

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA COSTO EFECTIVA PARA LA  
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN AUTOMATIZADA DE  
MICROSATÉLITES APLICADA EN *Triatoma dimidiata***

BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Mary Alejandra Krische Palacios

Guatemala

2004

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA COSTO EFECTIVA PARA LA  
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN AUTOMATIZADA DE  
MICROSATÉLITES APLICADA EN *Triatoma dimidiata***

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA COSTO EFECTIVA PARA LA  
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN AUTOMATIZADA DE  
MICROSATÉLITES APLICADA EN *Triatoma dimidiata***

BIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Trabajo de graduación presentado por Mary Alejandra Krische Palacios  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica

Guatemala

2004

Vo.Bo.:

(f) Paula Pennington  
Dra. Pamela Pennington  
Asesora

Tribunal:

(f) Paula Pennington  
Dra. Pamela Pennington

(f) Celia Córdón-Rosales  
Lda. Celia Córdón-Rosales

(f) José Héctor Aguilar  
Dr. José Héctor Aguilar

Fecha de aprobación: 1 de junio del 2004

## PREFACIO

Fue durante la década de los años treinta que se reportó en Guatemala por primera vez la existencia de *Trypanosoma cruzi*, el protozoo causante de la enfermedad de Chagas. Desde entonces, ha cobrado más vidas de las que oficialmente se reportan por falta de conocimiento, control e investigación. El objetivo de este proyecto de investigación es que sea una herramienta epidemiológica que exhorte al apoyo de ésta y otras enfermedades crónicas en nuestro país. Está dedicada a los hombres, mujeres y niños a quienes puedo ayudar con mi servicio para que mejore su calidad de vida, a través de la ciencia; a los entregados y estudiosos personajes que buscan insaciablemente entender cómo funciona el universo: porque son quienes construyen los peldaños sobre los cuales generaciones más jóvenes descubrirán nuevos motivos de impacto.

S.C.N.E. por Tu presencia y ayuda incondicional: gracias.

A mis papás y hermanos; primos, tíos y abuelos por su cariño, paciencia, confianza y apoyo.

Al equipo involucrado en el desarrollo de esta tesis: Al Centro de Estudios en Salud (CES), en la Universidad del Valle de Guatemala (UVG). Al apoyo económico de TDR/PAHO, "Tropical Diseases Research" por el financiamiento del proyecto número A10118 "Molecular genetic análisis of *Triatoma dimidiata* dispersal patterns from domiciliated and potential sylvatic foci in Guatemala" como parte de las actividades del programa de investigación de la enfermedad de Chagas realizada en el CES-UVG.

Agradezco el tiempo y energías invertidas en mí a los maestros que he tenido desde Pre-Primaria hasta el tribunal evaluador: Lda. Celia Cordón-Rosales, Pamela Pennington, PhD. y José Héctor Aguilar, PhD.

Al equipo de la División de Enfermedades Parasitarias “DPD” del “CDC” en Atlanta, en particular a: Ellen Dotson, PhD., Ben Beard, PhD., y Gena Groner, MPH., por colaboración y préstamo de equipo para el tamizaje de muestras por electroforesis capilar. A Audrey y Clay Lehnhart, Clyde y Renée Smith, Lanny Smith, por su calurosa acogida, confianza, y amistad.

A Mandy Schable y Travis Glenn en “Savannah River Ecology Laboratory” o “SREL”, por su colaboración para la elusión de las secuencias con microsatélites y diseño de cebadores.

Por su invaluable ayuda a mis amigos: José Roberto Ramírez, Alejandra Castillo, Paola Rivera, Carmen Lucía Contreras, Renata de Cabrera, Roberto Archila, Rodrigo González, Luis Martínez, Pedro Peralta, Alfonso Salam, Jorge Salam, Juan García y Bernarda Molina.

A quienes no menciono, pero que he agradecido personalmente.

A todos: muchas gracias.

## CONTENIDO

PREFACIO	iv
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
A. Enfermedad de Chagas	2
1. Generalidades	2
2. Epidemiología	3
3. Ciclo infeccioso	4
4. Diagnóstico	9
5. Prevención y vigilancia	9
B. Agente infeccioso	13
1. Clasificación taxonómica	13
2. Características morfológicas generales	14
3. Desarrollo de <i>Trypanosoma cruzi</i> en triatominos	15
C. Vectores en Guatemala	15
1. <i>Rhodnius prolixus</i>	17
a. Clasificación taxonómica	17
b. Importancia en la enfermedad de Chagas	17
2. <i>Triatoma dimidiata</i>	17
a. Nombres vulgares	17
b. Clasificación taxonómica	18
c. Distribución geográfica	18
d. Biología	18
e. Características morfológicas	20
f. Alimentación, preferencias alimentarias y ayuno	25
g. Patrones de defecación	27
h. Hábitat y relación con el domicilio	29
i. Organización del genoma	31
j. Organización del genoma mitocondrial	32
D. Marcadores para el estudio de variabilidad poblacional y reinfestación	34
1. Marcadores fenotípicos	34
2. Marcadores moleculares	34

a.	Electroforesis de isoenzimas	36
b.	RAPDs por sus siglas en inglés “Randomly Amplified Polymorphic DNA’s”, DNA polimórfico amplificado al azar	37
c.	RFLPs por sus siglas en inglés “Restriction Fragment Length Polymorphisms”: Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del DNA	38
d.	Microsatélites	39
E.	Microsatélites	41
1.	Características, ventajas y desventajas	41
2.	Modelos de mutación	43
3.	Métodos para el desarrollo de microsatélites	45
4.	Microsatélites polimórficos para <i>Triatoma dimidiata</i>	51
F.	Genética de poblaciones	52
1.	Frecuencia alélica en poblaciones	52
2.	Equilibrio en una población	52
3.	Estadísticos F de Wright	54
4.	Coefficiente de similaridad y distancia genética	54
III.	HIPÓTESIS	56
IV.	OBJETIVOS	57
A.	Objetivo general	57
B.	Objetivos específicos	57
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	58
A.	Metodología de colecta de las chinches	58
B.	Extracción de DNA	59
1.	DNA total de huevos para la biblioteca genómica y cuantificación	59
2.	DNA de patas de chinches para tamizar los microsatélites	59
3.	DNA de huevos y de chinches para controles positivos	60
C.	Enriquecimiento y clonación de fragmentos de DNA con microsatélites de <i>T. dimidiata</i>	60
D.	Análisis de secuencias e identificación de microsatélites	60
E.	Diseño de cebadores para amplificar microsatélites por la reacción en cadena de la polimerasa	61
F.	Optimización de condiciones de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar microsatélites y análisis por electroforesis capilar	65
G.	Análisis de microsatélites por electroforesis capilar	66
H.	Análisis genético de los microsatélites	67
I.	Creación de base de datos	68
J.	Análisis comparativo de costos y efectividad entre las metodologías para corrida y análisis de microsatélites: método tradicional y automatizado	69

VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
	A. Extracción de DNA genómico de huevos de <i>T. dimidiata</i>	70
	B. Secuenciación de clones enriquecidos con microsatélites	71
	C. Análisis de microsatélites	72
	D. Diseño de cebadores	74
	E. Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa usando electroforesis capilar	76
	F. Análisis de microsatélites por electroforesis capilar	80
	G. Identificación de alelos en cada locus	81
	H. Análisis genético de las secuencias de microsatélites	85
	I. Creación de base de datos en Microsoft ® Access	98
	J. Comparación de costos y efectividad entre electroforesis capilar y en geles de poliacrilamida	98
VII.	CONCLUSIONES	105
VIII.	RECOMENDACIONES	108
IX.	FUENTES CITADAS	110
	A. Literatura citada	110
	B. Internet	114
X.	ANEXOS	117
	A. Enriquecimiento de fragmentos de DNA con microsatélites de <i>Triatoma dimidiata</i>	117
	B. Amplificación de fragmentos de DNA de <i>Triatoma dimidiata</i> , ricos en microsatélites, mediante reacción en cadena de la polimerasa	118
	C. Purificación del producto de PCR	119
	D. Ligación y transformación de fragmentos con microsatélites a células competentes	119
	E. Tamizaje de colonias transformadas	119
	F. Reacción de secuenciación para los fragmentos con microsatélites	120
	G. Secuenciación de colonias positivas	120
	H. Amplificación de fragmentos de DNA ricos en microsatélites por reacción en cadena de la polimerasa	121
	I. Secuencia de clones positivos por PCR	121
	J. Listado de los números de identificación y localidades de colecta de cada individuo del estudio	132
	K. Manual de uso del software <i>Allelogram</i>	141
	L. Archivos de salida "binstats.out" con información sobre cada <i>bin</i> para cada marcador	146

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Tiempo de maduración de los huevos de <i>T. dimidiata</i> dependiendo de la temperatura ambiente	19
2.	Tipos de microsatélites según patrón de repetición	40
3.	Juegos de cebadores necesarios para el marcaje económico	50
4.	<i>Loci</i> de microsatélites para <i>T. dimidiata</i>	52
5.	Programa y termociclador empleado para las reacciones en cadena de polimerasa	66
6.	Cuantificación de DNA genómico con fluorómetro	71
7.	Secuencias y características de microsatélites de <i>T. dimidiata</i>	73
8.	Cebadores diseñados para amplificar secuencias de microsatélites de <i>T. dimidiata</i>	75
9.	Diversidad genética para cada locus por población	88
10.	Análisis de Hardy-Weinberg para las poblaciones estudiadas con cada uno de los locus	91
11.	Identidad y distancia genética de Nei para las poblaciones para el locus TDAK49	91
12.	Identidad y distancia genética de Nei para las poblaciones para el locus TDMS4	92
13.	Identidad y distancia genética de Nei para las poblaciones para el locus TDMS11	92
14.	Identidad y distancia genética de Nei para las poblaciones para el locus TDMS22	93
15.	Índice de fijación total y flujo de genes para todos los loci	95
16.	Cuadro comparativo de las metodologías empleadas para análisis de microsatélites	100
17.	Costo de la síntesis de juegos de cebadores con marcaje fluorescente	102

18.	Costo del análisis de microsatélites utilizando geles de poliacrilamida	103
19.	Costo del análisis de microsatélites utilizando electroforesis capilar	104
20.	Oligonucleótidos empleados para el enriquecimiento de DNA genómico de <i>T. dimidiata</i>	118
21.	Información de individuos capturados para este estudio	132

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Distribución de la enfermedad de Chagas en el Mundo	3
2.	Ciclo infeccioso de la enfermedad de Chagas	5
3.	Síntomas de infección de la enfermedad de Chagas	6
4.	Radiografías de complicaciones de la enfermedad de Chagas	8
5.	Dos estadios de <i>T. cruzi</i>	13
6.	Formas de <i>T. cruzi</i> encontradas en el intestino delgado y el recto de <i>Triatoma infestans</i>	14
7.	Vectores adultos	16
8.	Ciclos de transmisión de <i>T. cruzi</i>	20
9.	Aparato digestivo de triatomíneos	24
10.	Chinche defecando brevemente después de picar a una víctima	28
11.	Diagrama de las principales vías de transmisión de <i>T. cruzi</i>	31
12.	Variación de “PCR-RFLP” entre quistes de nemátodos de soja (SCN) y quistes de nemátodo de remolacha (SBCN)	39
13.	Protocolo de enriquecimiento para obtener microsatélites	47
14.	Reacción de ligación favorecida por la formación de sitio de restricción <i>XmnI</i>	49
15.	Reacción en cadena de la polimerasa usando el método económico para marcar cebadores con fluorescencia	51
16.	Cebadores de locus TDAK57 mas secuencia de cebador universal para ahorro de bases en el diseño	64
17.	Detección de DNA genómico de huevos de <i>T. dimidiata</i> para enriquecimiento	70

18.	Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores M13F y M13R para la detección de clones con inserto incorporado, según interrupción de gen de $\beta$ -galactosidasa	72
19.	Porcentaje de muestras que amplificaron por PCR	78
20.	Frecuencia alélica en locus TDAK49	82
21.	Frecuencia alélica en locus TDMS4	82
22.	Frecuencia alélica en locus TDMS11	83
23.	Frecuencia alélica en locus TDMS22	83
24.	Patrón alélico de locus TDAK49 para cada población	89
25.	Patrón alélico de locus TDMS4 para cada población	89
26.	Patrón alélico de locus TDMS11 para cada población	90
27.	Patrón alélico de locus TDMS22 para cada población	90
28.	Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para el locus TDAK49	93
29.	Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para el locus TDMS4	94
30.	Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para el locus TDMS11	94
31.	Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para el locus TDMS22	95
32.	Frecuencia alélica en locus TDAK49	96
33.	Frecuencia alélica en locus TDMS4	97
34.	Frecuencia alélica en locus TDMS11	97
35.	Frecuencia alélica en locus TDMS22	97

## RESUMEN

Esta investigación consiste en la identificación y caracterización de locus de microsatélites polimórficos para poblaciones de *Triatoma dimidiata*, uno de los vectores de la enfermedad de Chagas para Centroamérica. Se diseñaron 17 nuevas secuencias de cebadores para amplificar las regiones de microsatélites (TDAK) y se optimizaron las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa, comparando la efectividad de aditivos para la enzima Taq polimerasa y determinando el comportamiento de las bandas de desliz o “stutter bands” al emplear este aditivo. Al mismo tiempo, se tamizaron 3 locus publicados anteriormente, los TDMS4, TDMS11 y TDMS22 (Anderson, *et al.*, 2002) en poblaciones naturales de Guatemala y México. Los productos de PCR se corrieron en electroforesis capilar por presentar ventajas de alta repetibilidad, alta sensibilidad y baja incertidumbre, respecto a geles de poliacrilamida (PAGE). Se compararon estas dos metodologías y se determinó cual es la más ventajosa. Se ensayó una nueva metodología para el marcaje de cebadores. Schuelke (2002) recomienda emplear los cebadores universales, que pueden ser usados tanto en PAGE, como en electroforesis capilar. Los resultados muestran que este tipo de marcaje funciona sin problemas, igual que sin marcaje o marcaje por pares de cebadores, reduciendo los costos de análisis significativamente.

Para el análisis de genética de poblaciones, para cada locus se calculó el índice de fijación total ( $F_{st}$ ), flujo genético ( $Nm$ ), se determinó si las poblaciones estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, se determinó el grado de polimorfismo de cada locus, el alelo predominante y frecuencia alélica.

Se creó una plataforma electrónica para manipular los datos generados a partir de la electroforesis capilar, para reducir errores por copia y tiempo de análisis manual. Se creó una base de datos en Microsoft® Access llamada EpiTD que permitirá continuar haciendo análisis y registros de resultados en un futuro.

## I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas pone en riesgo a 120 millones de personas en América. En Guatemala, el agente causante *Trypanosoma cruzi* es transmitido a humanos y otros reservorios a través de las chinches: *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. Se han propuesto varias metodologías para controlar la enfermedad, sin embargo, la fumigación con insecticidas residuales es la que ha dado resultados satisfactorios, sobre todo para *R. prolixus*. Por otro lado, *T. dimidiata* ha demostrado que reinfesta las regiones previamente tratadas dificultando el control y la vigilancia entomológica. Se ha propuesto que el origen de este foco de reinfestación se localiza fuera de los domicilios, pero aún no se tiene información al respecto.

Se considera que los microsatélites son adecuados para localizar el foco de reinfestación de *T. dimidiata*. Estos son marcadores moleculares que proveen información acerca de flujo genético, estructuras poblacionales y diferencias poblacionales. Así, con la información que estos provean, podría modificarse o rediseñarse los métodos de control del vector. Se trabajó con chinches de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Zacapa y México, por ser regiones endémicas de esta enfermedad. Se les extrajo el ácido desoxiribonucleico o “DNA” (por sus siglas en inglés) y con este se identificaron los microsatélites por la metodología de enriquecimiento. Se clonaron al vector pGEM-T® Easy, de donde fueron secuenciados. Con las secuencias de los microsatélites y de las regiones laterales, se diseñaron cebadores que más tarde fueron utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa “PCR”, (por sus siglas en inglés), para amplificar estas regiones. Lo deseable es que estos *loci* demuestren un nivel de polimorfismo que contribuya a determinar si existen subpoblaciones o vínculos entre poblaciones, en estas regiones endémicas.

## II. ANTECEDENTES

### A. Enfermedad de Chagas

1. Generalidades. La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una infección parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (Nakagawa, *et al.*, 2003). Se transmite a humanos cuando insectos hematófagos de la familia Reduviidae infectados pican y depositan sus heces en heridas cutáneas o mucosas (WHO, 2000). La infección también puede ocurrir por transfusión sanguínea (WHO, 2004), trasplante de órganos infectados (Miles, *et al.*, 2003), de forma congénita (WHO, 2004) y aunque son pocos los casos reportados, por contaminación de alimentos (Miles, *et al.*, 2003). Se trata de una enfermedad incurable, asintomática en la fase aguda, manifestándose como fiebre, conjuntivitis unilateral o chacras tripanosomales (Roberts, 1986). Las complicaciones de esta enfermedad pueden ser miocarditis, fallos al miocardio, ataque cardíaco, trastornos en el sistema nervioso central, embolia pulmonar, disfunciones autonómicas del esófago y colon, resultando en megaesófago y megacolon de forma irreversible (Roberts, 1986). Si se detecta a tiempo, puede darse tratamiento, siendo los medicamentos de elección nifurtimox o benznidazol (WHO, 2004).

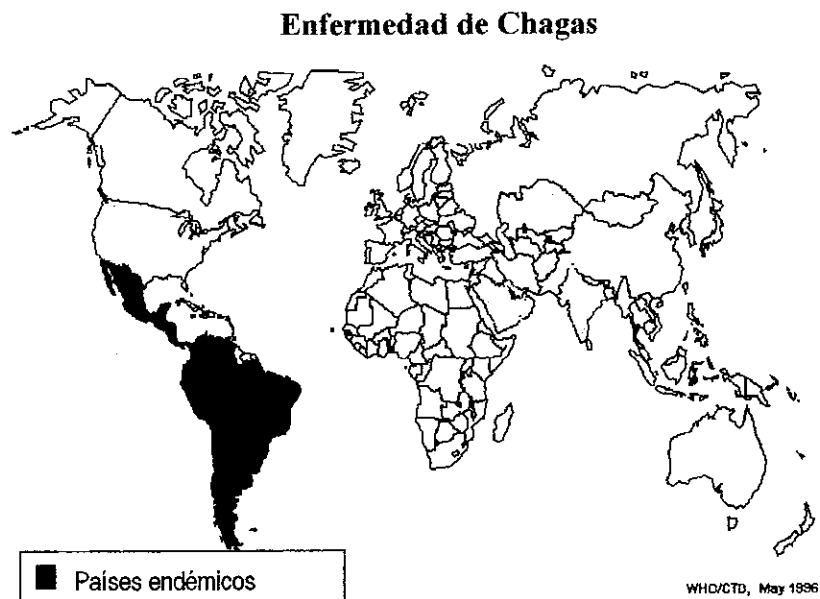
Fue descrita por primera vez en 1909, por el médico brasileño Carlos Chagas, quien reportó detalles sobre el parásito, el vector y hospederos que interactuaban en un ciclo infeccioso, que dio lugar a proponer metodologías de control (Umezawa, *et al.*, 2000). Actualmente está distribuida en 18 países, en dos zonas ecológicas diferentes: Cono Sur; Norte de Sudamérica, México y Centroamérica (WHO, 2004). Los vectores se han adaptado a vivir en el interior y alrededores de las casas y son importantes para la transmisión de *T. cruzi* (Nagakawa, *et al.*, 2003).

Algunos autores la categorizan como una enfermedad social, que depende de las condiciones de vida, que influyen directamente sobre las medidas de control aplicables, pobreza y prácticas higiénicas. Se ve asociada con enfermedades como tuberculosis, diarrea, malnutrición y otras infecciones como el SIDA (Pinto, 2002). Sin embargo, la

transmisión de la enfermedad puede ser efectivamente interrumpida controlando a las chinches dentro y fuera de las áreas de descanso de las casas (WHO, 1997).

2. Epidemiología. En América, están en riesgo de contraer la enfermedad 120 millones de personas. Debido a esta enfermedad, están registrados entre 16 y 18 millones de casos, habiendo cada año aproximadamente 300,000 nuevos casos y 21,000 muertes (WHO, 2004).

Figura 1  
Distribución de la enfermedad de Chagas en el Mundo  
(WHO, 2004)



En Guatemala, se estima que 4 millones de personas se encuentran en riesgo; 730,000 están actualmente infectadas y 30,000 personas se infectan anualmente siendo las poblaciones del Este las que están en mayor riesgo de transmisión. Se reporta que *T. dimidiata* está distribuido en 21 de 22 departamentos, mientras que *R. prolixus* está sólo en 5 (Nakagawa, *et al.*, 2003).

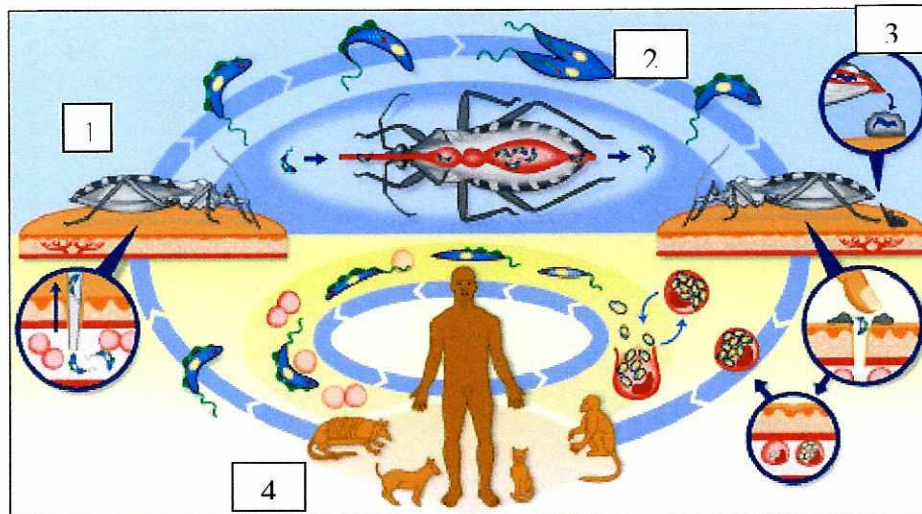
3. Ciclo infeccioso. La picadura de las chinches, para succionar sangre, es relativamente indolora y la mayoría de las personas no se despierta, si ocurre mientras duermen (WHO, 1997). Es frecuente observar que el vector defeca la piel, durante o posterior a la picadura. De esta manera, el protozoo que naturalmente se encuentra en las heces en forma de tripomatigote metacíclico, flagelado, entra en el huésped mamífero cuando se rasca la piel o restriega las mucosas (Macedo, 2002). Las infecciones humanas son conocidas (WHO, 1997) y se han confirmado en Costa Rica casos de la enfermedad en perros. El mecanismo de infección para estos animales ocurre cuando atrapan en sus ocicos, mastican o ingieren chinches infectadas como reflejo cazador (Montenegro, *et al.*, 2002). Aunque los perros son muy afectados, no son los únicos animales de los que las chinches se alimentan. Más adelante se discutirán las preferencias alimentarias de la chinche.

Una vez el parásito *T. cruzi* ingresó al sistema del huésped, su período de incubación es de 1-2 semanas posterior a la infección (Macedo, 2002; Ojeda y Murguía, 1998), los tripomastigotes penetran células locales y se diferencian a amastigotes (Macedo, 2002) a través de intermediario epi y promastigotes que no se replican en la sangre (Kollien and Schaub, 2000), que tienen forma redonda replicativa intracelular y sin flagelo (Macedo, 2002). Algunos amastigotes se diferencian de nuevo a tripomastigotes, provocando lisis celular. Cuando la célula muere, los amastigotes y tripomastigotes son liberados e infectan nuevas células, reingresan al torrente sanguíneo o colonizan tejido muscular o neuronal como mallas de amastigotes (Macedo, 2002).

Los insectos *Reduviidae* son infectados cuando el insecto se alimenta de sangre que contiene tripomastigotes, más tarde se diferencian a epimastigotes en el intestino del insecto, dando lugar a formas replicativas intravectoriales, flageladas, que se dividen por reproducción asexual. Alcanzan el recto, se diferencian a tripomastigotes metacíclicos infectivos y se completa el ciclo de vida (Macedo, 2002; Kollien and Schaub, 2000), ver la figura 2 “Ciclo infeccioso de la enfermedad de Chagas”.

Figura 2

Ciclo infeccioso de la enfermedad de Chagas (WHO, 2004)



1. Chinche se alimenta de sangre infectada.

2. Formas replicativas intravectoriales. 3. Diferenciación en el recto y deposición de heces infectadas a nuevo hospedero. 4. Además del humano, otros hospederos pueden ser: monos, armadillos, tucanes, perros, gatos, gallinas, entre otros.

La transmisión del parásito puede llevarse a cabo entre reservorios de animales silvestres e insectos sin involucrar a seres humanos. Los humanos pueden verse infectados cuando entran al ambiente natural donde animales silvestres infectados y vectores interactúan (WHO, 1997). Se han reportado casos de triatomíneos domésticos que ocurren como resultado de chinches adultas de áreas selváticas atraídas por las luces de viviendas (Miles, *et al.*, 2003). Cuando las áreas naturales son dominadas por humanos, los animales que funcionan como reservorios mueren o son forzados a salir, aumentando el potencial de transmitir el parásito a animales domésticos y personas. Además, la construcción de casas y refugios de animales alrededor de las casas provee alternativas para que las chinches descansen y se escondan (WHO, 1997).

La enfermedad se clasifica en fases: aguda, intermedia y crónica (Miles, *et al.*, 2003). La fase aguda inicia 7-9 días luego de que el parásito penetre a su hospedero,

denominándose: período de incubación. En este período, el parásito sufre un proceso intensivo de multiplicación tisular e invade el torrente sanguíneo y órganos (Pinto, 2002). Además, se observan leves dolores que se desarrollan en el punto de exposición a las heces de la chinche, que posteriormente dan lugar a conjuntivitis, signo de Romaña, también llamado edema unilateral o chagoma cutáneo (Miles, *et al.*, 2003); picazón severa, inflamación y en casos de grandes poblaciones de chinches, pueden causar anemia por pérdida continua de sangre (WHO, 1997).

Figura 3  
Síntomas de infección de la enfermedad de Chagas  
(WHO, 2003)



a. Signo de Romaña .



b. Irritación en el sitio de picadura de la chinche .

El signo de Romaña ocurre aproximadamente en un 50% de las personas infectadas y aunque la mayoría de pacientes sobreviven, puede ser fatal en niños (WHO, 1997). Se conoce de fases reactivadas agudas en pacientes inmunocomprometidos y se ha llegado a asociar la enfermedad de Chagas con casos de meningoencefalitis, especialmente en pacientes congénitos de Chagas o con enfermedades asociadas al sistema inmune. Es común que, por las características asintomáticas de esta fase, no se reconozca la enfermedad y dure hasta años (Miles, *et al.*, 2003). Existen otros síntomas que no son específicos para la infección de Chagas. Estos síntomas pueden incluir:

fatiga, fiebre, hepatomegalia, basomegalia, nódulos linfáticos inflamados; a veces, urticaria, pérdida de apetito, diarrea y vómitos. Los niños muy pequeños, con enfermedad de Chagas aguda, pueden presentar inflamación del cerebro e incluso, hasta causar la muerte. Generalmente, los síntomas duran de cuatro a ocho semanas antes de desaparecer, reciban o no tratamiento (CDC, 2003).

La forma intermedia se inicia de 8-10 semanas posterior a la exposición del parásito (CDC, 2003) sin presentar síntomas de la enfermedad, pero del 2% al 5% de estos pacientes pueden convertirse en formas cardíacas y digestivas, sin explicación hasta el momento (Umezawa, *et al.*, 2000).

La fase crónica se subdivide en fases: indeterminada, cardíaca y digestiva, de acuerdo a características clínicas (CDC, 2003). De acuerdo a reportes de la Organización Mundial de la Salud, se estima que el 27% de los pacientes infectados desarrollan problemas cardíacos que pueden causar la muerte, 6% desarrollan anormalidades en el sistema digestivo y 3% muestran daño en el sistema nervioso central y periférico como complicaciones crónicas (WHO, 1997).

La fase crónica se manifiesta en niños de hasta 2 años en los que se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-*T.cruzi* en el suero (OPS, 1998). Se estima que ocurre entre diez a veinte años posterior a la infección, siendo los síntomas cardíacos más frecuentes: cardiomegalia, ritmo y gasto cardíaco alterado, fallo cardíaco y ataque cardíaco. Puede ocurrir crecimiento de partes del tracto digestivo, constipación severa, problemas para tragar y megacolon, aunque no todos los pacientes desarrollan estos síntomas (CDC, 2003), ver Figura 4.

La infección congénita se puede presentar en el recién nacido, con manifestaciones clínicas o no. En lactantes mayores de siete meses de edad hay serología reactiva independiente de la madre. Para que una infección se catalogue como infección congénita debe cumplir con los siguientes requisitos: madre serológicamente reactiva, no haber recibido transfusiones y no haber permanecido en un área endémica (OPS, 1998).

Figura 4  
Radiografías de complicaciones de la enfermedad de Chagas  
(WHO, 2004)



a. Miocarditis



b. Megacolon

No existe vacuna ni respuesta inmune eficiente ya que el parásito logra persistir. Cuando los macrófagos ingieren linfocitos apoptóticos que han ingerido al parásito no lo destruyen, sino permiten al parásito sobrevivir. Se ha demostrado que la reacción del hospedero es mediada por citoquinas de células Th1, macrófagos y células T-CD8, a pesar de que en humanos, estos mecanismos sean tan pobremente definidos. A la larga, estas mismas respuestas inmunes son las responsables por la inmunopatología, porque la fracción glicolípida de las mucinas de tripomastigotes son las moléculas proinflamatorias microbianas más potentes. Además, se investiga a la enzima transialidasa por la importancia que tiene como posible inhibidor de la sobrevivencia intracelular del parásito. Esta es encargada de transferir ácido siálico de las moléculas sialiladas del hospedero, a las mucinas de la superficie celular del parásito (Umezawa, *et al.*, 2000).

4. Diagnóstico. Para demostrar la presencia del *T. cruzi* puede realizarse análisis microscópico, durante la fase aguda, de sangre fresca sin coagular en busca de parásitos móviles, tinción de Giemsa de gota gruesa para visualizar el parásito (CDC, 2003); por concentración de tripanosomas (Miles, *et al.*, 2000), ELISA por reacción de anticuerpos IgG (Umezawa, *et al.*, 2000) e IgM contra *T. cruzi* del suero (OPS, 1998) del paciente, hemocultivo, inmunofluorescencia o ensayos de hemaglutinación. Pueden darse resultados falso positivos, especialmente con pacientes de Leishmaniasis, pero puede evitarse usando proteínas recombinantes, mucinas purificadas y ensayos de Western Blot usando antígenos de *T. cruzi* (Umezawa, *et al.*, 2000). Estos reactivos también son útiles para el diagnóstico de rutina, ya que cada paciente chagásico puede presentar diferente reactividad ante los antígenos del parásito (OPS/OMS, 1998). Independientemente del mecanismo de transmisión, todos los pacientes en la fase aguda deben ser tratados, ya que es posible curar hasta el 100% de estos casos (OPS, 1998). Mientras que durante la fase crónica, es raro que se identifiquen parásitos, aunque la detección es favorecida empleando metodologías moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa o "PCR" por sus siglas en inglés (Umezawa, *et al.*, 2000). El agente puede ser aislado por: inoculación de ratones; cultivo en medio especializado; xenodiagnóstico, donde los vectores no infectados son alimentados con sangre de un paciente y cuatro semanas más tarde se examina el intestino de la chinche en busca de parásitos (CDC, 2003). Es importante mencionar, que aunque sería deseable realizar exámenes parasitológicos rutinarios antes y después de los tratamientos, no siempre es posible por la cantidad y laboriosidad de trabajo además de la baja sensibilidad de estos análisis (OPS y OMS, 1998).

5. Prevención y vigilancia. La higiene en los hogares es el mejor método para la protección individual, así como el aseo y mejoramiento de la vivienda. La mejora de la vivienda significa que el piso de las viviendas no sean de tierra, rajaduras, ni capas de materiales en donde las chinches puedan esconderse, aprovechando para ello los materiales disponibles en cada comunidad (WHO, 1997). De hecho, modelos

matemáticos han demostrado que la enfermedad podrá ser controlada cuando se logre la eliminación sistemática del vector, se mejore la vivienda y se sostenga un programa de control transfusional de la enfermedad (Pinto, 2002).

El uso de insecticidas para el control de la chinche es el método más práctico y de relativa accesibilidad. El costo de programas de fumigación puede aumentar según el tipo de insecticida utilizado, salarios de técnicos, viáticos y transporte de equipo al campo (Acevedo, *et al.*, 2000). Se rocían las paredes y techos de las casas de áreas endémicas con insecticidas residuales de larga duración. Estos esfuerzos, en conjunto con el mejoramiento de viviendas prevee reducir o eliminar sitios de proliferación de chinches, ya que se ha observado que el control de las chinches es un mecanismo factible para prevenir infecciones, aunque siempre deben tomarse medidas para prevenir reinfestaciones en sitios donde se ha logrado erradicar al vector (WHO, 1997). Si esto no se logra, significa que se encontrarán chinches vivas en estas áreas anteriormente rociadas, las que se denominan poblaciones residuales, suponiendo que escaparon a la aplicación del insecticida (Dujardin, *et al.*, 2002) o inmigran de poblaciones adyacentes, peridomésticas o silvestres (Anderson, *et al.*, 2002). En caso se observen colonias después de aproximadamente tres años, con el apoyo de programas de vigilancia entomológica, a este fenómeno se le denomina reinvasión y se propone la existencia de focos vecinos no identificados de donde resurgen chinches de forma activa o pasiva (Dujardin, *et al.*, 2002). Se han reportado casos de tasas de reinfestación de casi el 20% en aldeas, un año después del rociamiento con insecticidas (Anderson *et al.*, 2002). En otros lugares como Yucatán, se ha demostrado que la reinfestación ocurre 4-6 meses pasado el rociamiento y que al aumentar las poblaciones de chinches, también aumentan las tasas de infección de *T. cruzi*. En Belice, se observó un comportamiento similar. Además, los insectos selváticos se dispersan durante la estación seca, congregándose en sitios adecuados como refugio para la época lluviosa (Dumonteil, *et al.*, 2002).

En Bolivia, por ejemplo, *Triatoma infestans* se dispersó del hábitat selvático por rocas habitadas por *Cavia*, a través de la región de transmisión de *T. cruzi* doméstico de países del cono Sur (Gaunt y Miles, 2000). Ahora se ha detectado que las reinfestaciones

se atribuyen fundamentalmente a la presencia de focos residuales en los peridomicilios; además, se observó que la localidad que recibió tratamiento de insecticidas desde hacía 30 años y con más frecuencia que las demás localidades, es donde existía mayor diversidad genética (Segura, *et al.*, 2002). En países con altos índices de infestación de *Triatoma dimidiata*, como Guatemala, se ha observado que pueden alcanzar altos niveles de dispersión, lo que se debe a la facilidad que tienen los adultos para colonizar casas por el hecho de ser voladores (Dumonteil, *et al.*, 2002).

En el control, se está dando más importancia a la implementación de programas autosostenibles que a los tratamientos con insecticida, debido al costo y sus indeseables desventajas; además se promueve la participación de las comunidades descentralizando las actividades de control. Se proyecta la implementación de laboratorios de control epidemiológico en países endémicos. Estos facilitarán la recolección de muestras de sangre en el campo, asegurarán criterios estándar de diagnóstico y mantendrán la vigilancia y la prevención. Las fases a desarrollar son: preparatoria, de ataque y de vigilancia. Durante la preparación, el personal involucrado es entrenado para ejecutar las medidas de control. Durante el ataque, todas las casas donde se han detectado focos de infestación son rociadas; y en la vigilancia, se está alerta para que la infestación se encuentre siempre controlada (WHO, 1997).

Para el control de las chinches se han realizado ensayos con diferentes tipos de insecticidas. Se ha observado que el DDT es un insecticida que no es lo suficientemente efectivo contra los triatominos. Insecticidas más caros como dieldrin, hexacloruro de benceno y propoxur también han sido empleados, pero la actividad residual en paredes de adobe no dura más de tres meses. Por lo tanto, los insecticidas de elección son principalmente sintéticos como piretroides, dentro de los cuales pueden mencionarse: cipermetrin, ciflutrin, deltametrin, permetrin, lamdacihalotrin y fenpropatrin. A pesar de que existen otros más caros, estos tienden a tener actividad residual más larga y se aplican en dosis más bajas. Existen otras presentaciones utilizadas como los polvos rehidratables, concentrados en suspensión y fórmulas de liberación lenta con base de látex o acetato de polivinilo (WHO, 1997). La enfermedad de Chagas podría ser casi

totalmente erradicada por medio del control epidemiológico de los vectores, pero después de tratamiento, se espera cierta reincidencia. Esta enfermedad es zoonótica y esto implica que muchos animales salvajes actúan como reservorios y otras especies de triatomíneos que transmiten el parásito, especialmente en áreas silvestres (Kollien and Schaub, 2000).

Como medidas alternativas de control de la enfermedad se reportan compuestos que actúan contra el *T. cruzi* en el vector. Por ejemplo, análogos de hormonas juveniles, productos de algunas plantas como neolignanos y bacterias simbióticas (Kollien and Schaub, 2000). Sin embargo, hace falta encontrar la combinación adecuada de estos factores y las proporciones adecuadas. Se ha observado que agentes inhibidores del desarrollo del parásito no funcionan correctamente si se administran de forma aislada, sino que deben administrarse con sangre. En general, es importante elucidar el mecanismo de acción de estos métodos alternativos de control, de modo que se propongan nuevas estrategias de ataque para el vector (Kollien and Schaub, 2000).

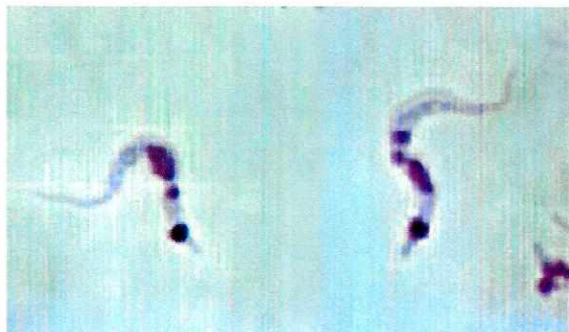
Nitrofurano y nitroimidazol son los medicamentos de elección para el tratamiento de la infección, pero deben considerarse los efectos secundarios que puedan provocar y las limitaciones que puedan presentar en función de variación de cepas del parásito, según posición geográfica. Otras preparaciones son tóxicas causando náuseas, vómitos, hipoplasia de médula ósea, dermatitis y polineuritis (Umezawa, *et al.*, 2000). Cualquiera que sea el tratamiento que se elija, este se concentrará en: (1) erradicar al parásito; (2) evitar la aparición o progresión de lesiones viscerales; y (3) en interrumpir la cadena de transmisión. El tratamiento se basa en la demostración de la relación entre el parásito y la inflamación a nivel de miocardio, en la regresión experimental de la fibrosis miocárdica con el tratamiento específico y en la demostración de que el tratamiento puede reducir la aparición o la evolución de lesiones cardíacas evaluadas por electrocardiograma. No se recomienda el tratamiento durante el embarazo, lactancia, insuficiencia hepática, renal, lesiones graves asociadas con la enfermedad de Chagas, ni en casos de hipersensibilidad a los medicamentos (OPS, 1998).

