

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD  
SUBPROGRAMA EDC-BIOLOGIA

**INFORME FINAL DE LA PRÁCTICA DE EDC  
LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA APLICADA Y PARASITOLOGÍA  
(LENAP)  
Enero 2004- Enero 2005**

Br. Elizabeth Solórzano Ortiz  
Profesora Supervisora: Licda. Eunice Enríquez  
Asesora Institucional: Licda. Antonieta Guadalupe Rodas

Vo.Bo. Asesora Institucional

## *INDICE*

1. 1.Introducción.....	3
2. 2.Cuadro de Resumen de la Actividades de EDC.....	4
3. 3.Actividades realizadas durante la practica de EDC	
4. Actividades de Servicio.....	6
5. Actividades de Docencia.....	8
6. Actividades No Planificadas.....	11
7. Actividades de Investigación.....	12
8. 4.Resumen de Investigación.....	14
<b><i>Informe Final de Investigación</i></b>	
9. Resumen.....	16
10.Introducción.....	17
11.ANTECEDENTES	
12. Definición de la enfermedad.....	18
13. Características de la Enfermedad de Chagas.....	18
14. Transmisión.....	18
15. Formas de Infección.....	19
16. Información General sobre Familia Triatominae..	
17. Vector <i>Triatoma dimidiata</i> .	
18. Taxonomía.....	19
19. Características Morfológicas.....	19
20. Biología.....	20
21. Ecotopos.....	20
22. Distribución de <i>T. dimidiata</i> .....	21
23. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. (PCR)(Polymerase Chain Reaction).....	23
24. Técnica de RAPD-PCR.....	23
25. Genetica de poblaciones.....	23
26. Trabajos realizados con la Técnica de RAPD-PCR.....	24
27. Planteamiento del Problema.....	26

28. JUSTIFICACIÓN .....	27
29. Objetivos.....	28
30. Hipótesis.....	29
31. Metodología.....	30
32. RESULTADOS .....	35
33. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	38
34. Bibliografía.....	43
35. Anexos.....	47

## *1. INTRODUCCIÓN*

El Subprograma de EDC Integrado para la carrera de Biología, tiene como objetivos el contribuir a la formación profesional del estudiante. La elaboración de un informe final de la práctica permite presentar las metas cumplidas y limitaciones presentadas, durante el desarrollo de la práctica en las tres grandes áreas en que se constituye: servicio, docencia e investigación. Además permite presentar un panorama general de las actividades realizadas, los objetivos alcanzados, y de manera muy importante el conocimiento adquirido, así como el servicio realizado en el tiempo de la práctica, y la información generada en el proceso de la investigación. Por otro lado permite al estudiante y supervisor contrastar lo esperado con lo obtenido. Las tres áreas de la práctica fueron realizadas en Laboratorio de Entomología aplicada y Parasitología, centro de investigación, generador de importante información en el área de salud y uno de los principales centros de investigación en Guatemala.

Además el informe final permite que el estudiante, informe sobre aquellas actividades que no se encontraban previstas en el Plan de trabajo, pero que después, de tener un mayor acercamiento a la unidad de práctica (Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología) y al proyecto de Investigación; se consideraron de suma importancia para el logro de los objetivos planteados en el Plan de Trabajo, Perfil y Protocolo de Investigación. También se presenta un breve resumen de la investigación realizada. Durante la socialización del informe, se permitió a los estudiantes, retroalimentarse de las prácticas e investigaciones desarrolladas por los compañeros, de manera que se puedan tener conocimientos de aquellas actividades e investigaciones de interés mutuo.

**2. Cuadro Resumen de Las Actividades de EDC**

<b><i>Programa Universitario</i></b>	<b><i>Nombre de la Actividad</i></b>	<b><i>Fecha de la Actividad</i></b>	<b><i>Horas EDC ejecutadas</i></b>
<b><i>Servicio</i></b>	-Limpieza de bioterio y alimentación de chinches de cultivo	Febrero 2004- Enero 2005	164
	-Preservación de <i>Triatoma dimidiata</i> y <i>Rhodnius prolixus</i>	Febrero-Junio	65
	-Servicio preliminar de Herbario	Enero-Febrero 2004	60
	- Organización de colección de		142.5

	<p>especímenes de <i>T. dimidiata</i>.</p> <p>-Colaboración en el Seminario: "Situación de la Meliponicultura y aprovechamiento de sus productos"</p> <p>-Giras de Campo</p> <p>-Extracción de ADN de especímenes de <i>T. dimidiata</i> provenientes de Esquipulas y Río San Juan, Nicaragua.</p> <p>Actualización de Base de Datos (Actividad no planificada)</p> <p>-Detección de <i>T. Dimidiata</i> en trampas naturales.</p>	<p>Febrero-Octubre 2004</p> <p>Febrero-abril</p> <p>Junio 2004</p> <p>Junio 2004</p> <p>Marzo-Junio 2004</p> <p>Mayo 2004</p>	<p>12</p> <p>24</p> <p>60</p> <p>45</p> <p>22</p>
<b><i>Docencia</i></b>	<p>-Capacitación para el uso de equipo de laboratorio y conocimientos básicos de RCP</p> <p>-Diseño, búsqueda de información para la elaboración y Realización de trifoliar de Biología Molecular</p> <p>-Reuniones con el</p>	<p>Marzo2004- Enero2005</p> <p>Mayo2004- Enero 2005</p>	<p>88</p> <p>37</p>

	<p>equipo de RCP</p> <p>-Asistencia al Primer Curso de Estudios Genéticos para Manejo de Vida Silvestre con énfasis en Tortugas Marinas</p> <p>-Asistencia al Seminario de Biología Molecular en la Universidad Rafael Landívar.</p> <p>-Asistencia al Primer congreso Multidisciplinario de EDC</p> <p>-Asistencia al Seminario de la Situación de la Meliponicultura y aprovechamiento de sus productos.</p> <p>-Asistencia a las conferencias: Manejo de Desechos Bio-Infecciosos y Generalidades Ecotoxicológicas</p>	<p>Mayo2004-Enero 2005</p> <p>Agosto 2004</p> <p>Marzo 2004</p> <p>Septiembre 2004</p> <p>Abril 2004</p> <p>Abril 2004</p>	<p>59</p> <p>25</p> <p>4</p> <p>15</p> <p>6</p> <p>6</p>
<b><i>Investigación</i></b>	<p>-Inventariado de especímenes de T. dimidiata provenientes de El Tule.</p> <p>-Extracción de ADN</p> <p>-Amplificación</p> <p>-Elaboración de</p>	<p>Febrero 2004-Enero 2005</p>	<p>530</p>

	Mezcla Maestra -Electroforesis de Geles y fotografiado. -Procesamiento y Análisis de datos -Elaboración de Perfil de Investigación -Elaboración de Protocolo de Investigación -Elaboración de Informe Final		
<b>Otras Actividades</b>	-Elaboración de Diagnostico de la Unidad de Practica -Informes Bimensuales y Socialización de estos -Plan de Trabajo.	Enero 2004-Enero 2005	80

### ***3. Actividades Realizadas durante la Práctica de EDC***

#### ***3.1. Actividades de Servicio***

3.1.1 *Nombre de la actividad:* limpieza de bioterio y alimentación de chinches de cultivo.

3.1.2. *Objetivo:* Contribuir con la limpieza del Bioterio y alimentación de chinches, utilizadas para diversos proyectos de investigación.

3.1.3. *Procedimiento:* Para la alimentación de las chinches de cultivo se limpian los frascos de vidrio que contienen las chinches de cultivo, se coloca una circunferencia de papel periódico en el fondo del frasco y un trozo de papel periódico plegado como un abanico, de una altura no mayor de dos tercios del frasco, se tapa con un cedazo fino y se asegura con un hule a la abertura del frasco. Para la alimentación de las chinches se utilizan cajas especiales de plástico, se colocan los ratones de los cuales se alimentará, en una malla de metal que los inmoviliza en el momento de la alimentación, se colocan las chinches dentro, por un momento que no se prolonga más de una hora.

Con respecto a la limpieza de bioterio, esta se realiza periódicamente cada quince días, en ella, se limpian las cajas en las cuales permanecen los ratones, se cambia la viruta, se lavan las pachas y se llenan de agua limpia y se limpia en general el bioterio.

3.1.4. Resultados : Se continuó con el cultivo de chinches y mantenimiento del bioterio.

3.1.6. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna.

3.2.1.Nombre de la actividad: Preservación de *T.dimidiata* y *Rhodnius prolixus*.

3.2.2. Objetivo: Enriquecer la colección de chinches, que son utilizadas como referencia para investigaciones o intercambios.

3.2.3. Procedimiento: Se obtienen de frascos las chinches que han sido previamente colectadas, se diferencian por sexo, estadio y especie y/o género, se introducen en frascos etiquetados con alcohol-glicerina al 2% y se anotan los datos de campo y de laboratorio en el cuaderno de inventario correspondiente.

3.2.4. Resultados : Se enriqueció la colección ya existente, ingresando los datos aproximadamente 196 especímenes.

3.2.5. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna

3.3.1.Nombre de la actividad : Organización de la colección de especímenes de *T. dimidiata*. preservados en alcohol- glicerina.

3.3.2. Objetivo: Contribuir en la organización de la colección de chinches, que se encuentra en el Bioterio y que son utilizadas en diversas investigaciones, como referencia o utilizando los especímenes como en las investigaciones genéticas, para intercambios, para que estas estén al alcance de los investigadores y puedan obtener los datos necesarios para diversos proyectos de investigación.

3.3.3. Procedimiento: Se limpian los frascos en los que se encuentran preservadas las chinches, si las etiquetas están dañadas se revisa su información y se reemplazan, así como se revisa el espécimen para asegurarse que se encuentre en buen estado, así si fuese necesario, se cambia el frasco contenedor o se cambia la solución de alcohol glicerina que lo preserva. Se colocan en cajas específicas para cada grupo o especie, estas cajas además deben ser preparadas con duroport, el cual debe ser agujerado para colocar los frascos, estos se colocan en orden correlativo de número de inventario y se ingresan la entomoteca.

3.3.4.Resultados: Se etiquetaron, revisaron y organizaron aproximadamente 8000 frascos de especímenes y se prepararon aproximadamente 36 cajas .

3.3.5.Limitaciones o dificultades presentadas: Faltan algunos frascos ya inventariados por lo que se encuentran vacíos en la colección.

3.4.1. Nombre de la actividad: Servicio preliminar de herbario.

3.4.2.Objetivo: Contribuir con el ordenamiento de las colecciones de referencia.

3.4.3.Procedimiento: Ingreso de muestras recientes en los anaqueles, ingreso de

información de muestras de las colecciones en el libro de inventario.

3.4.4.Resultados: Se ingresaron de forma adecuada la información en el cuaderno de inventario y se ingresaron las muestras asignadas, en la colección, enriqueciendo la misma.

3.4.5.Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna

- 3.5.1Nombre de la actividad: Colaboración en el Seminario “Situación de la Meliponicultura y aprovechamiento de sus productos”
- 3.5.2 Objetivo: Colaborar con la organización previa al evento y el día del evento.
- 3.5.3. Procedimiento: Se colaboro con la realización del logo de dicho evento, y se participo en otras actividades como una sesión y ordenando los fólderes que se entregaron a los participantes del evento, así como en el registro de los participantes el día del evento.
- 3.5.4. Resultados : Se asistió a una reunión en la cual fue adjudicada la labor de realizar el logo del Evento de Meliponicultura, y se realizó el logo y algunas mejoras al mismo, también se colaboro con otras actividades previas al evento y el día del evento, se colaboro con el registro de los asistentes al evento.
- 3.5.5.Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna

- 3.6.1. Nombre de la Actividad: Giras de campo
- 3.6.2. Objetivo: obtener especímenes de *T. Dimidiata* aprender las técnicas de colecta de *T. dimidiata*, y conocer las condiciones en la que el vector se desarrolla, colaborar con diversos proyectos de Investigación del LENAP.
- 3.6.3.Procedimiento: se realizo una gira de corta duración según la calendarización específica del LENAP en la ultima semana de junio, a las aldeas La Brea, El Tule, El Sillón, La Perla, del departamento de Jutiapa, Guatemala, lugares de interés para investigaciones de la enfermedad de Chagas realizadas por el LENAP, para conocer técnicas de colecta de *T. dimidiata* y otros triatomíneos, y colaborar con los proyectos de investigación del LENAP.
- 3.6.4.Resultados : Se realizo una gira de tres días ,21, 22, 23 de junio en cuatro aldeas de Jutiapa, El Tule, La Brea, El Sillón y La Perla, para realizar una colecta de especímenes de árboles de los bosques de las cuatro aldeas, y búsqueda de chinches silvestres, como colaboración con un proyecto de investigación del Lenap.
- 3.6.5.Limitaciones o dificultades presentadas: En el Plan de trabajo se habían programado más horas de giras de campo, sin embargo estas se calendarizaron para junio y diciembre, pero en junio el equipo del Lenap realizó solo una gira en junio, a la cual se asistió y en diciembre las actividades de investigación imposibilitaron la salida, por lo que estas horas se transfirieron a otras actividades de servicio y otras no planificadas.

