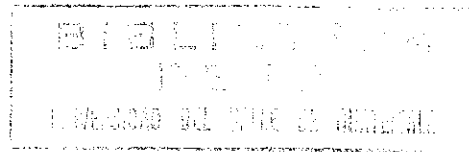


UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades
Departamento de Bioquímica

**ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LOS PRINCIPALES VECTORES DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS EN GUATEMALA: *Triatoma dimidiata* y
*Rhodnius Prolixus***



EDWIN RENE PALENCIA SANCHEZ

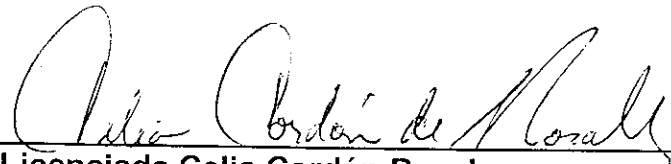
**Trabajo de Graduación presentado para optar al grado
Académico de LICENCIADO EN BIOQUIMICA**

Guatemala

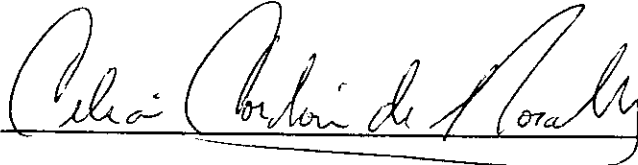
2000

**ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LOS PRINCIPALES VECTORES DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS EN GUATEMALA: *Triatoma dimidiata* y
*Rhodnius prolixus***

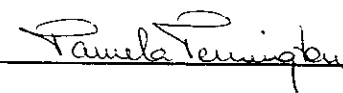
Vo. Bo.:

(f) 
Licenciada Celia Cordón-Rosales
Asesora

Tribunal:

(f) 
Licenciada Celia Cordón Rosales

(f) 
Licenciada Renata Méndizabal de Cabrera

(f) 
Dra. Pamela Pennington

Fecha de aprobación: 29 de junio, 2000

**A mis padres , José Víctor Palencia
y Eduarda del Rosario de Palencia, por la vida,
el amor y las ganas de existir**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme el privilegio de la vida.

A mis hermanos, Víctor, Ana Beatriz y Jorge por ser siempre un apoyo en mi carrera.

A mis amigos José Carlos y Lorena por las grandes enseñanzas.

A Licda. Celia Cordón Rosales, Licda. Renata de Cabrera y Dra. Pamela Pennington, por ser guías en mi carrera y en el presente trabajo.

A mis amigos del personal de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala: Bernarda, Pedro, Alfonso, Juanito por su ayuda.

RESUMEN

Se determinó la estructura poblacional de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Las áreas de colecta fueron: Tituque, Tuticopote, Las Palmas todas del municipio de Olopa, departamento de Chiquimula y la aldea Sabanetas, municipio de Santa Rosa de Lima, departamento de Santa Rosa. Las colectas se hicieron por intervalos de tres meses desde febrero de 1994 hasta octubre de 1997. rante dos años.

En las aldeas Tituque y Tuticopote se roció con los insecticidas cialotrina y propoxur. Se colectaron chinches antes y después del rociamiento con el objetivo de analizar el efecto que tiene la aplicación del insecticida sobre la frecuencia de los marcadores polimórficos. En este nivel de análisis se obtuvo un valor de heterogeneidad genética, Θ_{st} (Theta st) para *Triatoma dimidiata* de 0.009 (Θ_{st} en poblados no intervenidos 0.027) y para *Rhodnius prolixus* de 0.024 (Θ_{st} en poblados no intervenidos 0.061) indicando que las chinches encontradas durante la vigilancia son de naturaleza residual mas que una reinfestación proveniente de focos silvestres.

En el análisis de poblaciones para ambas especies, se concluye que existe poca estructuración ya que los valores de Θ_{st} de 0.176 para *Triatoma dimidiata* y 0.279 para *Rhodnius prolixus*. Además estos resultados sugieren una mayor domiciliación de *Rhodnius prolixus* comparado con *Triatoma dimidiata*.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	
A. ENFERMEDAD DE CHAGAS	
1. Descripción, Distribución e Incidencia	3
2. Actualidad en Guatemala	4
3. Parásito causante	5
4. Transmisión, Sintomatología y Diagnóstico	8
5. Tratamientos	12
B. TRIATOMINOS REDUVIDOS	
1. Descripción	13
2. <i>Rodnius prolixus</i>	14
3. <i>Triatoma dimidiata</i>	15
4. Dinámica de poblaciones	15
5. Métodos de control	16
C. GENETICA DE POBLACIONES	
1. Concepto	18
2. Medición de diferencias genéticas: Theta y Nm	19
3. Detección de la variación genética por la reacción en cadena de la polimerasa	
III. OBJETIVOS	24
IV. HIPOTESIS	25
V. MATERIALES Y METODOS	
1. Diseño experimental	26
2. Polimorfismo RAPD-PCR	

