amplificación.

Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).

El protocolo de RAPD-PCR fue modificado de Garcia et al (47). El Master Mix consiste en una mezcla de 37 µl que contienen PCR buffer, 10mM Tris-HCl (pH 8.3, 50 mM KCl), 3 mM MgCl₂, 40 pmol del iniciador seleccionado, y 200 µM de cada uno de los dNTP's (A, T, C, G).

A la mezcla de Master Mix se le agregaron 2 µl de ADN plantilla y 2 µl Taq polimerasa para un volumen final de 41 µl. El ADN se amplificó en un termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) con las siguientes condiciones:

- Para los iniciadores L1, L4 y L5:

80 °C por 15 min, 94°C por 1 min, 30°C por 2 min, 72°C por 1 min (2 ciclos); 94°C por 30 sec, 40°C por 2 min, 72°C por 1 min (32 ciclos); 95°C por 30 sec, 40°C por 2 min, 72°C por 5 min, (1 ciclo), posteriormente mantenido a 4°C.

- Para el iniciador H3:

80 °C por 15 min, 94°C por 1 min, 30°C por 2 min, 72°C por 1 min (2 ciclos); 94°C por 30 sec, 42.7°C por 2 min, 72°C por 1 min (32 ciclos); 95°C por 30 sec, 42.7°C por 1 min, 72°C por 5 min, (1 ciclo), posteriormente mantenido a 4°C.

Se incluyeron dos controles negativos en todas las corridas para detectar la presencia de contaminación. Posteriormente, 10 µl de amplicones fueron corridos en geles de 1.5% de agarosa y 0.5X TBE buffer (44.5 mM Tris-base, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8.0), utilizando los marcadores moleculares "100 bp Ez Load Molecular Ruler", con un rango de 100-1000 bp, muestra 10 bandas y "Phi-X 174 RF DNA/Nae III Fragments" con las bandas -1353, 1078, 872, 603, 310-. Los geles fueron posteriormente teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador por rayos UV. Luego, se procedió a tomar una fotografía digital que se descargó en la computadora.

Para medir la distancia genética entre dos unidades taxonómicas (OTU's), es necesario comparar sus patrones de bandas. Patrones similares significan que los individuos, son genéticamente cercanos, mientras que patrones diferentes indican divergencia genética.

Esto se realizó mediante el programa de análisis de imágenes GENEPROFILER de Scannalyteics. Se elaboraron tablas de presencia-ausencia para realizar las comparaciones entre poblaciones. Las poblaciones se compararon con base en las

frecuencias alélicas. Se asume que el genotipo dominante presenta bandas específicas de un peso molecular determinado, mientras que el recesivo no presenta bandas. La ausencia compartida de una banda provee más información, ya que se sabe que los individuos son homocigotos recesivos, para el carácter en cuestión, mientras la presencia compartida puede ser ya sea hemocigotos o heterocigotos dominantes (62). Para el análisis de datos se tomó como punto de partida la suposición de que la población se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg (67). A partir de las frecuencias del alelo dominante -p-, se procedió a realizar el cálculo ponderado de las frecuencias alélicas. Para ello, se tomó en cuenta el número efectivo de individuos que fueron amplificados (Cuadro 1) por primer y por región geográfica. De todos los loci encontrados, se seleccionó únicamente aquellos cuyas frecuencias alélicas ponderadas se encontraban entre 0.1 y 0.6. El índice de Nei (I'_N) y la distancia genética de Nei (D'_N) fueron calculados a partir de dichas frecuencias alélicas.

Se elaboró un árbol filogenético o dendrograma con el programa Neighbor de PHYLIP- *Phylogeny Inference package*-, versión 3.5C, con la opción UPGMA (32, 63). Estos son gráficos de agrupamiento en los que las unidades taxonómicas se encuentran al final de una rama. Estas se van uniendo entre sí hasta quedar sólo una de ellas. El índice de Fijación de Wright (F_{ST}) entre poblaciones y el número efectivo de migrantes (N_m)¹ fueron calculados con el programa RAPDFST a partir de la fórmula: $F_{ST} = 1/(4N_m+1)$. La última versión estima el Teta de Weir y Cockerham y el FST que utiliza la técnica de Lynch y Milligan.

En esta técnica, se utilizan las frecuencias alélicas de las poblaciones para estimar el nivel de flujo genético. Se utilizó así mismo el programa RAPDBIOS (63), programa que convierte los datos obtenidos a partir de la técnica de RAPD-PCR en frecuencias alélicas (DATATYPE=3) para subsiguientes análisis con BIOSYS. Biosys continua siendo uno de los programas de computación más utilizados para el análisis de datos de genética de poblaciones.

Se utilizó en el presente estudio la versión mejorada de Biosys para el doctor William Black, denominada BIOSYS-2 (64). Medidas de la variabilidad genética son calculadas con este programa (heterocigocidad promedio por locus, alélos por locus o porcentaje de loci polimórficos).

Posteriormente, se realizó un análisis jerárquico, con el cual se pudo comprender cómo se distribuían los componentes de la varianza. En este estudio se subdividió a la población total de chinches en tres niveles: el de la población total, el de las vertientes (Atlántico/Pacífico) y el de las subpoblaciones (cada una de las seis localidades). De esta forma se pudo estimar la contribución de cada nivel a la varianza total de la población (65).

8. RESULTADOS

Seis poblaciones de insectos triatominos del género *T. dimidiata* fueron comparadas utilizando la técnica molecular de PCR-RAPD. Algunos especímenes utilizados fueron tomados de la colección de referencia, los otros fueron colectados después. Se trabajó generalmente con especímenes adultos, sin importar el sexo de los mismos, que no afectan en los resultados de los análisis. Se trabajó con poblaciones provenientes de distintas regiones geográficas y con distinto hábito ecológico como se muestra a continuación.

SITIOS DE MUESTREO

Poblaciones Silvestres (Atlántico= 38)

Alta Verapaz (Cobán, Parque Nacional Laguna Lachuá): 8

Alta Verapaz (Lanquín, cuevas): 15

El Petén (Melchor de Mencos, sitio arqueológico Yaxhá): 15

Poblaciones Domésticas (Pacífico = 40)

Escuintla (Puerto de San José): 15

Santa Rosa (Santa María Ixhuatán, aldea Aguazarca): 15

Jutiapa (Jutiapa, aldea El Carrizal): 10

De los 78 individuos analizados, no siempre se logró una amplificación exitosa del ADN. En ciertos casos se obtenía una amplificación de todos los individuos una población, para un iniciador determinado. En otros casos ocurría lo contrario. Se muestra en el siguiente cuadro el número de individuos que fueron efectivamente amplificados por cada sitio de muestreo y con cada uno de los cuatro iniciadores (L1, L4, L5, H3), indicando el número real de muestras analizadas. Nótese que con el iniciador H3 se lograron amplificar menos muestras.