### 3. Actividades de Docencia

- 3.1.1.Nombre de la actividad: Capacitación para el uso adecuado del equipo de laboratorio y sobre procedimientos y conocimientos básicos de la RCP (reacción en cadena de la polimerasa).
- 3.1.2. Objetivo: Conocer los procedimientos adecuados para la utilización del equipo de laboratorio y conocer y comprender las bases del procedimiento de

la RCP.

3.1.3. Procedimiento: Se aprendieron progresivamente los procedimientos adecuados

para el manejo de diferentes aparatos utilizados

en la extracción, amplificación y análisis del ADN (ácido desoxirribonucleico), por medio de la técnica de amplificación polimorfica del ADN (RAPD-RCP), con supervisiones y capacitaciones no calendarizadas, impartidas por integrantes de la Unidad de Práctica como la Licda. Patricia Landaverde (asesora de Investigación) y la Licda. Claudia Irene Calderón y asistiendo a cursos varios.

3.1.3. Resultados : Se recibió una plática sobre las bases y técnicas generales de RAPD-RCP impartida por la Licda Claudia Irene Calderón, y se recibieron diversas capacitaciones en el uso de aparatos de RAPD-RCP, impartidas por la Licda. Patricia Landaverde, estas capacitaciones fueron recibidas durante el desarrollo de la investigación.

3.1.6. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna

3.2.1. Nombre de la Actividad : Diseño y Realización de un trifoliar sobre las líneas de investigación de interés para la investigación realizada , Biología Molecular.

3.2.2. Objetivo: crear un trifoliar que defina las líneas de investigación en las que se desarrolla la investigación en el área de Biología Molecular en el Lenap, para conocer y dar a conocer las mismas.

3.2.3. Procedimiento: Se obtuvieron antecedentes de las líneas de investigación de: Genética, Biología molecular, RAPD-PCR, sus objetivos, investigaciones realizadas y proyectos futuros.

3.2.4. Resultado: Se obtuvo información sobre Biología molecular, se definió los principales aspectos que debía contener el trifoliar, se consultaron varias fuentes bibliograficas a cerca del tema, y se consultaron algunos de los proyectos realizados por el LENAP. Estos fueron delimitados se reviso el diseño de dicho trifoliar.

3.2.5. Limitaciones o dificultades presentadas:Ninguna

3.3.1. Nombre de la Actividad : Reuniones con el equipo de RCP

3.3.2. Objetivo: Obtener conocimientos acerca de Biología molecular.

3.3.3. Procedimiento: Se leen y discuten artículos científicos sobre técnicas de investigación de Biología molecular y Genética, con los integrantes del equipo de RCP (Licda. Claudia Irene Calderón, Br. Sandy Pineda, . Licda. Patricia Landaverde, Br. Mauricio García y Br. Barbara Moguel) las reuniones son dirigidas por la Licda. Claudia Calderón, quien asigna quien presentara el articulo y tambien asigna temas que deben ser investigados por cada uno de los miembros del equipo, para luego ser discutidos.

3.3.4. Resultados Parciales: Se han realizado cinco reuniones, 10 discusiones de artículos y una discusión de temas de investigación y se ha presentado un articulo, durante las reuniones se expusieron inquietudes, planes y se organizaron actividades, como la realización de soluciones.

3.3.5. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna

3.4.1.Nombre de la actividad: Asistencia al Primer Curso de Estudios Genéticos para Manejo de Vida Silvestre con Énfasis en Tortugas Marinas.

3.4.2. Objetivo: Obtener conocimientos sobre estudios genéticos para manejo de vida silvestre, que pueda ser útil para el desarrollo de la investigación.

3.4.3. Procedimiento: Se asistió al curso impartido por el Dr. Omar Chassin Noria del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Mexico. y organizado por instituciones como FONACON, PROBIOMA, CECON, CMEB, ICADS, CONAP, Fonacyt y la Universidad de San Carlos de Guatemala. El curso fue impartido del 2-8 de agosto. Contando con una parte teórica y otra practica, además de la realización de lecturas de artículos relacionados.

3.4.3Resultados : se asistió al curso de el cuál se pudo obtener información importante para el desarrollo de la investigación y utilización de software para el análisis de datos obtenidos a partir de estudios genéticos, además se pudo obtener bibliografía relacionada con el tema de investigación y se pudo conocer información sobre estudios realizados en el área de interés (biología molecular y genética de poblaciones).

3.4.4.Limitaciones Presentadas: Debido a que la parte practica del curso fue impartida por las tardes, horario de cursos del octavo ciclo, solo pudo asistirse a la parte teórica que se realizo en horas de la mañana (siendo estas 20 horas acumuladas de las 40 totales); sin embargo la parte practica fue el desarrollo de las técnica que se utilizan en la investigación de EDC que realice por lo que no resulto perjudicial.

3.5.1. Nombre de la actividad: Asistencia al Primer Congreso Multidisciplinario de EDC.

3.5.2.Objetivo: Conocer Investigaciones realizadas por estudiantes de EPS y EDC de las 5 carreras de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y obtener información importante acerca de la investigación por profesionales de diversas carreras y de otros países.

3.5.3.Procedimiento: Se asistió a las diversas actividades del congreso realizado los días 1,2 y 3 de septiembre, en el colegio de Profesionales, se pudo obtener información importante acerca de investigaciones realizadas por profesionales de diversas carreras así como de los estudiantes de EDC y EPS, así como de temas de interés para nuestra carrera como la conferencia del manejo de áreas protegidas y los foros realizados.

Limitaciones o dificultades presentadas :Ninguna

3.2.1.Nombre de la actividad: Seminario de Biología Molecular (URL)

3.2.2. Objetivo: Conocer acerca de los principales temas de Biología Molecular.

3.2.3. Procedimiento: Se asistió a un seminario de Biología Molecular, impartido en la Universidad Rafael Landivar, el cual duro 3 días de los cuales solo pudo asistirse a uno.

3.2.3. Resultados: Se pudieron conocer algunos de los principios de la Biología molecular, y temas como alimentos transgénicos, su impacto, políticas relacionadas con su consumo, derechos de autor, etc.

3.2.6. Limitaciones o dificultades presentadas: Solo pudo asistirse un día porque el horario se traslapaba con la presentación del primer informe

bimensual ya que se realizó del 23, 24 y 25 de marzo 2004 y el otro día no se pudo asistir, porque el horario se traslapaba con clases y laboratorio.

3.3.1. Nombre de la actividad: Asistencia al Seminario “Situación de la Meliponicultura y aprovechamiento de sus productos” .

3.3.2. Objetivo: Conocer investigaciones realizadas por otros estudiantes de EDC, y de conferencistas invitados, a cerca de Meliponicultura.

3.3.3. Procedimiento: se asistió al Seminario el día 15 de abril del 2004.

3.3.4. Resultados : se asistió a las 4 primeras conferencias, en las cuales se obtuvo información general sobre la Meliponicultura y algunas de las investigaciones que el personal del LENAP ha realizado.

3.3.5. Limitaciones o dificultades presentadas: No pudo asistirse a la totalidad del evento debido a que el horario de la ultima parte se traslapaba con una evaluación.

3.6.1. Nombre de la Actividad : Asistencia a las Conferencias “Generalidades Ecotoxicológicas” y “Manejo de Desechos Bio-Infeciosos”

3.6.2. Objetivo: Obtener conocimientos acerca del manejo de desechos, que puedan ser aplicadas en el desarrollo de las investigaciones del Lenap.

3.6.3. Procedimiento: Se asistió a dos conferencias organizadas por la AEQ contando con la participación de conferencistas invitados.

3.6.4. Resultados: Se asistió a las dos conferencias que brindaron información importante sobre el manejo de desechos peligrosos, durante la investigación.

3.6.5. Limitaciones o dificultades presentadas:  
Ninguna

### **Actividades no Planificadas**

2.6.1. Nombre de la Actividad: Actualización de Base de Datos. (Actividad no Planificada)

2.6.2. Objetivo. Ingresar información reciente a la base de datos.

2.6.3. Procedimiento: Se ingreso la información proveniente de encuestas realizadas por personal del LENAP en varias regiones, información que es utilizada en varios proyectos de investigación del LENAP.

2.6.4. Resultados Parciales: Se colaboro con la actualización de la base de datos.

2.5.5. Limitaciones o dificultades presentadas:  
Ninguna

3.4.1. Nombre de la Actividad: Detección de Triatominos en trampas naturales.

3.4.2. Objetivo: Controlar la presencia de vectores de la enfermedad de Chagas en bromelias provenientes de regiones en las que se ha realizado rociamiento, para comprobar la efectividad del mismo.

3.4.3. Procedimiento: Se obtienen de bolsas, las bromelias previamente colectadas por personal del LENAP, se examinan detenidamente en búsqueda de insectos, la información de la etiqueta de la bolsa es inventariada en cuaderno, también se anota la presencia de insectos y el grupo al que estos pertenecen.

3.4.4. Resultados: Se examinaron aproximadamente 12 bromelias y se inventario su información.

3.5.5. Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna

3.7.1.Nombre de la Actividad: Extracción de ADN de especímenes de *T. dimidiata* de Río San Juan y Esquipulas, Nicaragua.

3.7.2.Objetivos: Extraer el ADN de especímenes de *T. dimidiata*, para ser utilizados en investigaciones genéticas.

3.7.3.Procedimiento: de los especímenes colectados, muertos se toman las extremidades (el número de extremidades depende del estadio de la chinche), y estas se limpian con alcohol, posteriormente se siguen los pasos de un protocolo de extracción de ADN, cuya metodología sirve para romper células y precipitar y separar proteínas y contaminantes del ADN (ácido desoxirribonucleico), para dejarlo libre para su estudio.

3.7.4.Resultados: Se extrajo el ADN de especímenes de *T. dimidiata* provenientes de dos poblaciones de Nicaragua.

#### 4. Actividades de Investigación

4.1.1 Nombre del proyecto: Comparación de la variabilidad genética de poblaciones de *Triatoma dimidiata* de 3 aldeas de Jutiapa, Guatemala, El Tule, La Brea y EL Carrizal por medio de la técnica de amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR).

Nombre de la Actividad: Elaboración del Perfil de Investigación

Objetivos: Establecer líneas guías y encaminar el desarrollo del protocolo.

Procedimiento: Se desarrollan las principales partes de un protocolo, es decir el diseño experimental, punto de partida de toda investigación, con establecimiento de objetivos e hipótesis de investigación así como un planteamiento del problema; este encaminara el desarrollo de la investigación y la mira a resultados útiles.

Resultados: Se elaboro un perfil de investigación que fue útil posteriormente para la elaboración del Protocolo.

Limitaciones o dificultades presentadas: Ninguna

Nombre de la Actividad: Elaboración del Protocolo de Investigación

Objetivos: Obtener un referente teórico sobre el problema a investigar y construir un marco de referencia en el desarrollo de la investigación.

Procedimiento: Se realiza una investigación bibliográfica exhaustiva del tema a investigar y se enfatiza en la necesidad de la investigación, que aportes nuevos dará, se establecen métodos, análisis a realizar y se establece un cronograma.