## B. Agente infeccioso

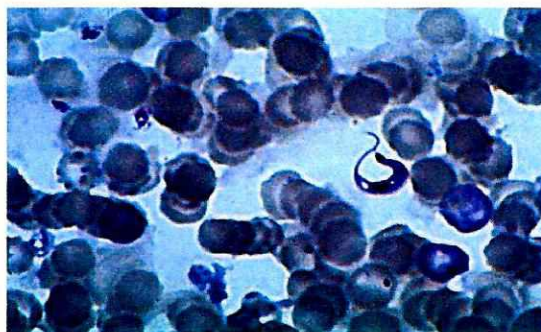
Dentro del género *Trypanosoma* se encuentran en Guatemala: *T. cruzi* y *T. rangeli*. El primero, se desarrolla en el tracto intestinal del vector y es el causante de la enfermedad de Chagas. El segundo no es patogénico para humanos y hospederos vertebrados, sin embargo se desarrolla e invade la hemolinfa y glándulas salivales del vector. Los primeros reportes de presencia de *T. cruzi* y *T. rangeli* en humanos guatemaltecos fueron realizadas en 1932 y 1934, respectivamente (De León, 1949; Blanco, 1943; Reichnow, 1933).

Figura 5

Dos estadios de *T. cruzi*



a. Epimastigotes en tinción (Beard, *et al.*, 2003)



b. Tripomastigote metacíclico en frote sanguíneo y tinción (WHO, 2004).

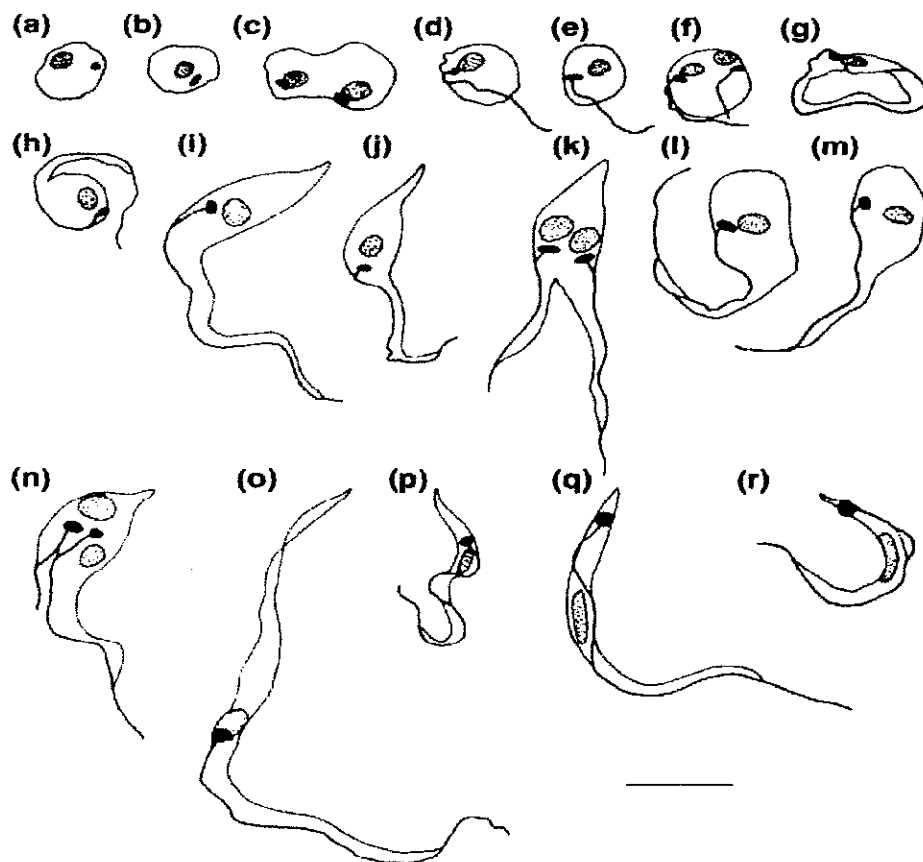
1. Clasificación taxonómica. *T. cruzi* se ubica sistemáticamente de la siguiente forma (INGEBI, 2001):

Superreino	Eukaryota
Reino	Protista
Phylum	Sarcomastigophora
Sub-phylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Sub-orden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i> (Chagas, 1909)

2. Características morfológicas generales. Existen 18 formas diferentes incluyendo las fases intermedias (Fig. 6):

Figura 6

Formas de *T. cruzi* encontradas en el intestino delgado y el recto de *Triatoma infestans*  
(Kollien and Schaub, 2000)



Dibujos de cámara lúcida de las formas del desarrollo de *Trypanosoma cruzi* encontradas en el intestino delgado y el recto de *Triatoma infestans*. Amastigotes (a-c) y esferomastigotes (d-f) con kinetoplasto redondo (a,d) o plano (b,e= o fases de división (c,f); fases intermedias de esferomastigotes y epimastigotes, formas de anillo (g) o forma enrolladiza (h); epimastigotes, largos (i) o formas cortas (j) o fases de división (k); formas intermedias entre esferomastigotes (oepimastigotes) y tripomastigotes con extremo posterior redondo y kinetoplasto lateral (l) o al lado posterior del núcleo (m); formas intermedias entre epimastigotes y tripomastigotes, incluyendo divisiones dispares (resultando en tripomastigote y epimastigote) (n) y fases alargadas largas (o) o cortas (p); tripomastigotes con kinetoplasto subterminal, de formación larga (q) o corta (r). Escala = 10µm.

3. Desarrollo de *T. cruzi* en Triatominos. La colonización ocurre en diferentes regiones del tracto gastrointestinal, dadas las diferentes condiciones de epitelio y superficie. En la sección del entodermo, las paredes poseen microvellos cubiertos de capas de membranas extracelulares, que luego de largos períodos de ayuno, desaparecen. Luego de una comida con sangre, muchos parásitos se desprenden de la microvellosidad. La capacidad de los Tripanosomátidos para adherirse a las diferentes regiones, se debe a modificaciones en el flagelo y/o cuerpo celular. Mientras están en el intestino delgado, la mayoría de epimastigotes se localizan entre el contenido del tracto gastrointestinal y las capas de membranas celulares, donde existe un contacto íntimo con las microvellosidades, mientras que en el recto, los flagelos se adhieren a la cutícula rectal, de un material similar al de los desmosomas. Aquí es donde se encuentra el sitio favorito para colonización, incluso cuando la chinche ha estado en largos períodos de ayuno (Kollien and Schaub, 2000).

En *R. prolixus* existen aglutininas de interés en el estómago y un importante factor hemolítico que lisa las membranas de los eritrocitos y que puede afectar también al *T. cruzi*. Entre 1 y 4 semanas después de realizada la infección, la densidad poblacional del parásito aumenta en el intestino delgado, pero se multiplican más en el recto, alcanzando  $10^6$  parásitos/individuo (Kollien and Schaub, 2000).

### C. Vectores en Guatemala

Son varias las chinches responsables de la enfermedad de Chagas para América Central y del Sur. Sin embargo, los que se presentan como los más importantes son: *T. dimidiata*, *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *T. nitida*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* (Pinto, 2002). Se trata de chinches que evolucionaron entre el Cretáceo tardío o temprano en el Cenozoico (Paleoceno, Eoceno) a chupadoras hematófagas, desarrollando anti-trombinas y mordeduras menos dolorosas (Gaunt y Miles, 2000).

Los Triatóminos son insectos que se clasifican de la siguiente forma: Triatomini, Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini y Alberproseniini. Estas familias comprenden 14 géneros que a su vez incluyen unas 111 especies aceptadas (Zeledón, 1981). En Guatemala existen principalmente tres especies domiciliarias de triatóminos vectores de la enfermedad de Chagas: *R. prolixus*, *T. dimidiata* y *T. nitida* (Nagakawa, *et al.*, 2003). En Sudamérica, no son encontrados a más de 3,000 m.s.n.m. (Pinto, 2002), mientras en Guatemala, se encuentran desde 50-1580m.s.n.m., siendo los 801-1000 m.s.n.m. la altura a la que más prevalecen (Tabaru, *et al.*, 1999). *R. prolixus* es el vector más eficiente para la transmisión de *T. cruzi*, aparentemente es exclusivamente intradoméstico en Centroamérica y puede ser casi totalmente eliminado por medidas de control con insecticidas. *T. nitida*, en cambio, aunque se encuentra en Guatemala, presenta una tasa de infestación tan baja que no representa una amenaza significativa para la transmisión de Chagas (Nagakawa, *et al.*, 2003). *T. dimidiata* se ha reportado en ecotopos selváticos y se ha observado que pueden dispersarse en ecotopos peridomésticos e intradomésticos (Nagakawa, *et al.*, 2003), siendo el vínculo natural el tacuazín, *Didelphis marsupialis* (Montenegro, *et al.*, 2002), y otros roedores creando una asociación entre vector, parásito, hospederos selváticos y hábitat terrestre (Gaunt y Miles, 2000).

Figura 7

Vectores adultos

a. *T. dimidiata*  
(WHO, 2003)b. *R. prolixus* (WHO, 2004)c. *T. infestans* (WHO, 2004)

Cabe mencionar que la tasa de transmisión de la enfermedad no depende del vector *per se*, sino de la densidad del vector por área, fuente de alimento predilecta,

susceptibilidad a las cepas de parásitos, longevidad, capacidad de defecar inmediatamente posterior a la ingesta de alimento, facilidad para que el parásito penetre la piel del mamífero, edad y condiciones inmunes del mamífero e irritabilidad durante la mordedura del vector (Pinto, 2002).

1. *Rhodnius prolixus*

a. Clasificación taxonómica

Superreino	Eucariota
Reino	Metazoa
Filo	Artrópoda
Clase	Insecta
Orden	Hemíptera
Familia	Reduviidae
Subfamilia	Triatominae
Género	<i>Rhodnius</i>
Especie	<i>Rhodnius prolixus</i>

([www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=13249](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=13249))

b. Importancia en la enfermedad de Chagas. *R. prolixus* es un buen transmisor de la enfermedad de Chagas en Guatemala, ya que está bien domiciliado y morfológicamente el parásito ha presentado cierta preferencia por este vector. Sin embargo, presenta la ventaja de que después de rociar con insecticidas un área, no se encuentra rastro.

2. *Triatoma dimidiata*

a. Nombres vulgares. En Guatemala se le llama chinchorra, chinche picuda, chinche de vaca, chinche de monte, chinchupa y telepate. En México el nombre vulgar es chinchona; en El Salvador es chinche cuerudo, talaje (a las ninfas) y telepate; Ecuador las conoce como chinchorro, chupasangre o chinche de caballo. En otros países de latinoamérica se les conoce con el nombre de babeiros, vinchucas, pitos (Zeledón, 1981).

b. Clasificación taxonómica. El vector de la enfermedad de Chagas *T. dimidiata* corresponde a la siguiente clasificación taxonómica:

Superreino	Eucariota
Reino	Metazoa
Filo	Artrópoda
Clase	Insecta
Orden	Hemíptera
Familia	Reduviidae
Subfamilia	Triatominae
Género	<i>Triatoma</i>
Especie	<i>Triatoma dimidiata</i>

([www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=72491](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=72491))

c. Distribución geográfica. La mayor parte de las especies de triatóminos están confinadas al continente americano (Regiones Neártica y Neotropical). Las pocas especies que existen afuera de nuestro continente pertenecen a la Región Oriental y al borde de la Región Australiana. Desde 1914 se conoce de la presencia de *T. dimidiata* en México, Honduras, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Ecuador y Perú (Zeledón, 1981).

En Guatemala parece tener predilección por ambientes secos en los departamentos orientales, pero también se le encuentra en zonas húmedas, como regiones de Alta y Baja Verapaz. A 300m representa un 2% de las poblaciones de triatóminos domésticos, a 900m constituye el 77% y a 1200m es prácticamente el 100%; en relación a *R. prolixus*. Dentro de los muchos hábitat selváticos, pueden mencionarse palmeras, agujeros en troncos de árboles, epífitas en árboles, madrigueras, agujeros en rocas y otros refugios animales (Miles, *et al.*, 2003).

d. Biología. La descripción de la biología de la chinche la realizó Zeledón (1981):

«Se estima que el ciclo de vida de *T. dimidiata* en la naturaleza es de un año y medio, pero pueden sobrevivir entre 5 meses y 3 años. El huevo madura a los 24-30 días,

pero puede variar según las condiciones ambientales. Ecológicamente, adultos y ninfas ocupan hábitats similares con hábitos de alimentación parecidos. » El desarrollo de la ninfa es una función de temperatura y tiempo en el Cuadro 1.

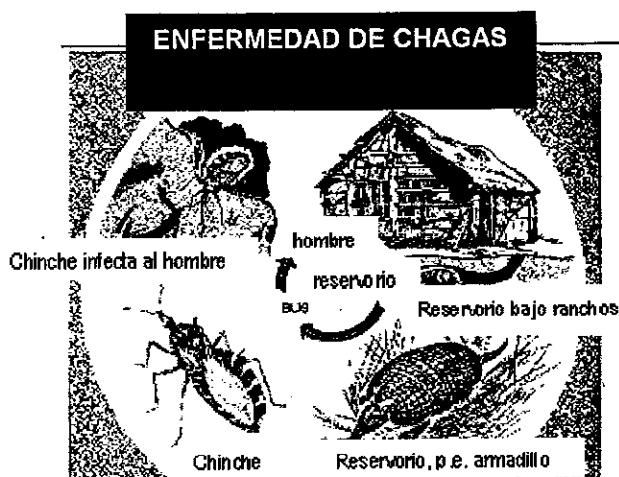
Cuadro 1

Tiempo de maduración de los huevos de *T. dimidiata* dependiendo de la temperatura ambiente (Adaptado de Zeledón, 1981)

Temperatura (°C)	Días
20	75
25	43
30	25
32	18
34	17
35	No eclosión

«El ciclo completo de huevo a adulto a 70% de humedad relativa puede ser de 276 a 339 días a 26-30°C. Los adultos pueden diferenciarse de las ninfas porque presentan alas, esculeto, conectivos y órganos genitales. Una hembra puede depositar durante su vida un promedio de 684 huevos, con un promedio diario entre 10 y 31 según las condiciones de temperatura y frecuencia de comidas. Cuando las hembras han copulado, los espermatozoides pueden almacenarse en las espermatecas incluso por más de un año pudiendo éstas volar hacia casas atraídas por la luz y depositar huevos fértiles para la formación de una nueva colonia. Las hembras vírgenes y alimentadas una vez son capaces de poner huevos estériles. Las que no han sido alimentadas pueden depositar huevos fértiles o infértiles dependiendo de que hayan tenido una cópula previa. En general, la infección de adultos con *T. cruzi* parece no afectar la oviposición, fertilidad y longevidad. Para copular, los adultos hacen un ruido con el surco estridulatorio. Los machos danzan alrededor de las hembras alimentadas antes de copularlas. En varios intentos al día, pueden copular hasta a 4 hembras en 3 días. Entre 16°C y 30°C la cópula puede variar entre 12.5 y 19.0 minutos.» (Zeledón, 1981).

Figura 8  
Ciclos de transmisión de *T. cruzi*  
(Campbell, 2004)



«Que las chinches se alimenten bien bajo condiciones controladas es difícil de lograr, especialmente con las ninfas de primero y segundo estadio, resultando en alta mortalidad entre ellas. Una comida sanguínea que produzca una buena distensión del abdomen es suficiente en cualquier estadio ninfal para llevar al insecto a la ecdisis». (Zeledón, 1981).

e. Características morfológicas. Los hemípteros se caracterizan por presentar un pico con un labio segmentado en forma de canoa, cuyos bordes tienden a juntarse por encima, excepto en la base en donde se encuentra el labro, y que aloja a las demás piezas bucales que son finas y delgadas (estiletos) y constituyen dos maxilas y dos mandíbulas. El rostro es largo en los hemípteros fitófagos y corto en los depredadores (entomófagos) y hematófagos, no alcanzando en este último caso el primer par de coxas. Son de pico recto y en reposo descansa debajo de la cabeza. Al picar, el rostro se dobla a la altura de la articulación de los segmentos 2° y 3°, por una porción

membranosa. Las mandíbulas ayudan a perforar la epidermis y las maxilas penetran en busca de un vaso capilar. El rostro posee tres segmentos cuyas relaciones relativas y de longitud total son importantes en taxonomías terminando casi siempre en el proesternon, en un espacio con pequeñas estrías transversales llamado surco estridulatorio (Zeledón, 1981).

A cada lado de la cabeza y a una distancia variable de los ojos, se encuentra una antena de cuatro segmentos que es útil para reconocer rápidamente algunos géneros. A *Triatoma* le nacen a la mitad, entre los ojos y el ápice de la cabeza; a *Rhodnius* le inician cerca del extremo anterior. El segundo segmento antenal posee pelos finos y largos, que se insertan en depresiones redondas, llamados tricobotrios cuya distribución parece ser característica en diversas especies (Zeledón, 1981).

«El pronoto posee un lóbulo anterior y otro posterior, que pueden llevar espinas o tubérculos de interés taxonómico. El mesonoto está formado por un esculeto. El abdomen en los adultos tiene siete segmentos visibles; el primero está escondido y los últimos tres son parte de la genitalia en ambos sexos. El conectivo o parte lateral del abdomen muestra generalmente manchas de variados colores y formas en las diversas especies. Los adultos son alados aunque hay una especie en la que, con excepción de algunos machos, son micrópteros; las alas anteriores son verdaderos hemélitros con una porción dura (corio) y otra membranosa (membrana); las posteriores son delgadas, membranosas y se doblan debajo de las primeras. El aspecto de la genitalia masculina se considera de valor taxonómico» (Zeledón, 1981).

En ellas el tórax posee sus tres porciones más o menos nítidas y el abdomen muestra 10 segmentos, aunque los últimos son muy reducidos. Las características del tórax dorsal permiten reconocer cualquiera de los cinco estadios ninfales y el aspecto de los últimos segmentos abdominales de la ninfa de 5º estadio permite determinar el futuro sexo del adulto (Zeledón, 1981).

De las más de 100 especies de triatomíneos en el Nuevo Mundo, las más importantes son las del ciclo selvático de la enfermedad, porque sólo algunas especies infestan casas y son importantes vectores para el ciclo doméstico. De estos, *R. prolixus*, *T. infestans* y *T. dimidiata* son los más importantes (Kollien and Schaub, 2000).

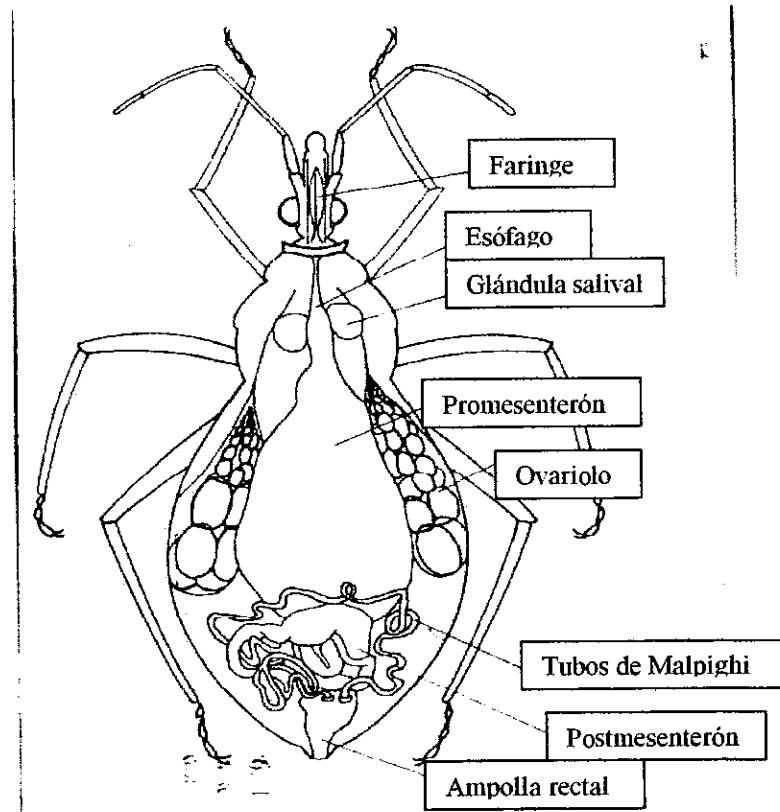
El color general es oscuro de alquitrán o negro con el conectivo y el corio que varía de un amarillo pálido al anaranjado, con una pilosidad corta e inconspicua. La cabeza es rugosa dorsalmente, cerca de dos veces más larga que el ancho a la altura de los ojos y aproximadamente del largo del pronoto. Los ojos vistos lateralmente alcanzan el borde de abajo, pero no el de arriba, de la cabeza. Los ocelos son grandes, situados a una distancia equivalente a aquella entre su borde anterior y el margen posterior de los ojos. Los tubérculos anteníferos son subcilíndricos, alargados, situados ligeramente posteriores al centro de la región anteoocular; el primer segmento antenal alcanza el nivel del ápice del clipeo; el segundo segmento posee muchas cerdas fuertes ligeramente mayores que el diámetro del segmento y con numerosos pelos delicados, cortos y erectos. El rostro es delgado, el primer segmento alcanza el nivel del ápice del tubérculo antenífero; el segundo alcanza el nivel del borde posterior de la cabeza. Casi todas las cerdas del rostro son cortas, pero ligeramente más largas, y menos numerosas en el ápice del segundo y tercer segmentos. El cuello es oscuro, con porciones laterales amarillentas. El pronoto es uniformemente oscuro o negro; el lóbulo anterior posee un tubérculo discal y uno lateral más pequeño a cada lado que no son puntiagudos ni elevados; los ángulos anterolaterales están dirigidos anterolateralmente; son cortos, subcónicos, en algunos especímenes amarillentos en el ápice. El escutelo es rugoso, con el área central no deprimida; el proceso apical es tan largo como el cuerpo del escutelo, subcilíndrico y ligeramente doblado hacia abajo en el ápice. Las patas son oscuras uniformemente; los fémures anteriores y medios poseen dentículos subapicales pequeños. Las tibiae anteriores y medias del macho tienen fosas esponjosas, que están ausentes en la hembra. El abdomen es convexo ventralmente, con diminutas estrías transversales y pilosidad corta. Los espiráculos están próximos, aunque no adyacentes, a la sutura conectiva. El color del

vientre varía desde oscuro de alquitrán hasta negro excepto en un área de extensión variable adyacente a la sutura conectiva. Los segmentos del conectivo poseen manchas color de alquitrán o negras en la parte media o tercio anterior, que ocupan la mitad o todo su ancho; de color amarillo pálido o anaranjado en todo el resto (Zeledón, 1981).

El tamaño de los adultos varía entre las formas obtenidas en la naturaleza, que en general son mayores que aquellas nacidas en el laboratorio. El macho es de 24.5-32.0 mm y la hembra de 24.5-35.0mm; el ancho del pronoto del macho mide 5.5-7.0mm y el de la hembra de 6.5-9.0mm; el ancho del abdomen del macho mide 9.0-13.0mm y el de la hembra 9.5-13.0mm. La disminución de tamaño en el laboratorio, en generaciones progresivas, ha sido observado en otras especies y no tiene una explicación clara. Se creen que estas diferencias podrían explicarse por la mayor dificultad que tienen las ninfas de alimentarse en forma completa en la naturaleza, lo cual las obliga a llevar a cabo numerosas comidas parciales, que no permiten una ecdisis o muda, en el mismo estadio con distensiones subsecuentes del tegumento. Estas diferencias de tamaño son notables muchas veces entre los correspondientes estadios ninfales de *T. dimidiata* nacidos en el laboratorio; además, se ha observado variabilidad cromática en adultos, especialmente en lo que se refiere a las manchas de las alas anteriores (Zeledón, 1981).

El huevo es de color blanco céreo y lustroso; varía durante el desarrollo embrionario a blanco sucio, melón pálido a salmón rojizo con dos manchitas oscuras que corresponden a los ojos de la ninfa. Ésta, en el momento de salir levanta el epérculo, como tapa de reloj y una vez afuera se sacude y estira. Al principio es de color rosa pálido, luego se torna rojo coral y finalmente adquiere un color más oscuro. La estructura de los segmentos genitales permite separar el futuro sexo en las ninfas, según la existencia de dos espermatecas y el aspecto histológico; la glándula accesoria es muy difícil de ver por ser muy reducida, lo cual explicaría porque los huevos de esta especie no se adhieren al sustrato. Miden 1820x1120 micrómetros, con un diámetro para el opérculo de 680 micrómetros (Zeledón, 1981).

Figura 9  
 Aparato digestivo de triatóminos  
 (Zeledón, 1981)



En el aparato digestivo de los triatóminos, tal como se muestra en la figura 9, el canal chupador continúa con la faringe; luego hay un esófago corto y un estómago distensible (promesenterón) en donde la sangre se acumula para su digestión. Este se continúa con una porción más delgada y larga (postmesenterón o intestino medio) que trae los productos principales de la digestión y que va a terminar en el saco rectal a la misma altura en que se abren las cuatro ampollas de los tubos de Malpighi que descargan la orina directamente en ese saco, que constituye por sí sólo el intestino posterior. En esa sección se encuentra una glándula especial, que tapiza la porción inicial del saco, llamada glándula rectal (Zeledón, 1981).

f. Alimentación, preferencias alimentarias y ayuno. Cada uno de los cinco estadios de ninfas y los adultos se alimentan de sangre. El alimento lo almacenan en el promesenterón, manteniendo la sangre casi intacta, ya que la acción de anticoagulantes de las glándulas salivales y del estómago la mantienen sin digerir. Durante una comida, se liberan hormonas diuréticas, agua y iones que son transportados por la pared del estómago, la hemolinfa se dirige a los túbulos de Malpighi, y más tarde se dirige al recto (Kollien and Schaub, 2000).

La alimentación del vector tiene un efecto importante sobre los parásitos que puedan encontrarse en el tracto gastrointestinal. La sangre puede causar efectos dañinos en la población total de parásitos, disminuyéndola >50% luego de 4 horas de haberse alimentado. Esto, porque los parásitos se encuentran con componentes nuevos de la saliva y enzimas digestivas, a los que no estaban expuestos anteriormente. Siendo las principales diferencias: temperatura, osmolalidad y disponibilidad de alimento. La orina depositada frecuentemente contiene las poblaciones de tripomastigotes metacíclicos. Luego de algunas horas, la proporción de epimastigotes a tripomastigotes aumenta, indicando la inducción de metaciclogénesis por la orina (Kollien and Schaub, 2000).

El período para atacar a una víctima varía en cada estadio y tiende a ser más prolongado en las primeras ninfas. En esta especie hay una tendencia a que la comida se vea interrumpida con cierta frecuencia, de modo que se prolonga el tiempo de contacto con la víctima. Sin embargo, se ha reportado que la hembra puede completar su alimentación en un tiempo menor a los 10 minutos. La alimentación de cada estadio ninfal y adultos varía, siendo las cantidades máximas de sangre ingeridas por una ninfa del 5° estadio, un macho y una hembra de 421.3, 290.4 y 425.2mg, respectivamente. Las cantidades variaron al alimentarse de *Didelphis marsupialis* (tacuazín) en un rango de 611.9 a 656.0mg; y de 496.4 a 518.5mg al alimentarse de gallina. En general, las hembras se alimentan más fácilmente y son más voraces que los machos (Zeledón, 1981).

Es frecuente que los adultos de *T. dimidiata* traídos del campo se rehúsen a alimentarse de animales de laboratorio, presentando una alta mortalidad. Usualmente, se ha observado que es más fácil alimentar a las ninfas del 2º estadio. El conejo, el armadillo y el pizote (*Nasua narica*) resultaron ser los más atractivos para la alimentación, mientras que las ratas, ratones y por último, el hombre: fueron los menos atractivos (Zeledón, 1981).

*T. dimidiata* muestra una cierta preferencia por huéspedes durmiendo y se ha observado que la víctima más común es el hombre, posiblemente debido a la mayor biomasa que ofrece dentro de una habitación. Sin embargo, se han reportado experimentos con antisueros preparados contra la sangre de diversos animales estableciéndose un importante hecho epidemiológico: existe una conexión clara entre el ciclo silvestre de *T. cruzi*, entre *T. dimidiata* y el zorro; así como *T. dimidiata* y el hombre o sus animales domésticos o sinantrópicos. En Ecuador, la sangre más frecuentemente encontrada en los insectos, tanto en las casas como en los peridomicilios, ha sido de rata y en segundo lugar, el hombre (Zeledón, 1981).

Las ninfas pequeñas son capaces de alimentarse de otras mayores o de adultos canibalísticamente. En la naturaleza con frecuencia se observan ninfas de primero y segundo estadios llenas de un líquido claro que es evidentemente hemolinfa de otras compañeras (Zeledón, 1981).

Estos insectos tienen una gran capacidad de resistirse al alimento y el fenómeno es conocido y ha sido estudiado en algunos países en varias especies. Esta capacidad generalmente aumenta con el estadio ninfal, especilamente después de efectuar una comida sanguínea. Los adultos resisten menos que las ninfas de quinto estadio y ambos sexos se comportan en forma similar. En general, las ninfas que más resisten son aquellas que toman una cantidad de sangre importante, pero no suficiente para llevarlas a una ecdisis. El máximo de resistencia se produjo en una ninfa de quinto estadio que duró viva en ayunas 10 meses y medio después de su última comida de sangre. A pesar de tener varias observaciones importantes sobre el comportamiento del ayuno, debe tomarse

en cuenta que la temperatura y la humedad relativa son factores determinantes (Zeledón, 1981).

Es usual que una alimentación sea suficiente para que se desarrolle al siguiente estadio larval, que ocurre dentro de 6 a 30 días. Después de cambio de exuvia, sólo pequeños residuos de sangre se encuentran presentes en el estómago, que al ser digeridos, inician un período de ayuno, que puede durar más de 12 meses dependiendo de la especie, ninfa y condiciones climáticas (Kollien and Schaub, 2000).

La alimentación induce grandes cambios en el insecto, especialmente en el recto. Un pH ligeramente ácido del contenido rectal cambia a alcalino en la orina, aproximadamente 24 horas luego de alimentarse. Con esto, aumenta la osmolalidad ligeramente de las heces respecto de la orina (320 a 410 mosmol kg<sup>-1</sup>) y luego cambia drásticamente en el contenido rectal amarillento hacia los siguientes días (hasta 1000 mosmol kg<sup>-1</sup>). Mientras iones como sulfato y fosfato predominan en el contenido rectal, la orina es principalmente amortiguada con una solución de cloruro de sodio y de carbonato. Las concentraciones de proteína libre y de aminoácidos enlazados son reducidas significativamente en la orina. En las segunda y tercer gotas de orina, proteínas/péptidos ricos en glicina, glutamato o leucina y tirosina son excretados (Kollien and Schaub, 2000).

g. Patrones de defecación. Es muy importante la habilidad que posee *T. dimidiata* para defecar durante o inmediatamente después de una comida sanguínea, especialmente para la transmisión de la enfermedad de Chagas. Se reporta que los estadios ninfales o el estadio adulto puede defecar antes de terminar la comida, lo que parece estar relacionado con las frecuentes interrupciones y consecuente aumento en la duración de su período de comida, sobre todo cuando se compara con el de *Triatoma infestans* y *R. prolixus*. Los machos y las ninfas en 5° estadio son los más tardados en defecar. Además, *T. dimidiata* produce menor número de defecaciones, en un período de tiempo determinado, que las otras dos especies, y el número de ejemplares que defecan en ese mismo tiempo también tiende a ser menor. Comparado a *R. prolixus* y *T. nitida*,

se observó que *T. dimidiata* podría ser menos eficiente en la transmisión de *T. cruzi* quizá con la excepción de las ninfas de 5° estadio y de las hembras, pero que esto se puede compensar por una relación más prolongada con la víctima (Zeledón, 1981).

Figura 10

Chinche defecando brevemente después de picar a una víctima  
(WHO, 2004)



El residuo color café que es excretado es el que contiene la carga de parásitos que ingresan al sistema de la víctima, por la picadura al rascarse o frotarse.

Inicialmente el contenido rectal es excretado, seguidos de gotas de orina clara y gotas de orina amarillenta con cada vez más esferas de ácido úrico. La sangre concentrada en el estómago, será levemente cambiada por enzimas que actúan sobre carbohidratos y hemolisinas. Luego, pasará en pequeñas cantidades a la parte posterior digestiva y de absorción en el intestino delgado. Mientras, los que se alimentan de sangre, usan tripsina para digerir proteínas, los triatominos usan catepsinas y requieren de acidificación del contenido intestinal (Kollien and Schaub, 2000).

h. Hábitat y relación con el domicilio. En cuanto al comportamiento de estos vectores, las chinches se encuentran en áreas boscosas como en áreas secas de las Américas. El adulto y las fases inmaduras viven en nidos y madrigueras de aves, murciélagos, ardillas, tacuazines y armadillos, entre otros animales, y durante la noche se alimentan de ellos. En algunos casos, las chinches se han adaptado a vivir en las cercanías de casas donde se alimentan de humanos y animales domésticos, incluyendo pollos, ganado, cabras, gatos y perros. Frecuentemente, durante el día, estas chinches descansan cerca de su fuente de sangre (WHO, 1997). En Guatemala, en el territorio del Petén, se han encontrado en cuevas de murciélagos, plantaciones de café, potreros de pastoreo vacunos y troncos de árboles viejos. Los troncos presentan una situación de importancia epidemiológica porque el campesino los corta para obtener leña e introduce al vector sin percibirlo en la corteza de los troncos o pedazos (Zeledón, 1981).

*T. dimidiata* ha sido capturada en casas y se asume que ha llegado atraída por la luz, particularmente las adultas, que por tener alas desarrolladas, poseen la facilidad de volar. Es más frecuente encontrarlas en casas con techo de palma, adobe, piedra, bajareque, paredes de caña, paredes agrietadas, mostrando preferencia por camas de tablas, varillas, petates y cajones acumulados bajo las camas o rincones del cuarto, generalmente en partes bajas a una altura menor a un metro. Y no debe olvidarse que el porcentaje de casas infestadas, así como el número de insectos encontrados, está en relación directa con las condiciones sanitarias de la casa. (Zeledón, 1981).

Las poblaciones de insectos que se encuentran dentro de la casa y la periferia, parecen indicar que existe un intercambio de individuos, que sugiere un desplazamiento constante de los insectos hacia adentro y/o hacia afuera del domicilio. La presencia de sangre humana en el contenido estomacal de los insectos incluyendo los estadios ninfales que han sido capturados en diversas partes de la casa, así parecen demostrarlo. Se ha observado una tendencia a permanecer cerca de una víctima en un mismo lugar, esto sucede por ejemplo en un gallinero próximo a la casa, estableciendo verdaderas colonias del insecto asociado con roedores o marsupiales que anidan entre la leña. En algunas localidades es frecuente encontrar numerosos ejemplares de *T. dimidiata* en el entrepiso.

Esto sucede en casas levantadas sobre bases a 50 centímetros o menos, que dejan un espacio abierto entre el suelo y el piso, adecuado para el refugio de diversos animales domésticos o sinantrópicos. En estos entrepisos se forman colonias del insecto que en la noche atraviesan los resquicios o hendiduras del piso, generalmente de madera y se alimentan de las personas dormidas, regresando luego a su refugio (Zeledón, 1981).

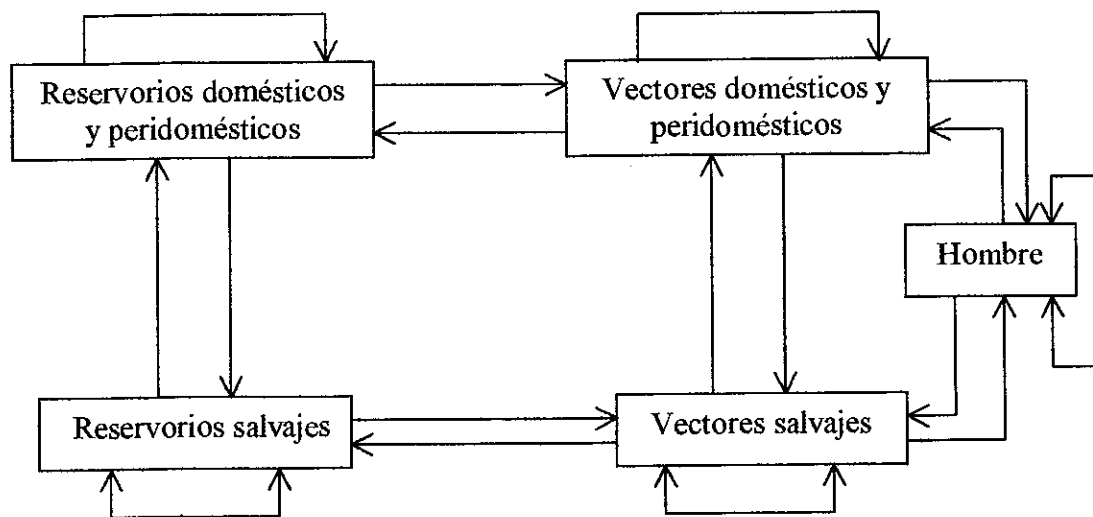
Los adultos con frecuencia depositan o dejan caer sus huevecillos en el suelo de las casas, principalmente debajo de las camas, permitiendo que las ninfas nazcan en este medio en donde ejercen su instinto protector que las hace pasar inadvertidas a sus enemigos desde pequeñas. Se tiene la curiosa observación de que las ninfas de esta especie ejercen una fuerte tendencia a cubrirse con cualquier tipo de partículas disponibles, con ayuda de sus patas traseras. El sustrato en el que se encuentran es rascado y se lo echan encima por movimientos de los tarsos y patas traseras en ángulo. Es muy posible que este instinto haya actuado a través del tiempo como un carácter selectivo en la evolución de este insecto que escapa así de sus enemigos y es la forma en la que se establece una relación directa entre las casas que tienen piso de tierra y la presencia del insecto en zonas endémicas (Zeledón, 1981).

Se comprobó que la “zarigüeya” juega un papel epidemiológico significativo al menos en tres de cuatro zonas encuestadas, no sólo por su abundancia sino, por su tendencia a convertirse en un animal sinantrópico. Este marsupial liga el ciclo silvestre del *T. cruzi* con el ciclo doméstico y ambos ciclos tienen al *T. dimidiata* como un vector común (Zeledón, 2002).

El control ecológico propuesto consiste en hacerle difícil la colonización del domicilio y del peridomicilio al insecto, modificando el ambiente para no producir nidos o refugios tanto para el insecto, como para aquellos animales de los que se alimenta. En algunas situaciones, podría pensarse en un control integrado (químico, físico y ecológico), en aquellos casos en que las poblaciones en el interior de las casas así lo justifiquen. No obstante, se debe pensar que las medidas deberán ser permanentes y de carácter sostenido, evitando, por diferentes razones y hasta donde ello sea posible, el uso

de insecticidas. Para lograr esto, la educación y la participación comunitaria activa no sólo son fundamentales sino que deben jugar un papel primordial (Zeledón, 2002).

Figura 11  
Diagrama de las principales vías de transmisión de *T. cruzi*  
(Adaptado de WHO, 2004)



i. Organización del genoma. No se encontró información respecto a la organización del genoma de *T. dimidiata*. Sin embargo, se encuentra en proceso una iniciativa AMSUD para la secuenciación del genoma de diferentes especies de Triatomíneos, incluyendo *R. prolixus*, *T. dimidiata* y *T. infestans* que contribuirá con importante información para las estrategias de control de estos vectores en Centro y Sudamérica. (<http://www.dbbm.fiocruz.br/triatomine/meeting.php3>)

Se sabe que las células de la mayoría de eucariotes contienen DNA nuclear heredado de forma biparental, mientras los organelos se heredan de forma uniparental. Esta diferencia en transmisión y patrones de evolución causan genealogías genéticas en el DNA de organelos y núcleos, reflejando diferentes aspectos de historia y biología de poblaciones de insectos (Sunnucks, 2000).

j. Organización del genoma mitocondrial. El DNA mitocondrial es útil para diferenciar entre especies similares y entre diferentes poblaciones de la misma especie, de diferentes regiones geográficas, pero no tiene la sensibilidad para detectar diferencias sutiles que existen frecuentemente entre poblaciones que han divergido recientemente, mientras que los microsátélites, por ejemplo, demuestran alta variación en el número de repeticiones vistas en individuos de diferentes poblaciones y son útiles para genética de poblaciones (Anderson, *et al.*, 2002).