CUADRO 1. Porcentaje de muestras amplificadas por iniciador

	L1	H3	L4	L5
<i>Petén</i>	14	11	14	14
<i>Lachuá</i>	7	7	8	8
<i>Lanquín</i>	9	4	10	14
<i>Escuintla</i>	12	12	14	13
<i>Santa Rosa</i>	12	11	13	13
<i>Jutiapa</i>	13	13	12	13
TOTAL	67	58	71	75
% de muestras amplificadas	85	74	91	96

A partir de los geles analizados y de la matriz binaria generada por el Geneprofiler, se obtuvo un total de 241 loci. A través de un cálculo ponderado de las frecuencias alélicas, se obtuvo un dato único por loci. Estos sufrieron un tamizaje: se seleccionaron únicamente aquellos loci cuya frecuencia del alelo dominante se encontraba entre 0.1 y 0.6. A raíz del conocimiento previo que se tiene de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* de Lanquín, se decidió realizar dos análisis: uno con Lanquín y otro sin Lanquín. Para cada uno, se presentan los loci seleccionados y la frecuencia de -p-.

CUADRO 2. Frecuencias alélicas de los loci con valores intermedios.

A partir de la matriz de datos binarios obtenida con el programa Genoprofiler, se calcularon las frecuencias alélicas, mediante promedios ponderados de seis poblaciones (con Lanquín) o de cinco únicamente (sin Lanquín). De todos los loci iniciales, se seleccionaron para los análisis subsiguientes, únicamente aquellos cuyas frecuencias alélicas se encontraban entre 0.1 y 0.6 (frecuencias intermedias). Notar que no son los mismos alelos en cada caso.

Frecuencias alélicas
c/Lanquín

Loci	p
H3-11	0.555
H3-12	0.242
H3-14	0.124
H3-19	0.211
H3-22	0.581
H3-25	0.297
H3-27	0.369
H3-28	0.12
H3-40	0.23
H3-7	0.272
L1-10	0.155
L1-12	0.386
L1-15	0.135
L1-16	0.341
L1-28	0.551
L1-41	0.1
L1-49	0.277
L4-15	0.592
L4-29	0.319
L4-4	0.132
L5-13	0.102
L4-14	0.115
L5-17	0.249
L5-19	0.487
L5-22	0.39
L5-25	0.113
L5-27	0.235
L5-29	0.547
L5-37	0.247
L5-42	0.288

Frecuencias alélicas
s/Lanquín

Loci	p
H3-12	0.254
H3-13	0.148
HE-14	0.124
HE-19	0.260
HE-24	0.105
H3-25	0.350
H3-27	0.398
H3-28	0.112
H3-40	0.233
H3-5	0.105
H3-7	0.315
H3-8	0.120
L1-10	0.150
L1-15	0.152
L1-16	0.405
L1-21	0.106
L1-26	0.353
L1-28	0.568
L1-41	0.228
L1-48	0.117
L1-49	0.254
L4-15	0.548
L4-29	0.302
L4-4	0.130
L5-1	0.109
L5-13	0.121
L5-17	0.215
L5-19	0.470
L5-22	0.371
L5-25	0.139
L5-27	0.228
L5-29	0.545
L5-37	0.246
L5-42	0.353

En base a las frecuencias alélicas ponderadas, y tomando en cuenta únicamente aquellas que se encontraban en el ámbito de 0.1 a 0.6 (presentadas en el cuadro 2), se procedió a calcular el índice de Nei y la distancia genética entre las poblaciones. Se realizó este cálculo incluyendo a Lanquín (cuadro 3) y excluyendo dicha población (cuadro 4) para visualizar mejor el efecto de esa población que tiene características de estar aislada geográficamente (recordemos que los especímenes provenientes de dicha localidad son colectados dentro de cuevas calcáreas). Las distancias más pequeñas encontradas son entre las poblaciones de Santa Rosa, Jutiapa y Lachuá.

CUADRO 3. Índices de Nei y distancias genéticas

	Índice de Nei (I'N)	Distancia Genética (DN)
Esc/Jut	0.919	0.085
Esc/Lac	0.919	0.084
Esc/Lan	0.776	0.254
Esc/Pet	0.846	0.167
Esc/SR	0.922	0.081
Jut/Lac	0.959	0.041
Jut/Lan	0.799	0.224
Jut/Pet	0.882	0.125
Jut/SR	0.951	0.050
Lac/Lan	0.841	0.173
Lac/Pet	0.886	0.121
Lac/SR	0.960	0.040
Lan/Pet	0.828	0.189
Lan/SR	0.808	0.213
Pet/Sr	0.889	0.118

Una forma de visualizar gráficamente los resultados presentados en el cuadro anterior es mediante un dendograma. Es un árbol que agrupa las poblaciones según la distancia que las separa, donde 0 es la mínima distancia, es decir que no existe diferencias entre las poblaciones comparadas. La figura 7, muestra las relaciones entre chinches de las seis localidades estudiadas (Escuintla, Jutiapa, Santa Rosa, Lachuá, Petén y Lanquín), logrando separar ligeramente las poblaciones silvestres de las domésticas.

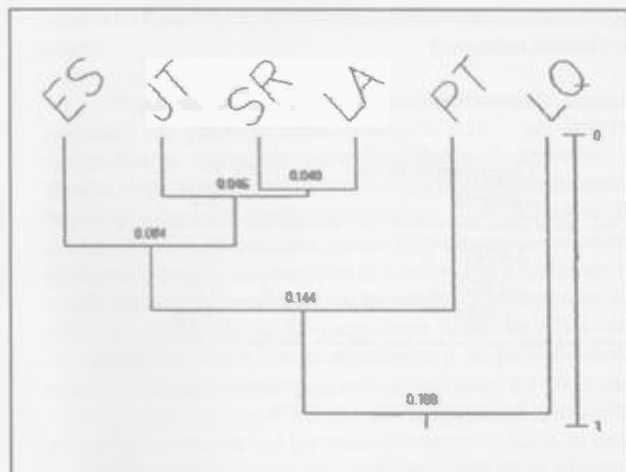


Fig. 7 Dendrograma producido por el método de UPGMA basado en loci de RAPD-PCR, utilizando la distancia genética de Nei.