Resultados: Se realizo un protocolo de investigación que fue mejorado paulatinamente.

Limitaciones o dificultades Presentadas: El Protocolo fue modificado varias veces, por cambios en las poblaciones a estudiar.

Nombre de la Actividad: Desarrollo de La Investigación

Objetivos: generar la información necesaria para los análisis de resultados

Procedimiento: Primero se realizó la extracción de ADN de las extremidades de las chinches muertas, según el protocolo de extracción, más tarde se realizaron mezclas maestras, para cada uno de los cuatro cebadores utilizados, a este se le añadió el ADN de los especímenes a estudiar, el cual posteriormente fue amplificado, es decir que se obtuvieron muchas copias de él a partir de la técnica de amplificación aleatoria de ADN RAPD'S PCR, el producto obtenido de la amplificación, se montó en geles de agarosa, los cuales se hicieron correr por electroforesis, y estos posteriormente fueron teñidos con Bromuro de Etidio, para revelar los patrones de bandas de ADN obtenidos, los geles fueron fotografiados para su posterior análisis en el programa GeneProfiler 4.2. y RAPDS Scanalytic.

Limitaciones o dificultades Presentadas: Algunos reactivos utilizados no presentaron una buena efectividad, por ello fue necesario repetir varias veces los procesos de amplificación, electroforesis y fotografiado de geles. Además la amplificación pudo iniciarse hasta octubre, cuando se contó con el termociclador necesario para la misma.

Nombre de la actividad: Análisis de Resultados y Elaboración de Informe final

Objetivos: analizar los resultados obtenidos, generar nueva información que aporte soluciones al problema de investigación.

Procedimiento: Las fotografías obtenidas durante el desarrollo de la investigación fueron analizadas en el programa Geneprofiler, se obtuvieron matrices de presencia ausencia de los loci analizados, las cuales permitieron el cálculo de Coeficiente de Fijación  $F_{st}$ , Numero efectivo de migrantes  $N_m$ , Indice de Nei y distancias genéticas a partir de esta información y el referente teórico se realizó un análisis, del cual se generó una discusión de resultados y se elaboraron todos los constituyentes del informe final de investigación.

### *Resumen de Investigación*

**Comparación de la Variabilidad Genética, de Tres Poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) provenientes de El Tule, La Brea y El Carrizal (Jutiapa, Guatemala) por medio de la Técnica de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD-PCR), 2004.**

Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología. Lenap.

Br.Elizabeth Solorzano Ortiz. elisolor@hotmail. com

Asesora de Investigación: Licda. Patricia Landaverde Gonzales.

La enfermedad de Chagas es una importante causa de mortalidad en Guatemala. Debido a que la enfermedad es detectable generalmente en la fase crónica, en la cual el daño causado por el parásito, *Tripanosoma cruzi* (habitante del tracto digestivo del vector *T. dimidiata*), es irreversible. Las estrategias para el control de la enfermedad, son de carácter preventivo, a través del control vectorial, son muchos los esfuerzos realizados en este sentido. Sin embargo, el vector ha presentado una gran adaptabilidad a tres tipos de ecotopos como los son el silvestre, peridomestico y domestico. Dentro del ecotopo domestico, generalmente el vector, se asocia a lugares relacionados con condiciones de pobreza, es decir viviendas del área rural, fabricadas con materiales vegetales. Dentro de las estrategias de control vectorial se ha realizado rociamiento de las viviendas afectadas, sin embargo, después de algunos meses, se encuentra reinfestación del vector, por ello es necesario conocer la dinámica poblacional del vector, para efectivizar las estrategias de control. El objetivo principal de la investigación fue, la realización de una comparación de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. dimidiata*, procedentes de tres aldeas de Jutiapa, Guatemala (área endémica de la enfermedad), para comprobar la estructuración de la población y la existencia de flujo genético de uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala, *T. dimidiata*. Esto para comprender los procesos de migración del vector, a través de coeficientes de Fijación, Índices de Nei y Distancias genéticas. Para conocer los índices mencionados y proveer información de

dicha dinámica poblacional, se utilizó la técnica de amplificación aleatoria de ADN, RAPD'S, variante de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, RCP; esta técnica permite el estudio molecular de especies cuyo genoma es desconocido, a partir de este se obtuvieron patrones de bandas de ADN, los cuales proporcionaron la información necesaria para calcular los índices y coeficientes mencionados. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de un flujo genético bajo para las tres poblaciones, con tasas de migración, menores a un individuo por generación, y coeficientes de fijación grande, que indican la tendencia de las poblaciones a la homocigidad es decir, que están perdiendo variabilidad genética. Sin embargo, en el análisis de agrupamiento se encontró a El Carrizal como la población más distante, como si se tratara de un grupo externo, y La Brea y El Tule formaron una agrupación, por lo que se realizó el cálculo de índices y coeficientes solo para esta agrupación evidenciando la existencia de una tasa migratoria mayor, entre estas dos poblaciones y un coeficiente de fijación menor, que indicaría que existe un flujo genético activo entre estas poblaciones. Resulta de gran importancia el estudio de más poblaciones del departamento de Jutiapa por tratarse este de un lugar endémico para la enfermedad, que permita establecer dinámicas poblacionales del vector y la complementación de esta técnica con otras técnicas moleculares y genéticas

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
PROGRAMA DE EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD  
SUBPROGRAMA DE EDC- BIOLOGÍA

## ***INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN***

Comparación de la Variabilidad Genética, de Tres Poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) provenientes de El Tule, La Brea y El Carrizal (Jutiapa, Guatemala) por medio de la Técnica de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD-PCR).

Elizabeth Solórzano Ortiz

Profesora Supervisora : Licda. Eunice Enríquez

Asesora de Investigación: Licda. Patricia Landaverde González.

VoBo. Licda. Patricia Landaverde Gonzáles

### ***Resumen de Investigación***

**Comparación de la Variabilidad Genética, de Tres Poblaciones de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) provenientes de El Tule, La Brea y El Carrizal (Jutiapa, Guatemala) por medio de la Técnica de Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD-PCR), 2004.**

Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología. Lenap.

Br.Elizabeth Solorzano Ortiz. elisolor@hotmail. com

Asesora de Investigación: Licda. Patricia Landaverde Gonzales.

La enfermedad de Chagas es una importante causa de mortalidad en Guatemala. Debido a que la enfermedad es detectable generalmente en la fase crónica, en la cual el daño causado por el parásito, *Tripanosoma cruzi* (habitante del tracto digestivo del vector *T. dimidiata*), es irreversible. Las estrategias para el control de la enfermedad, son de carácter preventivo, a través del control vectorial, son muchos los esfuerzos realizados en este sentido. Sin embargo, el vector ha presentado una gran adaptabilidad a tres tipos de ecotopos como los son el silvestre, peridomestico y domestico. Dentro del ecotopo domestico, generalmente el vector, se asocia a lugares relacionados con condiciones de pobreza, es decir viviendas del área rural, fabricadas con materiales vegetales. Dentro de las estrategias de control vectorial se ha realizado rociamiento de las viviendas afectadas, sin embargo, después de algunos meses, se encuentra reinfestación del vector, por ello es necesario conocer la dinámica poblacional del vector, para efectivizar las estrategias de control. El objetivo principal de la investigación fue, la realización de una comparación de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. dimidiata*, procedentes de tres aldeas de Jutiapa, Guatemala (área endémica de la enfermedad), para comprobar la estructuración de la población y la existencia de flujo genético de uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala, *T. dimidiata*. Esto para comprender los procesos de migración del vector, a través de coeficientes de Fijación, Índices de Nei y Distancias genéticas. Para conocer los índices mencionados y proveer información de dicha dinámica poblacional, se utilizó la técnica de amplificación aleatoria de ADN, RAPD'S, variante de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, RCP; esta técnica permite el estudio molecular de especies cuyo genoma es desconocido, a partir de este se obtuvieron patrones de bandas de ADN, los cuales proporcionaron la información necesaria para calcular los índices y coeficientes mencionados. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de un flujo genético bajo para las tres poblaciones, con tasas de migración, menores a un individuo por generación, y coeficientes de fijación grande, que indican la tendencia de las poblaciones a la homocigidad es decir, que están perdiendo variabilidad genética. Sin embargo, en el análisis de agrupamiento se encontró a El Carrizal como la población más distante, como si se tratara de un grupo externo, y La Brea y El Tule formaron una agrupación, por lo que se realizó el cálculo de índices y coeficientes solo para esta agrupación evidenciado la existencia de una tasa migratoria mayor, entre estas dos poblaciones y un coeficiente de fijación menor, que indicaría que existe un flujo genético activo entre estas poblaciones. Resulta de gran importancia el estudio de más poblaciones del departamento de Jutiapa por tratarse este de un lugar endémico para la enfermedad, que permita establecer dinámicas poblacionales del vector y la complementación de esta técnica con otras técnicas moleculares y genéticas

## **2. INTRODUCCIÓN**

La enfermedad de Chagas es transmitida por vectores del género Triatominae, que se encuentran ampliamente distribuidos en América Latina, desde México hasta Argentina

(WHO, 1999). En Guatemala, *Triatoma dimidiata* constituye el vector de mayor importancia. Además en otros países de Mesoamérica, *Triatoma dimidiata* figura como uno de los vectores de mayor importancia, ya que *T. dimidiata* es considerado como endémico de Centroamérica. La enfermedad de Chagas generalmente pasa desapercibida durante las fases en las cuales puede curarse; afecta en grado variable diversos órganos especialmente el corazón y órganos digestivos, siendo el daño irreversible. Una de las estrategias más eficientes de erradicación de la enfermedad de Chagas, es el control del vector. En Guatemala se han tomado medidas de control vectorial como el rociamiento, sin embargo este, no ha resultado del todo efectivo, debido a la reincidencia del vector meses después del rociamiento. El conocimiento de la estructuración poblacional de *T. dimidiata*, aporta evidencias necesarias para establecer cuales son las causas de la reincidencia y las medidas que pueden tomarse para optimizar los esfuerzos en la erradicación del vector.

El estudio genético de las poblaciones de *T. dimidiata* por medio de la técnica RAPD PCR (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), fue utilizado para establecer diferencias entre las poblaciones estudiadas del vector (El Tule, La Brea y El Carrizal, Jutiapa Guatemala); diferencias que morfológicamente no pueden establecerse. La comparación de bandas de ADN obtenidas por la técnica anteriormente mencionada (a partir de la extracción de ADN de las extremidades de los triatominos), al ser analizadas con programas estandarizados, proveyó la información sobre la estructuración de la población, migración y flujo genético de las poblaciones mencionadas. La utilización de esta técnica permite el estudio molecular de especies, cuyo genoma es aún desconocido, por ello resulta sumamente útil en el estudio molecular de *T. dimidiata*. La información obtenida debe considerarse en los planes de control vectorial, ya que indican interacciones poblacionales.

### **3.ANTECEDENTES**

#### **3.1.Definición de la enfermedad**

La enfermedad de Chagas, fue descubierta en el año de 1909 por el Dr. Carlos Chagas, y esta es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por vectores hematófagos, pertenecientes a la familia triatominae. Los vectores se encuentran ampliamente distribuidos en América Latina desde México hasta Argentina (WHO, 1991; Schoefield, 1994).

La enfermedad de Chagas es una causa importante de mortalidad en Centroamérica, la WHO (1999) reportó que 100 millones de personas se encuentran en riesgo de infectarse en América Latina y que 45,000 personas mueren anualmente por la enfermedad (WHO, 1991). La infección afecta en grado variable, diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y tracto digestivo. (Tabarú et. al 1999).

La forma más eficiente de protección contra la infección es el control del vector. (Tabarú et. al 1999).