El genoma mitocondrial es de 17,019 pares de bases (bp, por sus siglas en inglés “base pairs”) y es más grande que todos los genomas mitocondriales de insectos, exceptuando *Drosophila melanogaster*. Las diferencias en tamaño se deben en su mayoría a espaciadores intergénicos y el tamaño de la región de control, que supuestamente contiene un origen de replicación (Dotson and Beard, 2001).

La organización del genoma mitocondrial puede llegar a relacionarse con la organización, estructura y posible función de los genes en otros insectos. Se reportan 13 genes codificadores de proteínas, 22 de tRNA, se identificaron 2 unidades ribosomales en comparación con las secuencias de *Anopheles gambiae*, *Drosophila yakuba* y *Locusta migratoria*. La orientación y el orden de los genes es idéntico al de los : *D. yakuba*, *D. melanogaster*, *Ceratitidis capitata*, *Cochliomyia hominivorax*, a los crustáceos *Daphnia pulex* y *Penaeus monodon*. El hecho de que insectos tan divergentes compartan el mismo orden genético, sugiere que este arreglo puede ser ancestral para insectos y crustáceos; mientras las translocaciones observadas en otros insectos sean derivadas (Dotson and Beard, 2001).

*T. dimidiata* presenta sólo siete secuencias intergénicas, la mayoría de 1 a 5 bp de largo y de hecho varias de estas secuencias se entrecruzan y como la región de control de metazoos, posee una región de unidades repetitivas aleatorias (8 TRUs por sus siglas en inglés “Tandem Repeat Units”) que contribuyen a un total de 1,128bp de la longitud del genoma (Dotson and Beard, 2001).

Las secuencias que codifican proteínas de *T. dimidiata* son menos ricas en A+T (68.9%) que el resto del genoma mitocondrial y se observan codones con A o T en la tercera posición, de forma más prevalente (Dotson and Beard, 2001).

#### D. Marcadores para el estudio de variabilidad poblacional y reinfestación

1. Marcadores fenotípicos. Los marcadores fenotípicos son aquellos cuya variación observada en la población de interés se debe completamente a un solo factor mendeliano (Georges and Coppieters, 2000a). Es posible que los marcadores fenotípicos no sean neutros. Por ejemplo, la cobertura antenal de microreceptores químicos y mecánicos, recientemente usados para análisis morfológicos para determinar la estructura poblacional. Estos marcadores están influenciados por el medio ambiente, en particular con el desarrollo del insecto del huevo a adulto. La desventaja de este carácter medible, es que cambia rápido y su variación no depende sólo del medio ambiente, sino del control genético. Bajo condiciones ambientales de estrés, de deriva genética o de aislamiento físico entre dos poblaciones, el rasgo métrico es el primero en cambiar (Dujardin *et al.*, 2002).

En cuanto a las poblaciones de *T. dimidiata* en Guatemala, se observó correlación entre la variación métrica de la forma de la cabeza y la distribución geográfica. Las poblaciones se separaron en tres grupos: norte, intermedio y sur (más evidente en hembras) (Bustamante *et al.*, 2004).

2. Marcadores moleculares. Los marcadores moleculares son identificadores de DNA, por ejemplo las características de las secuencias de DNA mitocondrial y de microsátélites. Han resultado ser muy útiles para analizar variaciones genéticas entre varios taxa de organismos, incluyendo los triatominos (Anderson, *et al.*, 2002).

Entre los diferentes marcadores moleculares pueden mencionarse: RFLPs (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), RAPDs (“Randomly Amplified

Polymorphic DNA”) y microsatélites; pero ninguno es perfecto. Por ejemplo, para los polimorfismos en las secuencias de DNA mitocondrial, a pesar de ser útiles para distinguir diferencias entre especies similares y poblaciones de la misma especie en diferentes puntos geográficos, no es suficientemente sensible para detectar diferencias sutiles que existen frecuentemente entre poblaciones que divergieron recientemente (Anderson, *et al.*, 2002). Para otros marcadores, es difícil la comparación de bandas entre diferentes geles. Las isoenzimas permiten estimar relaciones entre colonias de insectos, pero se encuentran relativamente pocas variaciones dentro de cada colonia. Lo ideal sería que el marcador genético fuera fácil de usar, de alta variación, que distinga *loci* con alelos codominantes que puedan ser identificados con claridad. Por cierto, estas características han sido demostradas para los microsatélites (Queller, *et al.*, 1993).

La información que proveerán los marcadores moleculares será sobre distribuciones espaciales de alelos, que pueden usarse para estudiar flujo local de genes, por ejemplo la distancia de dispersión de pólen, la historia de poblaciones migratorias a gran escala (Queller, *et al.*, 1993) o si existen diferentes subpoblaciones que puedan diferir en competencia por el vector o sensibilidad a los insecticidas (Dorn, *et al.*, 2003). Así, el análisis del flujo genético entre varias subpoblaciones indicará si existe migración entre varias subpoblaciones y/o revelará la fuente de vectores que aparecen luego de rociamiento; así como la cobertura geográfica necesaria para el control efectivo (Dorn, *et al.*, 2003).

Es importante que el marcador molecular evolucione sin interferencia de selección, es decir, sin influencia del medio ambiente y esto se denomina neutralidad. La neutralidad permitirá una estimación no sesgada del flujo genético entre poblaciones. Sin embargo, esta característica no es muy fácil de demostrar y su validez es tan sólo una hipótesis en la mayoría de los casos (Dujardin *et al.*, 2002). Debe tomarse en cuenta también, que la calidad de la información que provee un marcador molecular depende de que tan consistentes y objetivos sean calificados los productos, que tan exactamente reflejen la variación genética y que tan representativos sean (Queller, *et al.*, 1993). Las tres características que definen a un marcador genético según Georges and Coppieters

(2000) son: (1) locus específico, (2) que sea polimórfico en la población estudiada, y (3) que sea fácilmente genotipado. La calidad del marcador genético normalmente es medida por su heterocigocidad en la población de interés.

Los estudios de reinfestación se pueden presentar como un caso particular del problema de la estructura poblacional y, por lo tanto, se pueden estudiar con los marcadores genéticos y fenotípicos. Lo particular del caso es que en un mismo análisis se comparan poblaciones tanto en el espacio como en el tiempo (Dujardin *et al.*, 2002).

Los marcadores moleculares presentan varias ventajas respecto a otros medios para realizar análisis de poblaciones. Entre ellas se puede considerar (lo que representa una gran ventaja) el que se utilice poco DNA, incluso de mala calidad y/o degradado, ya que se ensayan por reacción en cadena de la polimerasa requiriendo muy pequeñas cantidades de muestra. La otra ventaja que representa el uso de DNA en lugar de proteína, es que es más variable, más fácil de colectar y de almacenar. Los datos son relativamente más comparables que otras metodologías, facilitando la derivación de conclusiones a partir de los resultados de muchos estudios. Son preferibles los que informan sobre frecuencia alélica y de haplotipos. Y en el caso de que se utilicen marcadores múltiples, se podrá superar el muestreo biológico estocástico que pueda generar diferentes patrones en *loci* con historias similares y la detección de caracteres no concordantes que pueden ser de interés biológico. Por otro lado, los marcadores de locus simple o marcadores de organelos haploides proveen datos robustos para hacer análisis precisos, siendo los datos comparables entre estudios. Son numerosos e hipervariables, marcadores nucleares codominantes disponibles vía PCR para revelar variaciones en longitud entre alelos. Proveen datos sensibles que pueden conectarse de identificación individual hasta filogenia. Principal herramienta en la genética de poblaciones modernas. Usualmente, son de rápido desarrollo y tamizaje, pueden usarse en nuevas taxa con poco trabajo a futuro. Sin embargo, pueden considerarse algunas excepciones según el marcador del que se esté tratando (Sunnucks, 2000).

a. Electroforesis de isoenzimas. Las isoenzimas o aloenzimas son variantes alélicas de enzimas codificadas por genes estructurales. Las enzimas son proteínas que consisten de aminoácidos, algunos de los cuales están cargados eléctricamente, su detección es fenotípica. Como resultado, las enzimas tienen una carga eléctrica neta, basada en los aminoácidos que forman a la proteína. Cuando se reemplaza un aminoácido debido a una mutación, la carga eléctrica neta de la proteína puede verse alterada. Dado que los cambios en carga eléctrica afectan la razón de migración de las proteínas en un campo eléctrico, la variación alélica puede detectarse por electroforesis en gel y tinción enzimática (Van Treuren, 2000c).

Usualmente pueden distinguirse dos o más *loci* por enzima y se denominan *isoloci*. Por lo tanto, la variación de aloenzimas también es referida como variación isoenzimática. Este tipo de marcador ha sido aplicado a muchos casos de genética de poblaciones, incluyendo estructuras de apareamiento, estructuras de subpoblaciones y divergencia de poblaciones (Van Treuren, 2000c).

Las ventajas de este método son: (1) No requiere extraer DNA, (2) no se necesitan cebadores ni sondas, (3) es un ensayo fácil y rápido de realizar, (4) involucra pocos gastos, (5) zimogramas pueden interpretarse en términos de *loci* y alelos, (6) se observan alelos codominantes y (7) tienen alta reproducibilidad (Van Treuren, 2000c).

La principal desventaja de las aloenzimas es su baja abundancia, bajo nivel de polimorfismo y facilidad de degradación (Queller, *et al.*, 1993). Sin embargo, siguen siendo útiles para especies relacionadas. Además de presentar baja abundancia, los zimogramas pueden ser difíciles de interpretar debido a perfiles de bandas complejos que surgen por poliploidía o genes duplicados y la formación de heterodímeros intergénicos. Proteínas con idéntica movilidad electroforética (comigración) pueden no ser homólogas y la neutralidad selectiva es dudosa (Van Treuren, 2000c).

El procedimiento analítico consiste en preparar homogenizados de tejido, separarlos por polimorfismos con electroforesis usando geles de poliacrilamida o almidón y visualizar los polimorfismos por tinción enzimática (Van Treuren, 2000c).

b. RAPDs por sus siglas en inglés “Randomly Amplified Polymorphic DNAs” o DNA polimórfico amplificado al azar. El DNA de líneas celulares es amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa usando un primer RAPD. Luego de amplificar, se hace migrar por electroforesis y se tiñe más tarde con bromuro de etidio, para ser después visualizado bajo luz UV (Bickel, *et al.*, 1993).

Este tipo de marcador polimórfico muestrea el genoma, generalmente revela más variabilidad genética de la que demuestra el análisis de isoenzimas; además de ser útil para distinguir especies de chinches (Sunnucks, 2000). Pueden ser usados para generar más de un marcador y el número de cebadores disponibles es prácticamente ilimitado, así que muchos marcadores pueden ser identificados rápidamente (Bickel, *et al.*, 1993).

Los “RAPDs” son un ensayo de polimorfismos que se basa en la amplificación de segmentos de DNA al azar usando juegos de cebadores de secuencia nucleotídica arbitraria. Los polimorfismos pueden ser simplemente detectados como segmentos de DNA, que amplificarán solamente de un padre y son en la mayoría de los casos heredados de forma Mendeliana. Son útiles para contruir mapas genéticos en muchas especies y también pueden usarse para la diferenciación de especies procariotas ([www.biotoools.net/eng/tecnica/t31.htm](http://www.biotoools.net/eng/tecnica/t31.htm)).

Nanogramos de DNA genómico se someten a amplificación usando oligonucleótidos cortos de secuencia aleatoria. En teoría, estos cebadores se hibridizan (a 35°C o menos) en muchas regiones del genoma de forma simultánea. Sin embargo, amplificación geométrica sólo ocurre en regiones donde el extremo 3' del cebador se orienta hacia hebras opuestas y que no sea más de 3Kb de distancia. Estas condiciones

sugieren que los sitios de hibridación de los cebadores deben ser repeticiones invertidas. Los RAPDs pueden sesgarse en la amplificación de regiones repetitivas, pero puede amplificar regiones únicas también ([www.biotoools.net/eng/tecnica/t31.htm](http://www.biotoools.net/eng/tecnica/t31.htm)).

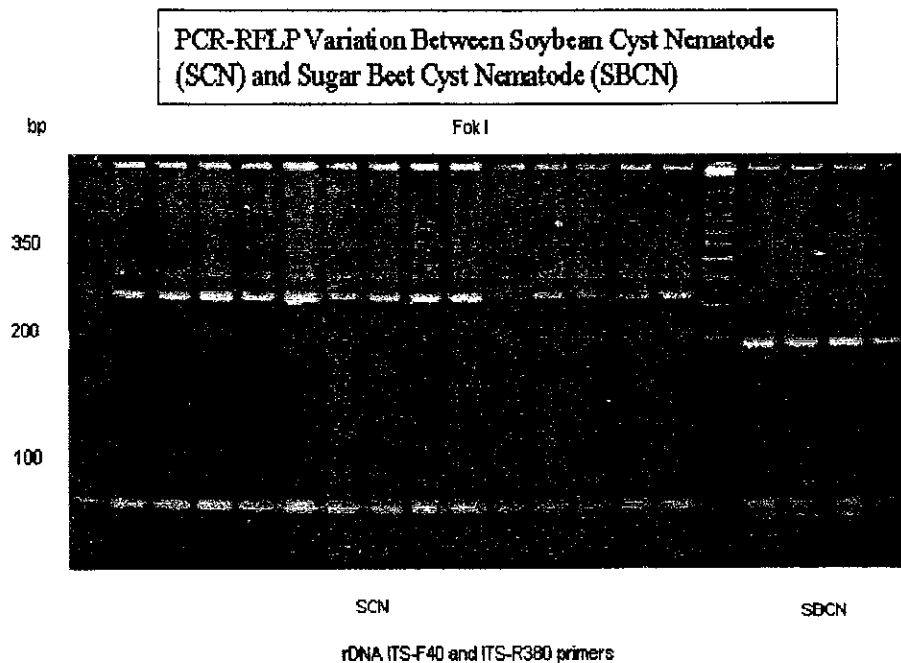
Las ventajas de los “RAPDs” son: (1) puede trabajarse sin conocer la secuencia de los organismos con los que se trabaja, (2) es fácil y compatible con aplicaciones analíticas, (3) se requiere poco DNA de muestra, (4) son altamente polimórficos y pueden procesarse muchas muestras con facilidad. La desventaja que posee, es que por ser una técnica no cuantitativa, no pueden distinguirse homocigotos de heterocigotos ([www.biotoools.net/eng/tecnica/t31.htm](http://www.biotoools.net/eng/tecnica/t31.htm))

c. RFLPs por sus siglas en inglés “Restriction Fragment Length Polymorphisms” o Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción del DNA. Los “RFLPs” o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción del DNA es una técnica en la que organismos pueden diferenciarse por análisis de patrones derivados de su DNA. Si dos organismos difieren en distancia entre los sitios de ruptura de una endonucleasa de restricción específica, la longitud de los fragmentos producida será diferente cuando el DNA sea digerido con una enzima de restricción. La similaridad de patrones generada puede ser usada para diferenciar especies, e incluso cepas, entre sí (Hill, 2004).

Las enzimas de restricción cortan las moléculas de DNA en sitios específicos. Diferencias entre individuos se determinan según las diferencias en migración de los fragmentos cortados. Estas diferencias pueden ser el resultado de mutaciones puntuales creando o destruyendo sitios de restricción, inserciones y/o deleciones alterando la longitud de un fragmento dado (Georges and Coppieters, 2000).

Figura 12

Variación de “PCR-RFPL” entre quistes de nemátodos de soya (SCN) y quistes de nemátodo de remolacha (SBCN) (Adaptado de Hill, 2004)



d. **Microsatélites.** Los microsatélites son repeticiones cortas al azar, de motivos nucleotídicos entre 1-5bp que se encuentran distribuidos en todo el genoma y pueden ser útiles para la identificación genotípica (Anderson, *et al.*, 2002; Van Treuren, 2000b). Han sido utilizados para el estudio de enfermedades genéticas, poblacionales, para recuperar información sobre estructura molecular y tasa de mutación (Jarne y Lagoda, 1996). El cuadro 2 muestra los tipos de microsatélites. Las interrupciones en arreglos de microsatélites, pueden funcionar como factores estabilizantes, haciendo que sean menos variables que los perfectos. Mientras que se espera que las repeticiones más largas sean más variables, no se ha demostrado correlación entre el tamaño de las distribuciones alélicas y el número de alelos, ni la varianza de las distribuciones (Jarne y Lagoda, 1996).

Algunos estudios han sido realizados con el fin de analizar sistemáticamente la ocurrencia, tamaño y densidad de diferentes tipos de microsatélites.

Cuadro 2  
Tipos de microsatélites según patrón de repetición  
(Adaptado de Goldstein and Schlötter, 1999; Jarne and Lagoda, 1996)

<b>Tipo de microsatélite</b>	<b>Definición</b>	<b>Ejemplo</b>
<i>Perfecto</i>	Son los que consisten de motivos repetitivos simples y no son interrumpidos por ninguna base que no coincida con el patrón de repetición	ctctctctctctctctctct
<i>Imperfecto</i>	Son los microsatélites que dentro de su patrón de repetición poseen una o más pares de bases que rompen la estructura	ctctctactctctctctct
<i>Interrumpido</i>	Son los microsatélites con la inserción de un pequeño número de pares de bases que no forma parte de la estructura repetitiva	ctctctagagagagctctct
<i>Compuesto</i>	Son los microsatélites que consisten de dos o más microsatélites adyacentes con diferentes tipos de repetición	tctctctagagagctgtctgt

Sin embargo, es evidente una gran variación en el genoma humano. A continuación se presentan los tipos de repeticiones:

*Repeticiones de dinucleótidos:* Conforman los *loci* más utilizados. Su densidad varía ampliamente según la especie trabajada, con una frecuencia de un locus por 5Kb a otros más característicos que ocurren cada 30-50Kb. Las repeticiones son usualmente menores a 30 y el reino animal es particularmente rico en repeticiones CA (Jarne and Lagoda, 1996).

*Repeticiones de trinucleótidos:* Este tipo de repeticiones ocurre en plantas y animales. Se estudian ampliamente por su conexión a algunas enfermedades y cáncer en humanos. Es frecuentemente asociado con exones donde no interrumpen el marco de lectura (“RF” o “Reading Frame” por sus siglas en inglés). Esta asociación lo hace menos favorable para ser utilizado en estudios de genética de poblaciones (Jarne and Lagoda, 1996).

*Repeticiones de tetranucleótidos:* Los miembros más representativos son las repeticiones GATA/GACA, que ocurren en muchos organismos superiores aunque la densidad varíe entre especies. En los genomas humano y del tomate, se agrupan cerca de los centrómeros y en serpientes tienen una distribución específica en el cromosoma sexual. Se encuentran frecuentemente como alargamientos compuestos y/o interrumpidos y a pesar de ser poco usados para biología poblacional, son altamente polimórficos (Jarne and Lagoda, 1996).

Entre las aplicaciones de los microsatélites pueden mencionarse la estimación de relaciones espaciales entre segmentos de cromosomas, para la elucidación temporal de relaciones entre orígenes de especies y géneros; poseen grandes niveles de variabilidad característicos, velocidad y confianza en el ensayo de laboratorio; pueden mapearse rasgos simples de genes. Son altamente discriminantes, heredados de forma biparental, codominantes y son encontrados rápidamente en análisis (Chambers y MacAvoy, 2000).

## E. Microsatélites

1. Características, ventajas y desventajas. *A priori*, se dice que los microsatélites están distribuidos de forma aleatoria en todo el genoma. Sin embargo, esto se asume sin haber realizado distribuciones de Poisson (Jarne y Lagoda, 1996). Es fácil su uso dada la pequeña cantidad de muestra requerida, la posibilidad de usar con muestreo no invasivo (en caso de animales). Puede usarse DNA degradado, que pueda contener suficientes copias de un microsatélite corto, que permita la amplificación. Pueden usarse templados pobremente almacenados o conservados, útil saber en el caso de

usar DNA de chinches muertas y facilita la recolección y almacenamiento en el campo (Queller, *et al.*, 1993).

Otras de las características deseables, que se menciona en la literatura, y que son características de los buenos marcadores moleculares son: (1) abundan en el genoma y se distribuyen a lo largo de éste aproximadamente al azar (Van Treuren, 2000b; Jarne y Lagoda, 1996); (2) son altamente polimórficos; (3) muestran perfiles de bandas que se interpretan como *loci* y alelos; (4) existe codominancia de alelos; (5) poseen alta reproducibilidad y (6) diferentes microsatélites pueden ensayarse por multiplex y correrlos en gel al mismo tiempo (Van Treuren, 2000b).

En cuanto a neutralidad, si un marcador genético es muy seleccionado, deja de ser bueno para marcar nada excepto a él mismo. Se espera que marcadores sean especialmente de regiones lo más neutrales posibles (Queller, *et al.*, 1993). La frecuencia relativa de *loci* en regiones neutrales se asume que es lo suficientemente baja para que la selección tenga poco efecto en estudios de genética de poblaciones (Jarne y Lagoda, 1996).

Los microsatélites permiten asignar *loci* múltiples a un gel sin el riesgo de confundirlos porque los primers de PCR se diseñan de modo que los productos sean lo suficientemente diferente en tamaño que corran a diferentes razones. Parecen ser buenos marcadores codominantes, ya que los marcadores dominantes son difíciles para estimar parámetros genotípicos (Queller, *et al.*, 1993), ya que la dominancia reporta un resultado presente/ausente, mientras la codominancia reporta los dos alelos y pueden identificarse para mayor precisión (Sunnucks, 2000).

Debe tomarse en cuenta que la alta tasa de mutación y selección pueden hacer que estos marcadores generen datos incorrectos sobre la historia genética del individuo. Los microsatélites aún pueden ofrecer equilibrio entre alta variabilidad e indeseadas tasas de mutación, altas. Mientras la variabilidad puede ser muy alta, las tasas de mutación pueden ser menores o iguales a  $10^{-4}$  (Queller, *et al.*, 1993).

La sensibilidad de un marcador debe ser la adecuada, ya que mucha información y tan diferente que no pueda relacionarse, puede ser tan malo como ninguna señal (Sunnucks, 2000). Características no tan deseables de los microsatélites son: (1) deben ser desarrollados para cada especie o grupo de especies cercanas relacionadas que desean analizarse (Paetkau, 1999); (2) este diseño puede resultar de alto costo (Van Treuren, 2000b; Jarne y Lagoda, 1996); (3) si la secuencia de los sitios donde se hibridizan los cebadores llega a mutar, puede mal interpretarse un heterocigoto por nulo u homocigoto (Van Treuren, 2000b; Jarne and Lagoda, 1996) (4) las “stutter bands” complican la lectura de polimorfismos (Van Treuren, 2000b), con trinucleótidos estas bandas raramente confunden, pero los dinucleótidos sí pueden inducir ambigüedades (Queller, *et al.*, 1993); (5) los modelos de mutación de microsatélites son poco conocidos y (6) la divergencia genética puede subestimarse por homoplasia (Van Treuren, 2000b).

Que ocurran cambios en el número de copias de microsatélites puede afectar directamente en: (1) la actividad transcripcional de un promotor; (2) la “ORF” (“Open Reading Frame” o fase abierta de lectura) de una región que codifica una proteína; (2) el enlace de proteínas a regiones repetitivas (funcionalmente correctas) que afecten la frecuencia de ciertos microsatélites; (3) la posibilidad de formar estructuras secundarias que afecten la frecuencia de secuencias particulares (Hancock, 1999).

2. Modelos de mutación. Como se ha mencionado anteriormente, en los cromosomas la distribución de los microsatélites es uniforme a lo largo de las áreas intergénicas, con la excepción de los telómeros y repeticiones trinucleotídicas y en casos muy aislados en regiones codificantes. Los microsatélites se originan en regiones de simplicidad críptica con un mínimo de 8 nucleótidos repetitivos como requisito para dar inicio al proceso (Chambers y MacAvoy, 2000).

El mecanismo de mutación predominante en microsatélites es “slipped strand mispairing” que ocurre dentro de un arreglo de microsatélites durante la síntesis de DNA, que puede resultar como pérdida o ganancia de una o más unidades repetitivas dependiendo de si el DNA recién sintetizado forma un anillo expuesto hacia fuera “loops out” o si lo hace el templado. La facilidad para que pueda hacer esto depende de las

secuencias que formen el arreglo y, en parte, del evento de las hebras líder (síntesis continua de DNA) o retardada (retardo de la síntesis discontinua). Si el tamaño de un microsatélite debe crecer con el tiempo, entonces, la ganancia de mutaciones unitarias debe ocurrir más frecuentemente o debe repararse más lentamente que la pérdida de mutaciones. Se sabe que la mayoría de mutaciones recién creadas son rápidamente corregidas por procesos celulares de reparación. Los arreglos con más unidades evolucionan más rápido. Esto puede atribuirse al relativamente ineficiente proceso de reparación de segmentos desapareados (Chambers y MacAvoy, 2000).

En cuanto a la desviación dependiente de la longitud, estudios realizados sobre la distribución genómica de STRs proveen indicios sobre la dependencia de longitud. La razón de mutación (GT) aumenta por más de dos órdenes de magnitud entre loci con 7.5 y 52.5 repeticiones. Mientras más largos los trazos también se notó un exceso en la ganancia de una repetición sobre la pérdida de una repetición y el número de ganancias de repeticiones múltiples. Sin embargo, la inestabilidad de heterocigotos es invocada como la fuerza que dirige los procesos evolutivos. De aquí nace el concepto de “diversity begets diversity” donde las mutaciones son más comunes en heterocigotos cuyos alelos muestran las más grandes diferencias en tamaños de arreglos. Este proceso crea una retroalimentación de aparente dependencia de longitud. Se argumenta entonces que la tasa evolutiva depende del tamaño de la población, tiempo de la generación y temperatura corporal (Chambers y MacAvoy, 2000).

Mientras las mutaciones agregan y quitan lentamente unidades de arreglos particulares, unas series de alelos de diferentes tamaños de repetición, empiezan a desarrollarse en la población. Los números de alelos son controlados por procesos de genética de población naturales como mutación, selección, deriva y migración, siendo la variedad resultante la revelada en encuestas de frecuencia alélica. Existen eventos que regeneran pequeños alelos y otros que crean alelos interrumpidos que pueden reducir la tasa de polimorfismo generada como un punto de anclaje que actúa contra el resbalamiento de la polimerasa durante la replicación. La “resurrección” de un *locus* antes “muerto” también puede ocurrir debido a una mutación favorable que elimine una

interrupción o delección y que el nuevo producto sea un *locus* de microsatélite (o su descendiente derivativo) (Chambers y MacAvoy, 2000).

Las mutaciones que ocurren bajo el modelo de “SSM” o “slipped strand mispairing” se justifican cuando el DNA a replicar es de naturaleza repetitiva y la hebra naciente se hibridiza pero corrida respecto a la hebra templado (Hancock, 1999).

El cambio en tamaño de los microsatélites que ocurre por entrecruzamiento bajo el modelo de “recombinación” da lugar a moléculas de DNA de tamaños desiguales, siendo una hebra más larga que la otra. La conversión génica que involucra transferencia unidireccional puede desfazar una secuencia fuera de un alelo a otro, que se sugiere que pueda generar diversidad en *loci* de microsatélites (Hancock, 1999).

No se ha acordado qué modelo de mutación debería ser utilizado, pero el uso de microsatélites permite conocer el tamaño de los alelos con una precisión de  $\pm 1\text{bp}$ , donde los alelos son caracterizados por el número de repeticiones en el *locus* analizado. Además, son más informativos que los polimorfismos de aloenzimas y menos que los análisis de mutación de secuencias (Jarne y Lagoda, 1996).

La validación de estos modelos depende de más estudios donde los alelos sean secuenciados (Chambers y MacAvoy, 2000).

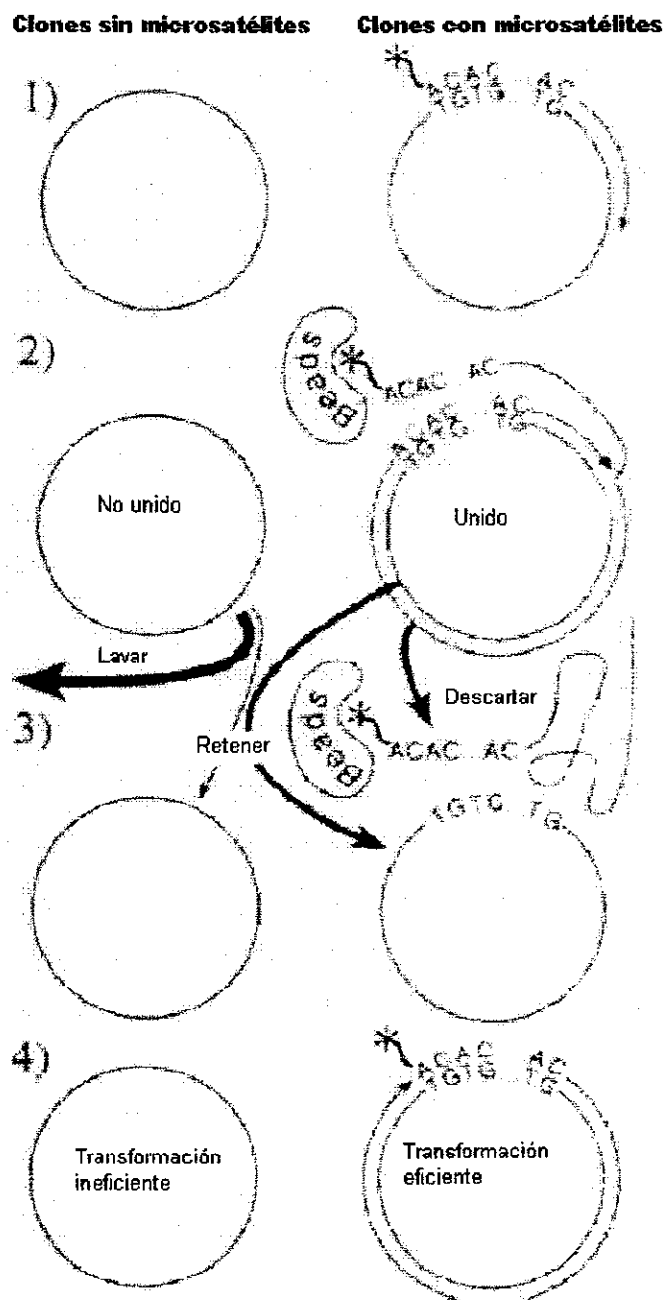
3. Métodos para el desarrollo de microsatélites. Cuando se tiene la secuencia del microsatélite y de las regiones vecinas, pueden crearse cebadores específicos para amplificar esta región por la reacción en cadena de la polimerasa (Van Treuren, 2000b). Pero para localizarlos, tradicionalmente se aíslan clones de microsatélites para crear un inserto pequeño en una librería genómica parcial en un vector (plásmido o fago), de donde más tarde se tamizan los clones repetidas veces por hibridización con filtro, usando una sonda del microsatélite (Paetkau, 1999). Los protocolos de enriquecimiento también se han desarrollado para aumentar la proporción de clones de una librería dada, que contiene los microsatélites de interés. Usualmente involucra amplificación por PCR de los insertos antes de ligar al vector (Paetkau, 1999).

El enriquecimiento selecciona clones en lugar de seleccionar fragmentos de DNA antes de ligarlos, la selección es de dos pasos (ver figura 15) y toma 1.5 días a partir de los protocolos tradicionales. Primero, los microsátélites son hibridizados secuencialmente y extendidos en clones que tienen la secuencia adecuada, previamente los oligonucleótidos de los microsátélites deben estar biotinilados. Luego, los clones son seleccionados usando perlas magnéticas ("beads") con estreptavidina. Durante este procedimiento es importante cuidar que la unión de DNA muy grande a las perlas magnéticas puede ser crítica, especialmente si se trata de DNA circular mayor a 7kb. Entonces, el DNA de hebra simple es eluido de las moléculas enlazadas y la reacción de extensión se repite. Se realiza una segunda extensión de la hebra para aumentar el rendimiento de los clones que contienen los microsátélites (Paetkau, 1999).

Para probar la presencia de secuencias de microsátélites interrumpidas, se utiliza el plásmido o fago. Por ejemplo, para buscar (CA)<sub>n</sub>, el oligonucleótido de amplificación (GT)<sub>15</sub> y M13F serían los utilizados, donde a mayor temperatura de anillación, mayor es la astringencia. Más tarde, estos productos de PCR son secuenciados y/o se visualizan en gel de agarosa (Paetkau, 1999).

El producto de PCR es purificado y se determina el rendimiento antes de continuar con la secuenciación 5' a 3', el DNA de hebra simple es purificado de la solución inicial del fago. Estas fases de amplificación contribuyen al buen rendimiento del proceso de enriquecimiento. Para localizar clones con microsátélites se propone hibridizar para identificar cuáles tienen microsátélites luego de trabajar grandes números de clones. El problema de secuencias iguales en múltiples clones, puede significar tener que secuenciar lo mismo más de una vez, innecesariamente. Esto puede solucionarse trabajando con mayor número de clones, favoreciendo los pasos donde se produzcan iguales cantidades de productos parejos, así como secuenciar pocos clones de cada plaqueo (Paetkau, 1999).

Figura 13  
 Protocolo de enriquecimiento para obtener microsatélites  
 (Paetkau, 1999)



Las enzimas que se utilizan son las "blunt-end enzymes" o de corte romo. El cebador que se inserta llamado "SNX linker" se utiliza para superar la limitante de hacer

restricciones específicas para la especie, que dan bajo rendimiento de DNA enriquecido y rinden insertos de librerías que no son una muestra amplia del genoma (Hamilton, *et al.*, 1999). La ventaja que representa es que, para los sitios de restricción, deja usar combinaciones de enzimas para obtener fragmentos entre 200-1000bp. Además, puede usarse en cualquier genoma sin depender de las frecuencias de restricción.

El SNX se adhiere al DNA genómico en una reacción de ligación y restricción simultánea que es altamente eficiente para recuperar secuencias por hibridación sustractiva. Es necesario que esta ligación se realice antes de hibridizar para poder enriquecer repetidas veces. Puede usarse para el enriquecimiento de cualquier DNA genómico. Estos métodos permiten mejorar las estrategias de enriquecimiento, hasta entonces usadas, para crear librerías de pequeños insertos representativas con altas proporciones de clones positivos (Hamilton, *et al.*, 1999).

Esta metodología para el desarrollo de microsátélites, es la más utilizada porque no se conoce o no se tiene suficiente información de la secuencia del genoma de muchos organismos. Asimismo, aumenta el número de fragmentos clonados que contienen repeticiones comparado a librerías de insertos al azar, se seleccionan sólo los fragmentos con microsátélites (complementarios a las secuencias de captura) que serán sólo los clones que se utilicen para secuenciar (Hamilton, *et al.*, 1999).

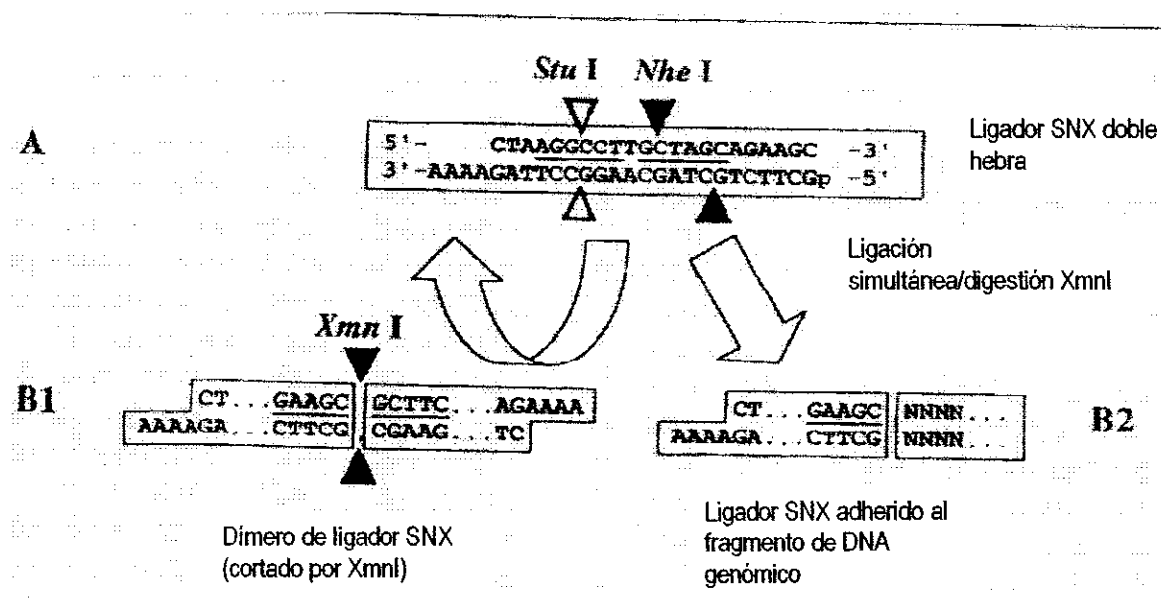
Sin la eficiencia del SNX, una gran proporción de fragmentos del DNA genómico no podría recuperarse para ser clonados, sin importar la eficiencia de la hibridación sustractiva. Pero, debe diseñarse de tal forma, que pueda ligarse al DNA genómico, sirva como cebador y contenga los sitios de restricción necesarios para ligarse a vectores de clonación (Hamilton, *et al.*, 1999).

Emplear como método de detección geles de agarosa y poliacrilamida puede no presentar la suficiente resolución para visualizar y caracterizar productos de amplificación de microsátélites. En esos casos, puede ser recomendable utilizar métodos automatizados que utilicen marcaje fluorescente. Sin embargo, los marcadores

fluorescentes son muy caros. Marcarlos con productos comerciales puede también ser muy caro, laborioso y se desperdicia mucho material (Schuelke, 2000).

Figura 14

Reacción de ligación favorecida por la formación de sitio de restricción *Xmn*I  
(Hamilton, et al., 1999).



Schuelke (2000) reporta un método económico para marcar con FAM, HEX, TET y ROX oligonucleótidos que pueden ser utilizados como cebadores reduciendo costos significativamente. En principio, se usan tres cebadores, uno con una cola de bases que serán de igual secuencia que un segundo primer. El marcaje fluorescente en este segundo cebador será llamado: universal (Schuelke, 2000).

El tercer cebador que se necesita es el reverso. La concentración del cebador "forward" debe ser menos de la mitad del reverso. El termociclador debe programarse de tal forma que en los primeros ciclos el cebador "forward", cuya secuencia final (\*\*\*, en el Cuadro 3) es igual a la secuencia del universal, sea incorporado y acumulado en los

siguientes productos de la reacción en cadena de la polimerasa. Más tarde, cuando el cebador frontal se agote, la temperatura de anillación será reducida para facilitar la sustitución con el cebador marcado con fluorescencia al producto final (Schuelke, 2000).