CUADRO 4. Índices de Nei y distancias genéticas.

En base a las frecuencias alélicas ponderadas intermedias. No toma en cuenta a la población de Lanquín.

	Índice de Nei (I'N)	Distancia Genética (DN)
Esc/Jut.	0.905	0.099
Esc/Lac	0.874	0.135
Esc/Pet	0.792	0.233
Esc/SR	0.897	0.109
Jut/Lac	0.919	0.085
Lac/Pet	0.867	0.143
Lac/SR	0.944	0.058
Pet/SR	0.861	0.150

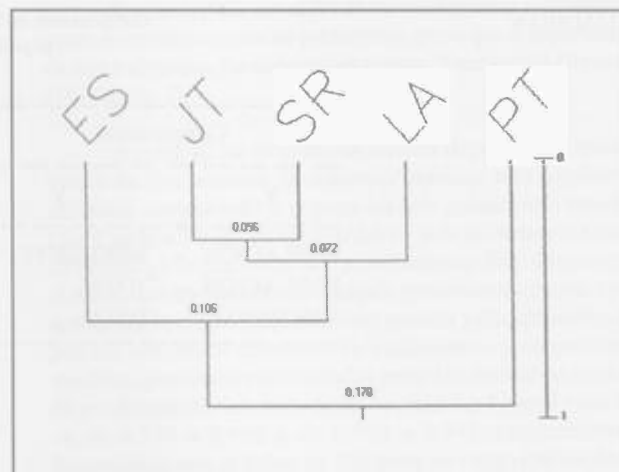


Fig. 8. Dendrograma producido por el método de UPGMA basado en loci de RAPD-PCR, utilizando la distancia genética de Nei. (muestra relaciones entre chinches de las localidades estudiadas, sin Lanquín)

Por otro lado, con el programa RAPDFST se calculó el índice de fijación F_{st} que cuantifica el efecto de la endogamia causado por la estructuración de las poblaciones, con tres técnicas: Wright, Weir & Cockerham y Lynch y Milligan, sin observarse mayor diferencia entre ellas. Asimismo, se obtuvo el cálculo de N_m que da una estimación del número efectivo de migrantes de una población a la otra.

CUADRO 5. Índice de fijación (F_{st}) y número efectivo de migrantes (N_m)

Índice de fijación (F_{st}) y Número efectivo de migrantes (N_m) según:	Wright		Weir y Cockerham		Lynch y Milligan	
	F_{st}	N_m	F_{st}	N_m	F_{st}	N_m
A partir de las 6 poblaciones estudiadas (con Lanquín)	.246	.8	.239	.8	.500	2
A partir de las 5 poblaciones estudiadas (sin Lanquín).	.171	1.2	.185	1.1	.187	1.1

Finalmente, se realizó un análisis jerárquico con el programa BIOSYS-2, para estimar los componentes de la varianza en tres niveles: Poblaciones (de mes), Vertientes y Población Total. Se realizó el análisis con y sin Lanquín, sin obtenerse mayor diferencia entre ambos análisis. En los cuadros 6 y 7 se observa que la mayor parte de la varianza se da entre poblaciones dentro de las vertientes.

CUADRO6

Componentes de la varianza y estadístico de F entre los loci
(6 poblaciones) (Análisis Jerárquico)

Comparación		Componente de la varianza	F XY
X	Y		
POBLACIÓN	VERTIENTE	2.43191	.211
POBLACIÓN	TOTAL	2.23208	.197
VERTIENTE	TOTAL	-.19983	-.018

CUADRO7

Componentes de la varianza y estadístico de F entre los loci
(5 poblaciones) (Análisis Jerárquico)

Comparación		Componente de la varianza	F XY
X	Y		
POBLACIÓN	VERTIENTE	2.01037	.174
POBLACIÓN	TOTAL	1.61096	.145
VERTIENTE	TOTAL	-.39942	-.036

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Dado que *T. dimidiata* es en Guatemala el principal vector de parásito *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, y que para desarrollar estrategias de control es indispensable comprender el comportamiento del vector, se decidió realizar un estudio sobre la variabilidad genética de seis poblaciones de chinches picudas y sobre su tasa de migración. Los estudios epidemiológicos detallados por poblaciones individuales, revisten de una gran importancia para efectos de control porque informan sobre la estructura poblacional, sobre la presencia o ausencia de movimiento entre las poblaciones, sobre las diferencias en el comportamiento de los especímenes, que regirán las futuras decisiones en los programas de erradicación de los vectores de la enfermedad de Chagas.

Por la importancia acerca del origen de las reinfestaciones, se seleccionaron poblaciones de hábito doméstico, las del Pacífico, y de hábito silvestre, las del Atlántico. Estudios anteriores realizados en el LENAP, habían utilizado otro tipo de marcador, el morfométrico, para caracterizar a las poblaciones, describiendo sus propiedades métricas, comparando la variabilidad de sus

caracteres y estableciendo si era posible diferenciarlas en base a dichos parámetros.

Investigaciones previas han mostrado que las poblaciones de *T. dimidiata* presentan una gran variabilidad morfológica y cromática a lo largo de su rango de distribución, que va desde México hasta la región norte de Sudamérica (18). Incluso dentro del país, las poblaciones presentan una extensa variabilidad: Por ejemplo los especímenes traídos de El Petén y de Lachuá son más pequeños (~3 cm), con coloración oscura mientras que los de Lanquín son más grandes (~4 cm) y de tonalidad clara.

Estudios morfométricos realizados por el LENAP han separado las chinches de Petén y las de Lanquín (66). Una forma de caracterizar la estructura de una población, es estudiarla con distintos marcadores, para tratar de explicar los patrones observados. En este proyecto se decidió utilizar un marcador genético y no fenético, para determinar, si a nivel del ADN existían variaciones significativas que mostraran una divergencia entre las poblaciones. Una técnica que ya había sido implementada en el laboratorio con anterioridad, la técnica de PCR- RAPD (Amplificación Aleatoria del ADN polimórfico, variante de la

técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa) fue utilizada con ese fin.