El insecto vector, se infecta al ingerir sangre de los mamíferos en la fase de tripomastigote de *T. cruzi*, el parásito se desarrolla en el tracto digestivo del insecto, cuando el insecto infectado pica al mamífero, casi inmediatamente defeca, sus heces contienen a los tripomastigotes metacíclicos, que corresponden a la fase infectiva del parásito, estos atraviesan la piel por las mucosas o por heridas. ( Aguilar FJ., 1997)

#### **3.1.2.Características de la Enfermedad de Chagas**

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

#### **3.1.3.Transmisión**

El ciclo de vida del parásito de la enfermedad de Chagas , *Trypanosoma cruzi*, se desarrolla en fases, de las cuales una involucra un vector invertebrado, que son insectos de la familia Reduviidae , conocidos comúnmente con el nombre de chinches picudas ; y un huésped vertebrado, que puede ser el hombre, perro, gato, roedores y otros mamíferos domésticos y silvestres (Yapur, 1994).

Las especies más importantes de triatomínicos transmisores son: *Triatoma dimidiata* (La más importante en Guatemala) , *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma nitida*. Las dos especies más importantes en el territorio nacional son *T. dimidiata*, *R. prolixus* (Yapur, 1994).

Los triatomínicos se infectan al ingerir tripomastigotes de la sangre periférica de mamíferos infectados. En la luz del mesogastrio de los insectos, los organismos se multiplican en forma de epimastigotes y después de un período de 15 a 30 días, su proliferación conduce a la formación de tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del insecto (Yapur, 1994).

Estas formas infecciosas se expulsan con las heces del triatomino, y los tripomastigotes empiezan la infección en nuevos huéspedes al penetrar por las abrasiones de la piel o por las membranas mucosas. Esta transmisión se denomina de estación posterior o por contaminación (Yapur, 1994).

#### **3.1.4. Formas de Infección**

En el hombre el *T. cruzi* se transmite por contaminación con las heces de los insectos. La transmisión del parásito puede efectuarse también por medio de transfusiones sanguíneas, por vía transplacentaria (congénita) o contacto accidental con la sangre de animales infectados, además de la vía oral (Yapur, 1994).

#### **3.2. Información General sobre Familia *Triatominae*.**

Los triatomínicos pertenecen al Orden Hemiptera (Chinches Verdaderas), y la subfamilia Triatominae, estos son caracterizados por su hábito hematófago, están distribuidos en América donde se conocen más de 100 especies y algunos son vectores del parásito que transmite la enfermedad de Chagas. Por su comportamiento y fisiología similares, todas las especies tienen la capacidad de ser portadoras del protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Lent & Wygodzinsky, 1979). Sin embargo condiciones como, la capacidad de adaptación del vector al hábitat humano y el alto grado de antropofilia (alimentación de sangre humana) que este posea lo pueden convertir en un vector efectivo de la enfermedad de Chagas en humanos (Lent & Wygodzinsky, 1979). Las especies de mayor importancia epidemiológica son las que colonizan fácilmente las viviendas de los humanos y viven en grietas de las paredes de casas rurales, especialmente aquellas asociadas a condiciones de pobreza, fabricadas de materiales como el bajareque y otros materiales de origen vegetal; las chinches salen de las grietas para alimentarse de los ocupantes en reposo, principalmente durante la noche (Schofield, 1994.).

Se caracterizan por presentar un aparato bucal que consiste en un labio segmentado en forma de canoa, que en los fitófagos es largo y recto mientras que en los hematófagos no alcanza el primer par de

coxas. El labio de los hematófagos se diferencia del que poseen los depredadores en que en los primeros es recto mientras en los últimos es curvo. Son considerados insectos hemimetabolos es decir, de metamorfosis incompleta. (Zeledón, 1981; Beaty & Marquardt, 1996) Los estadios ninfales son morfológicamente similares al adulto y comparten los mismos hábitos alimenticios y nichos ecológicos, por lo que todos poseen el mismo potencial en la transmisión de la enfermedad. (Beaty & Marquardt, 1996)

### **3.3.Vector *Triatoma dimidiata*.**

#### **3.3.1 Taxonomía:**

Reino: Animalia.

Phylum: Artropoda.

Clase: Insecta.

Orden: Hemíptera.

Familia: Reduviidae.

Sub Familia: Triatominae.

Género: *Triatoma*.

Especie: *T. dimidiata*. (Ayau, 1998)

#### **3.3.3. Biología.**

Organismos atraídos por la luz, y el dióxido de carbono expelido; son los machos quienes son más atraídos a los hábitos domésticos y peridomésticos. No son buenos voladores por ello su dispersión puede ser por medio de transporte pasivo, llevados en mercancía o madera por parte del hombre. (Schofield, 2001) Son organismos ovíparos, la oviposición comienza de 10 a 30 días después de la copulación, y puede continuar por varios meses. El número total de huevos puestos durante el ciclo de vida de la hembra varía de acuerdo a los factores externos, como disponibilidad de alimento, temperatura y humedad. Se ha encontrado un rango de oviposición entre 500 (el más usual) hasta más de 1,000 huevos. Las hembras vírgenes pueden poner huevos, aunque en menor cantidad e infértiles. (Lent & Wygodzinsky, 1979) . Después de alimentarse pueden pasar varios meses sin alimentarse reduciendo únicamente sus actividades durante las épocas frías del año. (Lent & Wygodzinsky, 1979; Zeledón, 1981)

#### **3.3.4. Ecotopos.**

Tipos de habitats de *T. dimidiata*, estos pueden ser dentro de la casa, en las cercanías de la casa o en remanentes de bosques o bosque no intervenidos (Landaverde 2004).

#### 33.4.1.Silvestre.

Los vectores se encuentran frecuentemente en ambientes naturales como bosques y selvas. Se alimentan de sangre de mamíferos, especialmente Zarigüeyas (*Didelphys marsupialis*). Suelen encontrarse en refugios de armadillos (*edentados*), en palmeras, árboles viejos y huecos, cuevas de murciélagos, montículos de piedra, etc. (Zeledón, 1981; Carcavallo, 2000; Schofield, 2000)

#### 3.3.4.2. Peridoméstico.

Se encuentran cerca o alrededor de casas rurales, en gallineros, perreras, chiqueros entre otros . Se alimentan de animales domésticos (perros, gatos, gallinas), los cuales constituyen reservorios de alimento para las chinches. (Lent & Wygodzinsky, 1979)

#### 3.3.4.3.Doméstico.

Se les llama así a los organismos que se encuentran dentro de las viviendas, cerca de los lugares donde duermen las personas que habitan la casa o animales domésticos que viven en el interior de la misma, y que finalmente llegan a alimentarse de humanos (Lent & Wygodzinsky, 1979 ).Generalmente *T. dimidiata* suele encontrarse en áreas rurales, en donde predominan las condiciones de pobreza, que se encuentran siempre relacionadas con la enfermedad, como se menciono anteriormente, casas de muros de bajareque, techos de palmas u otros materiales orgánicos, además suelen encontrarse en las grietas de los muros o detrás de plásticos o papeles que se encuentran frecuentemente pegados en los muros de las casas. Sin embargo, también se le ha encontrado en ambientes peri-urbanos e incluso urbanos como en Tegucigalpa, San José y Guayaquil. (Schofield, 2000)

#### 3.3.5.Distribución de *T. dimidiata*.

*T. dimidiata* posee una amplia distribución geográfica, desde el centro de México ( Campeche, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Quintana Río, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán) pasando por Belice, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, en algunas provincias de Venezuela, Colombia y Ecuador, extendiéndose hasta el norte de Perú. La altitud varía del nivel del mar hasta a 2,700 metros sobre el nivel del mar. (Carvalho et. al., 2000; Lent & Wygodzinsky, 1979; Harris et al., 2002; Schofield, 1994)

### 3.3.6.1. Condición de *T. dimidiata* en Guatemala.

*T. dimidiata* es el vector más importante en Guatemala debido a que presenta una amplia distribución en el territorio. Se encuentra en 21 de los 22 departamentos del país (Tabarú et. al, 1999). Se le encuentra en condiciones domésticas, peridomésticas y silvestres. La zona oriental del país, es el área de mayor endemidad (anexo 3), presentando índices de infestación domiciliar entre 12 y 45 %. Se ha trabajado con rociamiento selectivo, educación, promoción para mejoramiento de viviendas y vigilancia entomológica con participación de la comunidad. (OPS, 2002)

**Clima:** En casi todo el país domina el tipo de clima cálido tropical, aunque las temperaturas varían con la altitud. La temperatura tiene un promedio anual de 20 °C. El clima de las regiones costeras es de características más tropicales; la costa atlántica es más húmeda que la del Pacífico, con una temperatura cuya media o promedio anual es de 28.3 °C. La estación de lluvias se presenta entre mayo y noviembre. Las precipitaciones anuales de la zona norte oscilan entre los 1,525 mm y los 2,540 mm; la ciudad de Guatemala, en las montañas del sur, recibe cerca de 1,320 mm de promedio anual. (González, 2000; Jackson, 2001)

## 3.4 Descripción de lugares de Estudio

**El Tule:**

Caserío de la aldea Santa Gertudis, municipio de Quesada, Jut. Al sur del parje Joya Verde. 1 ½ Km. Por vereda al norte de la aldea. 1060 mts SNM, lati. 14° 19' 35", long. 90° 01' 46".

**La Brea:**

Aldea mun. Quesada, Jut. En la afluencia de la quebrada El Beneficio en la Quebrada Seca; por rodadura rumbo sureste son 3 Km. A la aldea Santa Gertrudis, de allí por camino de revestimiento suelto al sur hay 6 Km. A la cab. Mun. Escuela: 1,250 mts. SNM, lat. 14° 19' 43", long. 90° 03' 50".

**El Carrizal:** de la aldea Marías Montaña, mun., Jutiapa, Jut. 4Km. Sobre la ruta departamental, Jutiapa 2 Km al este de la aldea. 1,460 mts. SNM. Lat. 14° 22' 30", long. 89° 59' 03".

Caserío de

## 3.5. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. (RCP)

### (o PCR Polimerase Chain Reaction)

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es una técnica en la que se utiliza una enzima llamada polimerasa para multiplicar rápidamente un pequeño fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN), una molécula de doble cadena en forma de escalera que transporta el material hereditario en todos los seres vivos. Cada ciclo de RCP consta de tres fases. En la primera, llamada desnaturalización, se calienta el ADN para separar las dos cadenas que lo forman. En la segunda, llamada templado, la temperatura de la mezcla se rebaja para que los cebadores o fragmentos iniciadores del ADN se enlacen con las cadenas separadas de esta molécula. En la tercera o polimerización se eleva de nuevo la temperatura para que la enzima polimerasa copie rápidamente el ADN. En cada ciclo de RCP se duplica todo el ADN presente en la reacción, de manera que en unas pocas horas se obtienen más de mil millones de copias de un solo fragmento (Encarta 2000).

### 3.6. Técnica de RAPD-PCR

La técnica de RAPD-PCR ( Randomly amplified Polymorphic DNA. o Amplificación aleatoria del ADN polimórfico) es una modificación de la RCP tradicional utilizando cebadores oligonucleótidos de aproximadamente 10 pares de bases en una secuencia aleatoria, amplificando muchas regiones del genoma (Brown, 2001). En una amplificación, los amplicones resultantes pueden ser analizados por electroforesis en gel (Landaverde 2004). El conjunto de fragmentos amplificados es lo suficientemente variable para poder detectar polimorfismo entre individuos de una misma especie con esta técnica. El fragmento amplificado se define como un loci dominante. Se supone que éstos fragmentos amplificados son loci (plural de locus, lugar del cromosoma que ocupa un gen) dominantes que se segregan independientemente, o sea que pueden ser considerados como loci individuales (Apostol et al 1994).

### 3.7. Genética de Poblaciones.

La genética de poblaciones es el estudio del comportamiento de los genotipos y alelos en una población, los cuales son la base de la estructura poblacional de las comunidades animales que conforman los ecosistemas y su biodiversidad. Los cambios que puedan darse en las frecuencias génicas de las poblaciones, a causa de diversos factores ecológicos, son los causantes a través del tiempo de "la evolución". (Hartl & Clark, 1989; Hedrick, 1983; Falconer, 1981) Para el estudio, definición y comprensión de los cambios en las frecuencias génicas es necesaria la utilización de un principio que describe una situación hipotética en la cual no existe cambio en el acervo genético (Frecuencias de alelos) ya que esta sigue las condiciones de una población ideal, el equilibrio Hardy-Weinberg. Las condiciones que deben cumplirse para que una población se encuentre en equilibrio Hardy-Weinberg,

son : que la población de sea de tamaño infinito, con apareamiento aleatorio , sin mutación, ni migración, ni selección natural.