a.	Extracción	28
b.	Amplificación	29
c.	Visualización	30
d.	Construcción de base de datos	
i.	Bandas diagnósticas	31
ii.	Muestras	31
iii.	Control negativo	32
iv.	Calificación de bandas	32
e.	Análisis estadístico	32
B.	Materiales	33
VI.	RESULTADOS	34
VII.	DISCUSION	40
VIII.	CONCLUSIONES	42
IX.	RECOMENDACIONES	43
X.	BIBLIOGRAFÍA	44
	APÉNDICE	50

FIGURAS

	Página
1. Regiones de mayor riesgo de contraer la enfermedad de Chagas	5
2. Diferentes morfologías del <i>Tripanosoma cruzi</i>	7
4. Ciclo de vida del <i>Tripanosoma cruzi</i>	9
5. Bandas diagnósticas para <i>T. dimidiata</i>	35
6. Bandas diagnósticas para <i>R. prolixus</i>	37
7. <i>Rhodnius prolixus</i>	64
8. <i>Triatoma dimidiata</i>	64
9. Gel de agarosa de la amplificación de muestras	71
10. Gel de agarosa de la amplificación de muestras	72
11. Lugares de colecta para el estudio de genética de poblaciones de <i>Triatoma dimidiata</i> y <i>Rhodnius prolixus</i>	73

CUADROS

	Página
1. Tamaño molecular de las bandas diagnósticas para <i>Triatoma dimidiata</i> con el iniciador de reacción OPB18	36
2. Tamaño molecular de bandas diagnósticas para <i>Triatoma dimidiata</i> para OPA08	36
3. Bandas diagnósticas para <i>R. prolixus</i> utilizando OPA08	38
4. Heterogeneidad genética y migración efectiva para poblaciones de <i>Triatoma dimidiata</i>	39
5. Heterogeneidad genética y migración efectiva para poblaciones de <i>Rhodnius prolixus</i>	39
6. Resultados de amplificación con PCR de muestras de <i>Triatoma dimidiata</i> .	50
7. Resultados de amplificación con PCR de la especie <i>Rhodnius prolixus</i> .	58
8. Grupos de Tituque y Tuticopòte, Olopa Chiquimula	69
9. Distribución de grupos en Las Palmas	69
10. Distribución de grupos en Sabanetas	70

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen alrededor 18 millones de personas infectadas con la Enfermedad de Chagas y 100 millones de personas en riesgo de contraerla (OMS, 1998). Esta enfermedad, también conocida como tripanosomiasis americana, es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, y transmitida comúnmente por las chinches hematófagas o triatóminos. Los principales vectores en Guatemala son: *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. En la reunión realizada en Tegucigalpa, Honduras en 1997 y patrocinada por Tropical Disease Research/World Health Organization, se dió a conocer que el 34% de la población total de Guatemala está en alto riesgo de infección.

Como primer línea de ataque para la erradicación de la enfermedad, los programas para el control de la enfermedad de Chagas están orientados hacia la eliminación del vector domiciliado, por medio de insecticidas de acción residual aplicados en domicilios. La importancia del vector en la transmisión de la enfermedad radica en la efectividad de infestar con cierta facilidad los lugares de habitación de los humanos. Es por esto que en noviembre de 1995, como parte de un estudio piloto, se rociaron casas de las aldeas Tituque y Tuticopote, municipio de Olopa, departamento de Chiquimula, con dos insecticidas de acción residual: cialotrina y propoxur. Se colectaron chinches antes y después de la fecha de rociamiento. Además se colectaron chinches en dos aldeas que no fueron rociadas con insecticida: aldea Las Palmas, municipio de Olopa, Chiquimula y en la aldea Sabanetas, municipio de Santa Rosa, Santa Rosa.. (Cordón-Rosales, 1998)

La finalidad del presente estudio es contribuir a definir la estructura poblacional de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Para tal efecto se calculó el flujo genético y la frecuencia alélica entre los lugares de colecta. Los marcadores altamente polimórficos generados por la amplificación de ADN al azar por la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) dan la posibilidad

de realizar estos estudios. Además se observó la efectividad de una campaña de rociamiento con insecticida para la eliminación de ambos vectores: *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, concluyendo que *Rhodnius prolixus* es una especie genéticamente más homogénea que *Triatoma dimidiata* y por lo tanto más susceptible a campañas de eliminación por insecticidas.