El procedimiento de RAPD es relativamente rápido, no requiere de grandes cantidades de ADN, no involucra radioactividad ni requiere la transferencia tipo Southern blot (36). En el RAPD-PCR, el polimorfismo se segrega independientemente, sugiriendo que cada banda representa un locus individual (67) y que los alelos son dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas (datos binarios). Cabe señalar que los polimorfismos son heredados de manera mendeliana (68). La utilización de las patas como fuente de ADN evita la contaminación con ADN de simbioses y de parásitos como *T. cruzi*. Un control negativo, que lleva casi todos los componentes de la reacción excepto ADN, que es manipulado al mismo tiempo y de idéntica manera que los tubos que tienen el ADN, es incluido poniendo en evidencia si hay contaminación en el Master Mix alícuotado, para darle mayor confiabilidad.

Sin embargo, uno de los defectos de RAPD es la dificultad para reproducir sus patrones. Los factores que afectan a esta técnica son: la concentración y la calidad del ADN; la concentración de los iniciadores, la concentración de la Taq polimerasa, la concentración de los dNTPs (bases nitrogenadas) y del $MgCl_2$, ajuste del termociclador, y debe por lo tanto optimizarse las condiciones de trabajo y aplicarlas con rigor a lo largo del estudio (40).

Se asumió en este estudio que los fragmentos de ADN que comigraron en el corrimiento de geles, derivaban de alelos idénticos. Posteriormente, las frecuencias de los alelos en cada población fueron estimadas.

Al respecto podemos observar el cuadro 1 de los resultados, en la que se presenta el porcentaje de muestras amplificadas por iniciador. Se puede observar que fue con el primer H3 con el cual se tuvo más dificultad en la amplificación de las muestras (74% de muestras efectivamente amplificadas). Este tipo de resultados se ha repetido en estudios anteriores, como el de "*Comparación de poblaciones silvestres y domésticas de Triatoma dimidiata*" (66) y puede deberse a la secuencia del primer.

Lynch en 1988 demostró que al utilizar técnicas moleculares para determinar el grado de semejanza era necesario establecer las frecuencias de alelos en la población estudiada, para evitar sesgos en los análisis. Apóstol *et. al.* (62, 69) avaló este hecho indicando que los valores discriminatorios para determinar semejanza genética dependerán de la frecuencia de los alelos en la población estudiada. En este caso no se utilizaron las frecuencias extremas porque son menos informativas, y se seleccionaron únicamente aquellas cuya frecuencias se encuentra entre 0.1 y 0.6. No se utilizaron las frecuencias extremas que son menos informativas.

Esto se realizó con el fin de no sobreestimar o subestimar el grado de semejanza entre las poblaciones, por lo que el nuevo conjunto de loci trabajados, fue denominado como "Frecuencias Depuradas" (Ver Cuadro 2).

A partir de las frecuencias alélicas depuradas se calculó el índice de Nei, medida de distancia genética más ampliamente utilizada, comparando por pares las seis poblaciones estudiadas (Ver Cuadros 3 y 4). El cálculo del I'_N y de la Distancia Genética de Nei (D'_N), se realizaron con y sin Lanquín. Esto último se debe al hecho que las chinches de Lanquín provienen de cueva, y por su apariencia fenotípica (especímenes grandes y de coloración clara), por los resultados obtenidos en morfometría y en patrones de sensillas, parecieran estar aisladas geográficamente de las demás. Se puede apreciar entonces en los cuadros 3 y 4 que el valor de I'_N va de 0.776 a 0.960 y de 0.792 a 0.944, respectivamente. Recordemos que el índice de Nei tiene un rango que va desde 0, donde ningún alelo es compartido entre las dos poblaciones, hasta 1, donde las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas. Los resultados encontrados se acercan a la unidad, y puede deberse a distintas razones: hubo una reciente separación de las poblaciones por lo que aún no se diferencian entre sí; existe un flujo migratorio entre las mismas que las mantienen homogéneas; existe poca deriva genética por ser grandes poblaciones que ha evitado procesos de fijación alélica (57). En este caso específico, la segunda razón pareciera ser la más acertada aunque las otras no deben descartarse.

Incluso, durante las giras de campo, se han puesto trampas de luz cerca de las cuevas y las chinches que se colectan de esta forma difieren notoriamente de las que son colectadas dentro de las cuevas (Monroy 2002 com. pers).

Las poblaciones de Lanquín y Escuintla aparecen como las dos poblaciones genéticamente más distantes, con un $D'_N = 0.254$. El valor de D'_N va desde 0, en poblaciones con frecuencias alélicas idénticas; hasta el infinito, para poblaciones que no comparten ningún alelo.

Estudios de distancias genéticas calculadas entre especies y poblaciones de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*, (12) señalan los siguientes datos:

$D'_N = 0.504$ entre dos especies distintas y $D'_N = 0.013$ entre dos poblaciones de la misma especie. Así mismo, en el estudio realizado por Dorn y colaboradores (publicación en prensa), encontró muy pequeñas distancias genéticas ($D = 0.013 - 0.022$) entre tres subpoblaciones de *T. dimidiata* en una misma aldea. En nuestros resultados el D'_N va desde 0.040 hasta 0.254, por lo que se podría sugerir que todas las poblaciones muestreadas pueden estar diferenciándose entre sí, pero pertenecen aún a una misma especie.

Una forma de visualizar gráficamente las relaciones genéticas entre distintas poblaciones es a través de los dendrogramas, construidos con el método de UPGMA y el

graficado con el programa PHYLIP (Ver figuras 7 y 8). Los dendrogramas señalan entonces las relaciones genéticas entre las poblaciones.

En general se aprecia una separación entre hábitats, con excepción de Lachuá (silvestre) quien se asemeja más a las poblaciones domésticas de la vertiente Pacífica que a las otras poblaciones silvestres. Este punto podría explicarse debido a la existencia de un flujo entre dichas poblaciones, a través de movimientos pasivos de las chinches (mediante acarreo en troncos, la zona de Lachuá es explotada por su riqueza maderera), o bien por la existencia de poblaciones intermedias que sirven de puente hacia las poblaciones domésticas.

Además, cabe señalar que la muestra de Lachuá es la menos representativa cuantitativamente hablando, por lo que no se puede dar una explicación segura de la situación en cuestión.

Entre las poblaciones domésticas de Jutiapa, Santa Rosa y Escuintla existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. La población de Lanquín es separada por esta técnica de las demás poblaciones, a pesar de su cercanía geográfica con Lachuá. Quizá sólo pueda inferir que se esté dando algún proceso incipiente de especiación.