Cuadro 3  
Juegos de cebadores necesarios para el marcaje económico  
(Adaptado de Schuelke, 2000)

		Razón de concentración en la reacción en cadena de la polimerasa
Cebador forward	***** →	1/4
Cebador reverse	←	1
Cebador universal	FAM*****	1

\*\*\*\*\*Secuencias iguales entre cebadores forward y universal

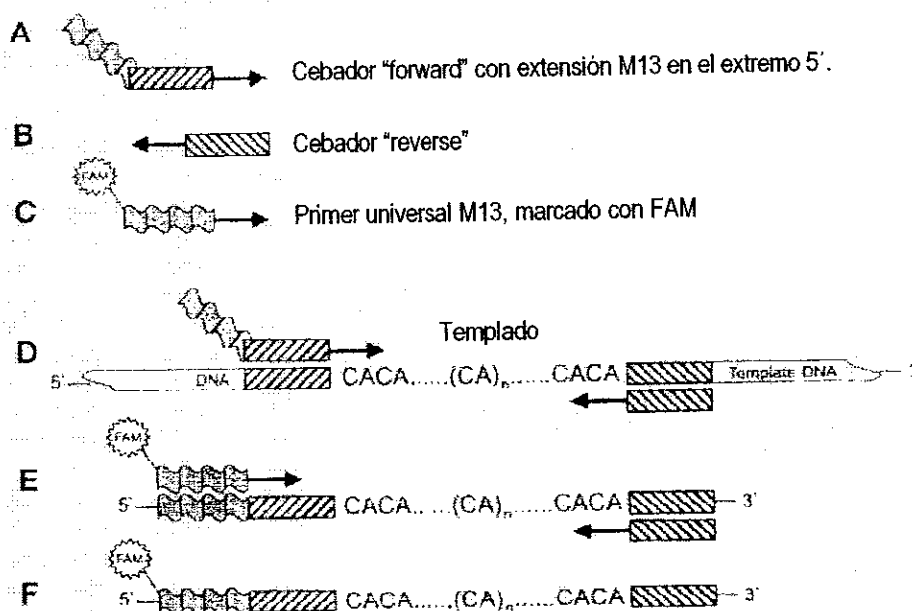
Para obtener máxima señal, se sugiere seguir las siguientes recomendaciones, aunque puede variar por organismo: (1) mantener cantidades equimolares de cebador universal y reverso; (2) que el cebador frontal esté a 1/4 de la concentración de cebador reverso para que al agotarse el universal, éste pueda sustituirlo y acumularlo en los productos de la reacción; (3) programar el termociclador para que utilice la temperatura de anillación que usa el cebador universal para los últimos 8 ciclos y (4) hacer un paso de elongación final mayor o igual a 10 minutos, porque pueden ocurrir “picos partidos” por la falta de homogeneidad de los productos de la reacción, al adicionar de forma irregular una A por acción de la polimerasa (Schuelke, 2000; Armour, *et al.*, 1999; Van Treuren, 2000b).

La interpretación de los resultados de los microsatélites, muchas veces depende de la experiencia del investigador. Establecer reglas rígidas como criterios de aceptación de

picos verdaderos resulta ser una labor muy difícil, especialmente, cuando las diferencias entre posibles casos según especie es tan evidente. Durante este proceso de interpretación, se ha observado que los *loci* de microsatélites son más largos y comunes en vertebrados que en invertebrados, siendo las especies de sangre fría las que tienen arreglos repetitivos más largos. Otra observación realizada es que, el que tengan altos niveles de variabilidad genética puede significar que los tamaños de muestra necesarios sean más grandes para poder estimar frecuencias alélicas con más precisión (Chambers y MacAvoy, 2000).

Figura 15

Reacción en cadena de la polimerasa usando el método económico para marcar cebadores con fluorescencia (Schuelke, 2000)



4. Microsatélites polimórficos para *Triatoma dimidiata*. Anderson y colaboradores (2001) reportan 8 pares de cebadores polimórficos para *T. dimidiata*. En su mayoría consisten de secuencias imperfectas. Ellos discuten que el estudio realizado fue de carácter preliminar y que necesitan continuar su evaluación para determinar el grado de polimorfismo sobre poblaciones reales. Los microsatélites reportados son:

Cuadro 4

*Loci de microsatélites para T. dimidiata*  
(Adaptado de Anderson, *et al.*, 2001)

Locus	Números acceso GenBank	Secuencia de los primers (5'-3')	Secuencia de microsatélites	Tamaño productos esperados	Número de alelos	Temperatura de anillación (°C)
TDMS1	AF487982	F: ggaaatacagggttttcaca R: aattgcactttcggatga	(gt) <sub>5</sub>	188 bp	18	57
TDMS3	AF487983	F:tcagatgacgaggtggattg R:acgacctcaacatccctttc	(ga) <sub>4</sub> (tag) <sub>3</sub> (tgt) <sub>3</sub>	141 bp	7	57
TDMS4	AF487984	F:cagttgttcacaggaagtgaatc R:gctcagaaaaatatgttcccagt	(ct)c(ct) <sub>25</sub> g(ct) <sub>2</sub>	184 bp	20	55
TDMS9	AF487985	F:cattgcaatcgtgtcgaaat R:tgcccaaaattttcgtgtct	(gt) <sub>13</sub>	194 bp	16	57
TDMS11	AF487986	F:gggtgcaccatgtttaaag R:agcgaatggtctgtgaattg	(ct) <sub>5</sub> (ca) <sub>5</sub> (ctca) <sub>2</sub> (ct) <sub>4</sub> (cactttt) (ct) <sub>20</sub>	202 bp	27	55
TDMS16	AF487987	F:ggaggtccagggtttttagg R:tttcaaaagggtccatttaacatt	(ct) <sub>23</sub>	169 bp	16	56
TDMS19	AF487988	F:ctcaagggatttattccagaa R:tctctgagaagccctatcacatc	(ctt) <sub>3</sub> (ct) <sub>13</sub> N <sub>8</sub> (ct) <sub>5</sub> N <sub>8</sub> (ct) <sub>6</sub>	188 bp	19	55
TDMS22	AF487989	F:tattatggttgccggtattaagg R:ccaccaagttttactatccat	(atgt) <sub>5</sub> atagt	100 bp	6	55

## F. Genética de poblaciones

1. Frecuencia alélica en poblaciones. Una medida de la variación genética en las poblaciones es la frecuencia alélica en cada *locus*. Para determinar la frecuencia alélica, se cuenta el número de veces que aparece cada alelo en la población y se divide por el número total de alelos muestreados. La frecuencia observada de heterocigotos, que es el número total de heterocigotos dividido el número de individuos muestreados, también es una medida de variación genética (Rodríguez, 2002).

2. Equilibrio en una población. En una población grande con apareamiento aleatorio, el equilibrio de Hardy-Weinberg ocurrirá después de que una generación provea las mismas frecuencias genéticas y se den en ambos sexos. El equilibrio Hardy-Weinberg implica que un gen y frecuencias genotípicas son constantes de generación en generación. Si ocurre desequilibrio, el equilibrio será reestablecido después de una generación de apareamiento aleatorio. Las condiciones de este tipo de equilibrio,

también implican que cuando las frecuencias génicas sean  $p$  y  $q$ , las frecuencias genotípicas serán  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$  para los dominantes, los heterocigotos y recesivos en un sistema de dos alelos. Esto puede inferirse por argumentos dados para un tipo recesivo bajo herencia dominante (Christensen, 2002).

Los genotipos de la progenie son construidos a partir de una muestra de los gametos producidos por los padres. Los tipos de gametos en la muestra son determinados por varios factores que influyen el proceso por el cual se transmiten los genes de una generación a la siguiente. Hardy y Weinberg propusieron una ley de equilibrio de los genotipos en una población, la cual tiene ciertas suposiciones. En una población grande, con reproducción al azar y ausencia de selección, migración y mutación, las frecuencias de genes y genotipos permanecen constantes de generación en generación. Para determinar si una población está en equilibrio Hardy-Weinberg, se muestrean un número de individuos y se estiman las frecuencias genotípicas y alélicas. Los números observados y esperados se comparan usando una prueba no-paramétrica como chi cuadrado ( $X^2$ ). Los grados de libertad se calculan como  $n(n-1)/2$  donde  $n$  es el número de alelos. Generalmente se asume que la muestra de individuos proviene de una sola población panmíctica que se reproduce al azar. Si una sola muestra es en realidad una mezcla de dos poblaciones diferentes genéticamente, la muestra no cumple con los requerimientos de Hardy-Weinberg. A este efecto de muestreo de más de una población simultáneamente se le conoce como efecto Wahlund. La magnitud del efecto Wahlund depende del grado de diferencias genéticas entre las poblaciones (Rodríguez, 2002).

Es frecuente, que las poblaciones naturales se encuentren subdivididas por varios factores en subpoblaciones que casi siempre están parcialmente aisladas entre sí. La estratificación de individuos en subgrupos con diferentes frecuencias alélicas produce una deficiencia de heterocigotos y un exceso de homocigotos. Se puede concluir que al subdividir la población, los genotipos ocurren en frecuencias como una simulación de un cierto grado de endogamia a pesar de que los individuos de cada subgrupo se cruzan al azar entre sí (Rodríguez, 2002).

3. Estadísticos F de Wright. Una medida común de las diferencias genéticas de las poblaciones es la  $F_{st}$ . La  $F_{st}$  es la razón de la varianza de frecuencias alélicas entre localidades al máximo de la varianza que se obtendría si cada localidad estuviera fija por uno de los alelos alternativos sin cambio en la frecuencia alélica media (Hedgecock, 2004).

Para subdivisiones poblacionales y de endogamia, existen tres niveles de complejidad a tratar: (I) individuales, (S) subpoblacionales, y (T) poblaciones totales. Estos niveles son jerárquicos porque cada individuo es parte de la población total. Para el análisis teórico de poblaciones jerárquicas, existen dos niveles convenientes a medir, en cuanto al apareamiento no aleatorio dentro de las poblaciones. El coeficiente de endogamia será simbolizado como  $F_{IS}$  y el índice de fijación  $F_{ST}$  es la medida del efecto de la subdivisión de la población por sí mismo en la probabilidad de autocigotidad.  $F_{ST}$  es la probabilidad de que dos alelos sean elegidos al azar de dentro de una misma subpoblación y sean idénticos en los descendientes (Hartl, 1980).

Los estadísticos F son  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ , con división dentro de una subpoblación, la varianza genética en la población total se divide en varianza dentro de las subpoblaciones y varianza entre subpoblaciones y este efecto de varianza es expresado convenientemente con estos estadísticos (Hartl, 1980).

El índice de fijación  $F_{ST}$  mide la cantidad de diferenciación genética entre subpoblaciones respecto a un grupo hipotético de subpoblaciones, pero teniendo la misma frecuencia alélica promedio que subpoblaciones reales. Cuantitativamente hablando, el rango 0.05 a 0.15 para  $F_{ST}$  puede ser considerado como indicador de gran diferenciación y superior a 0.25 puede indicar aún mayor diferenciación. Sin embargo, la diferenciación no es insignificante si  $F_{ST}$  es tan pequeña como 0.05 o menos (Hartl, 1980).

4. Coeficiente de similaridad y distancia genética. Se han propuesto varias formas de medir la distancia genética, pero todas se relacionan de alguna forma al estadístico  $F_{ST}$  (Hartl, 1980). El coeficiente de similaridad (S) es la proporción de los

marcadores moleculares compartidos entre dos individuos contrastados. Lo que se compara entre dos organismos es el número de alelos, aparentemente del mismo tamaño, amplificados y separados mediante electroforesis. Frecuentemente, la distancia genética ( $D$ ) es utilizada en lugar del coeficiente de similaridad. En la mayoría de los casos, la distancia genética es simplemente (1-coeficiente de similaridad) o ( $D=1-S$ ) (NIU Bioinformatics and Genomics Center, 2004).

A continuación se presenta el modelo de similaridad genética basado en un modelo geométrico:  $d$  es la medida de la divergencia genética entre poblaciones basado en el razonamiento geométrico; el razonamiento puede ilustrarse considerando un locus simple con dos alelos en cada una de dos poblaciones. Si las frecuencias alélicas se denotan  $p_1$  y  $q_1$  en una población, y se dejan las frecuencias correspondientes a la otra población  $p_2$  y  $q_2$ , entonces, geoméricamente, cualquiera de las dos poblaciones podrá caer en la circunferencia de un cuarto del círculo de radio 1 con dos ejes  $p_{1/2}$  y  $q_{1/2}$ . La longitud de la cuerda que conecta las dos poblaciones es  $(2d)^{1/2}$ , donde  $d=(1-\cos \theta)^{1/2}$ , y  $\theta$  es el ángulo entre los radios correspondientes. La cantidad  $d$  sirve como una medida satisfactoria de distancia genética y puede demostrarse que  $d^2=1-(p_1p_2)^{1/2} - (q_1q_2)^{1/2}$  (Hartl, 1980).

### III. HIPÓTESIS

Electroforesis capilar es el método costo efectivo para optimizar y automatizar la identificación y caracterización de microsátélites polimórficos en chinches *Triatoma dimidiata*.

#### IV. OBJETIVOS

##### A. Objetivo general

Optimizar y montar una técnica para identificar y caracterizar microsatélites polimórficos de forma automatizada, en *Triatoma dimidiata*.

##### B. Objetivos específicos

- Construir una librería de DNA genómico de *Triatoma dimidiata* enriquecida con microsatélites.
- Identificar y caracterizar microsatélites para *Triatoma dimidiata*.
- Diseñar cebadores para amplificar microsatélites en muestras de triatominos.
- Comparar el grado de polimorfismo de TDAK49 respecto a los TDMS (anteriormente publicados) utilizando las mismas muestras.
- Comparar costos y efectividad de las metodologías de revelado de microsatélites: electroforesis en gel de poliacrilamida y electroforesis capilar.
- Desarrollar y montar un procedimiento automatizado para la identificación y caracterización de microsatélites polimórficos de organismos diploides para el futuro.
- Crear y actualizar una base de datos que permita el análisis de la optimización.
- Determinar cuál es la metodología más conveniente para correr y analizar los microsatélites, electroforesis en gel de poliacrilamida y marcaje económico fluorescente utilizando GeneScan.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Metodología de colecta de las chinches

Las chinches son una submuestra de las colectadas durante la Encuesta Entomológica realizado en la Universidad del Valle de Guatemala. Esta encuesta transversal se desarrolló de acuerdo al protocolo de muestreo desarrollado por el Programa Nacional Colombiano para el Control y Prevención de la Enfermedad de Chagas (Comunicación personal, Celia Cerdón-Rosales).

Para cada municipio se elaboró una lista de todas las comunidades rurales por debajo de los 2000m sobre el nivel del mar, de acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) para 1994. Los municipios fueron numerados y las aldeas que ingresarían al estudio se seleccionaron al azar, utilizando una tabla de números aleatorios. Con base a los datos del INE, para cada aldea se determinó el número de viviendas a encuestar para las aldeas seleccionadas. Para la selección de la vivienda, al contar con croquis de la aldea seleccionada, se enumeraron las viviendas de forma secuencial y se procedió a sortear las viviendas a través de la tabla de números aleatorios, hasta completar el tamaño de la muestra. Se identificó cada sector, y las viviendas comprendidas en cada sector, con un número en forma secuencial. Se seleccionaron las viviendas al azar, utilizando también tablas de números aleatorios (Comunicación personal, Celia Cerdón-Rosales).

La encuesta entomológica se realizó por una brigada compuesta por 6-8 personas que trabajaron las visitas domiciliarias en parejas de acuerdo con una planificación semanal. Las parejas inspeccionaron cada domicilio durante un período de 15 minutos (equivalente a media hora/persona). Los triatómíneos colectados fueron rotulados y empacados durante cada visita. Para este análisis, se excluyeron de la selección todos los individuos en estadios menores al tercer estadio de ninfa (Comunicación personal, Celia Cerdón-Rosales).

## B. Extracción de DNA

1. DNA total de huevos para la biblioteca genómica y cuantificación. Los huevos utilizados para realizar la extracción de DNA fueron tomadas de la colonia de chinches del Insectario del Centro de Estudios en Salud, en la Universidad del Valle de Guatemala. Esta colonia se inició a partir de las colectas realizadas durante la Encuesta Entomológica 1997; en las Aldeas de Tituque y Titucopote, Municipio de Esquipulas, Departamento de Chiquimula, Guatemala.

Para la biblioteca enriquecida, se extrajo ADN de 31 huevos de *Triatoma dimidiata* (color rosado). Se realizó en dos lotes, una de 15 y otra de 16 huevos con el buffer de lisis con la siguientes concentraciones finales (c.f.): (50mM NaCl, 50mM EDTA, 1% SDS, 50mM Tris, pH 8, proteinase K 0.2mg/mL), incubado 12 horas a 50°C. Se dio tratamiento con RNAsa durante 30 minutos. El DNA se purificó en un paso de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitado con 4 M de acetato de sodio pH 4.8 y 3 volúmenes de etanol. Los precipitados fueron resuspendidos en 50µL de TE pH 8.0 (10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM Acido Etilendiamino Tetraacético (EDTA)). La pureza y concentración fueron determinadas por espectrofotometría UV. La integridad del DNA fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

2. DNA de patas de chinches para tamizar los microsatélites. Se escogieron 425 muestras de patas de la Encuesta Entomológica 1997 para tamizar los microsatélites y fueron almacenadas a -20°C en etanol al 70%. El Cuadro 22 resume las muestras escogidas. Es importante notar que las muestras fueron extraídas en diferentes lotes. Todas las muestras fueron extraídas con dos patas, glucógeno de ostra y 3 volúmenes de etanol al 100%, excepto las muestras 193-374 que fueron extraídas sin glucógeno. El glucógeno de ostra o "Glycogen Type II from Oyster" (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, MO) no interfiere en la reacción en cadena de la polimerasa (Focus, 1998), pero debe ser purificado para usos en biología molecular. Para esto, 5g de glucógeno se disolvieron en 10mL de agua filtrada (0.4µm). La primera extracción se realizó con un volumen de fenol, la segunda, con un volumen de cloroformo. Se agregó un volumen de etanol absoluto al

sobrenadante para que el glucógeno precipitara instantáneamente. Se recogió el precipitado por centrifugación y se dejó secar al aire. El polvo se pesó y se resuspendió en agua filtrada (0.4  $\mu\text{m}$ ) a un stock de 20mg/mL. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas (Salvi, 2002).

3. DNA de huevos y de chinches para controles positivos. Se escogieron dos chinches hembras, adultas para utilizar como controles internos. Se realizó extracción de DNA de las patas, cabeza y ootecas según el procedimiento de extracción de la sección 2: “DNA de patas de chinches para tamizar los microsatélites”.

C. Enriquecimiento y clonación de fragmentos de DNA con microsatélites de *T. dimidiata*

Este procedimiento fue realizado en el Laboratorio Ecológico Savannah River, de la Universidad de Georgia (Savannah River Ecology Laboratory, University of Georgia) de acuerdo al protocolo “Microsatellites Isolation with Dynabeads 2002” (Glenn and Schable, 2002). Ver Anexos A-F.

Las eluciones enriquecidas fueron amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa. Fueron clonadas, tamizadas y secuenciadas en el laboratorio del Departamento de Enfermedades Parasitarias del Centro de Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, GA, Estados Unidos de América. Ver Anexos G-H.

D. Análisis de secuencias e identificación de microsatélites

Las secuencias obtenidas a partir de los clones positivos secuenciados, se analizaron con SeqMan™ (DNASTar, Inc., Madison, WI). El procedimiento realizado para cada uno de los 95 clones secuenciados fue como se detalla a continuación.

Se escogieron los interferogramas obtenidos con los cebadores M13 forward y M13 reverse, se eliminaron de las secuencias del vector pGEM-T Easy, linkers “Super SNX” y otros posibles ruidos con las funciones “Set Vector” y “Trim ends”. Se alinearon ambos

interferogramas mediante el comando “Assemble” obteniendo una secuencia consenso, la cual se verificó y determinó la secuencia final a reportar, por la observación de interferogramas. Ver nomenclatura de secuencias en sección I de Anexos, para determinar si las secuencias fueron consenso o de una sola hebra.

Por medio del programa “Tandem Repeats Finder” (Benson, 1999) disponible en <http://c3.biomath.mssm.edu/trf.basic.submit.htm> se identificaron los microsatélites, utilizando los parámetros para principiantes “Basic”. Se tomaron en cuenta los microsatélites con períodos de al menos dos nucleótidos y ocho repeticiones.

A partir de las secuencias que contenían microsatélites, se hizo una búsqueda en el BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), para eliminar las que correspondieran a genes y secuencias previamente reportadas. Se continuó trabajando con todas las secuencias, ya que a pesar de encontrar dos que presentaron coincidencias en fragmentos de 10bp, no se trató de microsatélites ni sitios de cebadores.

#### E. Diseño de cebadores para amplificar microsatélites por la reacción en cadena de la polimerasa

Con el programa Primer3 (Old version) disponible en <http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/> se introdujeron las secuencias que contenían microsatélites. Las opciones del usuario se ajustaron al: despliegue de cinco posibles pares de cebadores para cada secuencia analizada, una estabilidad máxima para los cinco nucleótidos localizados en el extremo 3' de cada cebador, forward y reverse, de 9.0 (el valor corresponde al máximo delta G para una interrupción para los cinco nucleótidos calculado utilizando el parámetro más cercano de vecindad, siendo 9.00 el valor recomendado), valor máximo de mal apareamiento de 12.00, un valor máximo de mal apareamiento en pares de 24.00, un tamaño de cebador entre 18 y 27 pares de bases, con un óptimo de 20 pares de bases, una temperatura de fusión óptima de 60°C, dentro del rango de 57.0°C y 63.0°C (el programa calcula esta temperatura según fórmula reportada por (Rychlik, *et al.*, 1990); un porcentaje

de GC entre 20.0 y 80.0%, un puntaje máximo de autocomplementaridad de 8.0, un puntaje máximo de complementaridad en el extremo 3' de 3.00, no se permitió la presencia de acumulación de nucleótidos GC seguidos. El programa calcula valores de temperatura de fusión ( $T_m$ ) de cada cebador utilizando una concentración de sales de 50.0 mM y una concentración de oligos en la reacción de cadena de la polimerasa de 50.0nM. Para escoger los mejores pares de cebadores el programa se basó en un sistema de pesos tomando en cuenta todos los factores anteriormente descritos. El nombre de los pares de cebadores se fijó utilizando la identificación de la secuencia del clon positivo escogido, además de la letra "F" por "forward" y "R" por "reverse".

Como el método de detección de estas reacciones fue realizado por electroforesis capilar utilizando el ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los softwares GeneScan™ 2.1, (Applied Biosystems, Foster City, CA) y GenoTyper™ 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), como un método económico para el marcaje de cebadores con fluorescencia, se decidió marcar tres primers denominados "universales" en lugar de marcar uno de cada par de cebadores, según recomendaciones publicadas en "An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments" (Schuelke, 2002).

Sin importar el número de microsatélites que se desean tamizar, se disponen de, al menos, dos cebadores cuyas secuencias no pertenezcan ni se parezcan a las que serán tamizadas. Tan sólo deben poseer entre 10-20bp y ser los únicos cebadores marcados. Es recomendable, además, diseñar al menos dos de estos cebadores de diferente color para correrlos juntos. También, es recomendable diseñar los cebadores de modo que el producto que generen sean también de diferente tamaño. Por ejemplo, el fragmento que TDAK57 genera es de 99bp y está diseñado para detectarse de color verde (HEX™), mientras el TDAK68 genera un fragmento de 161bp y se detecta de color azul (FAM™). Estos fragmentos sí podrán correrse juntos, ya que estarán separados por 62bp y son de diferente color. No se recomienda correr dos productos del mismo color, aunque estén muy bien caracterizados, ya que podría confundirse un pico o grupo de picos con un posible nuevo alelo.

Como cebadores universales se utilizaron las secuencias “CAGT”, “T3 promoter” y “T7 promoter” (Comunicación personal, Mandy Schable) que se describe en el Cuadro 8. El CAGT fue marcado en el extremo 5' con FAM<sup>TM</sup> (6-carboxifluoresceína), mientras “T3 promoter” y “T7 promoter” fueron marcados con HEX<sup>TM</sup> (4,7,2', 4', 5', 7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína). Estas secuencias son promotores bacteriófagos que, en principio, no interfieren la amplificación con posibles bandas inespecíficas.

A uno de los cebadores específicos para cada locus (de los que no son universales) se le agregó una “cola” o fragmento de igual secuencia a los cebadores universales. De este modo, al cebador diseñado originalmente a través del programa Primer3, se le agregó aproximadamente 10 pares de bases correspondientes a la secuencia de uno de los cebadores universales. Ver Figura 16 y Cuadro 3.

El color se agrega a la hebra que está siendo amplificada cuando a medida que el fragmento original está siendo amplificado, tal como si se tratara de una mutación sitio dirigida, incorpora la secuencia de la “cola” a su fragmento. Este producto se va acumulando hasta que este cebador se agota, ya que se agrega en una razón 1:4. Es entonces cuando el cebador marcado sustituye al cebador que se agotó, pero que generó suficiente producto con su secuencia (la “cola”) y puede continuar amplificando el fragmento deseado, pero ahora con coloración. El único cuidado que debe tenerse al obtener los resultados finales, es que para obtener valores reales del fragmento, deben restarse las bases que se agregaron de “cola”, ya que no pertenecen al alelo de forma natural.

Para agregar la “cola”, se escogió el cebador que pudiera adaptarse mejor en secuencia al del cebador universal. Por ejemplo, ver Figura 19, si el cebador forward del locus TDAK57 iniciaba en “CCATAGC...” y el cebador universal terminaba en “...TCACCA”, entonces se pueden ahorrar bases al suprimir las bases repetidas, por lo que las bases “...CCA...” son eliminadas una vez.

Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de reducir al máximo la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los cebadores debido a la secuencia agregada. Esto es importante, porque al optimizar las reacciones en cadena de la polimerasa, la temperatura de anillación dependerá del tamaño y estabilidad de ambos cebadores (“forward” y “reverse”) de cada locus. Mientras mayor sea la diferencia en tamaño más difícil será optimizar cada reacción.

El tamaño de los cebadores no sólo es crítico para determinar la temperatura de anillación de la reacción, sino también para reducir la posibilidad de que se formen estructuras secundarias indeseadas que den lugar a la formación de dímeros de cebadores que reduzcan la eficiencia de la reacción. Se observa que a mayor tamaño, mayor es la probabilidad de que se formen estructuras secundarias estables: cada cebador consigo mismo o con el cebador en sentido opuesto. Para evitar esto, además de reducir el tamaño de los cebadores, también se analizó la estabilidad termodinámica de los mismos. Se utilizó el programa OligoAnalyzer 3.0 de IDT Biotools (<http://biotools.idtdna.com/Analyzer/>) para generar las estructuras secundarias más factibles: horquillas (“hairpins”), homodímeros y heterodímeros (los dos últimos, analizados según la energía libre de la estructura). Cuando la temperatura de anillación de una estructura secundaria era más baja que la temperatura diseñada para el PCR, se descartó la secuencia y se diseñó un nuevo par de cebadores.

Figura 16

Cebadores de locus TDAK57 mas secuencia de cebador universal  
para ahorro de bases en el diseño

Cebador forward: CCATAGCTTGTATTGCCCTATC +  
Cebador universal: \*FAM-CAGTCGGGCGTCACCA

Al agregar la secuencia del cebador universal que tiene el marcaje resulta:

\*FAM-CAGTCGGGCGTCACCACATAGCTTGTATTGCCCTATC

donde las secuencias CCA se repiten, pudiendo suprimirlas sin alterar la integridad de ambos cebadores. Al suprimir una de estas repeticiones resulta:

\*FAM-CAGTCGGGCGTCACCATATAGCTTGTATTGCCCTATC

Dado que el uso de marcaje universal es una nueva metodología, se decidió marcar dos cebadores de forma directa, para comparar resultados. Por último, la estabilidad de los cebadores y los productos pretendidos se analizaron con el programa “OligoAnalyzer 3.0” (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) disponible en <http://biotools.idtdna.com/analyzer>. Se evaluó la complementareidad de cada cebador consigo mismo con la función “selfdimer” y del cebador forward con el reverso con la función “heterodimer”. Para realizar este análisis, las condiciones de PCR fueron modificadas para cada reacción en cadena de la polimerasa. Para los cebadores, se inició con una temperatura de fusión de 5°C debajo de la temperatura teórica, es decir, se inició a 55°C y posteriormente, se trabajó a 60°C. La concentración de sales se trabajó siempre igual y el DNA se trabajó a la concentración inicial de extracción, dilución 1:10 y dilución 1:100.

#### F. Optimización de condiciones de reacción en cadena de la polimerasa para amplificar microsatélites y análisis por electroforesis capilar

Los microsatélites fueron amplificados a partir del DNA extraído de patas mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El volumen total de reacción fue de 15µL: 0.06µL de DNA templado por cada µL de volumen total de reacción; *Taq* buffer 1X (a c.f. de 10mM Tris-HCl pH9, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100) (Promega, Madison, WI); MgCl<sub>2</sub> a c.f. de 1mM (Promega, Madison, WI); deoxinucleótidos a concentración final de 0.250mM cada uno. Los cebadores: universal y reverse a 0.04mM (Ver Cuadro 3; Sección E. Microsatélites), el cebador sin marcaje ni secuencia complementaria a 0.01mM, manteniendo las razones de concentración según la posición de la secuencia marcada; la *Taq* polimerasa (buffer B) a 0.03U/µL. Los cebadores empleados para realizar el tamizaje fueron: TDMS4, TDMS11, TDMS19, TDMS22 (Anderson, *et al.*, 2002) y se optimizaron los TDAK que se presentan en el Cuadro 9 “Optimización de microsatélites TDAK”, en la sección de Resultados. Todos los cebadores TDAK fueron diseñados para tener la misma temperatura de anillación: 60°C. Los programas y termocicladores utilizados se presentan a continuación en el Cuadro 5. Se puso a prueba el

aditivo *Taq* extender<sup>TM</sup>, para la optimización de los locus TDAK, (Stratagene, La Jolla, CA) para ayudar a la amplificación de DNA “difícil” para la *Taq* polimerasa (buffer A). Se empleó igual que la *Taq* polimerasa ajustando solamente el volumen final de agua y la concentración de MgCl<sub>2</sub>. La dilución de DNA adecuada para realizar las reacciones en cadena de la polimerasa de cada locus se determinó a ensayo y error. Para TDMS se determinó que la mejor dilución es 1:10. Mientras los TDAK, se propone podrían funcionar mejor a dilución 1:100.

Cuadro 5  
Programa y termociclador empleado para las reacciones en cadena de polimerasa

TDAK		TDMS	
Ciclos	Temperatura y tiempo	Ciclos	Temperatura y tiempo
1x	5min a 92°C	1x	5min a 94°C
25x	30s a 90°C	30x	20s a 90°C
	1.5min a 60°C		28s a 55°C
	30s a 72°C		30s a 72°C
1x	6min a 72°C	1x	45min a 72°C
Hold	4°C	Hold	4°C
iCycler (BioRad)		Robocycler (Stratagene)	

#### G. Análisis de microsatélites por electroforesis capilar

Los productos obtenidos de los cebadores diseñados se corrieron en el equipo de electroforesis capilar ABI PRISM ® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se preparó un “master mix” para 98 reacciones, compuesto de 8.5µL de *hidi-formamide* y 0.5µL de marcador ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA) por reacción. Se agregaron 9µL de la mezcla en cada pozo de la placa de 96 pozos, seguido de 1µL del producto de PCR obtenido de cada muestra en análisis, luego, el DNA se desnaturalizó, a 95°C, por 3 minutos y en hielo por otros 3 minutos. Una vez preparada la placa, ésta se montó en el equipo. Los resultados obtenidos por el programa GeneScan<sup>TM</sup>2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) se analizaron visualmente y luego se comparó utilizando el programa GenoTyper<sup>TM</sup>1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) para registrar el tamaño, en pares de bases; la intensidad, en unidades relativas de fluorescencia de los picos observados en el electroferograma.

Durante el análisis visual, se establecieron condiciones que los picos en los electroferogramas debían cumplir para ser definidos como verdaderos. Las condiciones de pico verdadero se describen a continuación:

1. Los picos observados debían caer dentro del rango de tamaño (bp) esperado.
2. Debían poseer por lo menos 50 unidades relativas de fluorescencia como altura de pico.
3. Las bandas de desliz (“stutter bands”) se definieron como todas aquellas bandas que fueran de menor altura (unidades relativas de fluorescencia) y uno (o más múltiplos) de la repetición del microsatélite, más pequeños (en pares de bases) que el pico principal.
4. Bandas con mayor tamaño de fragmento y altura relativa mayor o igual al 75% respecto al pico principal, se consideran alelos.
5. Pares de bandas cuya diferencia en tamaño de fragmento es de 1bp no se consideran alelo, sino “pico dividido” o “Split peak”. Se define como pico verdadero el de menor tamaño. Estos picos se deben a la adición de una A al extremo 3' del fragmento por acción de la Taq polimerasa durante el PCR.

Los datos de GenoTyper™1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) fueron exportados a Microsoft® Excel para grabar como documentos .txt. Con el programa *Allelogram* se definieron los tamaños de cada los fragmentos amplificados a valores enteros y se obtuvo datos estadísticos, además de datos para graficar frecuencia alélica (Indury and Cardon, 1997).

#### H. Análisis genético de los microsatélites

Luego de escoger los picos reales se determinó la frecuencia alélica, el número de alelos, el número de alelos efectivos, la heterocigocidad observada y la esperada de cada locus. Los histogramas de frecuencia alélica se realizaron con SPSS 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL) Los programas GenAlex V5 (Australian National University, Canberra,

Australia) y PopGene 1.32 (Ag/For Molecular Biology Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for International Forestry Research) fueron utilizados para los cálculos de genética de poblaciones.

## I. Creación de base de datos

Se creó una base de datos en Microsoft®Access que incluye:

<b>Datos generales de la chinche según Encuesta Entomológica (Cordón-Rosales, 2004)</b>	Número de identificación Especie Estadio o sexo Hábitat donde fue colectada Si fue colectada viva o muerta Si está infectada con <i>Trypanosoma</i> y especie del parásito País, departamento, municipio y localidad de colecta Datos numéricos de altitud y longitud de localidades
<b>Datos de extracción de DNA</b>	Método de extracción utilizado Si se utilizó coprecipitante (Glucógeno de ostra) Número de patas Fecha y responsable de extracción Sitio de almacenamiento actual
<b>Datos de PCR</b>	Microsatélite tamizado Concentración de magnesio utilizada Uso de Taq extender o no Temperatura de anillación Termociclador empleado Fecha y responsable de reacción Sitio de almacén actual
<b>Condiciones de corrida del microsatélite</b>	Método de corrida Fecha y responsable de corrida Runfolder y zipnumber (formatos en los que se genera la información electrónica)
<b>Resultados de corrida</b>	Resultado de corrida de muestras y controles internos Masa molecular del pico (producto de la reacción en cadena de la polimerasa) Altura de dicho pico Observaciones especiales Peak width

J. Análisis comparativo de costos y efectividad entre las metodologías para corrida y análisis de microsátélites: tradicional y automatizado

Se realizó un análisis que comparó con detalle el tiempo que requiere correr y analizar una muestra utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida, denominado método tradicional, respecto a la metodología automatizada que emplea marcaje fluorescente realizado en un aparato de electroforesis capilar.

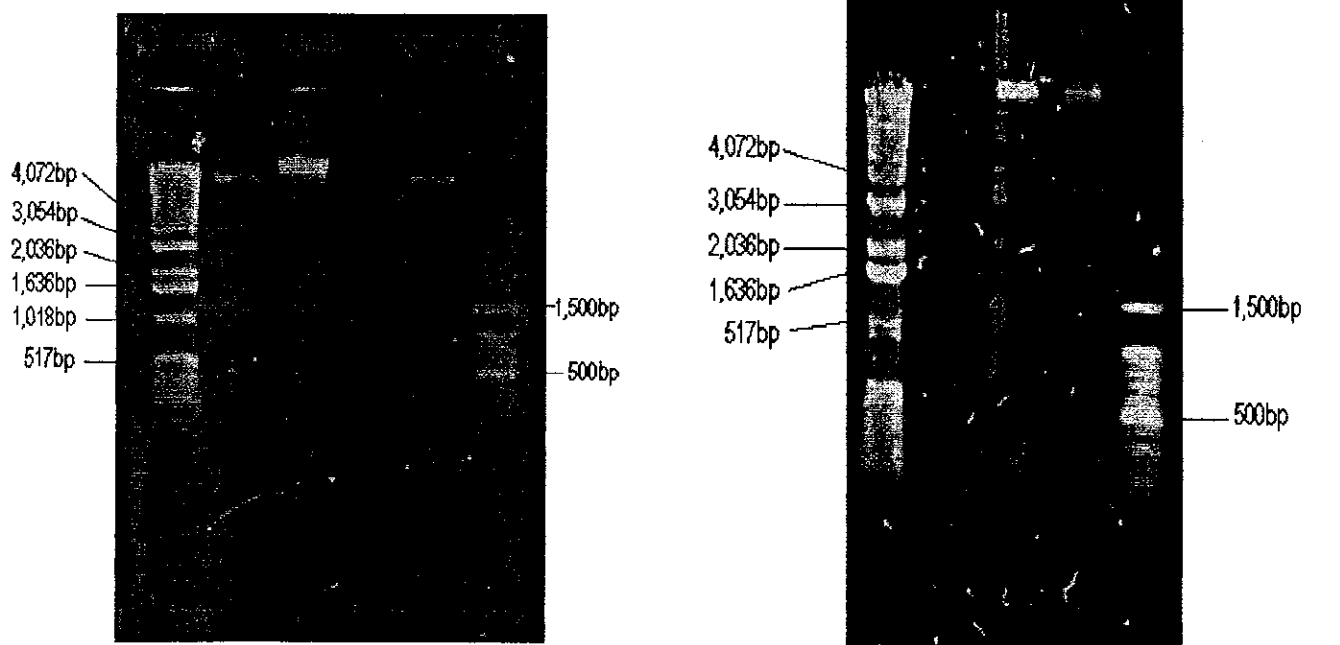
Se realizó un análisis del costo por muestra según la metodología utilizada y se compararon las ventajas y desventajas de cada metodología para determinar cual aportó mayores beneficios. Se determinó la alternativa más barata y que aportó los resultados más confiables, repetibles y sensibles.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Extracción de DNA genómico de huevos de *T. dimidiata*

Se utilizaron huevos de *T. dimidiata* como templado para hacer las eluciones enriquecidas (ver Anexos A-H). Las extracciones se realizaron a partir de 16 y 15 huevos utilizando el Wizard Genomic DNA Extraction Kit (Promega, Madison, WI). Se corrieron 10 $\mu$ L del DNA extraído en gel de agarosa 0.7% en 1x TBE, teñido con bromuro de etidio, ver Figura 17. Aunque se les trató con RNasa se observó una fuerte banda de baja masa molecular correspondiente al RNA, ver Figura 17b, pozo 3.

Figura 17  
Detección de DNA genómico de huevos de *T. dimidiata* para enriquecimiento



a. (1) 5 $\mu$ L marcador molecular 1Kb (Gibco BRL, Bethesda, MD); (2) 10 $\mu$ L extracción control sin kit comercial; (3) 10 $\mu$ L extracción más abundante e íntegra de DNA; (4) Agua como control negativo; (5) 10 $\mu$ L de extracciones control sin kit comercial; (6) 5 $\mu$ L marcador molecular 100bp (Promega, Madison, WI).

b. Pozos 3: 10 $\mu$ L DNA con banda de RNA a baja masa molecular; 4: 10 $\mu$ L extracción control sin kit comercial; 1: 5 $\mu$ L marcador molecular 1Kb (Promega); 5: 5 $\mu$ L marcador molecular 100bp (Boehringer).

Se propone que esta banda es RNA como resultado del desarrollo de la chinche en fases embrionarias, cuando se podría esperar una alta tasa de transcripción. Las bandas correspondientes al DNA genómico fueron íntegras, es decir, que no demostraron fracturas significativas que pudieran afectar el enriquecimiento. Posteriormente se cuantificó con espectrofotómetro, ver Cuadro 6, para determinar concentración y grado de pureza. Se determinó que ambas extracciones, contenían una razón de OD<sub>260/280</sub> de 2 indicando que aun existían impurezas de proteína (Brown, 2000). Sin embargo, tanto la pureza como la concentración final se consideraron adecuadas para continuar con el enriquecimiento, cumpliendo con la concentración mínima de 80ng/μL (Comunicación personal, Mandy Schable).