II. ANTECEDENTES

A. ENFERMEDAD DE CHAGAS

1. Descripción, distribución e incidencia

El médico brasileño Carlos Chagas en 1909, descubrió los hechos etiológicos, clínicos, epidemiológicos y parasitológicos de lo que más tarde se conocería como la enfermedad de Chagas (Aguilar, 1997). Chagas no sólo se limitó a éstos descubrimientos, sino que identificó algunos vectores y dedujo notablemente la mayor parte del ciclo de transmisión del *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad (Schofield, 1994; Aguilar, 1997; Fife, 1977).

La enfermedad de Chagas también es conocida como Tripanosomiasis americana. Es una zoonosis y esta distribuida a lo largo del continente americano abarcando desde la parte meridional de los Estados Unidos, pasando por México y Centroamérica hasta llegar al sur de Argentina (Market et al, 1990). Se ha reportado la presencia de insectos vectores (redúvidos) además de animales domésticos y silvestres que sirven como reservorios del *Trypanosoma cruzi* en lugares como Maryland,, Estados Unidos (Aguilar, 1997).

Si bien los datos básicos sobre prevalencia y morbilidad de la enfermedad de Chagas mejoraron en calidad y cantidad durante la década de los ochenta, aún es difícil establecer con precisión la distribución geográfica y prevalencia de la enfermedad. Las investigaciones están encaminadas a obtener los datos exactos al respecto (OMS, 1998).

Del total de 360 millones de personas que habitan los países endémicos al menos el 90 millones están en alto riesgo y entre 16 a 18 millones de personas están infectadas. Cabe mencionar que la prevalencia e incidencia de la enfermedad, como también la mortalidad debida a la misma, varían como

consecuencia de la migración poblacional, la ejecución de programas de control y cambios en las condiciones socioeconómicas, entre otros factores (OMS, 1998)

2. Actualidad en Guatemala

En 1932, un profesor del Instituto de Enfermedades Tropicales de Hamburgo, el doctor Reichenow, fue el primero en hacer una descripción detallada de la presencia del *Trypanosoma cruzi* tanto en los insectos vectores como en los humanos. A partir de los estudios de profesor Reichenow, se comenzó a desarrollar un interés por conocer más a fondo las formas de transmisión y como consecuencia el probable control de dicha enfermedad en Guatemala (Montenegro, 1943).

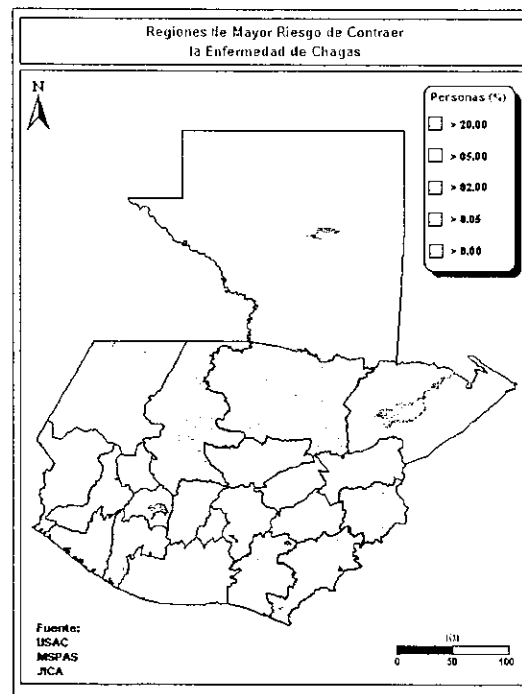
En diciembre de 1951 vino a Guatemala el distinguido médico venezolano Doctor Luis Manuel Peñalver, el cual hizo una enorme aportación a lo largo de los años para un mejor entendimiento de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Peñalver publica varios folletos y artículos científicos acerca de la historia de la enfermedad en nuestro país, además de tener un gran poder de divulgación acerca de la situación, en ese entonces, de la enfermedad. Otros de los aportes del Doctor Peñalver son los estudios terapéuticos realizados en animales de laboratorio utilizando difosfato de cloroquina, perimethamina y eritromicina. (Aguilar, 1997)

Actualmente, los departamentos de más riesgo para contraer la enfermedad de Chagas, con respecto a la presencia de vectores son: Chiquimula, en donde casi el 20% de las chinches están infectadas con *Trypanosoma cruzi*, lo cual da como resultado un porcentaje alto de personas infectadas con la enfermedad en este sector del país (Ministerio de Salud Pública, 1998).