Por otro lado, aunque a menudo nos referimos a los individuos de una región geográfica específica como miembros de una población, frecuentemente observamos que muchos tienden a agruparse, y por lo tanto a crear subestructuras. Una forma de determinar esa "partición" de la población en distintos niveles y de estimar el flujo migratorio, es a través de los estadísticos F (F_{st}) y del cálculo de N_m , número efectivo de migrantes que van a reproducirse por generación, dando una idea sobre la presencia o ausencia de flujo genético entre las distintas poblaciones analizadas. Dentro de una población subestructurada, dos subpoblaciones pueden no estar aisladas completamente por la presencia de migrantes entre las mismas, que permiten el intercambio genético. Así se mantienen heterocigotos en las poblaciones y se evita la pérdida de alelos por procesos de deriva génica.

Las migraciones dependen directamente de la movilidad de los individuos analizados, en este caso de las chinches, cuya capacidad de vuelo es relativamente limitada. A través de los estadísticos empleados, se obtuvieron resultados que sugieren el no desplazamiento de los individuos de Lanquín. Esto fue una de las razones por las que se decidió hacer los análisis con y sin Lanquín.

El cuadro 5 y los anexos 1-2 muestran los F_{st} y los N_m calculados en base a los estadísticos de Wright, Weir & Cokerham, Lynch & Milligan, con Lanquín y sin Lanquín. Allí se observa una diferencia al comparar los resultados obtenidos con Lanquín ($N_m = 0.8$) y sin Lanquín ($N_m = 1.2$).

Al no incluir a Lanquín en el análisis, el N_m aumenta, esto podría interpretarse como el que efectivamente las chinches de Lanquín no se están desplazando, como lo sugieren las asimetrías estudiadas en morfometría, que la población es altamente endogámica.

Estudios similares realizados en Guatemala han encontrado $N_m = 1.2$, como el que comparó chinches de *T. dimidiata* de Chiquimula con chinches de la misma especie de Santa Rosa (70). Asimismo, se encontró un $N_m = 9.7$ al estudiar la genética de poblaciones de *T. dimidiata* entre tres casas de uno de los pueblos que también fue estudiado en la presente investigación (Santa María Ixhuitán) (DORN et. al. en prensa). Se dice que solo se requiere de una migración reducida ($N_m = 1$) para mantener la homogeneidad genética entre las subpoblaciones (34).

Por lo tanto el 0.8 obtenido tomando en cuenta a Lanquín pueda estar señalando que la migración no es suficiente para mantener la homogeneidad entre las otras poblaciones y Lanquín, y que paulatinamente se estén sometiendo a procesos de deriva génica, que podrían llegar en determinado momento a la fijación de alguno de los alelos.

Esto puede ser un esbozo de lo que ocurrirá con la población de Lanquín. Además se ha intentado reproducir especímenes traídos de Lanquín con otros (domésticos o silvestres) sin éxito (Rodas 2002 com. pers). Sin embargo, los N_m son superiores a 1 al excluir a Lanquín del análisis, lo que se puede interpretar como la presencia de un flujo (mínimo pero presente) entre las otras poblaciones.

Se debe tomar con precaución estos resultados, porque entre las poblaciones silvestres y las domésticas existen barreras geográficas como macizos montañosos que puedan estar frenando de alguna u otra manera las migraciones.

¿Cómo explicar entonces la variabilidad fenotípica -color, tamaño, comportamiento- encontrada en las distintas poblaciones? La variabilidad morfológica podría aparecer previo al establecimiento de barreras reproductivas o genéticas, como lo había planteado Usinger y colaboradores en 1966 (32). Los rápidos cambios morfológicos, asociados con la adaptación ecológica, explica la discordia entre la diferenciación genética y la fenética. De allí el surgimiento del concepto de "especies ecológicas", donde dos poblaciones se diferencian al pasar por distintas presiones evolutivas. Esta idea sugiere que recientes unidades evolutivas estarían muy cercanas genéticamente (como se observa en este estudio) pero con tendencias evolutivas diferentes. En efecto, distintos factores ecológicos como el hábitat -selva, cuevas, viviendas- o como el clima, han puesto en evidencia la plasticidad fenotípica de los triatominos, con sus diferencias morfológicas y cromáticas, aunque el trasfondo genético permanezca similar.

El índice de fijación, F_{ST} , cuantifica el efecto de endogamia (67), es decir que calcula la reducción en la heterocigocidad promedio debida a la estructuración de las poblaciones. Wright, en 1978, sugirió las siguientes guías cualitativas para la interpretación de los F_{ST} :

- El rango de 0 a 0.05 puede ser considerado como indicador de poca diferenciación genética.
- El rango de 0.05 a 0.15 indica una diferenciación genética moderada
- El rango de 0.15 a 0.25 indica una diferenciación genética grande.
- Los valores de F_{ST} superiores a 0.25 indica una diferenciación genética muy grande. (67)

Los F_{ST} obtenidos, 0.246 (con Lanquín) y 0.171 (sin Lanquín) indican que la heterocigocidad promedio se redujo en un 24.6% y en un 17.1% respectivamente, debido al efecto de la subestructuración de las poblaciones. Es decir que no existe una reproducción completamente aleatoria dentro de la población total, por lo que en cada localidad se dan procesos de endogamia que reducen la heterocigocidad esperada. Se puede señalar también que sus valores caen en el tercer y segundo rango respectivamente, interpretándose según Hartl & Clark, como una diferenciación genética grande o moderada que subraya claramente la subestructuración de las poblaciones. Entonces, si $F_{ST} = 0$ indica que la frecuencia en las subpoblaciones es igual a la frecuencia de la población total, que implica por lo tanto la presencia de un flujo genético entre las poblaciones, un $F_{ST} > 0$ indica el que no se está dando un flujo genético suficiente para mantener la homogeneidad genética de las poblaciones. Esto se puede explicar por algún proceso de deriva génica.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos con el análisis jerárquico (ver cuadros 6 y 7, y Anexo 4) se puede comprender cómo se distribuyen en general los componentes de la varianza. Se observa que la mayor proporción de la varianza se encuentra entre poblaciones dentro de vertientes ($F = 0.211$ y $F = 0.174$). Los valores negativos obtenidos entre vertientes se interpretan como valores que están muy cercanos a 0, es decir que las poblaciones no se pueden separar por su ubicación según la vertiente. El hecho que el componente de la varianza que más contribuye en la diferenciación genética provenga de las poblaciones indica que existe deriva génica y poco flujo genético entre ellas. Sin embargo, el grado de aislamiento entre las poblaciones no es absoluto y existe un grado de migración entre las mismas. El hecho de que no exista un componente de varianza entre vertientes significa que están presentes los mismos genes a esa escala, y que la migración no se encuentra especialmente limitada por las vertientes. A pesar de que las poblaciones están diferenciadas entre sí, los mismos genes están representados en