Cuadro 6  
Cuantificación de DNA genómico con espectrofotómetro

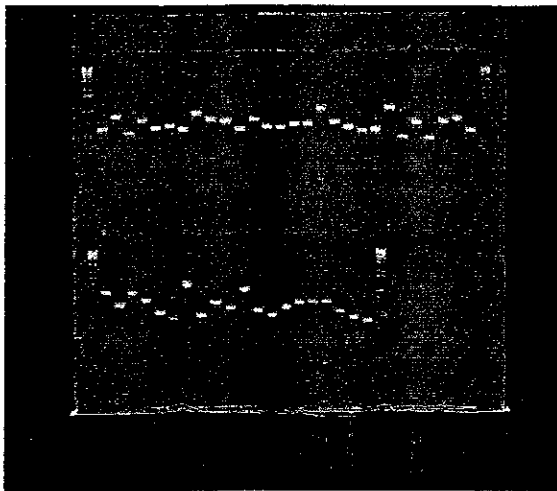
Extracción	Cantidad de huevos	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	Concentración DNA [ng/μL]
1	15	0.002	0.001	2	50
2	26	0.004	0.002	2	100
C- (agua)	0	0	0	0	0

#### B. Secuenciación de clones enriquecidos con microsatélites

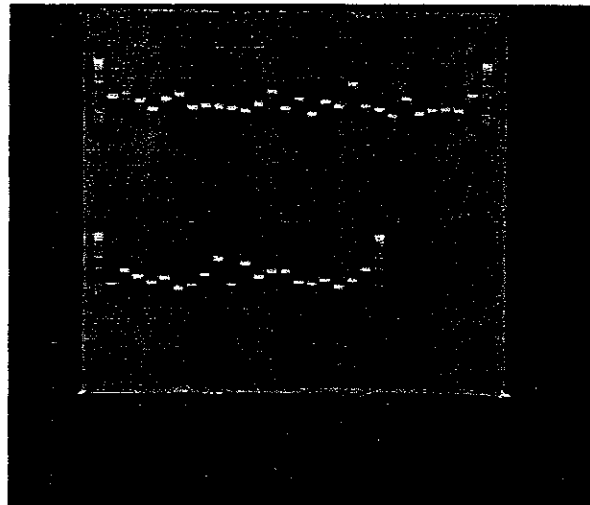
A partir de la amplificación de las soluciones enriquecidas obtenidas del “Savannah River Ecology Lab”, se continuó la amplificación y secuenciación del fragmento enriquecido en el laboratorio del Centro de Control y Prevención de Enfermedades o “CDC Centers for Disease Control and Prevention” Atlanta, GA, USA. De esta amplificación, se obtuvo una gama de fragmentos, cuyo tamaño estuvo, en promedio entre 400-500 pares de bases, ver Figura 18 incluyendo los cebadores M13F y M13R. Se trabajó con las eluciones enriquecidas 2, 3 y 4. Sin embargo, solamente la elución 2 (con dinucleótidos) funcionó posiblemente debido a que el enriquecimiento se realizara bajo condiciones muy astringentes y/o que el genoma de *T. dimidiata* fuera pobre en las secuencias de las eluciones 3 y 4 (exclusivamente tetranucleótidos) ver Anexos B.

Figura 18

Reacción en cadena de la polimerasa con cebadores M13F y M13R para la detección de clones con inserto incorporado, según interrupción de gen de  $\beta$ -galactosidasa



a. Clones 1-46; marcador molecular 1Kb (Promega) en primera y última posición de cada fila.



b. Clones 47-95; marcador molecular 1Kb (Promega) en primera y última posición de cada fila.

Se realizó la ligación a partir de las eluciones con microsatélites y se cultivaron las colonias que incorporaron el plásmido recombinante. Este fenómeno se detectó mediante la interrupción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa. Se escogieron 95 clones con plásmido incorporado, se lisaron y se amplificaron los insertos por reacción en cadena de la polimerasa, ver Figura 18, utilizando los cebadores M13F y M13R. Dado que no se contaron las colonias plaqueadas, no se calculó el porcentaje de clones positivos. Sin embargo, sí se sabe que todos los clones tienen el inserto.

La detección de los productos se realizó en gel de agarosa y tinción de bromuro de etidio. Posteriormente, fueron secuenciados para determinar exactamente el tamaño e identificar las secuencias con microsatélites.

### C. Análisis de microsatélites

La secuenciación se realizó en dos sentidos, forward (5' a 3') de la hebra sentido y reverse (5' a 3') de la hebra antisentido. Se generaron 116 secuencias a partir de 95

clones, ya que no siempre se obtuvieron secuencias consenso, probablemente porque la secuenciación en algunos de los dos sentidos no terminó.

Cuadro 7  
Secuencias y características de microsatélites de *T. dimidiata*

Locus (ID Clon)	Secuencia del microsatélite	Tipo	Número de acceso al BLAST	Ensayo de PCR
TDAK1	(CA) <sub>21</sub>	Perfecto	AY695416	NA
TDAK2	(AG) <sub>5</sub> ANAGAA (AG) <sub>9</sub>	Imperfecto	AY695417	N
TDAK4	(GT) <sub>26</sub>	Perfecto	AY695418	A
TDAK17	(AC) <sub>13</sub>	Perfecto	AY695419	A
TDAK20	(GT) <sub>6</sub> GAGT (GAGTGA) <sub>4</sub> (GA) <sub>7</sub> GT (GA) <sub>4</sub> GT (GA) <sub>5</sub>	Imperfecto	AY695420	N
TDAK21	(TC) <sub>7</sub> TT (TC) <sub>5</sub> TATCAC (TC) <sub>4</sub>	Imperfecto	AY695421	N
TDAK44	(TC) <sub>15</sub>	Imperfecto	AY695422	N
TDAK49	(TG) <sub>8</sub> AGG (GA) <sub>18</sub>	Interrumpido	AY695423	A
TDAK51	(GT) <sub>11</sub> (GA) <sub>13</sub>	Compuesto	AY695424	NA
TDAK57	(AC) <sub>12</sub>	Perfecto	AY695425	N
TDAK60	(AG) <sub>2</sub> AC (AG) <sub>11</sub> GG (AG) <sub>2</sub>	Imperfecto	AY695426	N
TDAK68	(AC) <sub>21</sub>	Perfecto	AY695427	A
TDAK73	(TG) <sub>23</sub>	Perfecto	AY695428	N
TDAK76	(AC) <sub>26</sub>	Perfecto	AY695429	NA
TDAK83	(CTGT) <sub>11</sub>	Perfecto	AY695430	A
TDAK85	(TC) <sub>4</sub> (GC) <sub>2</sub> (TC) <sub>13</sub>	Interrumpido	AY695431	N
TDAK95	(TC) <sub>12</sub>	Perfecto	AY695432	NA

A: amplificó, NA: no amplificó, N: no ensayado.

Para buscar microsatélites se utilizó el programa "Tandem Repeat Finder" (Benson, 1999). El número de secuencias con microsatélites encontrados fue de 35/95 (37%). Debe recordarse que la reacción de ligación se lleva a cabo al azar, por lo tanto, dos o más clones pueden contener la misma secuencia como inserto. Para continuar trabajando sin repeticiones se determinaron las secuencias que contenían el mismo microsatélite, con iguales regiones flancas, número y período de repetición. Ya conociendo las secuencias de la elución 2 (TG, AG, AAG, ATC, AAC, AAT y ACT) se esperaban clones con estas repeticiones y sus complementarios. Se identificaron 6/95 (7%) secuencias repetidas, y al ser eliminadas, se continuó con 29. La importancia de este paso radica en que podrían llegar a sintetizarse cebadores para el mismo

microsatélite y tamizarlos en una población como *locus* diferentes, cuando en realidad no lo son (Rivera, 2003). Asimismo, se suprimieron las secuencias de los cebadores M13F y M13R que se utilizaron para amplificar el inserto.

Es deseable que los microsatélites no se encuentren en exones o se encontrarían bajo selección, porque dejarían de ser neutrales contradiciendo las características de los buenos marcadores moleculares. Además, no deben haber sido reportados anteriormente. Para verificar esto, se realizó una búsqueda en el BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica o NCBI (por sus siglas en inglés “National Center for Biotechnology Information”) y aunque cinco secuencias, cuyo tamaño era entre 17 y 36bp, coincidieron a las correspondientes a los TDMS1, TDMS9 y TDMS11 (Anderson, et al. 2002) no fueron eliminadas, ya que correspondían a regiones flancas, no a los microsatélites *per se* ni a sitios de anillación de cebadores. Las secuencias encontradas, se resumen en el Cuadro 7.

#### D. Diseño de cebadores

Con el programa Primer3, se diseñaron cebadores en las regiones flancas de los microsatélites encontrados. El objetivo fue diseñar cebadores que pudieran ser utilizados tanto con electroforesis capilar (fluorescentes), como en geles de poliacrilamida (no fluorescentes). Resulta indispensable marcar los cebadores al utilizar la electroforesis capilar pero es innecesario, además de costoso, marcarlos para correr en gel de poliacrilamida. Así que aparentemente, para tamizar un microsatélite en cualquier metodología, eran necesarios tres cebadores: dos tradicionales y uno fluorescente. El fluorescente además, correspondía en secuencia a alguno de los dos de síntesis sin marcaje. El costo para esto es muy alto y resulta poco práctico. Fue entonces que se decidió diseñar lo que Schuelke (2002) denomina como cebadores universales.

Cuadro 8

Cebadores diseñados para amplificar secuencias de microsatélites de *T. dimidiata*

Locus	Hebra marcada	PRIMERS 5' → 3' (W/O LABEL)	Tm del cebador	Amplificón (sin cebadores universals)	Amplificón con cebador universal
TDAK1	F**	CCCAATTAACCCCTCACAAAGcaaaataaatgattatgtatggaatga	62.9	147	160
	R	taccccagagagtgaacccatc	57.9		
TDAK2	F	tcgcaagaaatgagagagaaaa	55.0	109	128
	R*	CAGTCGGGCGTCATCACCAAttgttttgatagaaggtctctg	70.0		
TDAK4	F**	CCCAATTAACCCCTCACTAAAGTtagcgattgttctcctttgc	67.8	197	213
	R	ttcttttcggtcccgtagtg	56.6		
TDAK17	F*	CAGTCGGGCGTCACCActtccaaccatttttctgttttg	69.9	134	149
	R	ctgctactaaaggatctatcaaat	54.0		
TDAK20	F	tgtcgtccaagtttatttgctc	56.0	153	169
	R*	CAGTCGGGCGTCACCAtgatttctctatttctgtttggaa	68.8		
TDAK21	F**	CCCAATTAACCCCTCACTAAAGaecttctattcgttctttctt	62.9	93	107
	R	Atgttcgaccctgacatcaa	56.2		
TDAK44	F	tcatcttgttctgttttagagagttga	57.0	103	123
	R***	GGGTAATACGACTCACTATAGGGcacagatatacatgcacacagaca	67.6		
TDAK49	F*	CAGTCGGGCGTCACCAatcatagaccacacaggt	70.4	160	174
	R	taaatggcaggttgattctg	55.3		
TDAK51	F	gtcgggtcccctgaataagga	58.0	151	168
	R**	CCCAATTAACCCCTCACTAAAGagcttctctgcgacttt	64.8		
TDAK57	F*	CAGTCGGGCGTCACCAtagcttgtattgcctatc	69.2	99	114
	R	tgtctacagatgtgtatggatgtg	56.9		
TDAK60	F	gagtgagtgagtgagtgggaca	60.5	109	123
	R*	CAGTCGGGCGTCACCAcattaaecttctcgtatgttgtg	68.9		
TDAK68	F	aacgggatgtcgtttgtttc	55.9	161	181
	R***	GGGTAATACGACTCACTATAGGGcttttgaggtcccctgagtg	68.3		
TDAK73	F*	CAGTCGGGCGTCACCAgtaatcacgataaaatggt	65.2	169	183
	R	agttagattcgttggtagga	52.4		
TDAK76	F	CAGTCGGGCGTCACACTtccgggtgaacgattt	70.0	187	200
	R	gtgttagcaattggtgtgtgtgtg	60.2		
TDAK83	F	Catctccagctcagcacaac	57.9	135	150
	R*	CAGTCGGGCGTCACCAgctgtgtgagagaggtg	74.4		
TDAK85	F**	CCCAATTAACCCCTCACTAAAGgcacagctaaacccaaaaa	65.4	124	141
	R	tatcctttcttctgttagaatagagagag	56.8		
TDAK95	F***	GGGTAATACGACTCACTATAGGgttgaaatcagctctttctctcc	65.4	106	125
	R	Agcaegcttttctgcttatt	58.0		
CAGT (FAM™)		*CAGTCGGGCGTCACCA (universal)	58.5		
T3 Pr (HEX™)		**CCCAATTAACCCCTCACTAAAG (universal)	52.9		
T7 Pr (HEX™)		***GGGTAATACGACTCACTATAGGG (universal)	56		

El Cuadro 8 presenta el resumen del análisis de estabilidad de cebadores. La nomenclatura del cuadro es como sigue: los cebadores universales son los últimos tres, la marca registrada entre paréntesis corresponde a la sustancia colorante, en el cuadro se presentan los valores de temperatura de anillación para cada primer, la “F” indica si el cebador es el “forward” (5’ a 3’), la “R” indica “reverse”. Los asteriscos indican la secuencia y el marcaje que tienen, según los cebadores universales al final de la tabla, así como la posición (“F” o “R”). Las secuencias en mayúsculas corresponden a las de los cebadores universales, las minúsculas corresponden a las de los cebadores originalmente.

#### E. Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa usando electroforesis capilar

La optimización de la reacción en cadena de la polimerasa para cada *locus* se inició luego de calcular la temperatura de anillación según la secuencia de los cebadores. Para las reacciones de los TDAK se utilizó *Taq extender*<sup>TM</sup> (Stratagene, La Jolla, CA) para facilitar la amplificación de DNA “difícil” para la *Taq* polimerasa, como los son las secuencias repetitivas. Este aditivo se utilizó para verificar si en realidad se observaba alguna mejoría de la amplificación, ya que es común que la *Taq* polimerasa se “resbale” de la última base copiada y se deslice unas pares de bases respecto a la base que realmente le corresponde, produciendo los llamados “stutters”, los cuales hacen difícil el análisis.

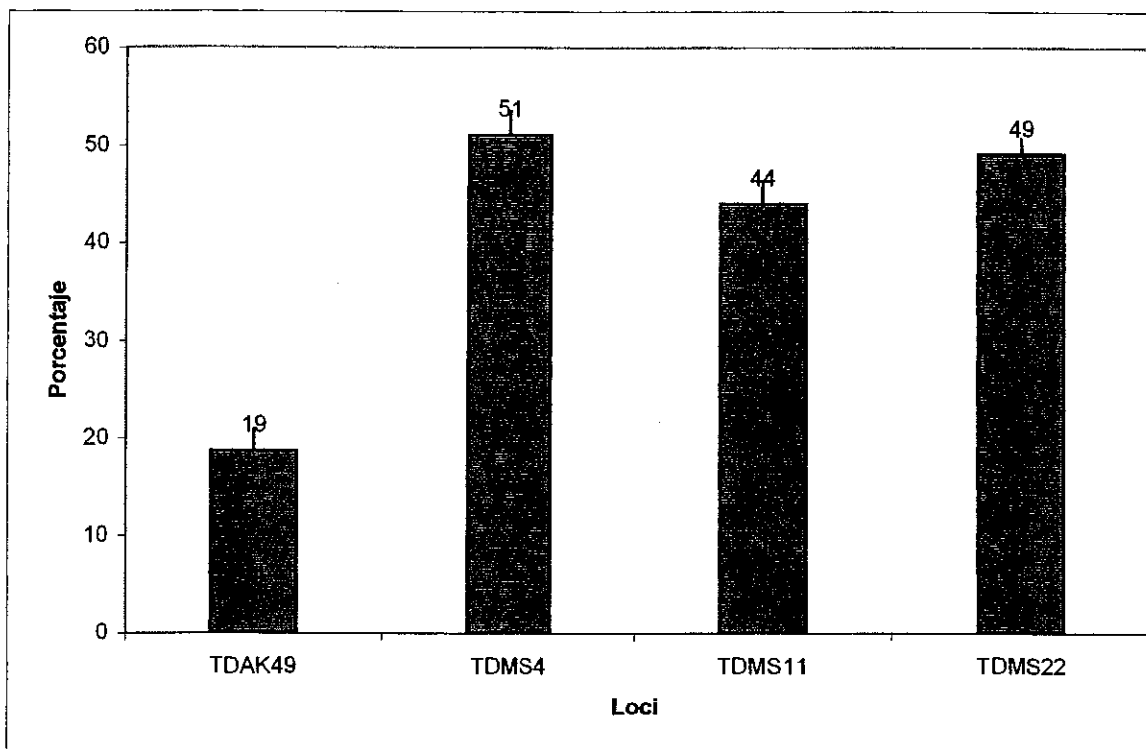
Las condiciones óptimas para correr los TDMS ya están reportadas (Anderson, *et al.*, 2002; comunicación personal, Cynthia Ralda). De los ya optimizados, se trabajaron únicamente los: TDMS4, TDMS11 y TDMS22. Con anterioridad se utilizaron los TDMS9 y TDMS19. Sin embargo, de éstos últimos se observó amplificación no consistente, así que para los fines de este estudio no fueron incluidos. Las diluciones de DNA utilizadas fueron también de 1:10 y aunque amplificaron relativamente mejor que en ensayos anteriores, los porcentajes de amplificación fueron bajos (Ver Figura 20).

Los *loci* TDMS4, TDMS11 y TDMS22 amplificaron relativamente mejor que el TDAK49, ya que el porcentaje de individuos positivos por PCR se encontró cercana al 50%, comparado con 19% para TDAK49. Se ha observado durante el análisis de los TDMS que ocurre un porcentaje significativo de individuos que no amplifican para los *loci* dados y se propone que se deba a la operación irregular del termociclador (comunicación personal, Cynthia Balda).

Es claro que el *locus* TDAK49 presentó un porcentaje de amplificación menor que los *locus* TDMS. Este comportamiento no pudo ser previsto durante la optimización, ya que para este fin se trabajó con menor número de muestras. El comportamiento de cada marcador podrá determinarse únicamente al trabajar poblaciones con tamaños estadísticamente representativos.

El DNA control utilizado para las reacciones en cadena de la polimerasa fueron extraídas de dos hembras disectadas, del insectario del Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala. Las extracciones se realizaron de tejido de pata y de las ootecas. El objetivo era determinar el comportamiento del mismo DNA en los diferentes marcadores, y si resultara necesario repetir corridas, seguir utilizando el mismo DNA e incluso comparar posibles desviaciones entre corridas diferentes. De no utilizar el mismo DNA, por ejemplo, no podría determinarse si un alelo nulo en una muestra se debía a que el DNA estuviera en mal estado, se tratara de un individuo nulo para ese alelo, o que el microsatélite aún no estuviera optimizado. Además, se utilizó como control positivo el clon lisado utilizado para secuenciar. Si los cebadores y la reacción son desarrollados bajo las condiciones adecuadas, el clon debe funcionar, la única limitante es la posible saturación de la enzima por exceso de sustrato, ya que el plásmido en estos cultivos bacterianos es de alto número de copias. Aunque se trabajó con alícuotas de 1:100 del DNA genómico, algunos microsatélites presentaron amplificación inespecífica. Es posible que este problema de amplificación inespecífica se contrarreste al utilizar DNA más diluido.

Figura 19  
Porcentaje de muestras que amplificaron por PCR



Para establecer que un juego de cebadores ya está optimizado, es importante tamizar poblaciones reales. Sólo así, podrá determinarse la calidad del marcador. De los marcadores optimizados, pudo tamizarse únicamente el TDAK49, utilizando *Taq* extender y diluciones de DNA de 1:10. Hubo casos de TDAK en los que tanto pata como ooteca funcionaron bien, pero hubo amplificación inespecífica de clon, probablemente debida a sobrecarga de DNA. Se recomienda probar nuevamente, con diluciones mayores. Este marcador mostró un porcentaje de amplificación relativamente bajo, del 19% y se observó un patrón en el orden de montaje de las muestras. Con los datos obtenidos todavía no puede determinarse si este patrón se debe al funcionamiento dispar del termociclador, a la mala calibración de pipetas multicanal o que el marcador sea verdaderamente nulo para la mayoría de las muestras.

Se optimizaron dos *locus* con *Taq* extender, dos sin *Taq* extender y uno con ambos; aunque se esperaría que con *Taq* extender ocurrieran menos artefactos y picos más definidos, esto sólo ocurre en casos aislados. La temperatura de anillación no se alteró amplificándolos, todos a 60°C.

Schuelke (2002), recomienda utilizar un programa de amplificación que tiene un anexo de otros 8 ciclos con temperaturas y tiempos de elongación adicionales. En su publicación, probablemente trabaja con *locus* que demuestran diferente comportamiento, ya que al ensayar esta recomendación, se observaron picos con amplificaciones inespecíficas, que no se observaron utilizando el programa recomendado en el Cuadro 5. Dadas estas observaciones, se decidió continuar trabajando con los programas descritos por ese cuadro.

En cuanto a la optimización de los *loci*, el TDAK4 funcionó bien sin utilizar *Taq* extender y la amplificación inespecífica que se observa del clon pueden deberse a exceso de DNA. El *locus* TDAK17 amplificó mejor sin *Taq* extender, ya que con el aditivo las alturas de los picos salieron más bajas. El TDAK49 funcionó bien con *Taq* extender, mientras que sin utilizar el aditivo, no amplificó nada. Este *locus* fue tamizado con las mismas muestras que los TDMS. El TDAK68 funcionó bien con aditivo, y al igual que el TDAK4 y TDAK49, probablemente se requiere utilizar el control del clon a mayor dilución. El TDAK83 amplificó bien sin aditivo, se recomienda también aumentar la dilución del clon. Amplificaron picos dentro del rango, con alturas relativas aceptables los DNA control los *locus* TDAK4, TDAK17, TDAK49, TDAK68 y TDAK83. Pero para conocer la calidad y comportamiento genético de estos marcadores, es necesario tamizarlos en poblaciones naturales.

En resumen, 3/9 *loci* fueron tamizados y amplificaron mejor con *Taq* extender y 2/9 *loci* amplificaron mejor sin *Taq* extender. 4/9 no amplificación o amplificaron productos inespecíficos. Así que no parece haber ningún factor en común que permita predecir la función del *Taq* extender.

#### F. Análisis de microsatélites por electroforesis capilar

Para realizar la optimización de las corridas de los productos de PCR, las alturas de los picos resultantes deben estar en un rango de 150-4000 unidades de fluorescencia. Si las alturas quedan fuera de este rango, pueden darse problemas de lectura de picos, por ejemplo, confusión de picos con ruido de fondo (Guía química GeneScan<sup>TM</sup>). Del producto de PCR se montó un microlitro a una dilución 1:10. Se montaron también muestras sin dilución, sin embargo, diluyendo se obtuvieron mejores resultados. Una forma de ahorrarse el trabajo de realizar diluciones es cuantificar los productos por fluorometría. Sin embargo, esta práctica, según el uso que se le dé, puede resultar poco práctica. Para aprovechar mejor los materiales para el aparato de electroforesis capilar y la ventaja del diseño de los cebadores, procuraron correrse dos locus por pozo. Esto permite que las muestras sean procesadas y analizadas en la mitad del tiempo y costo. La única dificultad que este procedimiento puede presentar es que las muestras posean una cantidad muy alta de sales respecto a la de DNA y que la señal sea más débil. Sin embargo, los picos obtenidos al realizar estas mezclas se encontraron dentro del rango deseado y no se presentaron problemas citables. Por otro lado, las alturas relativas de los picos pueden verse afectadas, más bien, por el número de copias que existan todo el contenido celular de la chinche. Esto se debe a que no se conoce la posición en la que se encuentran los microsatélites a nivel cromosomal, y si por alguna razón, existiera más de una copia del microsatélite, se esperaría que se viera amplificado con mayor facilidad que otro que sólo presenta una copia. Este puede ser el caso de algún locus que se encuentre en el cromosoma sexual X. Se ha reportado que las chinches *T. dimidiata*, a diferencia de *T. infestans*, pueden tener más de dos cromosomas sexuales X. Si se tuviera un microsatélite que está colocado en estos cromosomas, que a su vez, se encuentran en múltiples copias, podrían obtenerse picos significativamente más intensos que otros. Es por esto, que se sugiere considerar el estudio de la posición cromosomal de los microsatélites por FISH (por sus siglas en inglés "Fluorescent *in situ* hybridization" (Comunicación personal, Pamela Pennington).

Es importante mencionar, que el análisis de microsatélites posee ventajas sobre otros métodos de análisis. Sin embargo, debe considerarse que se realizan algunas asunciones para

que la información pueda ser modelada y analizada. Estas serán mencionadas en cada una de las secciones pertinentes.

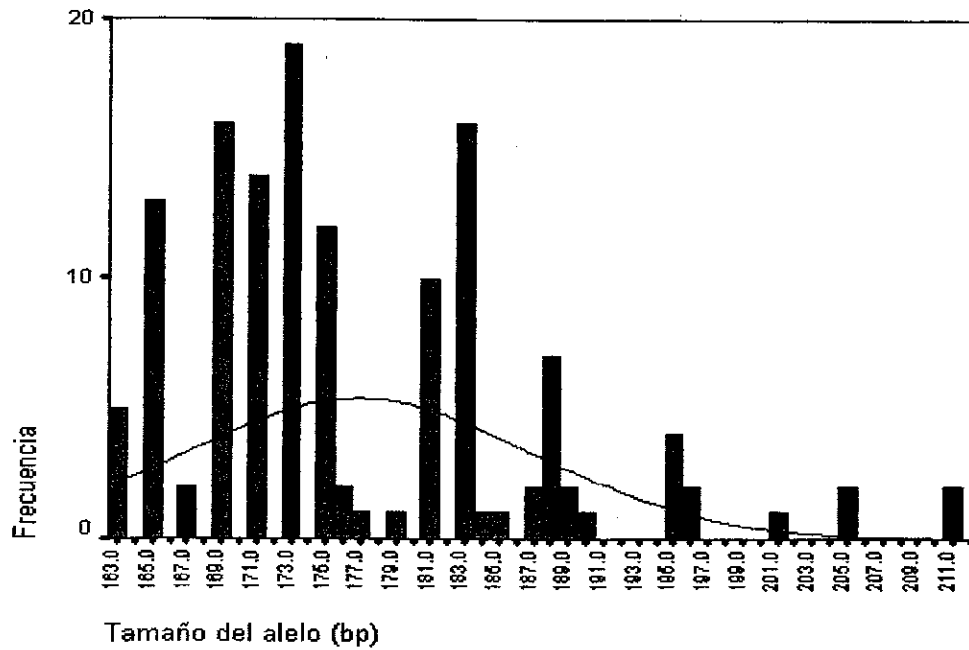
#### G. Identificación de alelos en cada locus

Las condiciones establecidas para identificar los alelos por locus se detallan en la sección de materiales y métodos. Como principal dificultad para realizar este análisis se puede citar el funcionamiento de la enzima Taq polimerasa. Esta enzima tiende a deslizarse, en posición, durante la amplificación del DNA templado, produciendo copias que varían en tamaño, aumentando o disminuyendo el número de repeticiones creando las llamadas “stutter bands” o bandas de desliz (Jarne and Lagoda, 1996). Además, la enzima Taq polimerasa, como cualquier otra enzima, ante un exceso de sustrato puede alterar su funcionamiento. En este estudio, se observó que ante un exceso de DNA templado, la enzima tendía a amplificar de forma inespecífica. Se observaron bandas que se encontraban fuera del rango de tamaño esperado y no fueron tomadas en cuenta, observándose más frecuentemente en muestras tamizadas, que en controles de clones.

Otro escenario que se observó con frecuencia durante el análisis, fueron alelos nulos. Los locus fueron amplificados a través de secuencias cebadoras o iniciadoras de DNA que son complementarias a las regiones flancas de los microsatélites. Si estos sitios mutan, las secuencias de los cebadores, no podrán hibridizar con el DNA templado y uno o ambos alelos no podrán amplificarse. Se prefiere el diseño de cebadores, en regiones que no codifiquen, de modo que no se encuentren bajo selección. En otros estudios, para reducir el efecto de los alelos nulos en el estudio, se seleccionan las muestras que amplifican para toda la serie de marcadores. Sin embargo, en éste, fueron muy pocas las muestras que amplificaron para todos los loci, de modo que se decidió realizar el análisis para cada población, por locus.

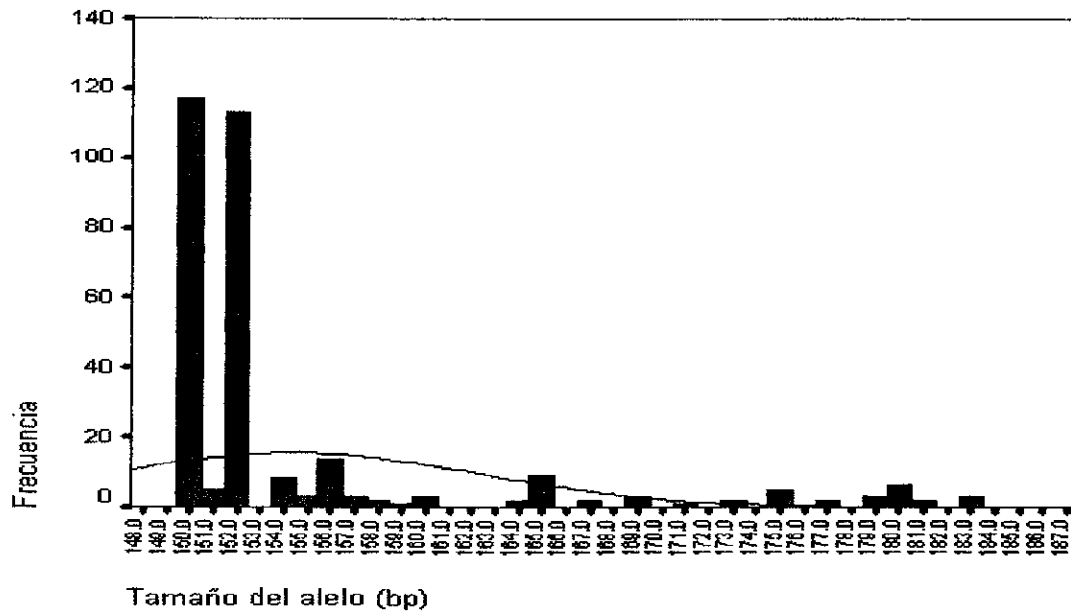
Aplicando los criterios anteriormente descritos, se identificaron y cuantificaron los alelos por locus (ver Figuras 21 a 24). Estas figuras muestran cualitativamente el grado de polimorfismo, de cada locus, siendo el más polimórfico el TDMS11, y el menos polimórfico TDMS22. Polimórfico es el locus con dos alelos o más, como todos los estudiados aquí.

Figura 20  
Frecuencia alélica en locus TDAK49



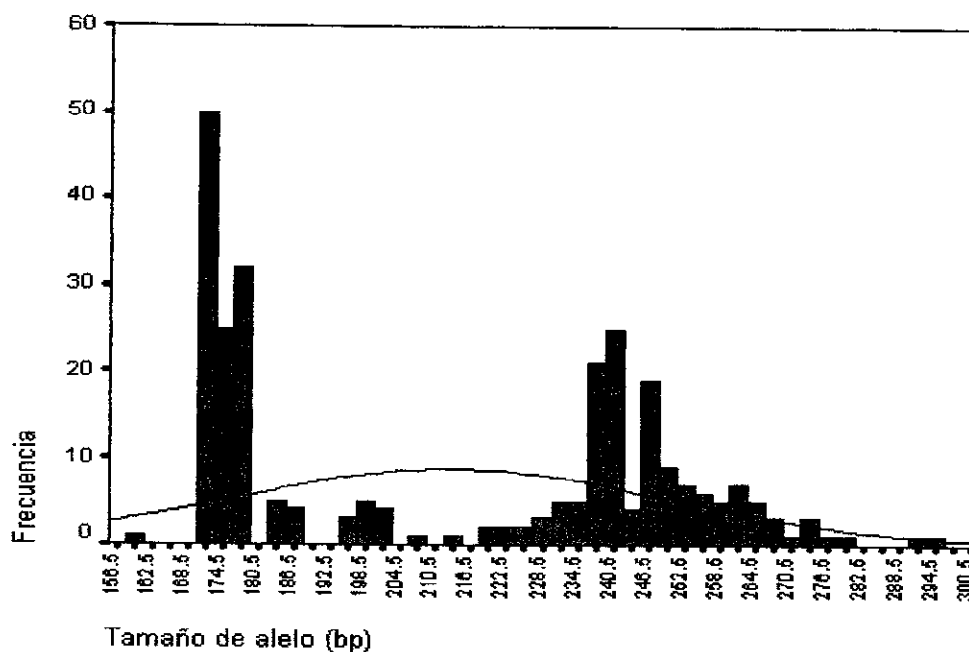
(TG)8AGG(GA)18: interrumpido, dinucleótido, 124-224bp.  
15 alelos, siendo el 166bp el más frecuente.

Figura 21  
Frecuencia alélica en locus TDMS4



(CT)C(CT)25G(CT)2: interrumpido, dinucleótido, 150-186bp.  
17 alelos, siendo el 150bp el más frecuente.

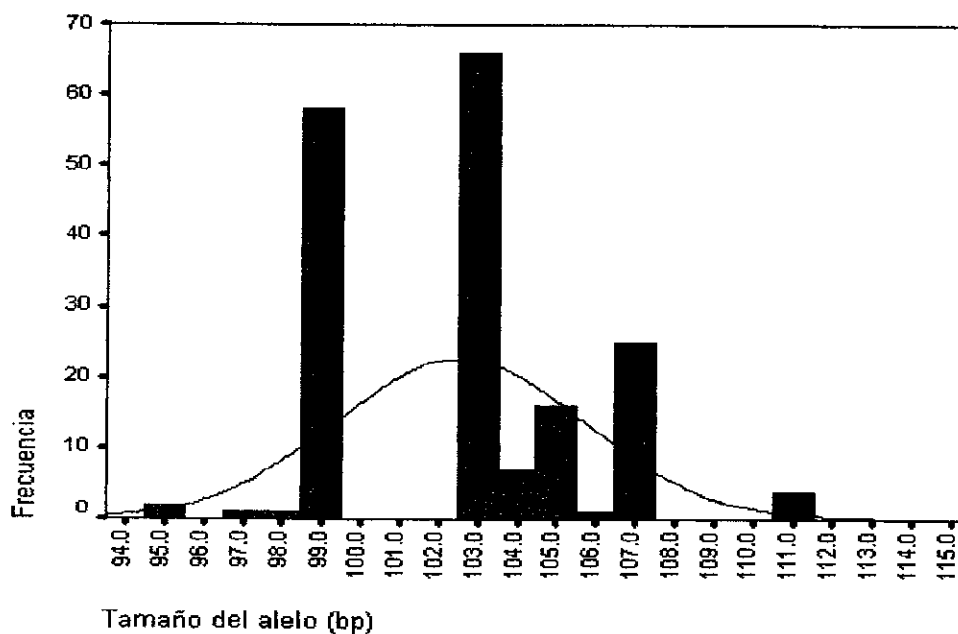
Figura 22  
Frecuencia alélica en locus TDMS11



37 alelos, siendo el 172bp el más frecuente.

(CT)<sub>5</sub>(CA)<sub>5</sub>(CTCA)<sub>2</sub>(CT)<sub>4</sub>(CACTTT)(CT)<sub>20</sub>: interrumpido, imperfecto, principalmente dinucleótido, 132-230bp.

Figura 23  
Frecuencia alélica en locus TDMS22



5 alelos, siendo el 99bp el más frecuente.

(ATGT)<sub>5</sub>ATAGT: interrumpido, tetranucleótido, 101-109bp.

Durante el estudio del comportamiento genético de poblaciones, el análisis puede consumir mucho tiempo y esfuerzo. Es por esto, que uno de los objetivos de esta investigación es crear una plataforma electrónica que permita trabajar los datos de una forma automatizada. Esto permitiría obtener resultados en menor tiempo y por lo tanto tamizar más muestras. Anteriormente, los datos generados por el software del equipo de electroforesis capilar se leían y anotaban manualmente, en este trabajo, se exportaron todos los datos a Microsoft® Excel, de donde fueron exportados nuevamente a Microsoft® Access. En este último programa, se calcularon razones de altura de picos, que podían ser bandas de desliz, respecto al pico predominante en el electroferograma. Como criterio de selección, se descartaron los picos cuyas razones fueran menor al 30%. Sin embargo, para poder realizar este tipo de manipulación de datos, es necesario que la optimización de las reacciones en cadena de la polimerasa se haya realizado muy cuidadosamente. La razón es que, si un electroferograma muestra dos grupos de picos, donde cada grupo fue amplificado a diferente razón, entonces se esperará obtener un grupo con picos sustancialmente mayores que el otro grupo, pudiéndolos confundir con bandas de desliz. Debido a que esta investigación pretendió optimizar las reacciones y la efectividad de la transferencia de información, después de procesar los datos con Microsoft® Access, se revisaron visualmente los electroferogramas para verificar que en los datos descartados, no se perdiera información valiosa. A pesar de esta limitante, el trabajo visual de leer y copiar manualmente datos de cada electroferograma puede reducirse significativamente manipulando datos electrónicamente, reduciendo también la posible introducción de errores al copiar.

Una vez identificados los individuos cuyos picos entraban dentro del rango teórico del locus en cuestión, utilizando el programa (Linux) *Allelogram* para definir y aproximar los alelos obtenidos. Este programa utiliza el método de mínimos cuadrados para generar la asignación categórica del alelo para cada muestra y una clasificación exacta de las cajuelas o *bins* para cada marcador. Permite asignar el tamaño de los alelos de forma matemática permitiendo al analista atender otras posibles fuentes de error en el laboratorio (Idury y Cardon, 1997).

Para utilizar el *Allelogram* es importante mencionar que deben hacerse dos asunciones. Primero, debe establecerse el período de repetición del microsatélite. Por ejemplo, (CA)<sub>13</sub> sería un período de 2. Segundo, el punto de corte, que será el parámetro que dependerá de la dispersión de los datos alrededor de un *bin*, transformando a cero todos aquellos valores que queden fuera de este intervalo. El punto de corte se determina experimentalmente, debe correrse el programa con una plantilla de los registros de datos brutos con diferentes valores de punto de corte. Se busca un equilibrio entre: el menor número de datos convertidos a cero, la menor dispersión, con menor desviación estándar. Algunos individuos pueden verse sacrificados con tal de tener información que se ajuste al modelo de este programa, pero si se realiza un muestreo con un N superior al deseado, puede no perderse significancia estadística. De la primera asunción para utilizar el *Allelogram*, es importante notar que los marcadores utilizados en este estudio fueron imperfectos y/o interrumpidos. Así que como valor de período, se ingresó el que fuera el predominante en el microsatélite, así que debe considerarse esta fuente de error.

Se determinó experimentalmente los puntos de corte de cada uno de los locus. Mientras más cercano a cero y lejano de uno, es mejor el punto de corte. Si los datos están dispersos, mientras el punto de corte se acerque a uno, menor será la cantidad de alelos que sean convertidos a cero. Sin embargo, al realizar las corridas de cada uno de los locus, se determinó que los puntos de corte tendían a uno aumentando significativamente la desviación estándar de los bin, por lo que se decidió correr todos los datos con 0.5, sacrificando algunos alelos. Estos alelos se revisaron manualmente y en algunos casos, fueron aproximados sin usar el programa.

#### H. Análisis genético de las secuencias de microsatélites

A partir del registro de alelos reales en las siete poblaciones de Guatemala y la de México se analizó el polimorfismo de las secuencias de microsatélites por locus y por población de forma simultánea. Se utilizaron dos programas para calcular los indicadores del comportamiento alélico, con GenAlex 5.04: la frecuencia alélica, número efectivo de alelos, heterocigocidad observada, heterocigocidad esperada e índice de fijación. Para comparar el número de heterocigotos esperados y observados se calculó chi cuadrado ( $X^2$ ) y probabilidad

(P) para determinar la existencia del equilibrio Hardy-Weinberg. Con el programa PopGene 1.31 se calculó la distancia e identidad de Nei *unbiased* para establecer si los grupos o poblaciones estaban relacionados entre sí. El índice de fijación total, permitió examinar el nivel de divergencia genética entre subpoblaciones y  $N_m$  para establecer si existía flujo de genes.