Luego esta Santa Rosa con un 16% de presencia de vectores de las cuales 27% tienen presente el parásito, Jutiapa 30% y 9.5%; Alta Verapaz 19 y 3.8% respectivamente, seguidos de Zacapa, Baja Verapaz y Quiché (Ministerio de Salud Pública, 1998).

En un estudio realizado en el oriente de Guatemala, se ha registrado un índice de infestación domiciliar de triatóminos en un 31% con una tasa de infección de 34-42% para *Triatoma dimidiata* y entre 19 y 20% para *Rhodnius prolixus* (Cordón-Rosales, 1998).

Figura 1. Regiones de Mayor Riesgo de Contraer la Enfermedad de Chagas



(Tabarú et al, 1999)

3. Parásito causante

El agente causante de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi*. En general los tripanosomas son hemoflagelados de la familia

Trypanosomidae que viven en la sangre y tejidos de los hospederos vertebrados. La estructura básica del *Trypanosoma brucei* es característica para la familia *Trypanomastidae* (Fife, 1977). La posición taxonómica del *Trypanosoma cruzi* es:

FILO: Protozoa
 SUBFILO: Sarcomastigofora
 ORDEN: Kinetoplastida
 SUBORDEN: Trypanosomatina
 GENERO: *Trypanosoma*
 SUBGENERO: *Schizotrypanorum*
 ESPECIE: *Trypanosoma cruzi*

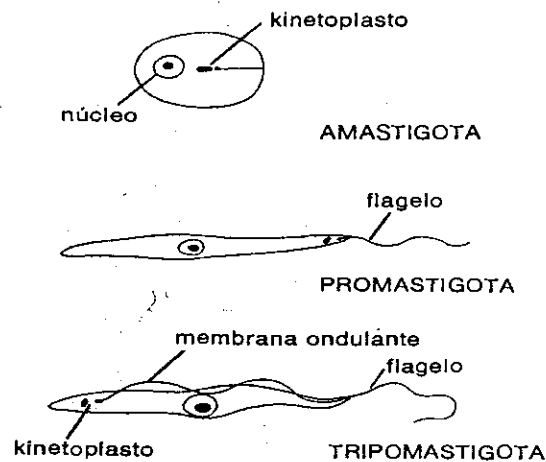
El ciclo de vida involucra dos hospederos (insectos y mamíferos) y la forma de transmisión incluyen dos mecanismos directos. El *Trypanosoma cruzi* se transmite a través de la contaminación de la picadura, abrasiones o conjuntiva, con las heces del vector lo que lo diferencia de *T. rangeli*, el cual es transmitido por medio de secreciones salivares del insecto al momento de picar (García and Bruckner, 1998).

El tripanosoma puede tener tres formas definidas: amastigote, promastigote y tripomastigote. Depende de la etapa del parásito, así será el grado de infección del hospedero. El tripanomastigote metacíclico es el estado infeccioso (Fife, 1977)

Adentro del cuerpo humano, el amastigote tiene una forma esférica u oval y no tiene flagelo definido. Es un estadio que se encuentra generalmente dentro de las células pero al romperse la membrana de dicha célula, pasan al torrente sanguíneo. En los promastigotes, el kinetoplasto (que le sirve como mitocondria) Esta localizado en la parte anterior del núcleo. En este estadio ya existe presencia de flagelo y tienen una forma alargada. La presencia de una

membrana ondulante y flagelo bien definido, es característico del tripomastigote. Este estadio del *Trypanosoma cruzi*, es el que lleva la infección a todo el cuerpo. El kinetoplasto está en la parte posterior y es aquí donde se produce toda la energía para el correcto funcionamiento del organismo (Fife, 1977).

Figura 2. Diferentes morfologías del *Trypanosoma cruzi*



(García and Bruckner, 1998)

Una diferencia importante entre los mitocondrias de las formas presentes en la sangre del hospedero y las que están en el intestino del vector, es que en los primeros la mitocondria es de tamaño pequeño mientras que en las segundas es mas grande. (Raad and Seed, 1977).