Para el conocimiento de las frecuencias en este principio, este se basa en el hecho de que las frecuencias génicas observadas en la población son exactamente las mismas que las frecuencias génicas de los padres, debido a que;  $p$  (alelo dominante), y  $q$  (alelo recesivo) se mantienen constantes a través de las generaciones, (Hartl & Clark, 1989) Siendo únicamente las frecuencias genotípicas las que varían;

- $AA = p^2$

- $Aa = 2pq$

- $aa = q^2$

Estos cambios pueden deberse a excepciones en el cumplimiento de las condiciones de una población ideal, provocando la estructuración de las poblaciones y a muy largo plazo “la separación de dos poblaciones en especies diferentes” es decir evolución. (Apostol et. al., 1993)

### 3.7.1. Frecuencias Génicas y RAPD PCR.

El proceso utilizado, para el estudio genético de poblaciones consiste en cuantificar cada uno de los loci replicados, (por medio de la detección de cada una de las bandas) después de amplificar las muestras y correrlas en los geles de agarosa (Landaverde, 2004). Para ello se usa el programa de análisis de imágenes RFLPscan, que traduce la fotografía que se toma a cada uno de los geles a una matriz binaria de “0” y “1”, siendo el “0” la ausencia de banda y el “1” la presencia. Posteriormente, en base a la matriz binaria, es posible calcular las frecuencias génicas para la realización de cálculos de distancia genética y migración de las poblaciones por medio del Índice de Nei y el Índice de Fijación  $F_{st}$  respectivamente.

### 3.7.2. Flujo Genético .

#### 3.7.2.1. Coeficientes de Fijación: (F)

Son coeficientes de correlación diferentes al estadístico

F. Se utiliza para conocer la variabilidad genética de una población (T) subpoblación (S) e individuos (I).

De ahí se deriva que;

$F_{ST}$  sea la medida de la diferenciación genética de una subpoblación y siempre es positiva.

$F_{IS}$  es una medida de la desviación de las proporciones Hardy Weinberg dentro de la subpoblación, cuando estas son positivas indican una deficiencia de heterocigotos y por lo tanto muestran una población cerrada sin migración.

$F_{IT}$  es la desviación del equilibrio Hardy Weinberg del individuo con relación a la población. (Tabachnick & Black, 1996; Hartl & Clark, 1989)

Existen dos formas de calcularse, una es según Cockeham y Weir que se basa en valores de varianza para calcularlos, así:

$$F_{ST} = \frac{V(q)}{q(1-q)} \quad (\text{Hartl \& Clark, 1989})$$

La otra formula según Lynch se basa en diferencias entre los heterocigotos esperados y los encontrados dentro de subpoblaciones y en la población total, así:

$$F_{ST} = \frac{H_s - H_o}{H_s} \quad (\text{Hartl \& Clark, 1989})$$

Donde;  $H_s$  son los heterocigotos esperados dentro de las subpoblaciones.

$H_o$  son los heterocigotos observados dentro de las subpoblaciones.

$H_T$  son los heterocigotos esperados en la población total en todos los loci.

$$F_{IS} = \frac{H_T - H_o}{H_T}$$

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_s}{H_T} \quad (\text{Hartl \& Clark, 1989; Hedrick, 1983})$$

(Landaverde, 2004)

### 3.7.2.2. Índice de Nei.

Es la medida de distancia genética más ampliamente utilizada, estas sirven para medir la cantidad de variabilidad genética compartida entre grupos, lo cual al ser analizado puede decirnos si éstos, poseen algún tipo de conexión la cual podría ser causada por migración. Para un locus simple con  $n$  alelos, la identidad genética de Nei es;

$$I_N = \frac{J_{XY}}{(J_X \cdot J_Y)^{1/2}}$$

DONDE

$$J_{XY} = \sum_{i=1}^n p_{ix} \cdot p_{iy}$$

$$J_X = \sum_{i=1}^n p^{i2x}$$

$$J_Y = \sum_{i=1}^n p^{i2y}$$

donde  $x$  y  $y$  representan a las dos poblaciones que se comparan.

A partir del estadístico  $F_{st}$ , se puede estimar el número efectivo de migrantes. ( $N_m$ )

Finalmente puede concluirse que las frecuencias génicas de las poblaciones a estudiar dependen de la cantidad de migrantes ( $m$ ) y del tamaño de la población ( $N$ ).

(Hartl & Clark, 1989; Hedrick, 1983; Tabachnick & Black, 1996; Calderón, 2002)

### 3.8. Trabajos realizados con la Técnica de RAPD-PCR.

El laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –Lenap– de la Escuela de Biología, Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ha realizado diversos estudios sobre la estructuración poblacional de *T. dimidiata* tanto en el área molecular como morfométrico. En el área molecular, El –Lenap– ha trabajado en colaboración con la Universidad de Loyola en Nueva Orleans.

La técnica generalmente utilizada hasta ahora ha sido RAPD-PCR, la cual se ha basado en trabajos de Apostol y colaboradores. (Apostol et. al., 1993; Apostol et. al., 1994; Apostol et. al., 1996, Landaverde, 2004)

En dichas investigaciones se ha logrado establecer el número de familias de *T. dimidiata* en una casa, pudiendo indicar la existencia de una endogamia moderada en las mismas ante la panmixia que la población presenta por la entrada de migrantes en una cantidad considerable, lo cual es un dato importante para la elaboración de estrategias de control del vector (Monroy et. al., 2002, Landaverde, 2004).

También se han realizado trabajos de comparación entre diversas poblaciones de Guatemala. Uno de los primeros fue la comparación de la diversidad genética de especímenes de tres localidades en el departamento de Santa Rosa, en el que se encontró distancias genéticas muy pequeñas entre las casas muestreadas ( $D = 0.013 - 0.022$ ) y entre las localidades ( $D = 0.0199$ ), tuvo un índice de fijación bajo también ( $F_{st} = 0.019 \pm 0.033$ ) y un número de migrantes  $N_m = 9.7$  a 12 entre casas y entre localidades, respectivamente. Esto sugiere que las casas entre pueblos no constituyen una población aislada sino una población panmíctica. (Dorn et al., 2003)

De igual manera se han hecho trabajos, comparando poblaciones de *T. dimidiata* en diferentes departamentos del país localizados en las vertientes del Atlántico y del pacífico y se ha encontrado

que no hay una asociación clara de las mismas, influenciadas por factores geográficos o por pertenecer a determinadas vertientes. Se observó que las poblaciones tienden a agruparse de acuerdo a las condiciones ambientales existentes y al ecotipo al cual pertenecen, sea éste doméstico o silvestre. Los valores de  $D = 0.04 - 0.254$  y de  $F_{st} = 0.246$  con Lanquín y  $F_{st} = 0.171$  sin Lanquín indican que la presencia de Lanquín aleja genéticamente a las otras poblaciones y al comparar el Número efectivo de migrantes  $N_m = 0.8$  con Lanquín y  $N_m = 1.2$  sin Lanquín, se deduce que Lanquín es una población que se encuentra aislada genéticamente del resto. (Calderón, 2002, Landaverde, 2004.) Dentro de las investigaciones mas recientes se encuentra una comparación de poblaciones silvestres y domesticas de *T. dimidiata* de México y Centroamérica (Landaverde, 2004)

También se ha elaborado otros trabajos de comparación de diversas especies de triatomíneos, donde se ha encontrado distintos patrones para cada especie. Sin embargo existen otros estudios como los elaborados para la diferenciación genética de *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius colombiensis* por medio de ADN<sub>r</sub> y RAPD-PCR, que ha permitido establecer que existe un índice de fijación de 0.24 y una migración efectiva de 0.6 individuos por generación, lo cual indica que no existe un flujo genético entre ambas especies para mantener una homogeneidad genética. ( Jaramillo et. al., 2001)

#### ***4.Planteamiento del Problema***

La enfermedad de Chagas, constituye una amenaza importante para la salud en América Latina, no tiene cura en la fase crónica, debido a que una vez se afectan órganos como el corazón, el daño es irreversible. Los tratamientos en la fase aguda de la enfermedad son muy costosos y representan un fuerte impacto económico en los países, por esta razón y por que reduce la capacidad de trabajo de las personas infectadas.

Esta enfermedad es transmitida por insectos triatóminos, que se encuentran ampliamente distribuidos desde México hasta Argentina (Tabarú, et al. 1999).

En Guatemala el vector de mayor importancia es *Triatoma dimidiata* (Tabarú, et al. 1999). Debido a la capacidad de adaptarse a hábitos domiciliarios y peridomiciliarios, el vector, cuyos habitats silvestres han sido degradados, migra en la búsqueda de nuevos habitats, en viviendas del tipo que son asociados con condiciones de pobreza, generalmente en el área rural, cuyos materiales son óptimos para el desarrollo del vector (materiales vegetales, bajareque, paredes agrietadas etc) (Schofield, 1994.).

Estudios realizados han demostrado que la forma más eficiente de protección contra la infección es el control vectorial; sin embargo, después de algunos meses de rociamiento, se encuentra una reinfestación por el vector. Aún no se saben las causas que originan la reincidencia del vector, se han planteado varias hipótesis para la explicación de este problema, unas apuntan a problemas con la efectividad del rociamiento y demás medidas de control y otras, a la migración de poblaciones silvestres y peridomiciliares; por ello resulta necesaria la comparación genética de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* provenientes de 3 aldeas del departamento de Jutiapa, lugar considerado como endémico de la enfermedad y cuyos habitantes se encuentran en alto riesgo de poseer la enfermedad, dicha comparación se espera provea evidencias que junto a otras investigaciones en la misma línea, realizadas por el Laboratorio de entomología aplicada y parasitología, permitan conocer las razones de la reincidencia y las migraciones en países de Centroamérica.

## **5.JUSTIFICACIÓN**

La enfermedad de Chagas constituye una causa importante de mortalidad en América Latina, se ha comprobado que una de las formas más efectivas en contra de la infección, es el control del vector, diversas instituciones como el LENAP y el Ministerio de Salud en Guatemala, han realizado esfuerzos para controlar los vectores de la enfermedad, sin embargo, después de algunos meses de rociamiento en la viviendas, ocurre reinfestación por el vector.

El principal vector en Guatemala es *Triatoma dimidiata*, el cual ha sido considerado como endémico de Centroamérica. No se tienen aún un conocimiento preciso de las razones por las cuales ocurre la reincidencia del vector después de la aplicación de químicos; se han planteado varias hipótesis para la explicación de este problema, unas apuntan a problemas con la efectividad del rociamiento y demás medidas de control y otras a la migración de poblaciones silvestres y peridomiciliares; por ello es necesario establecer una estructuración de la población del vector, a partir del conocimiento de la diferenciación genética. Es necesario realizar una comparación genética de las poblaciones de *Triatoma dimidiata* provenientes de tres aldeas del departamento de Jutiapa (La Brea, El Tule y El Carrizal) Guatemala, por tratarse este de un área endémica de la enfermedad y por ser este uno de los departamentos del país cuya población ha sido de las más perjudicadas por la enfermedad y cuyos habitantes se encuentran en mayor riesgo de contraer la enfermedad (poner cita de alto riesgo). A partir de la comparación genética de las poblaciones de *T. dimidiata*, se puede comprender su distribución geográfica, dispersión, estructuración de las poblaciones, flujo genético entre poblaciones y repercusiones en la aplicabilidad y efectividad de las medidas de control. La técnica de RAPD- RCP (amplificación aleatoria del ADN polimórfico) provee la sensibilidad suficiente para la diferenciación de poblaciones y variedades de *Triatoma dimidiata*. Se busca comprobar si existe una semejanza genética en dichas poblaciones y si existe flujo genético

## **6. OBJETIVOS**

### *Generales*

- ❑ Realizar una comparación de la variabilidad genética de las poblaciones de *T. dimidiata* procedentes de 3 aldeas de Jutiapa: La Brea, El Carrizal y El Tule, Jutiapa Guatemala; para comprobar la existencia de flujo genético.
- ❑ Comprobar la estructuración de la población.
  