distintas poblaciones distribuidas en las dos vertientes. También indica que la divisoria de vertientes no representa una barrera especialmente importante para la migración de *T. dimidiata*.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 La comparación de la variabilidad genética dentro y entre las seis poblaciones estudiadas, mediante la técnica de PCR-RAPD'S señala que a nivel genético, éstas han divergido moderadamente sin haber llegado aún a conformarse como especies diferentes por un proceso de especiación.
- 10.2 El Índice de Nei, basado en las frecuencias alélicas intermedias ($I'_N = 0.776 - 0.960$) cercano a la unidad, la Distancia Genética ($D_N = 0.040 - 0.254$) cercana a cero y el índice de fijación, $F_{ST} = 0.246$, indican que las poblaciones son similares genéticamente, qué no tienen una variabilidad marcada.
- 10.3 Existe flujo genético entre las poblaciones ($Nm = 1.1$), por lo que éstas no se encuentran del todo aisladas, se mantiene la homogeneidad en las frecuencias genéticas y se evita la fijación de los alelos.
- 10.4 A raíz de los análisis hechos con Lanquín, se infiere dicha población se encuentra más distanciada genéticamente de las demás poblaciones, que no existe el flujo genético necesario para mantener las frecuencias alélicas homogéneas entre los distintos demes de la población total.
- 10.5 La población de Lanquín aporta menos genes y es más endogámica que las demás, por lo que tiene poca importancia para el control de la enfermedad de Chagas.
- 10.6 Las poblaciones selváticas de Petén y Lachuá, tienen una endogamia, moderada y aportan genes a través de la migración, por lo que tienen mayor importancia en el control.
- 10.7 El análisis jerárquico mostró que el componente que agrupa la mayor parte de la varianza se da a nivel de las poblaciones.
- 10.8 No se encontró diferencia entre las vertientes con el análisis jerárquico, lo cual correspondería a diferencias entre las poblaciones silvestres y domésticas.
- 10.9 Las seis poblaciones analizadas pueden diferenciarse entre sí porque están sufriendo cambios paulatinos pero no son tan extremos por la presencia de un cierto flujo genético.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Los estudios de genética de poblaciones de *Triatoma dimidiata* en América Central y en Guatemala han sido muy escasos, especialmente con técnicas moleculares, como la del PCR-RAPD. Sin embargo la enfermedad de Chagas sigue siendo un problema serio de salud. Este trabajo presentó un intento de comprender la

estructuración poblacional de la chinche en Guatemala y las diferencias genéticas entre cada una de seis poblaciones analizadas.

11.2 Se sugiere que en estudios subsiguientes se tome un número de $n = 30$ como unidad muestral por población, que corroboren los resultados obtenidos en esta investigación y que aclaren el aporte individual en el flujo genético de las poblaciones silvestres de Petén y Lachuá. Asimismo se recomienda realizar estudios con la ayuda de otros marcadores genéticos, más sensibles, como ADN mitocondrial o microsatélites, con el fin de diferenciar las poblacionales de *T. dimidiata* en el país. Estos estudios servirían para monitorear los movimientos poblacionales, inferir el origen de las reinfestaciones y contribuir en el programa de rociamiento con insecticidas para la erradicación de dicho organismo - dónde rociar, en qué época, con qué frecuencia-. Deben priorizarse aquellos estudios que determinen el flujo genético de las poblaciones silvestres a las domésticas y que analicen la estructura poblacional en relación a su grado de endogamia para efectos de control.

11.3 Por otro lado, se sugiere a las autoridades encargadas de la salud en Guatemala que pongan especial interés en este tipo de investigaciones, que las apoyen tanto financiera como logísticamente.

11.4 El personal del ministerio debe capacitarse en la determinación de especímenes, en la aplicación adecuada del tratamiento químico, en la priorización de las aldeas según los índices de infestación y de infección. Se recomienda analizar las propiedades de distintos materiales que funcionen como emplastos de las paredes de las viviendas y reduzcan al máximo el desarrollo de los vectores. Asimismo, se deben adjudicar los recursos necesarios a las instancias de salud en el interior del país, para que puedan detectar eficientemente los casos positivos de *Trypanosoma cruzi* y que puedan tratar las infecciones en su fase inicial.

11.5 Por último, se sugiere que no dejen la parte de educación relegada a un segundo plano, puesto que es necesario que la población sepa cuáles son los riesgos de contraer la enfermedad, cómo deben combatirla, como pueden mejorar su vivienda para reducir los riesgos y qué deben hacer en caso de estar afectado con esta enfermedad.

12. REFERENCIAS

1. GUHL, F., JARAMILLO, C.A., 1998. Curso Taller "Control de Tripanosomiasis Americana y Leishamiosis: aspectos biológicos, genéticos y moleculares" Universidad de los Andes, Colombia
2. STARR, M.D., ROJAS, J.C., ZELEDÓN, R., HIRD, D.W., CARPENTIER, T.E., 1991. Chagas disease: risk factors for house infestation by *T. dimidiata*, the major vector of *T. cruzi* in Costa Rica. Am. J. of Epidemiology, vol. 133 (7), <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115949>
3. TABARU, Y., MONROY, C., RODAS, A., MEJIA, M., ROSALIES, R., 1999. the geographical distribution of vectors of Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala. Med. Entomol. Zool. Vol. 50 (1): 9-17, https://doi.org/10.7601/mez.50.9_1
4. PONCE, C., 1999. Elimination of the vectorial transmission of Chagas disease in Central American countries. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, suppl. 1: 417-418, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700082>
5. ZINGALES, B., 2000. Biochemistry, genetics and epidemiology of the two major groups of *Trypanosoma cruzi*.
6. SCHOFIELD, C.J., 1994. *Triatominae. Biología y control*. Trad. S. Tims y C.J. Schofield. Eurocom Publications. Reino Unido. 80 pp.
7. HIGO, H., et al., 1997. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in Central America and its comparisons with South American strains. International Journal for Parasitology 27(11): 1369-1374, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)10097-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)10097-0)
8. DE IEÓN GRANADOS, M.P., 1997. Estudio clínico, serológico y epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en Santa María. Tesis Químico Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC. Guatemala.
9. DORN, P., MELGAR, S., Gutierrez, A., KOTT, S., COMBE, C., SALVIA, D., RODAS, A., ROSALES, R., MONROY, C., 2002. The Chagas' vector, *Triatoma dimidiata*, is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. (En prensa), <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.436>
10. ZELEDÓN, R., SOLANO, G., ZUÑIGA, A., SWARTZWEDER, J.C., 1973. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), III. Habitat and blood sources. J. Med. Ent. Vol. 10, No. 4: 363-370, <https://doi.org/10.1093/jmedent/10.4.363>
11. SHERLOCK, I., 2000. *Trypanosoma cruzi e doença de chagas*. En Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Netto, M. (editors). 2d. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 431 pp.
12. DUARDIN, J.P., SCHOFIELD, C., PANZERA, F., 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas: Recherches taxonomiques, biologiques génétiques. Académie Royale des Sciences Outre-mer. 62 pp
13. PANZERA et al., 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatominae bugs (Hemiptera-Reduviidae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 56(6) 199, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.732>