En estudios anteriores realizados en vectores (Contreras, 2002), se han hecho análisis de diversidad genética intrarregional, interregional y todas las regiones como una sola población. En este estudio, se realizará un análisis por poblaciones, dado que las muestras amplificadas para cada locus no son las mismas y esto puede llevar a conclusiones erradas. Además, cada locus presentó diferente porcentaje de amplificación, de hecho, algunas poblaciones no amplificaron en absoluto algunos locus.

El Cuadro 16 muestra como cada locus presentó diferente número de alelos. Siendo Chiquimula la población con mayor número de alelos. Además los valores de heterocigosidad observada son significativamente menores que los valores de heterocigosidad esperada. Excepto para Zacapa con el locus TDMS22. Y a pesar de que puede deberse a que las poblaciones muestreadas estén unidas, pero que no se mezclen (Hedrick, 2000), en este caso, es más probable que se deba a un muestreo muy pequeño, demostrando deficiencia de heterocigotos. Esto significa que la mayoría de los grupos son deficientes en heterocigotos.  $N_e$ , el número efectivo de alelos indica cuántos alelos presentan la misma similar. Los datos de TDMS22 coinciden con los datos gráficos presentados anteriormente, ya que es el locus que presenta menores valores del número efectivo de alelos.  $F_i$ , el índice de fijación, es la frecuencia de homocigosidad para un alelo particular, en un locus dado (Contreras, 2002). TDMS4, en Zacapa es el que tiene mayor número de homocigotos, con un valor de 0.808, con una diferencia significativa de heterocigotos esperados y observados.

Otro análisis realizado fue el de Hardy-Weinberg, para determinar si las poblaciones se encontraban en equilibrio. Este es un modelo que sirve como referencia que se caracteriza

por no verse afectado por fuerzas evolutivas, excepto sólo las del proceso de reproducción (Contreras, 2002).

Las características del equilibrio de Hardy-Weinberg son: (1) El organismo debe ser diploide, (2) la reproducción debe ser sexual, (3) las generaciones no deben traslaparse, (4) el gen bajo consideración tiene dos alelos, (5) las frecuencias alélicas son idénticas en machos y hembras, (6) el apareamiento debe ser al azar, (7) el tamaño de la población, teóricamente debe ser infinita, (8) la migración debe ser despreciable, (9) la mutación puede ignorarse, (10) la selección natural no debe afectar a los alelos bajo consideración.

Para evaluar si la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg, se utiliza la probabilidad de la prueba chi-cuadrado  $X^2$ . Ver cuadro 17. Para considerar una población en equilibrio, el valor P debe estar en un rango 0-0.05, debido a que la desviación de valores observados y esperados no se debe únicamente al azar (Hartl and Clark, 1997). Es interesante observar que Jutiapa está en equilibrio con todos los marcadores, mientras que tan sólo Jalapa no están en equilibrio con ningún marcador. A pesar de ser el marcador menos polimórfico, es decir con pocos picos, el TDMS22 es el que muestra más poblaciones en equilibrio. Las poblaciones que no presentan equilibrio con los marcadores ensayados, pueden deberse a que se hayan detectado muchos alelos nulos, categorizándose como alelos nulos u homocigotos, individuos que en realidad eran heterocigotos. Inicialmente se trabajó con 434 muestras, pero para que Hardy-Weinberg sea representativo, deben trabajarse muestras mayores o iguales a 500 individuos (Hartl and Clark, 1997). Debe considerarse además, el porcentaje de alelos nulos que tienden a obtenerse con estos microsatélites, por lo que probablemente debió iniciarse con 750 muestras, en lugar de tan sólo 434.

A continuación en las Figuras 25 a 28, se muestra la diferencia significativa entre heterocigotos esperados y observados de forma gráfica. Mientras más alejados están, menor equilibrio de Hardy-Weinberg representan.

Cuadro 9  
Diversidad genética para cada locus por población  
(GenAlex, 2002)

<b>TDAK49</b>							
Población	N	Na	Ne	I	Ho	He	F
Chiquimula	25	10	6.443	2.024	0.520	0.845	0.384
Jutiapa	13	12	7.682	2.248	0.769	0.870	0.116
AltaVerapaz	6	6	5.538	1.748	0.667	0.819	0.186
BajaVerapaz	13	12	6.259	2.149	0.385	0.840	0.542
SantaRosa	7	5	3.920	1.470	0.429	0.745	0.425
Mexico	4	4	2.286	1.074	0.500	0.563	0.111
<b>TDMS4</b>							
Población	N	Na	Ne	I	Ho	He	F
Zacapa	7	6	3.920	1.574	0.143	0.745	0.808
Jalapa	17	5	1.979	0.964	0.353	0.495	0.287
Chiquimula	20	9	3.980	1.672	0.400	0.749	0.466
Jutiapa	6	4	2.400	1.075	0.333	0.583	0.429
AltaVerapaz	8	8	6.400	1.960	0.250	0.844	0.704
BajaVerapaz	16	4	2.265	0.997	0.313	0.559	0.441
SantaRosa	62	7	2.412	1.193	0.290	0.585	0.504
Mexico	9	6	3.240	1.455	0.444	0.691	0.357
<b>TDMS11</b>							
Población	N	Na	Ne	I	Ho	He	F
Zacapa	10	12	7.143	2.250	0.800	0.860	0.070
Jalapa	15	13	7.031	2.262	0.400	0.858	0.534
Chiquimula	38	25	10.736	2.804	0.553	0.907	0.391
Jutiapa	7	8	6.533	1.970	0.571	0.847	0.325
AltaVerapaz	19	21	8.595	2.652	0.474	0.884	0.464
BajaVerapaz	18	15	10.983	2.541	0.500	0.909	0.450
SantaRosa	24	9	6.472	1.987	0.542	0.845	0.359
<b>TDMS22</b>							
Población	N	Na	Ne	I	Ho	He	F
Zacapa	4	5	4.000	1.494	0.750	0.750	0.000
Jalapa	4	4	3.556	1.321	0.250	0.719	0.652
Chiquimula	10	2	2.000	0.693	0.400	0.500	0.200
Jutiapa	5	2	2.000	0.693	0.200	0.500	0.600
AltaVerapaz	7	3	2.279	0.898	0.143	0.561	0.745
BajaVerapaz	6	3	1.946	0.824	0.333	0.486	0.314
SantaRosa	32	5	3.136	1.291	0.375	0.681	0.449
Mexico	19	6	3.072	1.372	0.526	0.675	0.220

N = número de individuos en la población, Na = número de alelos, Ne = número efectivo de alelos, I = índice de información, Ho = heterocigotos observados, He = heterocigotos esperados, F = índice de fijación.

Figura 24  
Patrón alélico del locus TDAK49 para cada población

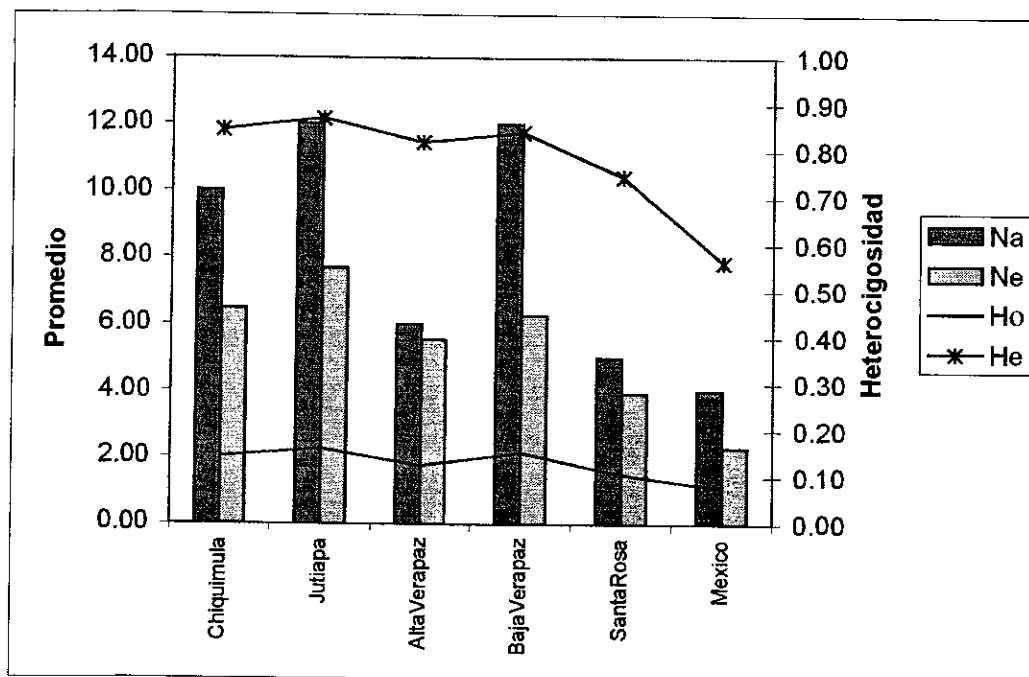


Figura 25  
Patrón alélico del locus TDMS4 para cada población

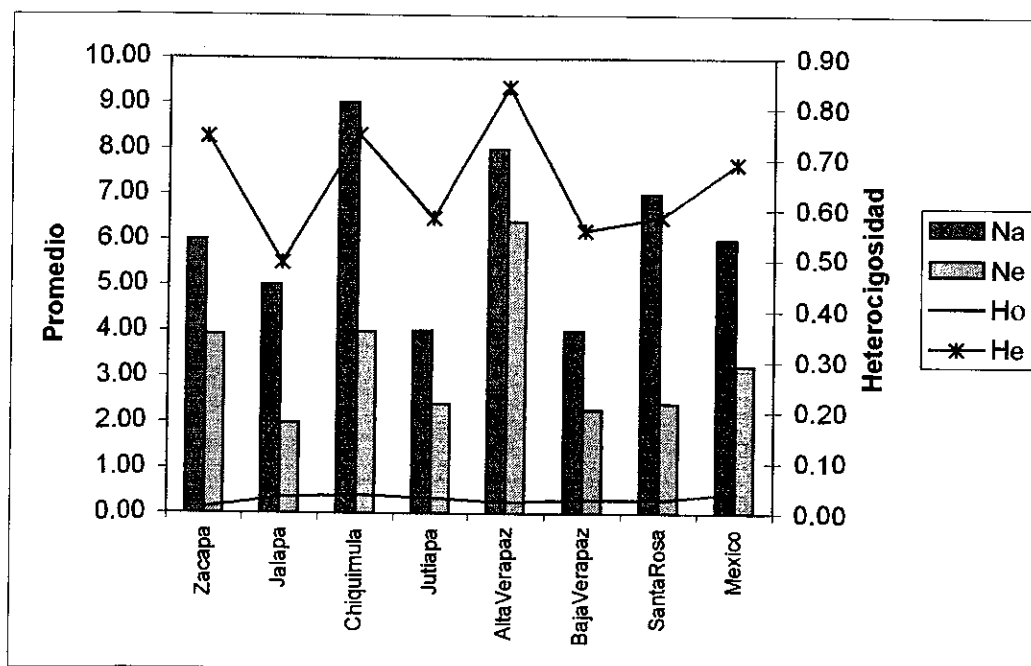


Figura 26  
Patrón alélico del locus TDMS11 para cada población

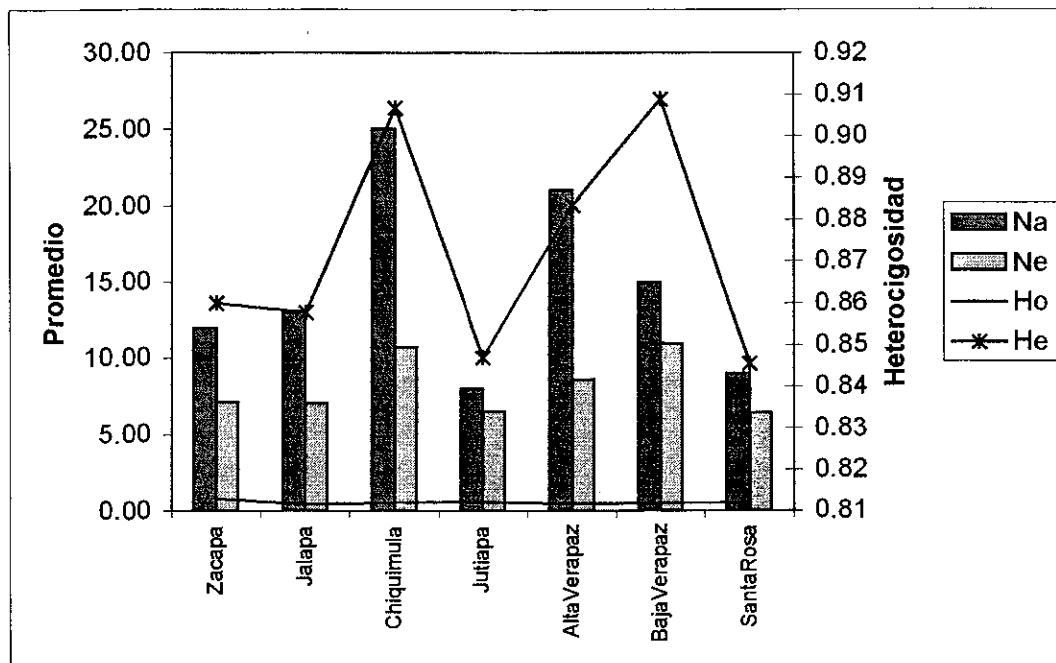
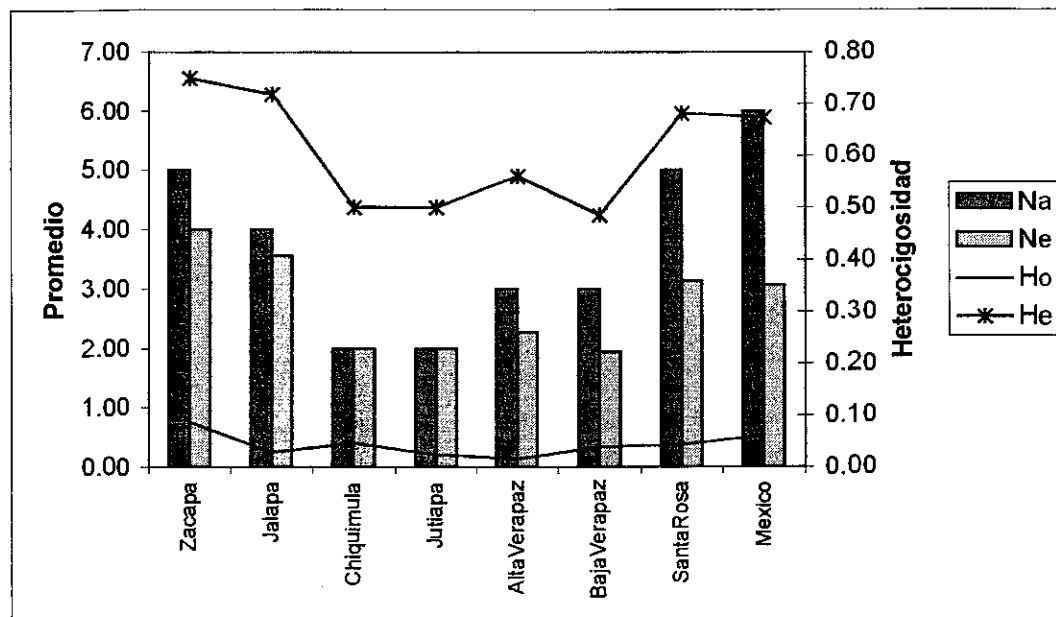


Figura 27  
Patrón alélico del locus TDMS22 para cada población



No pueden calcularse datos promedio para cada población, ya que las muestras amplificadas con los cuatro marcadores no son las mismas y podrían obtenerse resultados no representativos.

Cuadro 10  
Análisis de Hardy-Weinberg para las poblaciones estudiadas con cada uno de los locus (PopGene, 1999)

Microsatélites Valores de P en la prueba de $\chi^2$				
Población	TDAK49	TDMS4	TDMS11	TDMS22
Zacapa	No aplica	0.000004	<b>0.235517</b>	<b>0.440493</b>
Jalapa	No aplica	0.000045	0	0.023014
Chiquimula	0.003090	0	0	<b>0.423711</b>
Jutiapa	<b>0.120779</b>	<b>0.267362</b>	<b>0.057601</b>	<b>0.109599</b>
Alta Verapaz	<b>0.121600</b>	0.00001	0	0.041517
Baja Verapaz	0.000000	0.11251	0	<b>0.386151</b>
Santa Rosa	0.033898	0	0.000289	0.000002
Mexico	<b>0.302747</b>	0.036966	No aplica	<b>0.18407</b>

Para determinar la divergencia entre las ocho poblaciones, se calculó la identidad y distancia genética de Nei. El criterio de este análisis indica que la identidad es igual a uno si las poblaciones son más parecidas. La distancia genética indica que entre más cercano a cero sean los resultados, más relacionadas están las poblaciones entre sí. Por lo tanto, el Cuadro 18 nos demuestra que los grupos más parecidos, para este locus, son Baja Verapaz y México, coincidentemente al valor de la distancia genética, siendo los menores México y Santa Rosa, que también poseen el mayor valor de distancia genética.

Cuadro 11  
Identidad y distancia genética de Nei para las cuatro poblaciones para el locus TDAK49 (PopGene, 1999)

	Chiquimula	Jutiapa	AltaVerapaz	BajaVerapaz	SantaRosa	Mexico
<b>Chiquimula</b>	***	0.606	0.518	0.567	0.237	0.249
<b>Jutiapa</b>	0.501	***	0.293	0.359	0.226	0.141
<b>AltaVerapaz</b>	0.658	1.229	***	0.359	0.499	0.074
<b>BajaVerapaz</b>	0.568	1.024	1.026	***	0.204	0.818
<b>SantaRosa</b>	1.440	1.487	0.695	1.589	***	0.134
<b>Mexico</b>	1.389	1.959	2.602	0.201	2.013	***

Sobre los asteriscos se demuestra la identidad genética.

Bajo los asteriscos se demuestra la distancia genética.

Según el locus TDMS4, las poblaciones más parecidas son Baja Verapaz y Jalapa, con 0.985, seguidas de México-Jalapa y México-Baja Verapaz (que coincide con el anterior marcador). El locus TDMS11 indica las poblaciones más parecidas son Jalapa y Zacapa, el locus TDMS22, indica que son Chiquimula-Jutiapa, seguidas de Santa Rosa, Chiquimula y Jutiapas. Es interesante observar como para este locus, Baja Verapaz, Chiquimula y Jutiapa siguen en parecido, esto puede significar que este locus podría funcionar como marcador del proceso de diversificación, e ilustrarse geográficamente.

Cuadro 12  
Identidad y distancia genética de Nei para las cuatro poblaciones para el locus TDMS4  
(PopGene, 1999)

	Zacapa	Jalapa	Chiquimula	Jutiapa	AltaVerapaz	BajaVerapaz	SantaRosa	Mexico
Zacapa	***	0.860	0.734	0.456	0.246	0.818	0.418	0.834
Jalapa	0.151	***	0.902	0.630	0.321	0.985	0.600	0.960
Chiquimula	0.310	0.103	***	0.831	0.481	0.936	0.821	0.878
Jutiapa	0.784	0.461	0.186	***	0.510	0.729	0.968	0.620
AltaVerapaz	1.403	1.138	0.732	0.673	***	0.387	0.545	0.411
BajaVerapaz	0.201	0.015	0.066	0.317	0.950	***	0.712	0.960
SantaRosa	0.872	0.512	0.198	0.032	0.608	0.340	***	0.607
Mexico	0.181	0.041	0.130	0.479	0.889	0.041	0.499	***

Sobre los asteriscos se demuestra la identidad genética.

Bajo los asteriscos se demuestra la distancia genética.

Cuadro 13  
Identidad y distancia genética de Nei para las cuatro poblaciones para el locus TDMS11  
(PopGene, 1999)

	Zacapa	Jalapa	Chiquimula	Jutiapa	AltaVerapaz	BajaVerapaz	SantaRosa
Zacapa	***	0.839	0.709	0.146	0.217	0.455	0.368
Jalapa	0.176	***	0.694	0.258	0.143	0.521	0.267
Chiquimula	0.344	0.366	***	0.142	0.246	0.361	0.130
Jutiapa	1.922	1.354	1.954	***	0.099	0.454	0.261
AltaVerapaz	1.530	1.943	1.402	2.317	***	0.206	0.209
BajaVerapaz	0.787	0.652	1.018	0.790	1.580	***	0.581
SantaRosa	0.999	1.320	2.038	1.342	1.568	0.544	***

Sobre los asteriscos se demuestra la identidad genética.

Bajo los asteriscos se demuestra la distancia genética.

Cuadro 14  
 Identidad y distancia genética de Nei para las cuatro poblaciones para el locus TDMS22  
 (PopGene, 1999)

	Zacapa	Jalapa	Chiquimula	Jutiapa	AltaVerapaz	BajaVerapaz	SantaRosa	Mexico
Zacapa	***	0.648	0.707	0.707	0.593	0.843	0.713	0.784
Jalapa	0.434	***	0.833	0.833	0.890	0.822	0.907	0.391
Chiquimula	0.347	0.182	***	1.000	0.610	0.904	0.959	0.457
Jutiapa	0.347	0.182	0.000	***	0.610	0.904	0.959	0.457
AltaVerapaz	0.522	0.117	0.494	0.494	***	0.740	0.719	0.308
BajaVerapaz	0.171	0.196	0.101	0.101	0.302	***	0.856	0.542
SantaRosa	0.339	0.098	0.042	0.042	0.330	0.156	***	0.536
Mexico	0.243	0.938	0.784	0.784	1.176	0.613	0.623	***

Sobre los asteriscos se demuestra la identidad genética.

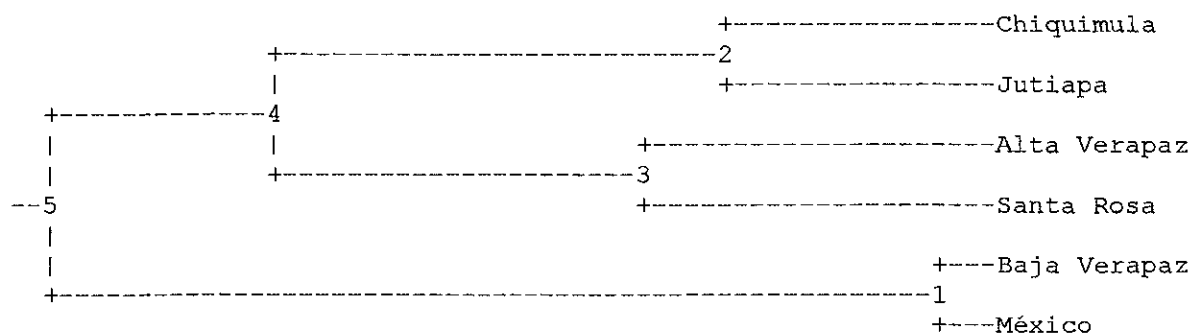
Bajo los asteriscos se demuestra la distancia genética.

Con la distancia genética de Nei, se construyó un dendrograma para cada locus. Lamentablemente los datos no son congruentes, pero debe recordarse que el tamaño de las muestras no es igual, que el porcentaje de amplificación varió, que las muestras que sí amplificaron no fueron las mismas y que se realizaron varias asunciones para realizar este cálculo. Aún así, pueden verse ciertos patrones, de los cuales, el locus TDMS22 muestra mejor relación entre sus datos y las barreras geográficas que existen entre estas poblaciones. Además, para algunos loci, no hubo ningún individuo de cada población que amplificara, de modo que la información puede estar incompleta.

Figura 28

Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para el locus TDAK49

(PopGene, 1999)



La figura 32, representa menor lo que se esperaría obtener de los datos tamizados. Una observación de relevancia, es que México es catalogado como una población independiente. Mientras que las demás poblaciones, no están geográficamente interrumpidas (Fig. 29).

Figura 29

Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para el locus TDMS4  
(PopGene, 1999)

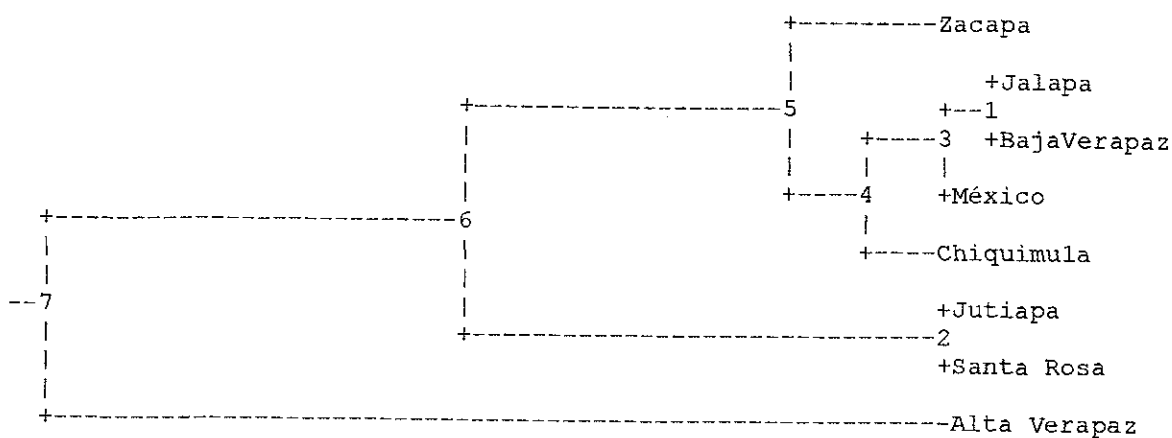


Figura 30

Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para el locus TDMS11  
(PopGene, 1999)

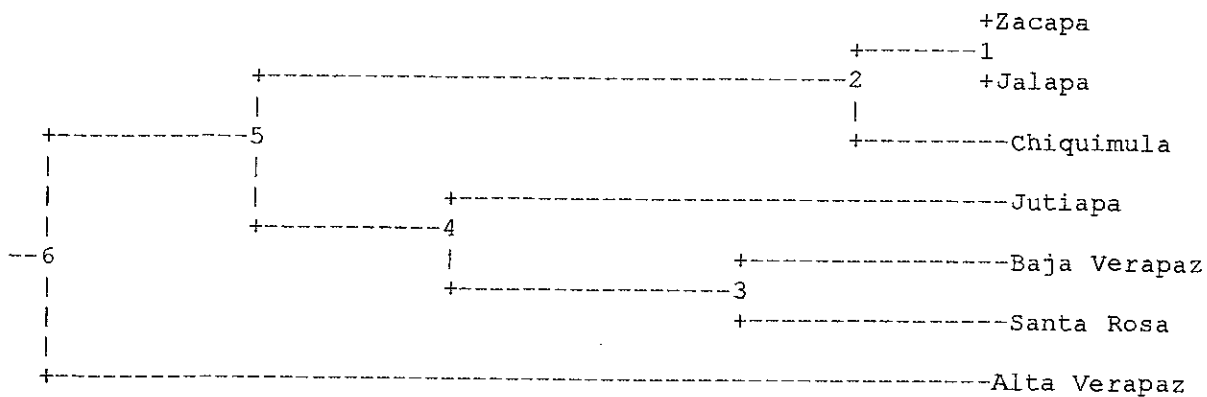
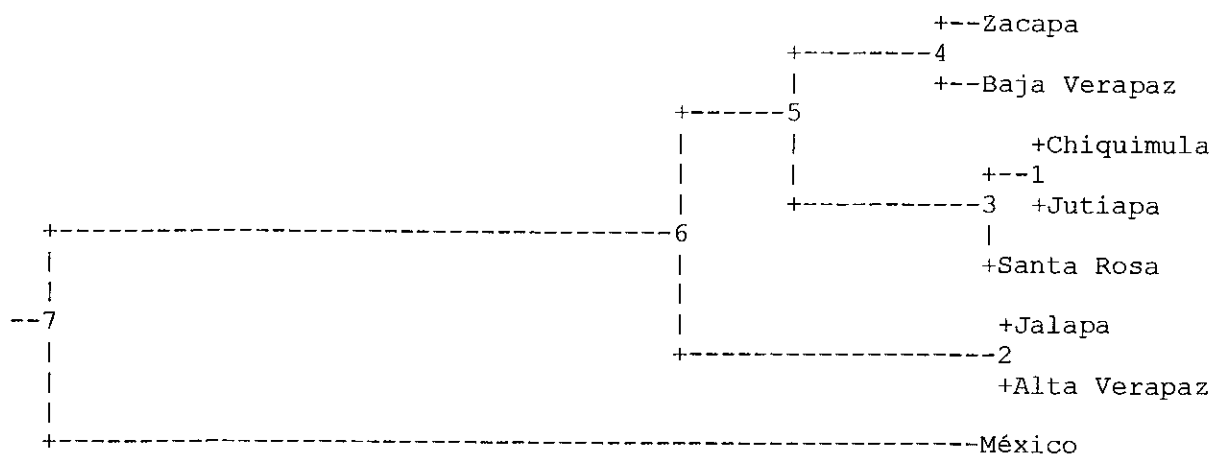


Figura 31  
Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para el locus TDMS22  
(PopGene, 1999)



Las poblaciones Chiquimula y Jutiapa son las más parecidas, Jalapa y Alta Verapaz le siguen en parecido. Chiquimula y Jutiapa a su vez, se parecen a Santa Rosa. Zacapa y Baja Verapaz se parecen también, y México se clasificó como población aislada.

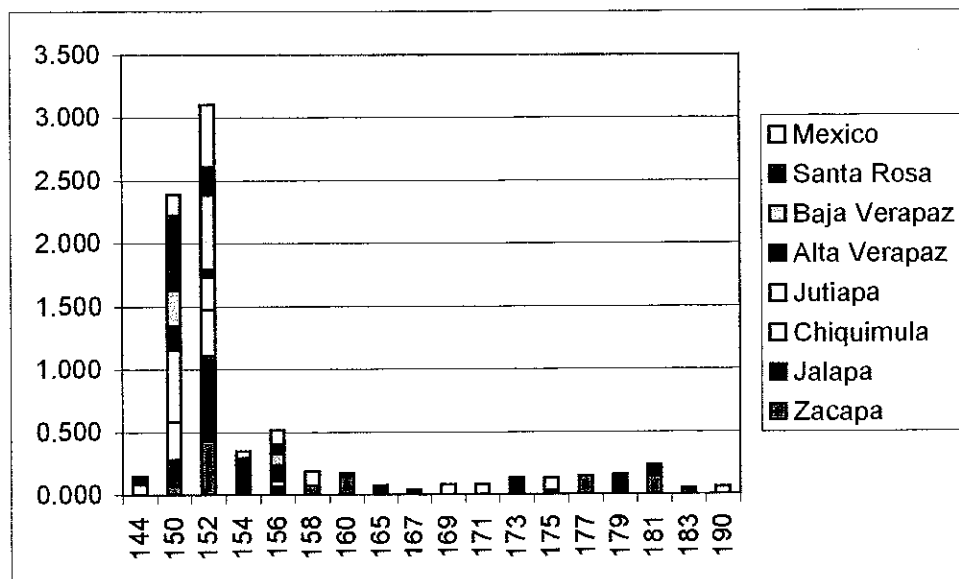
Cuadro 15  
Índice de fijación total y flujo de genes para todos los *loci*  
(PopGene, 1999)

<b>Locus</b>	<b>Fst</b>	<b>Nm</b>
TDK49	0.139	1.5544
TDMS4	0.125	1.7463
TDMS11	0.076	3.0375
TDMS22	0.138	1.5643

La diferenciación genética entre las ocho poblaciones, se calculó el índice de fijación total (Fst) y el flujo de genes (Nm). El Cuadro 16 muestra los resultados de estos cálculos, por locus. Si los valores de Fst caen dentro del rango 0-0.05, significa que existe poca diferenciación genética. Este no es el caso para ninguno de los locus descritos anteriormente, indicando que existe una gran diferenciación entre estas poblaciones. Además, Nm indica valores relativamente pequeños, considerando que el flujo de genes es un indicador del

número absoluto de organismos que migran a cada subpoblacion en cada generación. En promedio, una chinche migra cada generación lo cual indicaría que los grupos aparentemente están aislados y que sí existen barreras geográficas. Sin embargo, se recomienda incrementar el número de individuos a tamizar, ya que estos datos parecieran ser contradictorios.

Figura 32  
Frecuencia alélica en locus TDMS4



En la figura 34 se muestran muchos alelos con poca frecuencia, probablemente debido a un locus que en la actualidad está cambiando a una tasa significativamente mayor que los demás. El locus TDMS11, muestra más alelos que están distribuidos de forma más irregular entre las poblaciones.

La figura 36, muestra la frecuencia alélica del locus TDMS22. Este locus muestra dos alelos distribuidos en todas las poblaciones. Son los de tamaño 99bp y 103bp. Además de estar muy bien distribuidos, presentan frecuencias más altas y pocos alelos, lo que puede ser el mejor marcador molecular dentro de el grupo en estudio.



## I. Creación de base de datos en Microsoft ® Access

Se creó una base de datos denominada EpiTDAK-MS que contiene la información de colecta, extracción de DNA, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa, condiciones de detección y alelos verdaderos. La copia electrónica del diseño se encuentra al final de Anexos.

## J. Comparación de costos y efectividad entre electroforesis capilar y en geles de poliacrilamida

De acuerdo a uno de los objetivos de esta investigación, se realizó el análisis para determinar cuál es el método para correr y detectar microsatélites de mayor efectividad y menor costo. Para esto se condieró el trabajo a realizar manualmente por un técnico en el laboratorio, ventajas instrumentales que cada metodología presenta, riesgos al ejecutor y costo final por muestra. El Cuadro 10 resume las metodologías comparadas: PAGE o por sus siglas en inglés “Polyacrilamide Gel Electrophoresis” y la electroforesis capilar. Los datos presentados para PAGE se detallan según Mills (2001).

En cuanto al volumen de PCR sintetizado, con PAGE se utilizó 25 $\mu$ L de reacción, mientras electroforesis capilar empleó 15 $\mu$ L. Esta aparente diferencia puede modificarse únicamente con utilizar un termociclador que requiera menores volúmenes de reacción. Así que no se considera como un criterio crítico.

La electroforesis capilar necesita sintetizar cebadores fluorescentes para poder realizar la detección, cuyo análisis detallado se realizará más adelante, mientras que los geles de poliacrilamida utilizan cebadores sin marcaje, ya que la detección se realiza con tinción de nitrato de plata.

El tiempo necesario para preparar la gel y los datos que serán corridos en el programa que sea utilizado, en electroforesis capilar, aparentemente toma tiempo. Pero se compensa al comparar el tiempo necesario para preparar y polimerizar geles de poliacrilamida. El tiempo

de preparación de muestras para montaje, es decir la desnaturalización, requiere aproximadamente el mismo tiempo de preparación y montaje para ambas metodologías. En cuanto a la corrida *per se*, además de emplear 1 $\mu$ L comparado a 5 $\mu$ l de PAGE, la electroforesis capilar puede correr entre 188 y 384 muestras en una sola corrida, esto implica que pueden ahorrarse ocho montajes en PAGE. Y aunque la corrida completa en GeneScan tarde 8 horas, al montar con electroforesis capilar pueden ahorrarse 24 horas netas de corridas que pueden ser utilizadas en otras actividades de laboratorio. Si el técnico se organiza bien, pueden llegar a realizarse dos corridas en electroforesis capilar al día, es decir hasta cuatro placas, o sea, hasta 762 muestras si se conocen las condiciones óptimas. Mientras que PAGE permite correr hasta dos placas, es decir 92 muestras como máximo.

En cuanto al sistema de detección, mientras la electroforesis capilar no requiere ninguna preparación especial, además del marcaje fluorescente de los cebadores, PAGE presenta un procedimiento de al menos 90 minutos, en exposición al nitrato de plata. Para PAGE, los resultados finales deben leerse con regla milimétrica, mientras que electroforesis capilar presenta los datos en versión electrónica con una precisión y repetibilidad significativamente mayor. La incertidumbre para PAGE es de  $\pm 0.05$ mm y para electroforesis capilar es de  $\pm 0.5$ bp.

PAGE requiere una hora para analizar 46 muestras, mientras que electroforesis capilar requiere de un día para analizar 40-60 muestras. Sin embargo, el tiempo que se ahorre al realizar este procedimiento en PAGE, si la electroforesis capilar ya se encuentra optimizada puede reducirse significativamente al exportar información y manipular electrónicamente. Además, el tiempo que se ahorre en preparación, montaje y corrida de muestras en electroforesis capilar, puede ser invertido más tarde para analizar los datos generados por el programa de lectura.

Para almacenar la información, PAGE requiere que el técnico prepare un scan de cada placa y guarde la información, que ocupa aproximadamente 2Mb. Para la electroforesis capilar, los datos generados ya están en formato electrónico y pueden ocupar tan sólo 17Kb cuando ya fueron convertidos a formato Excel. Aunque la segunda metodología requiere procesamiento

de información como la visualización de electroferogramas, determinación de patrones de picos y descarte de bandas de desliz, existen y se utilizan programas auxiliares para realizar el análisis de estos datos.

Cuadro 16  
Cuadro comparativo de las metodologías empleadas para análisis de microsatélites.

	PAGE secuenciación	Electroforesis capilar
<b>Amplificación por PCR</b>		
Volumen total de reacción (1 muestra)	25 $\mu$ L	15 $\mu$ L
Taq polimerasa	0.5U	0.5U
Tipo de cebadores	Sin marcaje	Marcaje fluorescente en uno de los cebadores, en el extremo 5'
<b>Tiempo para la preparación del gel y/o del sistema</b>		
Cámara de electroforesis y polimerización en placas	120 minutos	No aplica
Ingreso de datos al sistema	10 minutos (en matrices de formato Excel).	20 min/placa (importando cuadro de formato Excel) o 30 min/placa (ingresando los datos manualmente)
Mantenimiento y limpieza del equipo (semanal)	20 minutos	20 minutos
<b>Preparación de precorrida</b>		
Tiempo	60 minutos	60 minutos
Metodología	(a) Desnaturalización de las muestras. (b) Preparación de placa (ajuste de temperatura, buffer y preparación de la muestra con buffer de montaje.	(a) Preparación de master mix y alicuota del producto de PCR. (b) Desnaturalización 5 minutos 95°C; 1 minuto en hielo
<b>Corrida de muestras</b>		
Volumen de producto de PCR para montaje	5 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Número de muestras que pueden procesarse por corrida	46	188-384
Tiempo de corrida	3 horas	8 horas
Corridas al día	1-2 geles	2-4 placas
<b>Sistema de detección</b>		
Nitrato de plata	Si - 90minutos	No aplica
Fluorescencia	No	Si (No necesita preparación)
Bromuro de etidio	Baja sensibilidad, funcional para agarosa.	No aplica

<b>Lectura del gel / análisis de datos</b>			
	Metodología de medición	Manual con regla milimétrica	Electroferogramas y datos electrónicos
	Incertidumbre de las medidas	±0.5mm	±0.5bp
	Tiempo para el procesamiento de datos (asumiendo que están optimizados).	46muestras/hora	20 muestras/día
<b>Almacenamiento de información</b>			
	Formato de almacén	Imágenes escaneadas en Formato digital (*.bmp)	Electroferogramas
	Espacio en bytes por corrida	2Mb/49muestras	17.5Mb/192muestras de datos brutos de corrida, datos en formato Excel ocupan (aprox.) 20.2Kb/192 muestras.
<b>Generación de desechos</b>			
	Tipo de desecho generado	Geles	Placas (pero pueden almacenarse a 4°C para correr varias veces)
	Volumen de desecho	85mL de gel polimerizado y teñido	1mL de producto de PCR
	Descarte especializado	No	Descarte químico para la formamida
<b>Riesgos a la salud</b>			
	Reactivos y desechos peligrosos	TEMED, APS, acrilamida, bis-acrilamida, nitrato de plata, bromuro de etidio, hidróxido de sodio, ácido bórico, ácido acético glacial, Bind Silane o Sigma Cote, etanol, formaldehído, formamida, persulfato de amonio, tiosulfato de sodio, radiación con luz UV.	HIDI-formamide

La generación de desechos no es una característica crítica entre metodologías. Sin embargo, vale la pena mencionar que mientras PAGE desecha aproximadamente 85mL de gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, electroforesis capilar desecha únicamente 1mL de DNA y formamida, en caso no se desee guardar la preparación para futuras corridas. Además, durante la preparación de gel de poliacrilamida el técnico debe exponerse a una serie de reactivos que son tóxicos, mientras en la electroforesis capilar expone únicamente a 0.8mL de formamida por placa.