- ❑ Establecer la existencia de flujo genético del vector de la enfermedad de Chagas *T. dimidiata* en las tres poblaciones estudiadas, para comprender los procesos de migración del vector.

### Objetivos Específicos

- ❑ Analizar los patrones de bandas obtenidos para obtener:
- ❑ El índice de fijación ( $F_{st}$ ) y el Número efectivo de migrantes mínimo ( $N_m$ ).
- ❑ Determinar la tasa de migración entre poblaciones (migrantes/ generación).
- ❑ Comparar la distancia genética entre las poblaciones utilizando el índice de Nei como estadístico.

## ***7. HIPOTESIS***

Existen diferencias genéticas entre las poblaciones de *Triatoma dimidiata* provenientes de las tres distintas localidades estudiadas (El Tule, La Brea, El Carrizal; Jutiapa, Guatemala); por bajo flujo genético.

## ***8. METODOS***

### **7.1. DISEÑO**

#### **7.1.1. POBLACIÓN**

Especímenes de *T. dimidiata* provenientes de El Tule, El Carrizal y La Brea; Jutiapa, Guatemala

### 7.1.2.MUESTRA

30 individuos de *T. dimidiata* de cada población.

## 7.2.TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL PROCESO DE INVESTIGACIÓN

### 7.2.1.RECOLECCIÓN DE DATOS

#### Colecta de Material Biológico.

El material biológico (las chinches), fue colectado en diferentes años antes de la elaboración de este trabajo, por el personal del Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (Lenap), y que se encuentra en una colección entomológica (en frascos con alcohol-glicerina al 2%)

#### Material biológico. (Chinches Muertas)

Los ejemplares previamente colectados son introducidos a una base de datos, de la colección de referencia. Esta base de datos se encuentra clasificada según país, y especie de insecto triatomineo.

Esta se elabora de la siguiente manera: los organismos recientemente muertos (máximo tres días) son disectados en busca de seropositividad para el parásito *Tripanosomas cruzi*, como paso siguiente se le asigna un número de identificación, en el cuaderno correspondiente. (Según especie de triatomineo o país) Se procede identificar con el mismo número un frasco de plástico y se introduce al individuo con alcohol glicerina al 5%. Para el procesamiento de muestras se procede a cortar las patas de donde se extrae el ADN (Landaverde, 2004).

13

#### Extracción de ADN.

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

Adultos y 5° Estadío: 2 patas.
--------------------------------

4 y 3° estadio: 3 patas.

2° estadio: 4 patas.

1° estadio: el individuo entero

- Lavado con 500 µl etanol y luego con agua.
- Se agregan 100µl del buffer de extracción. (anexo 6)
- Se maceran las muestras con pistilos estériles.
- Se centrifuga momentáneamente para homogenizar todo al fondo del tubo de ensayo.
- Se incuban las muestras a 65° durante 15 -30 minutos.
- Se agrega 14µl de K-Acetato 8M para una concentración final de 1M.
- Se mezcla e incuba en hielo durante 15 minutos.
- Se centrifuga en frío 10 minutos a máxima velocidad.(a 14,000rpm).
- Se alícuotan 200µl de etanol frío al 95% . Se transfiere el sobrenadante para cada muestra al tubo con etanol frío al 95%. Se agita (Se pueden guardar las muestras a este nivel por tiempo indefinido).
- Se incuba en hielo 10 min., luego se centrifuga 20 min. en frío a máxima velocidad. (14,000 rpm) Se descarta el sobrenadante.
- Se disuelve el precipitado (hebras de ADN) en 100 µl etanol al 70 % y después en etanol al 95 %. No se agita para no disolver el precipitado de ADN.
- Se disuelve el precipitado en 50 µl de TE estéril con 1U ARNasa.
- Se guardan las muestras a -70° si no se van a usar inmediatamente. (Coen et. al., 1982, Landaverde, 2004).

### Amplificación por medio de RAPD PCR.

#### Preparación de Master Mix.

- En un eppendorf estéril se hace la mezcla para cada reacción de 41µl totales (37µl MMx + 2µl de ADN + 2µl Taq.) (Anexos 7)
- Se conserva en frío después de agregar los dNTP's (nucleótidos) y el primer (Cebador)
- Se usan los siguientes cebadores de Operon;  
H3; 5`CAT CCC CCT G 3` L1; 5` CGG CCC CTG G 3`  
L4; 5` GTG GAT GCG A 3` L5; 5`AAG AGC CCGT -3`
- Se agrega a los tubos la cantidad de Master Mix (MMx) estandarizada. (37 µl de MMx para cada uno). Se alícuota la Taq polimerasa para la amplificación. (García et. al., 1998, Landaverde, 2004).

### Adición del ADN.

- Se agrega la cantidad de ADN estandarizada. (2 µl.)
- Se coloca en el termociclador los tubos con ADN y su MMx. Se inicia amplificación y se espera a que la temperatura ascienda a 80° C. Cuando llega a esta temperatura se coloca la Taq. (2 µl)
- El ciclo del programa de amplificación es el siguiente:

#### Cebadores L1, L4 y L5:

- a. Inicio; 15 min. a 80° C.
- b. Primeros ciclos, 1 minuto a 94° C. 2 minutos a 30°C y 1 minuto 72° C.
- c. 32 ciclos; 30 segundos a 94° C, 2 minutos a 40°C y 1 minuto a 72° C.
- d. Ultimo ciclo; 30 segundos a 95° C, 2 minutos a 40° C, y 5 minutos a 72° C.
- e.
- f. Finalmente la temperatura baja a los 4° C.

#### Cebador H3:

- a. Inicio; 15 min. a 80° C.
- b. Primeros ciclos, 1 minuto a 94° C. 2 minutos a 30°C y 1 minuto 72° C.
- c. 32 ciclos; 30 segundos a 94° C, 2 minutos a 42.7°C y 1 minuto a 72° C.
- d. Ultimo ciclo; 30 segundos a 95° C, 2 minutos a 42.7° C, y 5 minutos a 72°C.
- e. Finalmente la temperatura baja a los 4° C.

### Montaje y Corrimiento de Geles.

#### Preparación de los geles.

- Se mezclan 2.7 g. de agarosa y 180 ml. de TBE (anexo 6 ) (1.5% de agarosa)
- Se calienta hasta que la agarosa se disuelva.
- Se enfría más o menos a 60° C y se vierte en el molde.  
(Landaverde, 2004)

#### Montaje de los Geles por Electroforesis.

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

- Se mezcla 1µl Colorante de carga y se mezclan 10µl de muestra de ADN amplificado y se vierten en el pozo.
- Se corre el gel en la cámara de electroforesis, a 89 voltios por 2 horas y media. 15
- Se coloca el gel en un recipiente con bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml., (anexo 6) por más o menos 30 a 45 minutos, para colorear las bandas.

#### Lectura y Fotografía Geles.

- Se leen las bandas de ADN de los geles en un transiluminador a una longitud de onda de luz UV 256 nm.
- Se toma una fotografía digital.

### 7.2.2.ANALISIS DE DATOS

#### Análisis de Geles.

- Se analizan las fotografías de los geles por medio del programa Geneprofiler versión 4.03 de Scanalitic, para la obtención de una matriz binaria, donde la presencia de una banda es igual a 1 y la ausencia igual a 0.
- Se calculan las frecuencias génicas asumiendo que la población estudiada se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg y que las bandas presentes son alelos dominantes.
- Se seleccionan los loci con frecuencias alélicas entre 0.1 y 0.6, debido que las presentes en este rango contienen mas información (Apóstol) . Los demás alelos se descartan para evitar introducir sesgo con las bandas poco frecuentes o propios de la especie.  
(Landaverde 2004)

#### Análisis Estadístico.

- Se calcula el índice de fijación ( $F_{st}$ ) y del Número efectivo de migrantes mínimo ( $N_m$ ), a través del programa RAPDFST, para determinar la el numero absoluto de migrantes independientemente del tamaño dela población entre

poblaciones. (Black, 1997), el índice de fijación cuantifica el grado de endogamia causado por la estructuración de las poblaciones.

- Se comparan la distancia genética entre las poblaciones utilizando el índice de Nei como estadístico.(Landaverde, 2004).
- Se elabora un dendrograma.  
(Hartl & Clark, 1989; Hedrick, 1983; Tabachnick & Black, 1996)

## **INSTRUMENTOS PARA REGISTRO Y MEDICIÓN DE LAS OBSERVACIONES**

### **7.3. Equipo**

\_\_\_ Extracción de ADN

### Amplificación.

<b>Equipo.</b>
Micropipetas
Congelador 20°C.
Tubos eppendorf de 200 ul
Termociclador.
Hieleras
Campana de Flujo Laminar.

<b>Reactivos.</b>	
Thermo Buffer 10x	MgCl <sub>2</sub>
Primers;	Oligonucleotidos
H3; 5'CAT CCC CCT G 3'	H <sub>2</sub> O para PCR
L1; 5' CGG CCC CTG G 3'	Taq polimerasa
L4; 5' GTG GAT GCG A 3'	
L5; 5' AAG AGC CCGT -3'	

### Corrimiento de Geles.

<b>Equipo.</b>
Cámaras de Electroforesis
Micropipeta.

<b>Reactivos.</b>	
Loading gel (loading dye)	Bromuro de Etidio
TBE 0.5X	Agarosa.
Agua destilada	

## 9.Resultados

### 9.1 Índice de Nei (I'N) y Distancia Genética(D'N)

A continuación se observan la tabla conteniendo los valores de distancia genética (D'N) entre las tres distintas poblaciones; siendo su mínimo valor cero, para población con distancia genética entre sí nula.

	El Carrizal	El Tule	La Brea
El Carrizal	0	0.222	0.308
El Tule	0.222	0	0.076
La Brea	0.308	0.076	0

A continuación se observa la tabla de Índice de Nei (I'N), el cual indica el grado de similitud genética entre dos poblaciones, este valor se obtiene a partir del antilogaritmo de los valores de distancia genética siendo 1 el valor de máxima similitud.

	El Carrizal	El Tule	La Brea
El Carrizal	1	0.801	0.735
El Tule	0.801	1	0.927
La Brea	0.735	0.927	1

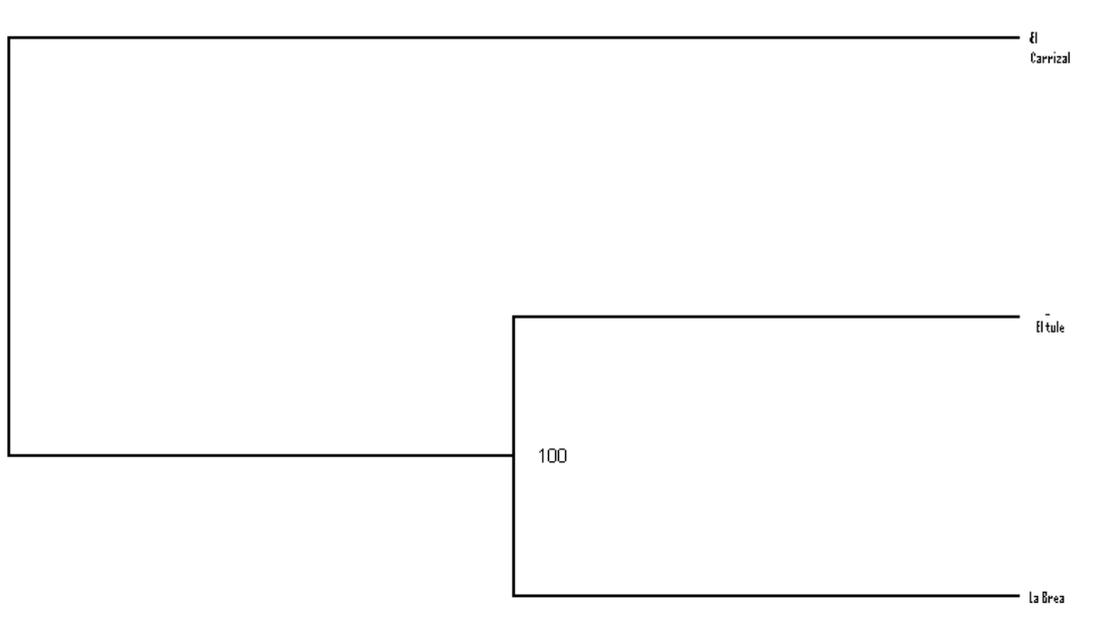
### ***9.2 Coeficiente de Fijación (Fst) y Número efectivo de Migrantes (NM).***

Por medio del programa RAPDFST se obtuvieron los valores de Coeficiente de Fijación y Numero Efectivo de migrantes. Los valores fueron proporcionados por medio de tres métodos

	Wright		Weir & Cockerham		Lynch	
	Fst	Nm	Fst	Nm	Fst	Nm
Tres Poblaciones Originales	0.218	0.9	0.308	0.6	0.310	0.6
El Tule y La Brea	0.085	2.7	0.191	2.7	0.180	1.1

### ***9.3 Análisis de Agrupamiento***

A partir de los valores de Distancia Genética D'N para cada uno de los análisis se elaboró un dendograma; en el cual se puede observar nodos asociados por pares, agrupados de acuerdo a su porcentaje de ocurrencia en 1000 repeticiones.