14. LENT, H., WYGODZINSKY, P. 1979. *Revision of the Triatominae (hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease*. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 163:123-520.
15. WHO. 1998. *Proceedings of the Second International Workshop of Population Genetics and Control of Triatominae*. Tegucigalpa, Honduras.
16. IBÁÑEZ-BERNAL, S. PAZ-RODRÍGUEZ, R. 1999. *Los complejos de especies de Triatoma en México y CA*. En Schofield C.J. Ponce, C. (editors) *Proceedings of the Second International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*, Tegucigalpa, Honduras. INDRE, México City, 131 pp.
17. BARGUES, M.D., MARCILLA, A., RAMSEY, J.M., DUJARDIN, J.P., SCHOFIELD, C.J., MAS-COMA, S., 2000. *Nuclear rDNA Molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.95(4): 567-573, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000400020>
18. SOLIS-MENA, S., 2000. *Genetic variability and morphometrics of Triatoma dimidiata (Latreille, 1811) geographical populations*. Unpublished. London School of Tropical Medicine and Hyg. London.
19. MARCILLA, A., BARGUES, MD., RAMSEY, J.M., MAGALLON-GASTELLUM, E., SCHETTINO, PM., ABAD-FRAINCH, F., DUJARDIN, J.P., SCHOFIELD, C.J., MAS-COMA, S. 2001. *The its-2 of the nuclear rDNA as a Molecular Marker for Populations, Species and Phylogenetic Relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease*. Molecular Phylogenetics and Evolution vol. 18 (i): 136-142, <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0864>
20. ZELEDÓN, R., GUARDIA, V., ZÚÑIGA, A., SWARZWELDER, JC. 1970. *Biology and ethology of Triatoma dimidiata (Latreille 1811) II. Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation and size of adults*. J. Med. Ent. Vol. 7, No. 3: 313-319, <https://doi.org/10.1093/jmedent/7.3.313>
21. DIOTATIUTI L. 2000. *Triatomine vectors: ecological factors and behavioural aspects* second Expert Committee on the Control of Chagas Disease WHO. Brasília, Brasil.
22. MEIA, M., MONROY, RODAS, A. MASAHIRO, H., FLORES, P. 1998. *Reservorios de la enfermedad de Chagas*. JICA.
23. ZELEDÓN, R., GUARDIA, V., ZÚÑIGA, A., SWARZWELDER, JC. 1970. *Biology and ethology of Triatoma dimidiata (Latreille 1811). II. Life span of adults and fecundity and fertility of females*. J. Med. Ent. Vol. 7 No. 4: 462-469, <https://doi.org/10.1093/jmedent/7.4.462>
24. BORROR, DJ., TRIPLEHORN, CAJOHNSON, NF., 1989. *An introduction to the study of Insects*. 6 ed. Saunders College Publishers. USA. 875 pp.
25. LENT, H., JURBERG, J., 1985. *Sobre a variação intra-específica em Triatoma dimidiata (Latreille) e Triatoma infestans (Kug) (Hemipter, Reduviidae)*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 80(3): 285-299, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761985000300004>
26. ZELEDÓN, R. 1983. *El Triatoma dimidiata (Latreille, 1811)*. En Arcavallo, R. Ravinovich, J. Ton, J. (editores) *Factores biológicos y ecológicos de la enfermedad de Chagas*, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OMS, OPS: Servicio Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Acción Social. Argentina. 250 pp.
27. AYAU MILLA, O., 1999. *Enfermedad de Chagas*. Impresos Litográficos, Guatemala. 338 pp.
28. MONROY, C., et. al. 1992. *Vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala*. En Ogata, K (editor). *Memoria del I Seminario Internacional de Enfermedades Tropicales*, Guatemala. *Enfermedades Tropicales en Guatemala*. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Guatemala, 128 pp.
29. BORGESE, C., PRES, H.H.R., BARBOS, S.E., UNES, C.M.S., PERERIRA, M.H., ROMANIA, A.J., DIOTATIUTI, L., 1999. *Genetic variability in Brazilian triatomines and the risk of domiciliation*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 94 (suppl 1): 371-373, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700072>
30. MONROY, C, et. al. 199. *Ecología intradomiciliar de Triatoma dimidiata en Santa María Ixhuatán*. En Tharu, Y (editor). *Enfermedades Tropicales de Guatemala*. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Guatemala, 215 p.
31. ROHLF, J. 1990. *Morphometrics*. Annu. Rev. Ech Sist. 21:299-316, <https://doi.org/10.1146/annurev.es.21.110190.001503>
32. MANGIN, S., WILKINSON, R.C., RUBIO-PALIS, A., DANOFF-BURG, J.A., ROBERTS, D., 1999. *Population structure of the primary vector in South America, Anopheles darlingi, using isozyme, random amplified polymorphic DNA internal transcribed spacer 2, and morphologic markers*. Am J of Trop Med Hyg 60(3): 364-376, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.364>
33. BUSTAMANTE, DM., 200. *Morfometría de seis poblaciones del principal vector de la enfermedad de*