El tipo de síntesis para los cebadores es un tema importante de comparación. Aunque PAGE pueda significar una menor inversión en síntesis de cebadores, puede presentar algunas desventajas, que no compensen este ahorro. Si se sintetizan únicamente cebadores sin marcaje, para PAGE, se invertirán \$20 por cebador. Ahora, para sintetizar un cebador con marcaje fluorescente, se invierten \$140, esto es un costo que definitivamente debe considerarse. Anteriormente, se han sintetizado pares cebadores para una serie de locus para detección con electroforesis capilar, así que uno de cada par cebador para un locus dado, debía marcarse. El Cuadro 8 compara los costos de la síntesis de cebadores marcados.

Cuadro 17  
Costo de la síntesis de juegos de cebadores con marcaje fluorescente

		<i>Cebadores tradicionales</i>				
		<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
<i>Cebadores fluorescentes</i>	<i>1</i>	<b>160</b>	180	200	220	240
	<i>2</i>		<b>320</b>	340	360	380
	<i>3</i>			<b>480</b>	500	520
	<i>4</i>				<b>640</b>	660
	<i>5</i>					<b>800</b>

Costos estimados basados en: \$140 marcaje fluorescente y \$20 sin marcaje.

La línea diagonal en negritas muestra el costo que implica sintetizar la mitad de los cebadores con fluorescencia. Como se ha comparado con estudios similares realizados anteriormente (Rivera, 2002; Contreras, 2002). Pero si se sintetiza un marcador fluorescente, por ejemplo, y los demás se sintetizan de forma tradicional, los costos pueden reducirse hasta los valores resaltados con color. Se comprobó que la efectividad del marcaje no se ve afectada de ninguna manera, así que se considera que de tamizar, por lo menos, con dos cebadores marcados con electroforesis capilar se considere emplear el marcaje universal según Schuelke (2002).

A pesar de que PAGE requiere más trabajo en laboratorio, es posible que por tener recursos limitados para la realización de un proyecto, se prefiera esta metodología. En el Cuadro 19 se presenta el listado de reactivos y cantidad necesaria para realizar las corridas. El cálculo se realizó por muestra. Cada muestra es corrida a un costo de \$1.34. Mientras que en el Cuadro 20 se muestran los reactivos y costo por muestra de la electroforesis capilar. Considerando que se esperaría poder diseñar cebadores con distinto marcaje y tamaño de fragmento esperado, lo mejor es correr dos marcadores por placa. Si esto se realiza así, el costo puede ser de \$2.05, siendo de \$4.10 si se realizan independientemente. La diferencia entre metodologías es de \$0.71, que se ven justificados en repetibilidad, incertidumbre, tiempo e incluso contacto de compañías distribuidoras de reactivos.

Cuadro 18  
Costo del análisis de microsátélites utilizando geles de poliacrilamida

Descripción reactivo	Presentación	Precio de reactivo*	Cantidad de reactivo por /corrida	Ratio	Costo por muestra (\$)
ácido acético	2500 mL	Q 220.20	40.00mL	62.50	\$ 0.44
ácido bórico	500 g	Q 248.33	8.25g	60.61	\$ 0.51
acrilamida 99.9%	500 g	Q 1,705.25	0.11g	4680.70	\$ 0.05
alconox 2%	1816 g	Q 161.14	3.00g	605.33	\$ 0.03
APS	100000 mg	Q 232.16	31.20mg	3205.13	\$ 0.01
Bind Silane	25000 uL	Q 672.00	5.00uL	5000.00	\$ 0.02
bis-acrilamida	5 g	Q 203.38	0.26g	19.33	\$ 1.31
carbonato de sodio anhidro	500 g	Q 165.83	60.00g	8.33	\$ 2.49
dodecil sulfato de sodio	1000 g	Q 1,706.40	8.66g	115.47	\$ 1.85
etanol absoluto	2500 mL	Q 198.66	538.00mL	4.65	\$ 5.34
filtros Walthmann # 1	100 U	Q 240.00	2.00U	50.00	\$ 0.60
formaldehído 37%	1000 mL	Q 103.13	16.00mL	62.50	\$ 0.21
hidroxido de sodio	1000 g	Q 150.00	181.00g	5.52	\$ 3.39
nitrate de plata	25 g	Q 331.49	3.00g	8.33	\$ 4.97
persulfato de amonio	10000 mg	Q 187.73	31.20mg	320.51	\$ 0.07
Sigmacote	100 mL	Q 376.00	2.00mL	50.00	\$ 0.94
TEMED	50000 uL	Q 578.85	107.00uL	467.29	\$ 0.15
tiosulfato de sodio*5H <sub>2</sub> O	500 g	Q 160.49	0.004g	125000.00	\$ 0.00
Trizma	500 g	Q 1,603.36	16.20g	30.86	\$ 6.49
urea	1000 g	Q 432.00	42.00g	23.81	\$ 2.27
Costo por corrida:					\$ 31.15
Costo por muestra :					\$ 1.34

\*Tasa de cambio: Q.8.00 por \$1.00.

Cuadro 19  
Costo del análisis de microsatélites utilizando electroforesis capilar

<i>Descripción de reactivos</i>	<i>Razón de rendimiento por muestra</i>	<i>Costo reactivo</i>	<i>Costo por muestra</i>
HIDI-formamide	5882.35	\$28.00	\$0.00
ROX (reacciones)	1600	\$315.00	\$0.20
Placas Gene Scan (20/paquete)	3840	\$79.35	\$0.02
Septas (20/paquete)	3840	\$122.00	\$0.03
Polimero POP-4 (7mL)	0.00390625	\$305.00	\$1.19
Buffer 10X	0.0065104	\$66.00	\$0.43
Capilares arreglo 22-cm (16 corridas)	3200	\$565.00	\$0.18
<b>Costo por muestra:</b>			<b>\$2.05</b>

## VII. CONCLUSIONES

- La riqueza relativa de secuencias repetitivas de dinucleótidos en *T. dimidiata*, sugiere la abundancia de éstos en el genoma, ya que la elución de tetranucleótidos no funcionó durante el enriquecimiento. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de haber preparado eluciones enriquecidas bajo condiciones muy astringentes.
- A partir de la secuencia de 95 clones, se identificaron sin repeticiones. Se diseñaron cebadores a 17 loci (llamados "TDAK"), de los cuales nueve se ensayaron y cinco están optimizadas para tamizar poblaciones naturales.
- Se optimizaron las condiciones de reacción en cadena de la polimerasa para los locus TDAK4, TDAK17, TDAK49, TDAK68 y TDAK83, solamente se tamizó el TDAK49 y las demás deben ser ensayadas en poblaciones naturales.
- Los locus TDAK49, TDMS4, TDMS11 y TDMS22 presentaron un porcentaje de amplificación positiva promedio del 40%, tan baja tasa de amplificación puede indicar mutaciones en sitios de hibridación de los cebadores. Para futuros ensayos el tamaño de la muestra se incrementa para evitar pérdidas de representatividad estadística. Todos los locus estudiados ensayados presentaron entre 5 y 38 alelos lo cual indica que son polimórficos.
- El polimorfismo en cada población depende del locus, siendo el TDMS11 el más polimórfico.
- Se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg para los cuatro locus. Sin embargo, para los demás locus, los tamaños de muestra son inferiores a 500 individuos como para ser contados como representativos estadísticamente.
- Distancia e identidad genética de Nei de cada locus no coinciden entre sí. Para poder comparar todos los microsatélites, debe procurarse un tamaño de muestra más grande y/o trabajar con las muestras que funcionaron con la mayoría de loci.

- A pesar de que los dendrogramas no coinciden entre sí, el que concuerda con los resultados que se esperarían basados en características geográficas es el locus TDMS22.
- El índice de fijación total ( $F_{st}$ ) superior a 0.05 para todas las poblaciones indica que sí existe un alto grado de diferenciación genética para todos los loci.
- El flujo genético ( $Nm$ ) indica que en promedio un individuo migra a cada subpoblación en cada generación. Según este indicador, geográficamente las poblaciones se encuentran relativamente aisladas.
- Para el locus TDAK49 los alelos 171 y 173 son los más compartidos por todas las poblaciones, siendo el alelo 173 el más frecuente.
- Para el locus TDMS4 los alelos 150 y 152 son los más compartidos por todas las poblaciones, siendo el alelo 152 el más frecuente.
- Para el locus TDMS11 los alelos que se identificaron más alelos que están distribuidos de forma irregular entre las poblaciones, siendo el alelo 172 el más frecuente.
- Para el locus TDMS22 los alelos 99 y 103 son los más compartidos por todas las poblaciones, siendo el alelo 103 el más frecuente.
- El método de marcaje fluorescente se realizó con el uso de tres cebadores universales que permiten utilizar los mismos cebadores para amplificar y correr en geles de poliacrilamida y electroforesis capilar.
- Marcar cebadores universales es significativamente más barato que marcar uno de cada par de cebadores por locus con fluorescencia.
- El Taq extender como aditivo para reducir la formación de bandas de desliz o “stutter bands” se demostró efectivo para dos de cinco casos. Mientras los demás fueron optimizados sin aditivo ni problemas. La formación de bandas de desliz puede ser controlada manipulando la concentración de DNA templado además de manipular.
- El costo de correr una muestra con PAGE es de \$1.34, mientras que correr con electroforesis capilar es desde \$1.03, corriendo tres muestras a la vez.

- Las ventajas que la electroforesis capilar respecto a PAGE son: corridas de preparación más sencilla, mayor procesividad de muestras, incertidumbre de  $\pm 0.05\text{bp}$ , alta repetibilidad, uso de menor número de reactivo peligrosos, menor volumen de desechos generados, procesamiento de información electrónica y la posibilidad de automatizar corridas de rutina.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda determinar mapear los microsatélites en los cromosomas utilizando la técnica de “Fluorescent in situ Hybridization o FISH”, por sus siglas en inglés, que permitan determinar si existe más de dos copias de cada locus, y si alguno está ligado a cromosomas sexuales.
- Si se observa que la recuperación de DNA durante la extracción es muy bajo, puede utilizarse glucógeno de ostra para favorecer la recuperación.
- Para el marcador TDAK49 se recomienda repetir PCRs de las muestras que no funcionaron y montar en diferente orden, para descartar la posibilidad de resultados desviados por funcionamiento dispar del termociclador y/o aparato de electroforesis capilar.
- Implementar un programa de procedimientos operativos estándar que permitan monitorear el funcionamiento de los aparatos más críticos para el estudio como los termocicladores.
- Aumentar aproximadamente en un 50% el número de muestra a ser tamizado con cada *locus*. Así, en caso ocurran pérdidas de datos por individuos que presentan alelos nulos, el estudio no pierda significancia estadística.
- Continuar la evaluación del uso de Taq extender ya que en algunos casos se observan picos de amplificación inespecífica, en lugar de mejorar la amplificación.
- Si se utiliza como control positivo clones, dado que el plásmido que contienen las bacterias es de alto número de copias, se recomienda diluir más ya que puede ocurrir amplificación inespecífica por exceso de DNA.
- Correr más de una muestra por pozo en electroforesis capilar de modo que se procesen más muestras por corrida, se analicen juntas y se reduzca la cantidad de reactivos y materiales por corrida.
- Usar con cebadores universales como marcaje fluorescente ya que demostró ser efectiva y más barata que el marcaje de uno de los cebadores por par en un *locus*.

- Manipular la información electrónicamente es más efectivo que lectura y copia manual porque evita introducir errores de copiado. Además, si se prevee ir actualizando una base de datos, se evita la tarea de digitar información que ya existe electrónicamente.

## IX. FUENTES CITADAS

### A. Literatura citada

- Acevedo, F., Godoy, E., Schofield, C. (2000) *Comparison of Intervention Strategies for control of Triatoma dimidiata in Nicaragua*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Brazil. Vol 95(6); 867-871pp.
- Anderson, J., Lai, J., Dotson, E., Cordon-Rosales, C., Ponce, C., Norris, D., Beard, B. (2002). *Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector Triatoma dimidiata*. Infection, Genetics and Evolution 1; 243-248pp.
- Armour, J., Alonso Alegre, S., Miles, S., Williams, L., Badge, R. (1999) *Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA*. In Goldstein, D., Schlotterer, E. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press. USA. 352pp.
- Benson, G. (1999). *Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences*. Nucleic Acids Res. 27:2. 573-80.
- Brown, T. A. 2000. *Gene cloning: an introduction*. 3<sup>rd</sup> ed. Stanley Thornes. United Kingdom. 334pp.
- Castillo, L.A. (2002). *Análisis de variabilidad génica de Trypanosoma cruzi aislado de triatominos de cinco áreas endémicas de Guatemala*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Chambers, G., MacAvoy E. (2000) *Microsatellites: Consensus and Controversy*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B 126; 455-476pp.
- Contreras, C. (2003). *Estructura microgeográfica de poblaciones de Anopheles albimanus en Guatemala utilizando ADN microsatélite*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Dorn, P., Melgar, S., Rouzier, V., Gutierrez, A., Combe, C., Rosales, R., Rodas, A., Kott, S., Salvia, D., Monroy, C. (2003) Journal of Medical Entomology. Vol 40(4); 436-40.
- Dotson, E. M. and Beard, C. B. (2001). *Sequence and organization of the mitochondrial*

- genome of the Chagas disease vector, Triatoma dimidiata*. Insect Mol Biol. 10(3): 205-15.
- Dujardin, J.P., Schofield, C. J. and Panzera, F. (2002). *Los Vectores de la Enfermedad de Chagas. Investigaciones taxonomicas, biologicas y geneticas*. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Classe des Sciences naturelles et médicales. Traducción al español.
- Dumonteil, E., Gourbière, S., Barrera-Pérez, M., Rodriguez-Félix, E., Ruiz-Piña, H., Baños-Lopez, O., Ramirez-Sierra, M., Menu, F., Rabinovich, J. (2002). *Geographic distribution of Triatoma dimidiata and transmission dynamics of Trypanosoma cruzi in the Yucatán Peninsula of Mexico*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol 67(2); 176-183pp.
- Goldstein, D. and Schlötterer, C. (1999). *Microsatellites Evolution and Applications*. Great Britain. Oxford University Press. 352pp
- Hancock, J. (1999) *Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms*. In Goldstein, D., Schlötterer, E. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press. USA. 352pp.
- Hamilton, M., Pincus, E., DiFiore, A., Fleischer, R. (2000). *Universal Linker and Ligation Procedures for Construction of Genomic DNA Libraries Enriched for Microsatellites*. Biotechniques 27; 500-507pp.
- Hartl, D. (1980). *Principles in Population Genetics*. Sinauer Associates. USA. 488pp.
- Hartl, D. and Clark A. (1997) *Principles of Population Genetics*. 3<sup>rd</sup> ed. USA. 481pp.
- Hendrick, P. (2000) *Genetics of Populations*. 2<sup>nd</sup> ed. Jones & Bartlett Publishers. USA. 553pp.
- Jarne, P., Lagoda, J. (1996). *Microsatellites, from Molecules to Populations and Back*. Trends in Evolution and Ecology. Vol 11(10); 425-529pp.
- Kollien, A., Schaub, G. (2000) *The Development of Trypanosoma cruzi in Triatominae*. Parasitology Today. Vol 16(9); 381-387pp.
- Macedo, A.M., Oliveira, R.P., Pena, S.D. (2002). *Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis*. Expert Rev Mol Med. Mar 5: 1-16.
- Miles, M. Feliciangeli, D., Rojas de Arias, A. (2003). *American trypanosomiasis*

- (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies.* BMJ. Vol. 326; 1444-1448pp.
- Mills, K. (2001). *Estudio de la variabilidad genética de poblaciones de Anopheles albimanus de América Latina, mediante el uso de secuencias microsatélites como marcadores moleculares.* Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M., Rosales, R., Tabaru, Y. (2003) *Epidemiology of Chagas Disease in Guatemala: Infection Rate of Triatoma dimidiata, Triatoma nitida and Rhodnius prolixus (Hemiptera, Reduviidae) with Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli (Kinetoplastida, Trypanosomatidae).* Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Vol. 98(3); 305-310.
- Montenegro, V., Jiménez, M., Pinto Dias, J., Zeledón, R. (2002) *Chagas Disease in Dogs from Endemic Areas of Costa Rica.* Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Vol 97(4); 491-494pp.
- Nakagawa, J., Cordon-Rosales, C., Juárez, J., Itzep, C., Nonami, T. (2003) *Impact of Residual Spraying on Rhodnius prolixus and Triatoma dimidiata in the Department of Zacapa in Guatemala.* Memorias Instituto Oswaldo Cruz, Vol.98(2); 277-282.
- Organización Panamericana de la Salud. (2002). *Taller para el Establecimiento de Pautas Técnicas en el Control de Triatoma dimidiata.* Iniciativa de Centroamérica y Belice para la Interrupción de la Transmisión Vectorial de la Enfermedad de Chagas por Rhodnius prolixus, Disminución de la Infestación intradomiciliaria por Triatoma dimidiata y la Eliminación de la Transmisión Transfusional de Trypanosoma cruzi. El Salvador. 36pp.
- Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. *Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas: Conclusiones de una consulta técnica.* Fundación Oswaldo Cruz. Brasil. 1998. 32pp.
- Paetkau, D. (1999) *Microsatellites Obtained Using Strand Extension: An Enrichment Protocol.* Biotechniques 26; 691-697pp.
- Paekal, R. and P. E. Smouse. (2002) **Genetica Analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research.** Canberra, Australia. Australian National University. GenAlex V 5.0

- Queller, D., Strassmann, J., Hughes, C. (1993) *Microsatellites and Kinship*. Trends in Ecology and Evolution. Vol 8; 285-288pp.
- Rivera, P. (2003). *Identificación y caracterización de microsatélites polimórficos en Trypanosoma cruzi*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Roberts, R. (1986). *Infectious diseases: pathogenesis, diagnosis and therapy*. Year Book Medical Publishers. USA. 402pp.
- Rodriguez, F. (2002). *Population genetics of the malaria vector the mosquito Anopheles albimanus, based on microsatellite DNA as molecular markers, in Latin America and the Caribbean*. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Rychlik, W., Spencer, W.J. and Rhoads, R.E. (1990). *Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro*. Nucleic Acids Res. 18(21): 6409-12.
- Schuelke, M. (2000) *An Economic Method for the Fluorescent Labeling of PCR Fragments*. Nature Biotechnology, Vol 18(2); 233-234pp.
- Sunnucks, P. (2000) *Efficient genetic markers for population biology*. Trends in Ecology and Evolution. Vol 15; 199-203pp.
- Tabaru, Y., Monroy, C., Rodas, A., Mejía, J., Rosales, R. (1999). *The geographical distribution of vectors of Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala*. Medical and Entomological Zoology. Vol 50 (1); 9-17pp.
- Zeledón, R. (1981). *El Triatoma dimidiata (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas*. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. 164pp.
- Zeledón, R. (2001). *Evidence of colonization of Man-made Ecotopes by Triatoma dimidiata (Latreille, 1811) in Costa Rica*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol 96(5); 659-660pp.
- Zeledón, R. (2002). *Aspectos ecológicos y de control del Triatoma dimidiata (Latreille, 1811) in Taller para el Establecimiento de Pautas Técnicas en el Control de Triatoma dimidiata*. Iniciativa de Centroamérica y Belice para la Interrupción de la Transmisión Vectorial de la Enfermedad de Chagas por *Rhodnius prolixus*, Disminución de la Infestación intradomiciliaria por *Triatoma dimidiata* y la Eliminación de la Transmisión Transfusional de *Trypanosoma cruzi*. Organización Panamericana de la Salud. El Salvador. 36pp.

## B. Internet

- Beard, C., Pye, G., Steurer, F., Rodriguez, R., Campman, R., Townsend Peterson, A., Ramsey, J., Wirtz, R., Robinson, L. (2003) *Chagas Disease in a Domestic Transmission Cycle in Southern Texas, USA*. Vol 9(1) [www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no1/02-0217-G4.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no1/02-0217-G4.htm)
- Bickel, L., Bowling, A., Murray, J., Michelmore, R., Bowen-Pidgeon, D., Millon, L. (1993) *Identificación of syntenic groups in the horse using RAPD markers and a somatic cell hybrid panel*. In Proceeding, 8th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene Mapping. <http://www.vgl.ucdavis.edu/~lvmillon/rapd.html>
- Center for Disease Control and Prevention, CDC. 2003a. *Chagas disease fact sheet*. [http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/factsht\\_chagas\\_disease.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/factsht_chagas_disease.htm)
- Christensen, K. (2002). *Population Genetics*. [http://www.kursus.kvl.dk/shares/vetgen/\\_Popgen/genetics/genetik.htm](http://www.kursus.kvl.dk/shares/vetgen/_Popgen/genetics/genetik.htm)
- Dujardin, J., Panzera, F., Schofield, C. *Triatominae: estructura poblacional y estudios de reinfestación*. CETIFAC. Bioingeniería UNER. Actualizacion Agosto 2002. [www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c001/duja.htm](http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c001/duja.htm)
- Georges, M., Coppieters, W. (2000a) *Introductory Course to QTL mapping in Outbred Half-Sib Pedigrees*. <http://cgil.uoguelph.ca/QTL/PhenotypicMarkers.htm>
- Georges, M., Coppieters, W. (2000b). *Introductory Course to QTL mapping in Outbred Half-Sib Pedigrees*. <http://cgil.uoguelph.ca/QTL/GeneticMarkerDefinition.htm>
- Glenn, T. and Schable, M. (2002) *Microsatellite Isolation with Dynabeads 2002* ©. [www.uga.edu/srel/DNA\\_Lab/Msat\\_Easy\\_Isolation\\_2000.rtf](http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/Msat_Easy_Isolation_2000.rtf).
- Hedgecock, D. *Population Genetics of Marine Organisms*. <http://www.usglobec.org/news/news6/news6.hedgecock.html>
- Hill, W. (2004) *RFLPs*. <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/rflp.html>
- INGEBI. (2001). Molecular biology of Chagas disease laboratory. (Last revised: Enero 2002), last update: 2001. <http://Therion.dna.uba.ar/labchagas/espaniol.htm>

- INVITROGEN. 1998. *Effect of Glycogen on PCR and RT-PCR*. In The Help Box from Your Technical Support & Training Team. Focus (1998); Vol 20(2); pp.37. [www.invitrogen.co.jp/focus/202037.pdf](http://www.invitrogen.co.jp/focus/202037.pdf)
- Melcher, U. (2003) *Allozymes* In Molecular Genetics. <http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11123.html>
- NIU Bioinformatics and Genomics Center. *Two dimensional ordination of genetic similarity matrix*. Revised February 2004. Last updated June 2003. <http://biolinx.bios.niu.edu/t80maj1/mds.htm>
- U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health. National Center for Biotechnology Information. [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=13249](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=13249)
- Pinto, J. *Epidemiology of Chagas Disease*. 2002. [www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html](http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html)
- Salvi, R. (2002). *How to prepare Molecular Biology grade glycogen*. [www.protocol-online.org/protocols/Glycogen.htm](http://www.protocol-online.org/protocols/Glycogen.htm)
- Segura, E., Manfredi, C., Fichera, L., García, B. (2002) *Variabilidad genética de poblaciones naturales de T. infestans provenientes de áreas tratadas y no tratadas con insecticidas*. [www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c004/segura.htm](http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c004/segura.htm)
- Van Treuren, R. (2000a) *Characteristics of genetic markers*. [www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/charctrs.htm](http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/charctrs.htm)  
In About "CGN molecular markers" [www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/right.htm#top](http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/right.htm#top)
- Van Treuren, R. (2000b) *Microsatellites*. <http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/mcrosats.htm>  
In About "CGN molecular markers" [www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/right.htm#top](http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/right.htm#top)
- Van Treuren, R. (2000) *Allozymes*. In "CGN molecular markers" <http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/allozyms.htm>
- World Health Organization. (1997). *Vector Control-Methods for Use by Individuals & Communities*. [www.who.int/water\\_sanitation\\_health/resources/en/vector210to222.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/en/vector210to222.pdf),

[www.who.int/docstore/water\\_sanitation\\_health/vectcontrol/ch03.htm](http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/vectcontrol/ch03.htm)

World Health Organization (2004a). *Chagas disease*.

<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf>

World Health Organization (2004b). Geographical distribution: Chagas disease.

<http://www.who.int/ctd/chagas/geo.htm>

Yeh, F., Rong-cai, Y. and Tim Boyle (1999). *PopGen version 1.31*. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>



desnaturalización a 95°C, por 5 minutos, se capturaron las perlas unidas a la sonda marcada con biotina y se precipitaron los fragmentos de DNA, ricos en microsatélites, presentes en el sobrenadante, mediante la precipitación con acetato de sodio y etanol. El DNA genómico del parásito se enriqueció utilizando tres tipos de mezclas de oligonucleótidos, denominadas “enriched elution” 2, 3 y 4. Cada una correspondió a las mezclas de oligonucleótidos indicadas en el Cuadro 6.

Cuadro 20

Oligonucleótidos empleados para el enriquecimiento de DNA genómico de *T. dimidiata*  
(Schable, Comunicación personal 2003)

Secuencia número ("Oligomix")	Mezcla	Concentración (µM)	Volumen (µL)
2	(TG) <sub>12</sub> (AG) <sub>12</sub> (AAG) <sub>8</sub> (ATC) <sub>8</sub> (AAC) <sub>8</sub> (AAT) <sub>12</sub> (ACT) <sub>12</sub>	100	200
3	(AAAC) <sub>6</sub> (AAAG) <sub>6</sub> (AATC) <sub>6</sub> (AATG) <sub>6</sub> (ACCT) <sub>6</sub> (ACAG) <sub>6</sub> (ACTC) <sub>6</sub> (ACTG) <sub>6</sub>	100	150
4	(AAAT) <sub>8</sub> (AACT) <sub>8</sub> (AAGT) <sub>8</sub> (ACAT) <sub>8</sub> (AGAT) <sub>8</sub>	100	200

B. Amplificación de fragmentos de DNA de *Triatoma dimidiata*, ricos en microsatélites, mediante reacción en cadena de la polimerasa

Las eluciones se resuspendieron en 23µL de 10mM Tris-HCl pH 8.0. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con los cebadores Super SNX bajo las siguientes

condiciones: 2.5µL 10X buffer para *Taq* polimerasa (Promega, Cat # ), con 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µL de albúmina bovina sérica, 1.5µL de dNTPs a 2.5mM, 1.3µL Super SNX, 2.0µL 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2µL de *Taq* polimerasa (Promega) 2.0µL de DNA a un volumen final de 25µL. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 2 minutos a 95°C; 25 ciclos de: 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 1.5 minutos a 72°C; 30 minutos a 72°C y tiempo de espera a 4°C. Los productos se corrieron en gel de agarosa 1% con buffer TBE.

#### C. Purificación del producto de PCR

Se utilizaron las columnas de purificación de PCR Amicon ® Microcon-PCR centrifugal filter devices (Micon Bioseparations Millipore) y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Cada muestra se resuspendió en 20µL de buffer TE.

#### D. Ligación y transformación de fragmentos con microsátélites a células competentes

La ligación se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del vector (Promega, Cat# A1360) pGEM-T® Easy Vector, a una razón de 3:1 de producto a vector, en un volumen final de 10µL. 4µL de la mezcla de ligación se agregaron a 50µL de células competentes JM109 (Stratagene, Cat# 200235) y se reposaron en hielo por 20 minutos. Se realizó choque térmico por 50 segundos a 42°C, se dejó en hielo por 2 minutos y se incubó en 600µL de medio isotónico SOC a 37°C con agitación suave por aproximadamente 1 hora. Se plaqueó en medio LB con ampicilina y X-gal a 37°C toda la noche.

#### E. Tamizaje de colonias transformadas

A partir de las células transformadas que crecieron en las placas, se seleccionaron todas las que parecían poseer un inserto, se cultivaron en medio LB sólido con ampicilina 75mg/mL y X-gal a 75mg/mL. Se realizó otro tamizaje mediante la reacción en cadena

de la polimerasa para distinguir aquellas colonias transformadas con el vector que contenían el inserto de las que no lo poseían utilizando los cebadores M13 en el termociclador iCycler (BioRad) con el siguiente programa: 5min a 94°C; 30 ciclos de: 30s a 94°C, 30s a 47°C y 1min a 72°C; 10min a 72°C y hold a 4°C..

Al finalizar el programa los productos de PCR obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 2% en 1X TBE y la detección se realizó tñiendo el gel en bromuro de etidio con visualización bajo luz UV.

#### F. Reacción de secuenciación para los fragmentos con microsatélites

Esta metodología está adecuada para realizar secuenciación automatizada. Se realizan dos “master mixes” para dos reacciones por muestra purificada, una con el cebador “forward” (M13F universal 5´-GTTTTCCCAGTCACGAC-3´) y otra con el cebador “reverse” (M13R universal 5´-ATGACCATGATTACGCC-3´). Para cada reacción se preparó un volumen final de 20µL de: 2µL Terminator Ready Reaction Mix, 6µL de buffer de secuenciación, 10mM de cebador y se aforó con agua. Las condiciones de reacción fueron: 25 ciclos de: 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C y tiempo de espera a 4°C en el termociclador Perkin Elmer 9600 Thermal Cycler. Se purificaron los productos de estas reacciones como se detalla en la sección “C. Purificación del producto de PCR” anteriormente detallada.

#### G. Secuenciación de colonias positivas

La secuenciación se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Enfermedades Parasitarias (por sus siglas en inglés “DPD”) del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés “CDC”) en el secuenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

#### H. Amplificación de fragmentos de DNA ricos en microsatélites por reacción en cadena de la polimerasa

Las tres soluciones de DNA, enriquecidas con microsatélites se resuspendieron en 23 $\mu$ L de agua, doblemente destilada, durante toda la noche, a 4°C y se amplificaron mediante una reacción en cadena de la polimerasa. El volumen final de la reacción fue de 50 $\mu$ L. Las condiciones de la reacción fueron: 0.1 $\mu$ L de solución enriquecida/ $\mu$ L volumen final de reacción ó 0.05 $\mu$ L de solución enriquecida/ $\mu$ L de volumen final de reacción; *Taq* buffer 1X de Promega (Cat # M1882 ). Las concentraciones finales son de: 10mM Tris-HCl pH 9, 50mM KCl, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100; MgCl<sub>2</sub> a 2.0mM, deoxinucleótidos a 0.15mM cada uno, el cebador Super SNX 24 a 0.5 $\mu$ M y *Taq* polimerasa a 0.03U/ $\mu$ L. Consistió en desnaturalización inicial rápida a 95°C.}

#### I. Secuencia de clones positivos por PCR

A continuación se presentan las secuencias de los 95 clones secuenciados. La nomenclatura se realizó de la siguiente forma:

Ejemplo: Tdimid1 m13fr; 398bp

Tdimid1= Clon número uno de *Triatoma dimidiata*

M13= Amplificación por PCR usando cebadores M13

F= Secuencia forward

R= Secuencia reverse

FR= Consenso de secuencias forward y reverse

398bp= Tamaño del fragmento en pares de bases

**Secuencia resaltada**= Cebadores M13F y R.

**Secuencia enmarcada**= Microsatélite

**Secuencia en negritas**= Cebadores diseñados





Tdimid23 m13rf; 210bp.

CGGGAWAGNGATTGKTAAGGCCCTAGMTAGCAGAATCACTCCGGTGGACGGATTTTGTCCAAATACTTCCG  
TGTCATGTGCGGTGACACAACCTTAAACGGAGTTTAAACCTTGGGATTCGATTTCTCGTTTTGTTAGACAT  
TTTGTCTCTGTGTNTCTCTCTCACACACACACACACACGCACACAAAAATCTCTAAAAACSTGTGT

Tdimid24 m13f; 532bp.

CATTGTTTAAGGCCCTAGCTAGCAAAAATCCGTTCTCTACTTTGATGGAGGTTAAGCTTGTTTTACATACAA  
TGGGCTGGTGATCCCATTTCTGAAACAAATCCACTTCTGGTTGGCAATCACGTTAAAGGCAACTTTAAAA  
AAATTCATGATTCCCTTATACAGAAACGACTTCCCTAGTCTTACTGCTTGTTTTCCCTAAATAACTACTCCAGA  
GCCATGAGTCTCTCGACAACCTACATCAATATGCCGCCCTTATATATTCAAAATATGGTTACAATCGATAAGCA  
ATTCGCATTTTTCACTTCCCTCTAACTCCCTAGTAACAGGAAAGTAAATGCGATCGTGCCAAATTTTTCGAAATTGA  
GTTTTTACCAAAAAATACATGGTTTGGAGTTCTCTGAATACGAAAAAAATGTTTTTAGCGAAAGGTCTGTGT  
GTGTGTGTATGTGTGTGTAAACAGAATATCTCAAAAACGAAAAGTTACAGGAAGCTCAAACCTGGTAGTCCG  
TTTAGGTGATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAAAATCAC

Tdimid25 m13rf; 223bp.

TGCCTAGCTAGCAGAATCACAATCAACTAAGATGCTATAGAGAAAAACATAATCCCACCCCTCCCCAAAA  
TCTCCCTTAAATGACTTTTTACCCGGAGAAATACTATTTGAGTCCATTCGTAACCGCTAACCAACCAAGGCTT  
CTCGTAACTATAAAACAACCTTACACATACAACACACACACACACTAACATGTGATTTCTGCTAGCTAGGSC  
TTAAACAATC

Tdimid26 m13r; 544bp

TGTTTTAAGGCCCTAGCTAGCAGAATCACAGAATTTGTAGTGTTAGATTTTTGTTGTGGTTGGTCTGCAGAGC  
AGCTGGAAATCATCAGTTATACGCTGAATGAGTGTATAACTGAATTACAAGTTCCATGTATATGAAGAAA  
ATGTTTTTACCGAATGTCTGTGGTCAAGTATTAAGAAATGCTTAATGTTGCAGCGCCCTCTAAGGCCATC  
CCCTAAAAAATAAAAAAAAAAATCAATATTTCTGGAAAAATGTTTCAAATAAAAGTGATAGTCATTTATAAA  
TGTAAGAGTGTAAGTATGTATACAAAGCTTAAAGAAAACCGTGTGGAGCTGTTTTTGAGGAAATATCAAA  
AAACTGAAAAGGAAAAAACATTTCTGTTTTTCCGGTATTTCCGTATTTCCGGTTGATGGATTTTGATCGAAA  
CTTTCATGTSTGATGCGGTGGTAATACCTAAATGAAATAGTATATTTGAGCATCCTGCGATTATTGGATTT  
TGAGATTTTTTTCACACACACACACACACATACACCAGTGTGATTT

Tdimid27 m13r; 632bp.

TGTTTTAAGGCCCTAGCTAGCAGAATCACCCCTGATTTGAAAGTATTTTAAGCTATTGTAGAAATCAGGCACCC  
AAAAATCAAATTTCTCAAAAAAATATTTCAAATAAAAACAAATAGCAAGCATTCCAAATATATATATGCAA  
ACATTTCTATCACTGTTTTTAATATTTCCCTAATTACACAAAAGTTAGAATCATACCTACATTGTATTGATGT  
GACAATTTAGAAGTGAAAACTTAACTCCCCAGAACCTTCCAAACATAGCTTTCTCGAAAAATGTTTTC  
AAATAAAATTTATAAGGATTATTTGGGGATAGTCAGTAACTGTGTGTGTGTGCATATATGTATGTATATGA  
ATAGCATAGCTCAAAAACGCAAAATCCAGAAAGTTAAAAAATAATGACATTTCTGTGTGGGTATCATCATG  
AGACAGGAACCTTATCTGTGAAAATTTCTCAMCCGGAAGTATCACTTTACAAAATGGATTTTTTCAGTTTTTT  
CGCGATTTTCTCGTAAACGGCTCCAACAATTTTACAAAATTTGGGTTATTAACCTACACACATACAAAACAG  
CTACAACCTTTATTTGTAACATTTCTCTGAAAAAGATTTCTGCTAGGCTAGGGCTTAAACATTCG

Tdimid28 m13rf; 393bp.

TGTTTTAAGGCCCTAGCTAGCAGAATCACACAAACCTCCTCATCGATCAGTTTAACGT CATCCATACCTCCCT  
TCTCASTAACACACTCGTTAGACACATCTTCAAGCCACAAAGAGAATATCTTTTCTCTCCCCCTCTCTCT  
CTCTTACTGCTGTAAGAGCAAGTATTGCGATCGTTTCAAATTTYTGAAATTGAGTTTTACCCGAAATACA  
TGTTTTCAGGTCCCCTGAGGCCGCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATATATAACTCAAAAACGGAAAAATCA  
AATAAAGGTGAAATTTGGTATTTAGTTAGCTGCTACCAGGGATCGCGACAGCAAGCTTTTGGTCAAAAATCA  
GCCAACTGGAAGTGATTTMGCTAGCTAGGSCCTTAAACA



ACAACTGTGCAACAGCTCCGCATTGCCCTACAGGAAGAATAGGGTGTCCBTCGGCMAAAGTCCATAGCCTG  
ATTACATCRATCGGATCAGAGCCCTTAGTATTGCCCCAGGAGGCAATTTAGAATTAAGGATTCCTGTA

Tdimid33 m13f; 389bp.

TGTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATCTATTTCGCGTTTTGACCATTTGATGTTCCCTTGCTTCGCCTTTATGCC  
ATAAATTAATTCGCCGATATACTTTGACTGGTTCGTCAACAGCACCAGTGCTAATTTGCACCTTCAACCT  
GCTTCACTTTACTTTAGTTTAGGATTCTTGCAATTACAGCCAGTTCTCTTCGTTACGTATTATTTCCCTTCA  
TACCCATAGCTTGTATTGCCCTATCCTTCATCCCATCATTTTCATCTTCTCCACATTTACACACACACACAC  
ACATCCATACACATCTGTAGACATATTATATCGCACTTCAACTTACCTGTGATTCTGCTAGCTAGGGCTTA  
AACA

Tdimid35 m13r; 930bp.

TGTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATCACTGAAAGAAAGAGTGTTTAACTGAAATTTGCTCCGTGCAAGTCTA  
TGTTATCACTGTGTTCTGTCAAAGCATCCTGATGATGGGCGAACGCCCGAAACCGGTGATGACCACAAAA  
TGAAGCAGGCTACCACGGAATATCTCTGATGTAATTATATAGTTTTCTGTTAAAAATCATCCATTGTT  
AACTTTACTTTCATAAAAAATTTGAAACGGTAATCCCAGTATTATTTACTGAACTGAATTAATCATGAATTGA  
TATATTAAGCCCGTTTTATAGTTTTGATTAGGTGAGGATCGAGTAACGAATGGTGTTCAAACAGTTATAG  
CTTATTAGATGTATTGKTGATAGAAAAAGTTTGAAGAAAATCGTTGGAGAAAATCACAGAAAAACAAAA  
TTTATTTTTTAAAAATGGCACTTTCGGTTGAACGATTTTTACGAAAAGCTTATTCFCAGGTATCCCGAGAGC  
ATTTTAACGGAATGTTAAGTTTGAACATTCGTGATCTTTCGTCTTTGAGATATGCTGTCCTTTGA-  
CCAATTTAAAAACTACTTTTTTGGACTCAGGGGA-  
CCACCTCAAACGAATATTTCCGGTGAAAACCTCGATATCGAAAaTTTGACATGATTMCaATACTTCCTCTA  
ACTAAAAGTAAGAGAAAaTAAAAaTCTAaTATTTAaCTCTAgAGAAAAGTtATTTACAACTTTTGTTTCAGT  
TGCGACACTCCTATCGCTCGTGTGGGGGCAAATCTGAAACTCGATTGTATAAAAAGTGGCCCTTTTCTCT  
CTTGTCAAATAAATAACTATTTTATACTGTTTCATTTCCGGTCACTTAGATAATTATAACCAAATTATTGA  
TCCAGTTCACAAGAAAATTCATAAATAGTTTTTGGATAAAAATAAGG

Tdimid36 m13r; 293bp.