#### **9.4 Reproducibilidad de la Técnica**

Se realizó una prueba para observar la reproducibilidad de la Técnica de RAPD PCR; debido a que aunque esta técnica provee la ventaja de estudiar el polimorfismo en las frecuencias génicas de poblaciones cuyo genoma es aún desconocido, presenta la limitante de no poseer una alta reproducibilidad durante la amplificación, para lo cual se realizó una prueba del porcentaje de reproducibilidad dentro de los mismos geles, la cual consistió en colocar un mismo individuo dentro de la misma amplificación, por medio de eso se evaluaría el grado de reproducibilidad que daban las condiciones para cada individuo dentro de la amplificación.

	<i>L1</i>	<i>L5</i>	<i>L4</i>	<i>H3</i>	<i>promedio</i>
Reproducibilidad Dentro (en	78.52%	48%	78.57%	76.67%	70%

porcentaje)					
-------------	--	--	--	--	--

## ***10. Discusión de Resultados***

## 10.1. Análisis realizado

Se realizaron dos análisis, el primero consistió en el estudio de las tres poblaciones El Tule, la Brea y El carrizal (Jutiapa, Guatemala) en el cuál este último se encontró evidentemente separado de El Tule y La Brea, por lo que se realizó el segundo análisis con un nuevo cálculo de número efectivo de migrantes y coeficiente de fijación para estas dos últimas. En estudios anteriores los individuos del El Carrizal en Jutiapa siempre se han observado separados del resto de las poblaciones, como si se tratara de un grupo externo y cuyas explicaciones en estudios anteriores indican que probablemente se trate de una población constituida por individuos que se encuentran en proceso de diferenciación de la especie *Triatoma dimidiata* (Landaverde, 2004).

## 10.2. Distancia Genética e Índice de Nei (I'N)

El índice de Nei (I'N), posee un valor máximo de 1, el cuál indica que las poblaciones analizadas con dicho valor poseen frecuencias génicas idénticas.

Por su parte el valor de Distancia Genética (D'N) posee un valor mínimo igual a cero, indicando que no existe distancia genética entre las poblaciones, pues sus frecuencias génicas serían idénticas.

En los análisis realizados de las poblaciones se encontró una distancia genética entre La Brea y El Tule mucho menor que entre El Carrizal y las dos últimas encontrándose el mayor valor de distancia entre La Brea y El Carrizal, siendo este un valor más elevado que el obtenido por la investigación de Landaverde (2004), sin embargo esta no incluía valores obtenidos por los cebadores de H3, la distancia entre el Tule y La Brea es 4 veces menor que la anterior. Por su parte el índice de Nei nos indica una alta similitud entre las frecuencias génicas de El Tule y La Brea, correspondiente este a un 92.7% y de apenas un 73.5% entre La Brea y El Carrizal. En un estudio realizado por Duajardin, *et. al.* (2002) señalaron que el valor de distancia genética obtenido para dos especies diferentes siendo estas *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, a partir de isoenzimas, fue de 0.504, sin embargo los valores encontrados entre La Brea y El Carrizal, no son muy inferiores a este y son bastante mayores a los encontrados por Landaverde (2004) de 0.2523, indicando que los datos obtenidos no son para individuos de la misma especie. Sin embargo se trata de una técnica diferente. Por otro lado los valores para el índice de Nei son bastante parecidos de 0.735 y 0.77 a los obtenidos por Landaverde (2004).

Si se puede o no considerar a la población de El Carrizal como la misma especie que las provenientes de El Tule y La Brea, es algo que no está muy claro, pues en otros

trabajos donde se han realizado comparaciones de poblaciones de Guatemala, El Carrizal se presenta como una población muy diferenciada del resto (Calderón et al, 2004) (Landaverde,2003,2004).

Además Dorn et. al. (2003) utilizando la misma técnica que en esta investigación fue utilizada, señalaron que los valores de distancia genética para poblaciones que pertenecen a una misma especie y que poseen mucha similitud genética al no encontrarse reproductivamente aisladas y formar parte de una gran población panmíctica entre y dentro de aldeas adyacentes en Guatemala, encontraba entre 0.013 y 0.022, indicando que no es el caso para las poblaciones estudiadas.

El dendograma obtenido a partir de las distancias genéticas muestra gráficamente lo que los valores de los índices nos indican, esto después de realizarse una aleatorización de los datos a partir de 1000 repeticiones; indicando en el cien por ciento de las repeticiones, lo mencionado anteriormente, es decir la agrupación estrecha de El Tule y La Brea, presentando distancias pequeñas con respecto a las obtenidas para El Carrizal que se separa completamente de ellas.

### ***10.3. Coeficiente de Fijación ( $F_{st}$ ) y Número efectivo de Migrantes ( $N_m$ )***

El coeficiente de Fijación  $F_{st}$  es la medida de la diferenciación genética de “subpoblaciones” y siempre es positivo; es decir que indicará en qué porcentaje las frecuencias génicas de dichas “subpoblaciones” están perdiendo heterocigocidad, o dicho de otra manera que tanto se está tendiendo a la fijación alelica (Hedrick, 1983).

Un rango entre 0 a 0.05 puede ser considerado como un indicador de poca diferenciación genética, un rango entre 0.05 y 0.15 indica diferenciación genética moderada y uno entre 0.15 a 0.25, una diferenciación genética grande; los valores de  $F_{st}$  superiores a 0.25 indican una diferenciación genética muy grande.

Los valores obtenidos en el análisis para las tres poblaciones son bastante elevados siendo el menor valor de 0.218 y llegando hasta 0.310 indicando que estas poblaciones se están diferenciando genéticamente y que presentan una desviación de las frecuencias génicas del equilibrio Hardy- Weinberg, es decir que esta ocurriendo fijación alelica, por algún tipo de aislamiento entre estas tres poblaciones, ya que además como lo muestran los valores de  $N_m$  (número efectivo de migrantes), no esta ocurriendo migración entre estas tres poblaciones, o al menos no de manera efectiva, pues los valores de 0.6 y 0.9, indican que, ni siquiera un individuo migra por generación.

Sin embargo, al realizar el análisis únicamente con las dos poblaciones que, como muestran los otros análisis y el dendograma se encuentran más cercanas, es decir, La Brea y El Tule, se encontraron valores de coeficiente de fijación considerablemente menores en un rango de 0.085 a 0.18 es decir con diferenciación genética moderada y valores de Nm mayores, indicando que estas poblaciones si presentan un grado importante de migración entre ellas.

#### ***10.4. Reproducibilidad de la Técnica***

Como se menciona en el referente teórico, aunque la técnica de RAPD'S PCR es muy útil para el estudio molecular de organismos cuyo genoma es desconocido, su reproducibilidad es muy baja; para comprobar el porcentaje de reproducibilidad en esta investigación se utilizaron controles internos en cada amplificación a partir de repeticiones los resultados obtenidos, estos indicaron una reproducibilidad promedio para los cuatro cebadores de un 70.%

## 11. Conclusiones

- Las distancias genéticas obtenidas a partir del análisis de patrones de bandas de los individuos de las tres poblaciones, indican que existe cierto agrupamiento de La Brea y El Tule respecto de El Carrizal el cuál se encuentra muy separado de las dos primeras (como si se tratara de un grupo externo), presentando una mayor distancia con La Brea.
- El índice de Nei confirma la información, presentándola de manera más clara (ya que presenta un número máximo de 1 que indicaría la igualdad en frecuencias genéticas) la información obtenida por la distancia genética, ya que los valores para el índice de Nei entre La Brea y El Tule son muy cercanos a 1 (0.927) mientras que los de El Carrizal y La Brea son bastante menores.
- El índice de Fijación obtenido, nos indica que se cumple la hipótesis planteada, de la existencia de una diferenciación genética muy grande entre las tres poblaciones, además indica, la tendencia a la fijación alélica en las poblaciones por aislamiento y su tendencia a la homocigocidad, y el Número efectivo de

migrantes calculado, confirma la explicación de esta diferenciación, es decir la baja tasa de migración, que fue menor de un individuo por generación, para las tres poblaciones.

- El análisis de Índice de Fijación y de Numero efectivo de migrantes, excluyendo a El Carrizal, permite observar, que la tasa de migración para El Tule y La Brea se incrementa a más de un individuo por generación y el Índice de Fijación disminuye entre el rango que indica diferenciación genética moderada.
- Aunque los valores de distancia genética fueron altos y la tasa de migración baja, no se puede decir que hay ausencia de flujo genético entre las tres poblaciones, por lo que este puede ser provocado por la migración de vectores de forma pasiva, accidental o activa.

## 12.Recomendaciones

- Se recomienda la utilización de otras técnicas moleculares en el estudio de diferenciación genética, de las poblaciones de *T. dimidiata*, como lo podría ser la hibridación de ADN de diferentes poblaciones.
- Con respecto al control vectorial, se recomienda tener en cuenta en las estrategias, la existencia de flujo genético, principalmente entre La Brea y El Tule, ya que son unos de los lugares a los cuales se han focalizado los esfuerzos preventivos de la enfermedad de Chagas y la consideración de este aspecto en los problemas de reincidencia del vector *T. dimidiata*.
- Se recomienda el estudio de la dinámica poblacional de *T. dimidiata* provenientes de otras poblaciones de Jutiapa, por tratarse este de un lugar endémico de la enfermedad de Chagas, que permita optimizar los esfuerzos en el control vectorial.

### **13.BIBLIOGRAFIA**

1. **Aguilar, F.J. 1997. Parasitología Medica**, 3ra Ed. Litografía Delgado, Guatemala 336pp.
2. **Anderson J.M., Lai J.E., Dotson E.M., Cordon-Rosales C., Ponce C., Norris D.E., & Beard C.B.** Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. Infection, Genetics and Evolution. 2002;1:243-248.
3. **Apostol, B.L., Black, W.C., Reiter, P., & Miller, B.R.** Use Randomly Amplified Polymorphic DNA Amplified by Polymerase Chain Reaction Markers to estimate the number of *Aedes aegypti* Families at oviposition site in San Juan Puerto Rico. Am J Trop Med Hyg 1994;51(1):89-97.
4. **Apostol, B.L., Black, W.C., Reiter, P., & Miller, BR.** Population genetics with RAPD-PCR marker: The breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Heredity. 1996;76:325-334
5. **Beard, C.B., & Lyman D. F.** DNA-based Approaches for Inter- and Intraspecific Analysis of Chagas Disease Vectors. Proveniente: del II Taller Internacional sobre Genética Poblacional y Control de Triatomíneos. Tegucigalpa, Honduras. Marzo 8-11 1998 131 p. (p. 74-77)
6. **Brown T,A.** Gene Cloning and DNA analysis. An introduction. 4<sup>th</sup> edition. Blackwell. Science Ltd. Oxford USA. 2001. 363 p.