- Chagas en Guatemala, Triatoma dimidiata* (Latreille 1811) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), para la caracterización geográfica de la especie. Tesis Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. USAC, Guatemala.
34. TABACHNICK, W.J., BLACK, W.C., 1996. *Population genetics of disease vectors*. In Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado. Pp. 417-437.
 35. BARBOSA, SE, et. al. 1999. Differences in saliva composition among Brazilian population of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica* 72: 91-98, [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(98\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(98)00073-4)
 36. VALADEZ, E., KAHL, G., 2000. *Guías de ADN: teoría y protocolos de laboratorio*. Mundi-Prensa y Universidad Autónoma de Chapingo. México 147 pp.
 37. SHLEIF, P., 1993. *Genetics and Molecular Biology* 2nd edition The Johns Hopkins University Press, USA.
 38. BROKER, R.J., 1999. *Genetics: analysis and principles*. USA. Addison Wesley Longman. Inc.
 39. APOSTOL, BL., BLACK, W.C., REIETER, P. MILLER, B.R. 1996. *Population genetics with RAPD-PCR markers: Aedes aegypti in Puerto Rico*. *Heredity* 76: 325-334, <https://doi.org/10.1038/hdy.1996.50>
 40. BLACK IV., W.C., 1996. *PCR with arbitrary primers approach with care*. *Insect Molec. Biol* 2(1): 1-6, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00118.x>
 41. DORN, P.L., et.al. 1999. *Utility of the polimerase chain reaction in detection of Trypanosoma cruzi in Guatemalan Chagas disease vectors*. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 60(5) 740-745, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.740>
 42. ANDERSON, J., LAI, J.E. DOTSON, E.M., CORDÓN-ROSALES, C., PONCE, C., NORRIS, D.E., BEARD, C.B., 2002. *Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector Triatoma dimidiata*. *Infection, Genetics and Evolution* vol 1(3): 243-248.
 43. GRACIA COLLEVATTI, R., VIANELLO BRONDANI, R., GRATTAPAGLIA, D., 1999. *Development & characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species Caryocar brasiliense*. *Heredity* 83: 748-756, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1999.00638.x>
 44. LEWIN, B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press, U.S.A. 990 pp.
 45. LYMAN, DE. MONTH, FAESCALANTE, AA, CORDÓN-ROSALES, CWESSON, DM. DUJARDIN, P. BEARD, CB. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas disease. *AmJ. Trop. Med. Hyg.* 60(3) 377-386, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.377>
 46. DUJARDIN, JP., PANZERA, P. SCHOFIELD, CJ. 1999. *Triatominae as a model of biological plasticity under ecological pressure*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 94 (supl 1): 223-228, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700036>
 47. GARCIA A.L. et. al. 1998. *RAPD as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae)*. *J. Med. Ent.* 35(1): 38-45, <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.1.38>
 48. DUJARDIN, J.P., TBAYRENC, M., VENEGAS, E., MALDONADO, P. DESEUX, P. AYALA, F.J., 1987. *Isoenzyme evidence of lack of speciation between wild and domestic Triatoma infestans (Heteropter: Reduviidae) in Bolivia*. *J. Med. Entomol.* 24(1): 40-5, <https://doi.org/10.1093/jmedent/24.1.40>
 49. NOIREAU, F., ZEGARRA, M., ORÓÑEZ, J., GUTIERREZ, T., DUJARDIN, J.P. 1999. *Genetic structure of Triatoma sordida (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia: Application on control interventions*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 94(3): 347-351, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000300011>
 50. BORGES, E.C. DUJARDIN, J.P. SCHOFIELD, C.J., ROMANIA, AJ. DIOTAIUTI, L., 2000. *Genetic variability of Triatoma brasiliensis (Hemiptera: Reduviidae) populations*. *J. Med Entomol.* 37(6): 872-877, <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.6.872>
 51. JARAMILLO, C. MONTAÑA, ME., CASTRO, L.R., VALLEJO, G.A., JUL., F., 2001. *Differentiation and Genetic Analysis of Rhodnius prolixus and R. colombiensis by rDNA and RAPD Amplification*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol 96 (8): 1043-1048, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000800003>
 52. PANZERA, F., PEREZ, R., HORNOS, S., PANZERAY., CESTAU, R., DELGADO VNICOLINI, P., 1996. *Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera Reduviidae): a review*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol 91 (4): 515-518, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000400021>
 53. SCHOFIELD, CJ., 2000. *Challenges of Chagas Disease Vector Control in Central America*. Global Collaboration for development of pesticides for public health. WHO/CDS/WHOPES/GCOPP/2000-1.
 54. LANGSDORF, A., 1999. *PCR Technique and Theory for analyzing the genetic structure of populations*. Resumen del curso, que fue patrocinado por USAC. DAADy CONCYT.
 55. FALCONER, D.S. 1998. *Introducción a la genética*

- cuantitativa. Editorial Continental, S.a. d.C.V. México. 428 pp.
56. HARTLD L. 2000. *A primer of population genetics*. 3ª. ed. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. 221 pp.
 57. HEDRICK, P.W., 1983 *Genetics of Populations*. Science Books International Publisher. USA. 629 pp.
 58. AVISE J.C., 1994 *molecular markers, natural history evolution*. NY. Chapman & Hall, Inc, <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2381-9>
 59. HARTL D CLARK, A.G., 1989 *Principies of population genetics* 2ed Sinauer Associates, Inc. Canadá. 682 pp.
 60. SLATKIN M. 1981 *Estimating levels of gene flow in natural populations* Genetics (99):323-335, <https://doi.org/10.1093/genetics/99.2.323>
 61. BLACKIV, W.C. DUTEAU, N.M., 1997. *RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetics*. Chapman and Hall. Chap 31 pp-361-373, https://doi.org/10.1007/978-94-009-1535-0_31
 62. APÓSTOL, B.L., et al., 1998 *Estimation of the number of full-sib offspring from oviposition site using RAPD-PCR markers application to the mosquito Aedes aegypti*. Theo. App Genet. 86: 991-1000, <https://doi.org/10.1007/BF00211052>
 63. BLACKIV, W.C., 1998 *FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in population*. Colorado State University, Ft. Collins, CO 80523.
 64. SWOFFORD D.L., SENDER, B., 1981, *BIOSYS-1: a fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics* J Hered. 72: 281-283, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109497>
 65. MERIDA, a.M., et al. 1999 *Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of Anopheles albimanus in South and Central America* Am. J. Trop. Hyg. 53(5): 469-477, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.469>
 66. MONROY, C., et al. 2004 *Morphometrics and PCR-Rapds for studies of migration and reinfestation patterns of Triatoma dimidiata and Rhodnius prolixus in Guatemala and Honduras*. Tomado del resumen del Primer encuentro Internacional sobre enfermedades tropicales. NETROPICA.
 67. HARTL DL., CLARK AG., 1997 *Principies of population genetic* Sinauer Associates, Inc. Canadá. 524 pp.
 68. HADRI'S, HBALICK, M. SCHERWATER, B. 1992 *Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology* Molecular Ecology (1): 5-63, <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1992.tb00155.x>

Copyright (c) 2004 C.I. Calderón y M.C. Monroy

Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)