TGTTTAAGGCCTANCTAGCAGAATCACTAAATAGCATCACTCAGAAGGAAAGTCTGCAAGCTGAAACCTGA  
TATTCGGTTTTGGCCATCACAGGTCATTGATAGAAAATATCGGTCAAAAGCGTCCAACCCGAACATCACT  
TTACTTTTTTGCGCTTTTTTCAAAAAGGACTACCAAAAATTTTTTTTAAATCTTTCACATATcTWCARCACCC  
CCCCCCCACACACACATACACATAGACATGCACACACACATAGACAAGTTGTAGTGATTYTGCTAGCTAGG  
NCTTAAACA

Tdimid37 m13r; 531bp.

TGTTTAAGGCCTANCTAGCAGAATCACTTCAACGGAATAGCAAGTTTGAGCTTACGACTTTTTGTTTTGA  
GATATTCTCTAAAAACAAACACACGCACACACACAAGACTATTCGCTAAAAACATTTTTTTTGCTTGGGG  
GGCCTCAAACATGTATTGCCGGTGAACCTCCATTTTCGAAAATCTGGCAGGATCGCATTACTTCTCTTA  
CTAAGAGAAGAGAAAAGTAAAAGAACATCGGTAATAGATATTTTAAAAATGGAACATAAAGGAATTTAAGAT  
TTATGCCCAGATTTTTGAACGTTACTATTTTTGAAACGCGTAATGTTGCTGCAAGTTGCAAACCTGKGGAGAT  
GAATAGCATGGGGCCACAGACACAAAAAAAATCCAGTTTGTATATTAAGATTTCTTTAGTTATTTCAATA  
AATACTTCTTTGCCAGGTATACCTGACACACAGCCATTTTTATTCACGTAATAAAAAATCTGCAAACGTGG  
GGTGATTCTGSTAGCTAGGCCTTAMACAATGA

Tdimid38 m13rf; 406bp.

TGTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATCACATAATCGGACATACGCACACACACACACACACAGCACGTACG  
AAAAGCTACAGTCTACAAAACCTAACCTGGTTCATGCATACATGCATCTTTATCATTTACCTTAATTAAT  
GGCAATCCGATACTCAATAGTGTTTTATAAAAAGGAATGTCGTAATACATGCTCTGATTTTCGATTTCAAGT  
AAGAAAAAATTCAAAATGATAATTTTAGTTTCATCTATATATGTTTCCCTGTGGCAGGGATGATAAAATC  
TTAAATATTAATAATGATTTGATAATTTGTCGAAACTGGGACTTCTAATTTGAAATGCAAATCAGTGTTA  
ATGGTTATTAGTTTTAGTATACTCGTGATTCTGCTAGCTAGGGCTTAAACA

Tdimid39 m13f; 546bp.

CATTGTTAAGGCCTAGGCTAGCANAATCACAATCTCACATGATTACAATTAATTTTCAGGATTAAGAACT  
CTAGGTCGAAGTTTACAAACATGGACCAATCTGGCTTTTTTAGGCTGCTTGCAAAAGTTGTAGGGAGAGAG  
CACGGKCTAAGATTAATATTACAATGTCCGATTGCTGAAAGCATTGGGAAGAAAAATGAGATGGACGGTG  
AGAGACANAAAGCTTGATATGTTAAAAGAAAGGKTGCAGCGGCCAGGKTATCAATATATTTATTTGTCAA  
TTATCTACATAACATTGATGTTTGAGGACAATTGAAGGCAGAAGGAAATGACCTTGATAATTCGGTCTACG  
TTTTCCGAAATGTTGCGCTAATTTCAATGATAGAAGCAAACATAAATCNGGCTCATAAATAATAAAATGA  
AATGGCCTGCCAACAAACCCTATTTCAATAATATTTTAAATGKTAATCACTTCTCTAATTGCTTGATAA  
CCANAAATGGGGCTTCTTATTCCTGKAATGGAATTGGCTGGCCCTATT

Tdimid39 m13r; 400bp.

TGTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATCACTATATTTGCTGGTATTTCTGTGTATTATTAGAAGAATCTCAGTT  
TTGAGAGAGTTCTTCAAATTTTTCATAATCTTTTCGTGTCATAATATGACATTTACACGGACAACACTAAAA  
CTCTCTTTTTTTCATCTCAAGATTTTGGCTTCTCTCTCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
TTCGGTCTGCTTCATGGCTATTTACAGCCTGCATCTCCTACCCTAATTGCGCTTCATTATAATGCTCTCCTC  
CCGATCTCTATACCAGCCAAATACGGSCAGCCAAATCCATTACAGGAATAAGAAGACCAATTTCTGGNTAT  
CAAGCAATTAGAGAACTGATTTAACATTTAAAAATATTATTGAAA

Tdimid40 m13rf; 341bp.

TGTTTAAGGCCTAGCTAKCASAATCACTTCCGTTGAGAAAATTTGACAGACAACCTTAGTGTSGGATCCCA  
TGGTGATACTTAAACGGAATATCATGTTGAACTTTCTGTGACTTTTTCGTTTTTGGGSTATGATGTGCACA  
CACACACACACACATACACAGACCAATTTCTAAAAACATTTTCTGGGCTTATGGGACCTCAAGAAAGGGA  
TTAGCTCAATGGTAGCGCACTGGAGGTCCCGGTTAGAAAAATTAGATTTTCTCTTCTTAGGAGCCTCTTAC  
AGCTCACTGTCCGGAGACCGGCAGTGCATTGAGAAGGCTCCGATCTTTGGGGTGATT

Tdimid41 m13r; 213bp.

TGTTTAAGGCCTANCTAGCANAATCACACTGTTAACAAATACACTATATGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGA  
GTGTGTTTATATATGTGTGTGTGTGTGAGAGAGAGAGAGAAATGAGTGAGAGCAACACACACGCACACAN  
GGATAGAATTTTGGTGTCCAACAAACGGTGGTGAGGAGAGCCCGCAAAAAGGGTGACAGGAGGGGAAGTT

Tdimid42 m13r; 430bp.

TTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATCGTTTCCATGACTGAGGTCCAAACATTTGGCAAAGCTTAGAAAATGTTT  
ATCACAATCACCGATTGAAGAATGTTGAAGAAGGAAAAAGGACATTTGTTTGCTGCGGGGTATCCAGTCAA  
ACTGATGGATAACCATTGGAAAGTAGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTGTGCGTGTGAGAAGGAGGAAGTGA  
AATATTTTACTCTACTTTTCTAAAAAGGATGAGGATGCTGAAAAGCCAGGCGGGTTGGAGCTTACTCG  
TATGTTTATGTTTGGAGACATGGTCTTGCCTTGCAGATGATATATTTTGGAGGTATTAGTAAAAAAA  
AAAAAAAAGAAAAGAAAATGGAAAAGCTCCTGTTCTGTTATCAGTGATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAC  
AATG

Tdimid43 m13r; 287bp.

TTAAGGCCTAGCTAGCAGAATCACGAAAAAAAAAGTTTTTAACGAATAGTCTGCTTGGGTGTGGGTATGAT  
TTAATAGAATATCTCAAAAGCGAAAAATCGCAGGAAGCTCAAATTTGGTATTAACGTTTAGATACTACCAC  
CGCATTAGACACGAAGATTTTCAAGCAAAATCCATCAACCGGAAGTCCGAYTTTACTGAWTTTTTTTTTTTT  
CAGTTTTTTCGTGATTTTCTCAAAAMRRcAWWAAMGWTTTTTMKYTAA-ASTTTGTATAGG--  
TGATTTGGGTGTG









J. Listado de los números de identificación y localidades de colecta de cada individuo del estudio

A continuación se presenta la información de cada individuo colectado para este estudio. El número que aparece en la primera columna corresponde a un número correlativo asignado una sola vez para identificar en los procesos de laboratorio a la chinche identificada por el "ID chinche". El ID chinche informa sobre la geografía de la captura y el número de casa. El hábitat intradomiciliar o peridomiciliar se refiere a captura dentro de la casa o en sus alrededores respectivamente. De algunas muestras se desconocen algunos datos, por lo que se les denominó en el campo desconocido "ND" o no determinado.

Cuadro 21  
Información de individuos capturados para este estudio

No.	ID chinche	Departamento	Hábitat	Sexo	Estado al recolectar	Detección microscópica de infección con <i>T. cruzi</i>
1	19-038-22-D4	Zacapa	Intra	hembra	viva	no
2	19-065-16-D1	Zacapa	Intra	macho	muerta	ND
3	19-098-65-D1	Zacapa	Intra	macho	viva	no
4	19-103-69-D1	Zacapa	Intra	macho	viva	no
5	19-110-1-D1	Zacapa	Intra	hembra	viva	si
6	19-111-10-D1	Zacapa	Intra	hembra	viva	si
7	19-132-56-D1	Zacapa	Intra	hembra	muerta	ND
8	19-144-22-D1	Zacapa	Intra	macho	viva	si
9	19-144-22-D2	Zacapa	Intra	macho	viva	no
10	19-145-10-D1	Zacapa	Intra	macho	viva	no
11	19-149-38-D1	Zacapa	Intra	hembra	viva	si
12	19-171-47-D1	Zacapa	Intra	macho	viva	si
13	19-171-47-D2	Zacapa	Intra	macho	viva	no
14	19-171-47-D4	Zacapa	Intra	macho	viva	no
15	19-173-59-D3	Zacapa	Intra	macho	viva	no
16	19-173-59-D5	Zacapa	Intra	hembra	viva	no
17	19-173-59-D6	Zacapa	Intra	macho	viva	no
18	19-173-59-D7	Zacapa	Intra	macho	viva	no
19	19-173-59-D8	Zacapa	Intra	hembra	viva	no
20	19-188-6-D1	Zacapa	Intra	hembra	muerta	ND
21	19-188-7-D1	Zacapa	Intra	macho	viva	si
22	19-297-22-D7	Zacapa	Intra	hembra	muerta	ND
23	19-297-22-D11	Zacapa	Intra	hembra	viva	no
24	21-001-1-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	no

25	21-001-1-D2	Jalapa	Intra	macho	viva	no
26	21-001-1-D3	Jalapa	Intra	hembra	viva	no
27	21-001-1-D4	Jalapa	Intra	macho	viva	no
28	21-001-1-D5	Jalapa	Intra	macho	viva	no
29	21-002-8-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	si
30	21-004-2-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	no
31	21-004-4-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	no
32	21-026-5-D1	Jalapa	Intra	hembra	viva	no
33	21-027-4-D1	Jalapa	Peri	macho	viva	no
34	21-027-4-D2	Jalapa	Peri	macho	viva	no
35	21-027-4-D3	Jalapa	Peri	macho	viva	no
36	21-027-4-D4	Jalapa	Peri	macho	viva	no
37	21-027-4-D5	Jalapa	Peri	macho	viva	no
38	21-027-4-D6	Jalapa	Peri	macho	viva	no
39	21-027-4-D7	Jalapa	Peri	macho	viva	no
40	21-027-4-D8	Jalapa	Peri	macho	viva	no
41	21-027-4-D9	Jalapa	Peri	macho	viva	no
42	21-027-4-D10	Jalapa	Peri	macho	viva	no
43	21-027-4-D11	Jalapa	Peri	macho	viva	no
44	21-027-4-D12	Jalapa	Peri	macho	viva	no
45	21-027-4-D13	Jalapa	Peri	macho	viva	no
46	21-037-21-D1	Jalapa	Peri	hembra	viva	no
47	21-042-2-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	no
48	21-045-12-D1	Jalapa	Intra	hembra	viva	si
49	21-060-148-D1	Jalapa	Intra	hembra	viva	si
50	21-094-13-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	no
51	21-094-13-D2	Jalapa	Intra	macho	viva	no
52	21-104-7-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	si
53	21-113-4-D3	Jalapa	Intra	hembra	viva	si
54	21-113-4-D4	Jalapa	Intra	hembra	viva	si
55	21-113-4-D5	Jalapa	Intra	hembra	viva	si
56	21-113-4-D6	Jalapa	Intra	hembra	viva	si
57	21-113-6-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	no
58	21-113-6-D2	Jalapa	Intra	hembra	viva	no
59	21-113-6-D3	Jalapa	Intra	macho	viva	si
60	21-118-14-D2	Jalapa	Intra	hembra	viva	si
61	21-162-4-D1	Jalapa	Intra	macho	viva	si
62	21-163-12-D1	Jalapa	Intra	hembra	viva	no
63	20-020-1-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
64	20-020-1-D2	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
65	20-020-1-D3	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
66	20-021-8-D2	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
67	20-021-8-D4	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
68	20-022-12-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
69	20-022-12-D2	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
70	20-034-35-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
71	20-036-17-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
72	20-036-17-D2	Chiquimula	Intra	macho	muerta	ND

73	20-038-5-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
74	20-040-5-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
75	20-040-8-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
76	20-042-11-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
77	20-044-122-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
78	20-044-114-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
79	20-046-68-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
80	20-047-30-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
81	20-047-28-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
82	20-048-8-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
83	20-048-26-D1	Chiquimula	Intra	macho	muerta	ND
84	20-051-22-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
85	20-051-22-D2	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
86	20-051-22-D3	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
87	20-093-2-D2	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
88	20-093-3-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
89	20-093-6-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
90	20-093-6-D2	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
91	20-094-8-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
92	20-094-8-D2	Chiquimula	Intra	hembra	muerta	ND
93	20-094-9-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	si
94	20-094-9-D3	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
95	20-094-10-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
96	20-094-10-D2	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
97	20-094-11-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
98	20-095-11-D2	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
99	20-095-12-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
100	20-095-12-D2	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
101	20-095-13-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
102	20-095-13-D2	Chiquimula	Intra	macho	viva	no
103	20-095-14-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
104	20-095-14-D2	Chiquimula	Intra	hembra	viva	si
105	20-095-14-D3	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
106	20-095-16-D1	Chiquimula	Intra	macho	viva	si
107	20-118-1-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
108	20-118-1-D2	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
109	20-118-6-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
110	20-118-6-D2	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
111	20-118-6-D3	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
112	20-119-10-D1	Chiquimula	Intra	hembra	viva	no
113	20-128-1-D1	Chiquimula	Intra	macho	muerta	ND
114	20-128-1-D2	Chiquimula	Intra	hembra	muerta	ND
115	22-044-7-D6	Jutiapa	Intra	hembra	muerta	ND
116	22-044-7-D7	Jutiapa	Intra	hembra	muerta	ND
117	22-044-18-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
118	22-044-18-D2	Jutiapa	Intra	hembra	viva	no
119	22-044-49-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
120	22-055-4-D1	Jutiapa	Intra	macho	muerta	ND

121	22-055-13-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
122	22-055-13-D2	Jutiapa	Intra	macho	viva	si
123	22-055-13-D3	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
124	22-055-13-D4	Jutiapa	Intra	hembra	viva	no
125	22-055-13-D7	Jutiapa	Intra	macho	muerta	ND
126	22-057-16-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	si
127	22-057-16-D2	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
128	22-057-18-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
129	22-057-18-D2	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
130	22-057-18-D3	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
131	22-057-18-D4	Jutiapa	Intra	hembra	viva	no
132	22-057-19-D1	Jutiapa	Intra	hembra	viva	no
133	22-058-7-D6	Jutiapa	Peri	hembra	viva	si
134	22-058-7-D7	Jutiapa	Peri	macho	viva	si
135	22-058-7-D8	Jutiapa	Peri	N4	viva	no
136	22-058-31-D1	Jutiapa	Peri	macho	viva	no
137	22-059-45-D2	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
138	22-059-45-D3	Jutiapa	Intra	hembra	viva	si
139	22-059-27-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
140	22-059-27-D9	Jutiapa	Peri	macho	muerta	ND
141	22-062-22-D2	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
142	22-062-22-D3	Jutiapa	Intra	hembra	viva	no
143	22-063-1-D1	Jutiapa	Intra	hembra	viva	no
144	22-069-45-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
145	22-069-52-D1	Jutiapa	Intra	hembra	viva	no
146	22-069-52-D4	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
147	22-070-21-D4	Jutiapa	Intra	hembra	viva	no
148	22-070-41-D1	Jutiapa	Intra	hembra	viva	si
149	22-070-41-D2	Jutiapa	Intra	macho	viva	si
150	22-071-2-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
151	22-071-2-D2	Jutiapa	Intra	hembra	viva	si
152	22-071-2-D3	Jutiapa	Intra	macho	muerta	ND
153	22-071-7-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
154	22-071-7-D2	Jutiapa	Intra	N4	viva	no
155	22-071-7-D3	Jutiapa	Intra	hembra	muerta	ND
156	22-075-40-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	si
157	22-075-40-D2	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
158	22-075-40-D3	Jutiapa	Intra	hembra	viva	si
159	22-075-40-D4	Jutiapa	Intra	hembra	viva	si
160	22-075-40-D5	Jutiapa	Intra	hembra	viva	si
161	22-077-147-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	no
162	22-077-147-D2	Jutiapa	Intra	macho	viva	si
163	22-077-147-D3	Jutiapa	Intra	N4	viva	si
164	22-077-147-D4	Jutiapa	Intra	hembra	viva	si
165	22-077-147-D5	Jutiapa	Intra	N5	viva	si
166	22-078-15-D1	Jutiapa	Intra	macho	viva	si
167	16-001-1-D1	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
168	16-003-4-D1	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no

169	16-003-4-D2	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	no
170	16-003-5-D2	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
171	16-003-5-D3	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	si
172	16-003-5-D4	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	no
173	16-010-6-D1	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
174	16-012-1-D1	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
175	16-012-2-D1	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
176	16-012-3-D1	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	no
177	16-012-5-D1	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	no
178	16-023-1-D1	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	si
179	16-025-5-D1	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	no
180	16-029-7-D1	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	si
181	16-009-10-D1	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
182	16-005-5-D31	Alta Verapaz	Peri	macho	viva	no
183	16-005-5-D32	Alta Verapaz	Peri	hembra	viva	no
184	16-005-5-D33	Alta Verapaz	Peri	hembra	viva	no
185	16-005-5-D34	Alta Verapaz	Peri	hembra	viva	no
186	16-005-5-D35	Alta Verapaz	Peri	hembra	viva	no
187	16-005-5-D36	Alta Verapaz	Peri	macho	viva	no
188	16-005-5-D37	Alta Verapaz	Peri	N5	viva	no
189	16-005-5-D38	Alta Verapaz	Peri	N5	viva	no
190	16-005-5-D39	Alta Verapaz	Peri	N5	viva	no
191	16-005-5-D40	Alta Verapaz	Peri	N5	viva	no
192	16-005-5-D41	Alta Verapaz	Peri	N5	viva	no
193	16-005-5-D43	Alta Verapaz	Peri	N5	viva	no
194	16-005-5-D44	Alta Verapaz	Peri	N5	viva	no
195	16-005-5-D1	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
196	16-005-5-D2	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
197	16-005-5-D3	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	no
198	16-005-5-D4	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	no
199	16-006-11-D1	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
200	16-006-11-D4	Alta Verapaz	Intra	hembra	viva	no
201	16-009-9-D2	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
202	16-009-9-D3	Alta Verapaz	Intra	macho	viva	no
203	15-015-24-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
204	15-017-129-D4	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
205	15-024-26-D3	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
206	15-026-1-D2	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
207	15-026-1-D3	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
208	15-026-4-D3	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
209	15-027-69-D2	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
210	15-028-36-D16	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
211	15-036-2-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
212	15-041-13-D2	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
213	15-041-13-D3	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
214	15-041-13-D4	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
215	15-071-4-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
216	15-073-16-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	si

217	15-073-16-D2	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
218	15-074-20-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
219	15-075-23-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
220	15-075-26-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	si
221	15-077-34-D2	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
222	15-082-1-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	si
223	15-082-5-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	si
224	15-091-10-D2	Baja Verapaz	Peri	macho	viva	no
225	15-102-1-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	si
226	15-105-39-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
227	15-112-12A-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	si
228	15-115-9-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	si
229	15-117-21-D2	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
230	15-117-21-D3	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
231	15-117-21-D4	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
232	15-117-21-D6	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
233	15-117-21-D7	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
234	15-117-21-D8	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
235	15-143-2-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
236	15-148-10-D1	Baja Verapaz	Peri	hembra	viva	no
237	15-149-1-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
238	15-149-3-D2	Baja Verapaz	Peri	hembra	viva	no
239	15-155-5-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
240	15-200-2-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
241	15-200-3-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
242	15-233-5-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
243	15-239-3-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
244	15-241-1-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
245	15-241-1-D2	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
246	15-241-1-D3	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
247	15-241-1-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
248	15-241-1-D5	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
249	15-241-1-D6	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
250	15-241-1-D8	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	no
251	15-244-7-D1	Baja Verapaz	Intra	macho	viva	no
252	15-244-11-D1	Baja Verapaz	Intra	hembra	viva	si
253	1-084-108-D1	Chiquimula	ND	N4	ND	ND
254	4-058-108-D1	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
255	4-058-108-D2	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
256	4-052-108-D4	Chiquimula	ND	ND	ND	ND
257	4-052-108-D5	Chiquimula	ND	ND	ND	ND
258	1-061-228-D1	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
259	1-061-228-D2	Chiquimula	ND	ND	ND	ND
260	1-031-228-D1	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
261	1-031-228-D2	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
262	1-127-239-D1	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
263	1-148-239-D1	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
264	1-148-239-D2	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND

265	4-052-239-D3	Chiquimula	ND	ND	ND	ND
266	1-072-048-D2	Chiquimula	ND	N4	ND	ND
267	1-029-054-D1	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
268	4-051-54-D1	Chiquimula	ND	ND	ND	ND
269	4-051-54-D2	Chiquimula	ND	ND	ND	ND
270	1-077-237A-D1	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
271	1-077-237A-D2	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
272	1-077-237A-D3	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
273	1-027-237A-D1	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
274	1-027-237A-D2	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
275	1-027-237A-D3	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
276	1-064-033-D2	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
277	1-064-033-D4	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
278	1-064-033-D5	Chiquimula	ND	N4	ND	ND
279	1-076-033-D1	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
280	1-076-033-D2	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
281	1-024-033-D2	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
282	1-024-033-D3	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
283	1-024-033-D4	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
284	1-024-033-D5	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
285	1-035-033-D2	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
286	1-051-060-D1	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
287	1-051-060-D2	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
288	1-089-060-D1	Chiquimula	ND	N4	ND	ND
289	1-089-060-D2	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
290	1-089-060-D3	Chiquimula	ND	ND	ND	ND
291	1-036-060-D1	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
292	1-036-060-D2	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
293	1-036-060-D3	Chiquimula	ND	ninfa	ND	ND
294	4-013-060-D1	Chiquimula	ND	macho	ND	ND
295	4-013-060-D2	Chiquimula	ND	hembra	ND	ND
296	5-096-10-D1	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
297	5-096-10-D2	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
298	5-096-10-D3	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
299	5-096-10-D4	Sta. Rosa	ND	N3	ND	ND
300	5-118-10-D1	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
301	5-118-10-D10	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
302	5-118-10-D11	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
303	5-118-10-D14	Sta. Rosa	ND	N3	ND	ND
304	5-096-11-D1	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
305	5-096-11-D2	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
306	5-096-11-D3	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
307	5-096-11-D4	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
308	5-118-11-D1	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
309	5-118-11-D10	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
310	5-118-11-D11	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
311	5-118-11-D12	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
312	5-096-12-D1	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND

313	5-096-12-D2	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
314	5-096-12-D3	Sta. Rosa	ND	N3	ND	ND
315	5-118-12-D1	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
316	5-118-12-D10	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
317	5-118-12-D11	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
318	5-102-03-D1	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
319	5-102-03-D2	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
320	5-120-03-D1	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
321	5-120-03-D2	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
322	5-120-03-D3	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
323	5-104-37-D1	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
324	5-104-37-D2	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
325	5-104-37-D3	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
326	5-120-37-D1	Sta. Rosa	ND	N3	ND	ND
327	5-120-37-D2	Sta. Rosa	ND	N2	ND	ND
328	5-099-38-D1	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
329	5-099-38-D6	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
330	5-099-38-D11	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
331	5-119-38-D2	Sta. Rosa	ND	N3	ND	ND
332	5-119-38-D3	Sta. Rosa	ND	N3	ND	ND
333	5-119-38-D4	Sta. Rosa	ND	N3	ND	ND
334	5-101-54-D1	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
335	5-101-54-D2	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
336	5-101-54-D3	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
337	5-119-54-D1	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
338	5-119-54-D2	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
339	5-119-54-D3	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
340	5-102-55-D1	Sta. Rosa	ND	hembra	ND	ND
341	5-102-55-D3	Sta. Rosa	ND	N5	ND	ND
342	5-102-55-D5	Sta. Rosa	ND	N4	ND	ND
343	5-119-55-D1	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
344	5-119-55-D2	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
345	5-119-55-D3	Sta. Rosa	ND	macho	ND	ND
346	Alex Guerra, Lachuá	Alta Verapaz	ND	hembra	viva	si
347	300003	México	Intra	macho	muerta	ND
348	300005-1	México	silvestre	macho	muerta	ND
349	300005-2	México	silvestre	macho	muerta	ND
350	300006-3	México	silvestre	macho	muerta	ND
351	300006-4	México	silvestre	macho	muerta	ND
352	900002	México	silvestre	macho	muerta	ND
353	60000-2	México	Intra	macho	muerta	ND
354	60000	México	ND	hembra	muerta	ND
355	600003-1	México	ND	hembra	muerta	ND
356	600003-6	México	ND	hembra	muerta	ND
357	700035-6	México	Peri	hembra	muerta	ND
358	700044-2	México	Peri	hembra	muerta	ND
359	100006	México	Peri	macho	muerta	ND
360	100011	México	Intra	macho	muerta	ND

361	200027	México	Intra	macho	muerta	ND
362	200015-7	México	Intra	hembra	muerta	ND
363	200027-2	México	Intra	macho	muerta	ND
364	20028-2	México	Intra	hembra	muerta	ND
365	600003-4	México	Peri	macho	muerta	ND
366	600003-8	México	Peri	macho	muerta	ND
367	300005-3	México	silvestre	macho	muerta	ND
368	300005-11	México	silvestre	hembra	muerta	ND
369	300007-7	México	silvestre	hembra	muerta	ND
370	300007-8	México	silvestre	macho	muerta	ND
371	605316	México	ND	macho	muerta	ND
372	605116	México	ND	macho	muerta	ND
373	Insectario	México	ND	macho	muerta	ND
374	Insectario	México	ND	macho	muerta	ND
375	6-165-12-D1	Sta. Rosa	Intra	N4	viva	si
376	6-001-4-D2	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
377	6-073-4-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
378	6-074-8-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
379	6-078-12-D3	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
380	6-067-1-D2	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	si
381	6-067-4-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
382	6-248-2-D4	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
383	6-249-5-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
384	6-249-7-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
385	6-249-11-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	si
386	6-253-2-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
387	6-010-12-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
388	6-005-5-D2	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
389	6-014-8-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
390	6-194-1-D1	Sta. Rosa	Peri	N5	viva	no
391	6-193-17-D4	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
392	6-026-9-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
393	6-350-2-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
394	6-352-10-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	si
395	6-356-6-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	si
396	6-364-10-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
397	6-362-3-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
398	6-358-4-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
399	6-295-1-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
400	6-315-9-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	si
401	6-303-1-D3	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
402	6-303-5-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
403	6-304-7-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
404	6-262-1-D1	Sta. Rosa	Intra	N5	viva	no
405	6-258-1-D4	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	si
406	6-272-2-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	si
407	6-079-1-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
408	6-091-21-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no

409	6-100-22-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
410	6-108-52-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
411	6-084-39-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
412	6-088-16-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
413	6-049-5-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
414	6-205-1-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	si
415	6-059-3-D1	Sta. Rosa	Intra	N5	viva	no
416	6-044-7-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
417	6-047-11-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
418	6-144-70-D1	Sta. Rosa	Intra	N5	viva	no
419	6-227-99-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	si
420	6-153-19-D1	Sta. Rosa	Intra	N5	viva	no
421	6-229-7-D4	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
422	6-148-6-D4	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
423	6-237-383-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
424	6-116-1-D2	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	si
425	6-140-1-D3	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
426	6-114-6-D1	Sta. Rosa	Intra	N5	viva	no
427	6-122-1-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
428	6-111-3-D1	Sta. Rosa	Intra	N5	viva	no
429	6-109-1-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
430	6-336-1-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	no
431	6-329-5-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
432	6-032-14-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no
433	6-333-5-D1	Sta. Rosa	Intra	hembra	viva	si
434	6-027-1-D1	Sta. Rosa	Intra	macho	viva	no

### K. Manual de uso del software *Allelogram*

*Allelogram*: Programa automatizado para definir alelos de marcadores microsátélites

Contenido:

USO

ENTRADA

convert\_format.sh

SALIDA

GRÁFICAS

USO:

1) Crear el ejecutable:

*Allelogram.c* escrito en ANSI C y puede ser compilado (en Unix) como sigue:

USO:

- 1) Crear el ejecutable:

Allelogram.c escrito en ANSI C y puede ser compilado (en Unix) como sigue:

```
gcc -lm -o allelogram.exe allelogram.c
```

- 2) Crear el archivo de entrada con el formato requerido –ver sección ENTRADA
- 3) Ejecutar el programa con el comando:

```
allelogram.exe allelogram_ipt.dat markerlist.dat
```

durante la ejecución se requiere:

- Tamaño de repetición (número en pb, por ejemplo 3 para un marcador trinucleótido)
- Distancia para el punto de corte (pb) de la media para el tamaño de los alelos (por ejemplo ~0.5 para marcadores dinucleótidos)

N.B.

- Los archivos de salida están escritos en el directorio “allelogram\_output.dir”. El directorio debe crearse antes de correr el programa.
- Los programas deben correrse en el directorio allelogram.dir para asegurar que los archivos de salida se envíen al directorio apropiado.

ENTRADA:

El programa allelogram requiere de 2 archivos de entrada:

- i) allelogram\_ipt.dat: es el principal archivo de datos (contiene el tamaño de los alelos)
  - ii) markerlist.dat
- i) Hay dos formatos de entrada:

Formato 1: El formato 1 es el archivo de datos de entrada requeridos por el programa allelogram (allelogram\_ipt.dat)

Formato 2: El formato 2 es el archivo de datos que es convertido en el formato 1 por el *scriptconvert\_format.sh*

Formato 1:

El archivo de datos de entrada debe contener una línea para cada persona con los siguientes campos:

Columna 1: código que identifica a la persona (alfanumérico)

Columna 2-N: tamaño de los alelos, 2 parejas (4 columnas) por marcador:

- pareja de alelos con números enteros (poner cero si no se ha hecho el llamado de alelos previamente)

- datos crudos de los picos de parejas de alelos (obtenidos de un programa de genotipificación)

Un ejemplo de un fragmento de archivo, describiendo 3 individuos genotipificados con 2 marcadores:

1234	320	332	320.71	332.67	112	118	111.82	117.79
1234 a	322	332	322.54	332.54	114	120	113.69	119.87
1011	322	324	322.67	324.57	116	118	115.96	117.96
.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.	.	.	.

Las columnas 2, 3, 6, 7 corresponden a los alelos que se han definido manualmente (son valores discretos asignados) antes de usar el programa. Si los alelos todavía no se han definido manualmente, estas columnas deben tener un 0 para cada individuo.

1234	0	0	320.71	332.67	0	0	111.82	117.79
1234 a	0	0	322.54	332.54	0	0	113.69	119.87
1011	0	0	322.67	324.57	0	0	115.96	117.96

Las columnas 4, 5, 7, 8 corresponden al valor real asignado a cada fragmento de DNA.

Formato 2:

Este archivo de datos de entrada debe contener para cada marcador una línea para cada persona con los siguientes campos:

Columna 1: el marcador, puede ser numérico, con caracteres o ambos sin espacios.

Columna 2: código individual, id.

Columna 3, 4: el tamaño de las parejas de alelos definidos anteriormente (se coloca 0 si no se ha hecho previamente)

Columna 5, 6: los datos crudos de las parejas de picos (obtenidos de un programa de genotipificación)

D7S481	1234	320	332	332.71	332.67
D7S481	1234 a	322	332	332.54	332.54
D7S481	1011	332	334	322.67	324.57
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
D7S481	1234	112	118	111.82	117.79
D7S481	1234 a	114	120	113.69	119.87
D7S481	1011	116	118	115.96	117.86

El *script* “convert\_format.sh” convierte el formato 2 en el formato 1 y crea el archivo markerlist.dat. Ver sección de convert\_format.sh

ii)

----

markerlist.dat: Es la lista de nombres de los marcadores con el orden correspondiente al archivo de entrada.

```
D7S481
D7S481
.
```

El archivo markerlist.dat es creado por el *script* “convert\_format.sh”

convert\_format.sh

-----

*script* para convertir el formato del archivo en el formato requerido por el programa

ENTRADA:

Ver formato 1 en la sección INPUT (i)

USO:

- i) compilar el programa “markerlist.c” (utilizando en convert\_format.sh) con el comando:

```
gcc -o markerlist.exe markerlist.c
```

para crear el ejecutable markerlist.c

- ii) correr el *script*:

```
convert_format.sh file_format1.dat
```

Nota: correrlo en el directorio allelogram.dir

SALIDA: allelogram ipt.dat: file\_format2.dat  
Ver formato 2 en la sección ENTRADA (i)

markerlist.dat: lista de marcadores  
-entrada requerida por el programa

SALIDA:

-----  
(en el directorio allelogram\_out.dir)

-allelogram\_format1.out: como el formato de entrada 1 únicamente con las parejas de alelos definidos

-allelogram\_format2.out: como el formato de entrada 2 únicamente con las parejas de alelos definidos

-allelogram\_all.out: como el formato de entrada 1 con las parejas de alelos definidos para cada marcador (3 parejas, 6 columnas, por marcador)

-binstats.out: la información de cada *bin* o cajuela por marcador

-allele.err: lista de alelos que tengan distancia del promedio del *bin* > al punto de corte especificado. Nota: para cada marcador a una salida separada para cada alelo en la pareja.

En el futuro se podrá incluir la intensidad del pico en los datos de entrada y se podrá definir un punto de corte para la intensidad. Por ejemplo, si la intensidad del pico es < 50 se eliminan los alelos.

#### GRAFICAS:

#### USO:

##### 1) Copiar

-archivo de salida "allelogram\_all.out" y

-archivo "markerlist.dat"

en el directorio "graph.dir"

##### 2) El programa merge.c se utiliza en allele\_gph.sh; se debe crear el ejecutable antes de correr allele\_gph.sh

Compilarlo usando:

```
gcc -lm -o merge.exe merge.c
```

##### 3) Correr el *script*:

```
allele_gph.sh allelogram_all.out markerlist.dat
```

A medida que el *script* se mueve y muestra las gráficas, el usuario debe oprimir cualquier tecla para eliminar la figura actual y mostrar la siguiente figura.

Cada gráfica muestra 3 curvas – Picos (sin cambio)

Alelos definidos manualmente (si se incluyeron)  
Alelos definidos automáticamente

El programa le pregunta al usuario:

- Si incluyó los alelos definidos manualmente o colocó cero como dato
- Si quiere salvar la gráfica como archivo ps

El *script* también llama a merge.exe y un número de comandos awk/shell para buscar datos y asegurarse que los datos que tengan cero se eliminen.

#### GRAFICAS:

-----

eje-x: conteo acumulativo de alelos para un marcador  
eje-y: tamaño del alelo

L. Archivos de salida "binstats.out" con información sobre cada bin, para cada marcador

#### MARKER TDAK49 :

-----

allele	smallest	largest	bin mean	NumAlleles	SumSqrs	std dev
1	145.29	145.29	145	1	0	0
2	148.58	148.66	149	3	0	0.04
3	163.41	163.69	164	5	0.04	0.09
4	165.32	165.8	166	11	0.18	0.13
5	166.8	168.13	167	2	0.88	0.66
6	168.54	169.38	169	8	0.54	0.26
7	170.9	172.07	171	9	1.23	0.37
8	172.35	174.07	173	8	1.88	0.49
9	174.86	175.89	176	7	0.73	0.32
10	180.65	181.69	181	4	0.72	0.42
11	183.27	184.33	184	7	0.58	0.29
12	187.25	187.57	187	2	0.05	0.16
13	189.49	189.49	189	1	0	0
14	195.55	195.55	196	1	0	0
15	210.96	210.96	211	1	0	0

#### MARKER TDMS4 :

-----

allele	smallest	largest	bin mean	NumAlleles	SunSquares	std dev
1	141.24	141.24	141	1	0	0
2	141.82	143.13	143	8	1.36	0.41

8	154.12	154.25	154	2	0.01	0.06
9	156.18	156.59	156	4	0.13	0.18
10	159.67	159.67	160	1	0	0
11	164.86	164.91	165	2	0	0.02
12	166.9	166.9	167	1	0	0
13	169.04	169.04	169	1	0	0
14	177.05	177.05	177	1	0	0
15	179.11	179.17	179	2	0	0.03
16	181.25	181.25	181	1	0	0
17	183.06	183.06	183	1	0	0

MARKER TDMS11 :

---

allele	smallest	largest bin	mean	NumAlleles	SumSquares	StdDev
1	105.95	106	106	2	0	0.01
2	157.83	158	158	1	0	0
3	169.42	170	170	5	0.08	0.13
4	170.63	172	172	28	4.63	0.41
5	172.18	174	173	19	5.6	0.54
6	174.87	176	175	6	1.02	0.41
7	176.24	178	177	14	2.33	0.41
8	178.75	179	179	1	0	0
9	181.04	181	181	1	0	0
10	185.72	186	186	4	0.04	0.1
11	195.45	195	195	1	0	0
12	197.8	198	198	1	0	0
13	198.46	200	199	2	0.86	0.66
14	200.7	201	201	1	0	0
15	205.64	206	206	1	0	0
16	218	218	218	1	0	0
17	222.47	222	222	1	0	0
18	225.28	225	225	1	0	0
19	228.83	229	229	1	0	0
20	230.47	231	231	2	0.07	0.19
21	233.13	234	233	2	0.15	0.28
22	235.27	236	236	5	0.35	0.26
23	236.89	237	237	3	0	0.01
24	238.91	239	239	6	0.06	0.1
25	240.92	241	241	3	0.01	0.05
26	242.8	243	243	2	0.05	0.16
27	244.97	245	245	3	0.02	0.07
28	246.72	247	247	2	0.08	0.2
29	248.73	249	249	3	0.1	0.18
30	250.96	251	251	2	0.02	0.1
31	252.83	253	253	2	0	0.04
32	255.08	255	255	2	0	0.01
33	258.13	258	258	1	0	0

29	248.73	249	249	3	0.1	0.18
30	250.96	251	251	2	0.02	0.1
31	252.83	253	253	2	0	0.04
32	255.08	255	255	2	0	0.01
33	258.13	258	258	1	0	0
34	260.16	261	261	3	0.61	0.45
35	264.86	265	265	2	0	0.02
36	267.34	267	267	1	0	0
37	270.32	270	270	1	0	0
38	277.24	277	277	1	0	0

MARKER TDMS22 :

---

allele	smallest	largest	bin mean	NumAlleles	SumSqrs	std dev
1	94.38	94.48	94	2	0.01	0.05
2	97.63	100.05	99	41	3.43	0.29
3	102.66	104.54	103	35	8.73	0.5
4	104.66	107.59	106	12	9.19	0.88
5	181.48	181.48	181	1	0	0