7. **Calderón, C.** Variabilidad Genética de *Triatoma dimidiata* (Latreille 1811) en tres poblaciones silvestres del Atlántico y tres poblaciones domésticas del Pacífico de Guatemala, utilizando la técnica de amplificación aleatoria de AND polimórfico (RADP) (Tesis de Graduación, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.)  
Octubre del 2002. 74 p
  
8. **Carvalho, R., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., & Gaivao, C.** Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). 22  
  
Proposals For Taxonomic Arrangements. Entomología y Vectores. Río de Janeiro. Jun. 2000;(1):1-99.
  
9. **Dorn, PL., Melgar, S., Rouzier, V., Gutierrez, A., Combe, C., Rosales, R., Rodas, A., Kott, S., Salvia, D., y Monroy, C.M.** The Chagas Vector, *T. dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. J. Med. Entomol. 2003. 40(4):436-440
  
10. **Falconer D.S.** Introducción a la genética Cuantitativa. Editorial Continental. S.A. de C.V. México. 1981. 428p.
  
11. **González, A. ed.** Almanaque Mundial 2000. Nuevo Milenio. Editorial México. Televisa. 2000. 465p.
  
12. **Harris, K.D., Ramsey J.M., Ordoñez R., Córdón-Rosales C., Salazar Schettino P.M., Monteiro F.A., Dotson E., & Beard C.B.** Evidence of a Species Complex in the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*. Am Soc Trop Med Hyg 2002. Submitted.

13. **Hartl D.L, & Clark A.G.** Principles of Population Genetics. 2nd Edition. Massachusetts. Copyright. 1989. 682 p. (p. 343-344)
14. **Hedrick, P.W.** Genetics of *Populations*. USA.Science Books International Publisher. 1983 . 629 p
15. **Jaramillo, C., Monaña, M.F., Castro, L.R., Vallejo, G., & Guhl, F.** Differentiation and Genetic Analysis of *Rhodnius Prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD Amplification. Mem Inst Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. November 2001;96(8):1043-1048
16. **Landaverde, P.,** Comparación de poblaciones silvestres y doméstica de *Triatoma dimidiata* (Latreille,1811) de México y Centroamérica por medio de la técnica de aplicación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD-PCR)”
17. **Lent, H., & Wygodzinsky, P.** Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas’ Disease. Boletín del museo de historia Natural de América. 1979;163(3):123-520
18. **Lewin B.** Genes VII. Oxford. University Press. New York.. 2000. 990 p.
19. **Marcilla, A., BARGUES, M.D., Ramsey, J., Magallon-Gastelum, E., Salazar, P.M., Abad-Franch, F., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., &**

23

**Mas-Coma, S.** The ITS-2 of the nuclear DNA as a Molecular Marker for populations especies an Phylogenetic Relationships in Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) Vectors of Chagas Disease. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2001;18(1):136-142

20. **Monroy, CM., Chávez, JJ., Morales-Betoulle, ME., Landaverde, P., Rodas, A., Enriquez, E., Bor, Silvia., & Melgar, S.** Relaciones parentales de *Triatoma dimidiata* en una vivienda de El Cuje, Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa. Revista Científica Edición Especial. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2002. 37 p. (p. 10-17)
- 34
21. **OPS—Organización Panamericana de la Salud.** Taller para el Establecimiento de pautas técnicas en el control de *Triatoma dimidiata*. Documento OPS/HCP/HCT/214/02. Organización Panamericana de la Salud. San Salvador. OPS. 2002. 35p.
22. **Panzer, F., Perez, R., Hornos, S., Panzer, Y., Cestau, R., Delgado, V., & Nicolini, P.** Chromosome Numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review Mem Inst Oswaldo Cruz. Río de Janeiro Jul./Aug., 1996;Vol:91(4): 515-518.
23. **Panzer, F., Hornos, S., Pereira J., Cestau, R., Canale, D., Diotaiuti, L., Dujardin, J.P., & Pérez, P.** Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). Am. J. of Tropical Medicine & Hygiene 1997;57(6):732-739
24. **Solis-Mena, S.** Genetic variability and Morphometrics of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) geographical populations. (Upgrading reporta from London School of Hygiene and Tropical Medicine.) 2000. 14p
25. **Solomon, E.P., Berg, L.R., Martin, D.W., & Villet C.** Biología de Villet. 3era edición. . México. Interamericana McGraw-Hill 1996. 1194 p.

26. Tabachnick, W.J., & Black, W.C. Population genetics of disease vectors. In  
Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado 1996. (p. 417-437 )

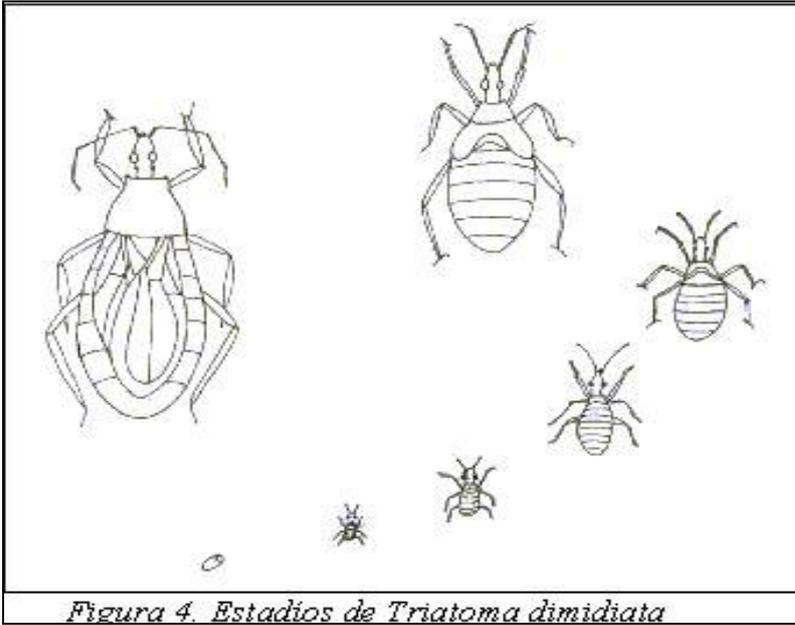
24

27. TABARU, C. MONROY, A. RODAS, M. MEJÍA and R. ROSALES "The geographical distribution of vectors of Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala" Med. Entomol. Zool. Vol. 50 No. 1 p. 9-17 1999.

28. Yapur, A. 1994, Efecto de Infusiones de *Jacaranda mimosifolia*, *Neurolaena lobata* y *Solanum hartwegii*, Sobre Curvas de Parasitemia, de *Trypanosoma cruzi*. (Tesis de graduación, Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia)

29. Zeledón, R. El triatoma dimidiata (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas. EEUNED. San José. Costa Rica. 1981. 147p.

## 12. ANEXOS



*Figura 4. Estadios de Triatoma dimidiata*

**Fuente: Universidad Simón Bolívar.**



Figura 4. Distribución de *Triatoma dimidiata*.

Fuente: Casa de la Cultura Ecuatoriana, 1993.



Figura 6. Mapa de Guatemala.

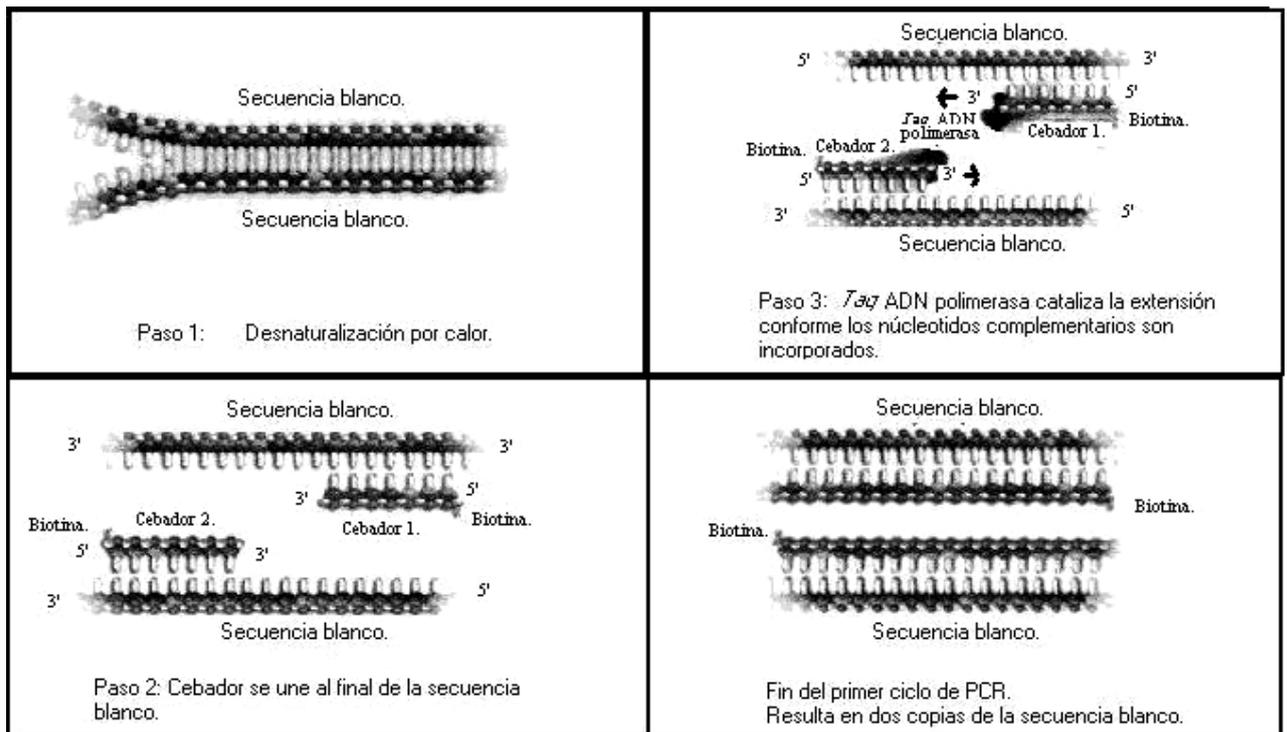


Figura 11. Ciclo de PCR.

Fuente: Roche, 2003.

## Preparación de Reactivos.

### Termobuffer. (Para obtener a concentración 10X)

Mantener todo frío.

Grind buffer:	Para 100 ml	Solución stock
0.1 M NaCl	2 ml	5M NaCl
0.2 M sucrosa	6.9 g	342.3 g/mol
50 mM EDTA	10 ml	0.5 M EDTA,
pH 8.0		
100 mM Tris-HCl, pH 8.0-9.0	10 ml	1 M Tris-HCl, pH
8.0		
0.05% SDS	500 µl	10% SDS

Usando agua esterilizada llevar a 100 ml, filtrar a través de un filtro de 0.2 µm y calentar a 65°C por 1 hora. Mantener refrigerado y estéril. Alícuotas de 1 ml; guardar a -20°C.

### EDTA 0.5M (pH 8.0)

Se quiere obtener una solución de 0.5M y pH 8.0 para ello se necesita.

Disolver 186.1g (el dato se obtiene de multiplicar) de Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O en 700 ml H<sub>2</sub>O. Ajustar pH a 8.0 con 10M NaOH (~ 50ml). Agregar H<sub>2</sub>O aforando a 1 litro.

### Ingredientes para la preparación del Master Mix.

#### Bromuro de Etidio. (10mg/ml)

REACTIVO.	Volumen para 1 Reacción.	Volumen para 25 reacciones.
H <sub>2</sub> O	31.38 µl	784.5 µl
ThermoBuffer.	4 µl	100 µl
MgCl <sub>2</sub>	1.2 µl	30 µl
dNTP's	0.32 µl	8 µl
Primers.	0.1 µl	2.5 µl

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

Disolver 200mg de Bromuro de Etidio en 20ml de H<sub>2</sub>O. Mezclar bien y mantener a 4°C en oscuridad.

#### TBE al 5X. (1 litro)

54g TRIZMA Base

27.5g Ácido Bórico.

20ml de 0.5M EDTA (pH 8.0)

Agregar agua tridestilada para llegar a 1 litro.

Mezclar bien y disolver todo el sólido en el líquido.