Esta característica morfológica es importante en la diferenciación de los estadios del parásito. El ciclo de vida comienza cuando el insecto redúvido, vector de *T. cruzi*, pica al vertebrado y defeca cerca de la picadura. La irritación de la picadura induce al vertebrado a rascar esta área, lo cual permite la penetración del parásito a través de las abrasiones. El *T. cruzi* está presente en las heces de los redúvidos, pero no son los únicos insectos donde se puede desarrollar. La importancia de los redúvidos en la transmisión de la enfermedad

radica en que ellos pueden infestar con cierta facilidad los lugares de la habitación de los humanos (Market et al, 1990).

La forma en que el *T. Cruzi* ingresa al torrente sanguíneo es la de tripomastigote metacíclico, la cual tiene la capacidad de llevar la infección a todo el cuerpo pero no la de reproducirse. Esta forma al entrar a las células (principalmente la del sistema reticuloendotelial, músculo cardíaco, músculo esquelético, músculo suave) pierde el flagelo y la membrana ondulante y por fisión binaria forma un amastigote (García and Bruckner, 1998).

El amastigote continúa dividiéndose por fisión binaria hasta que por fin destruye a la célula hospedera. Cinco días después de la invasión de la célula hospedera, un número definido de amastigotes se convierten en tripomastigotes maduros, los cuales circulan por la vía sanguínea (Fife, 1977)

Al ser ingeridos por la chinche, los tripomastigotes se convierten en epomastigotes y, entre dos y cuatro semanas después de la infección se convierten en tripomastigotes metacíclicos la cual es la forma mas infectiva del parásito. Estas formas infectivas son excretadas con las heces y posteriormente transmitidas a los mamíferos hospederos (Fife, 1977)

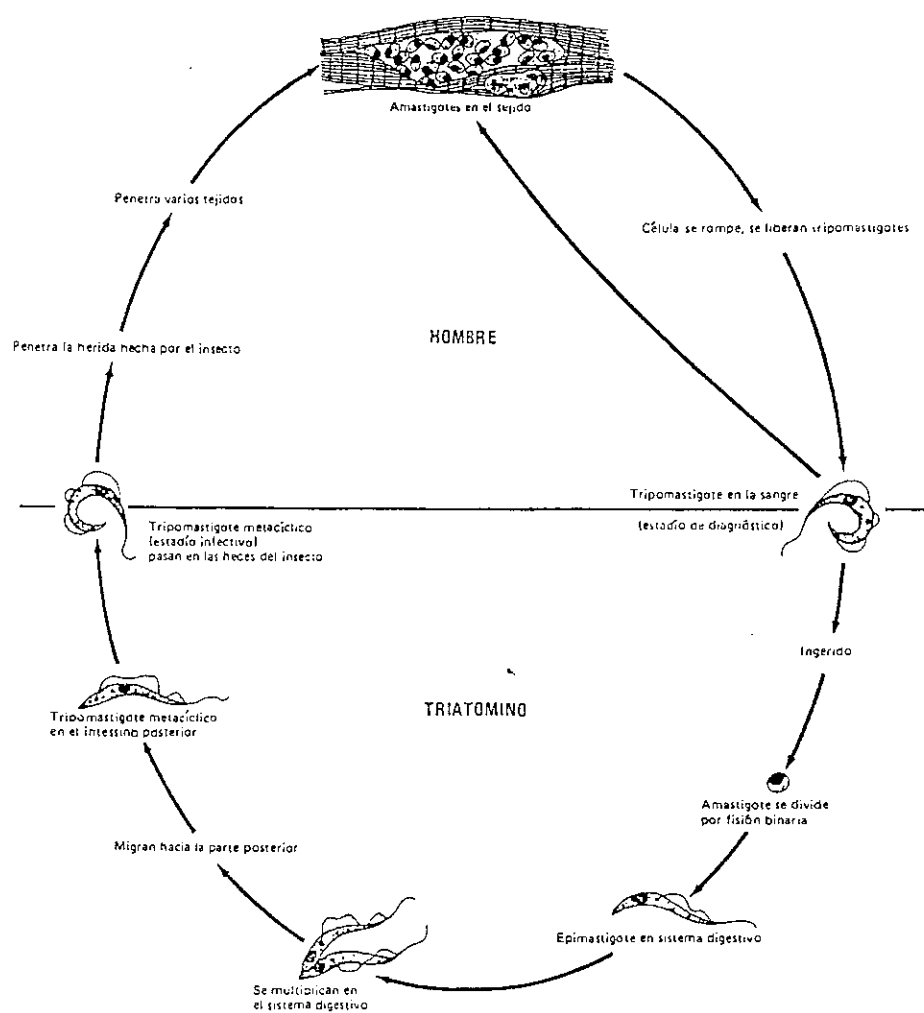
4. Transmisión, sintomatología y diagnóstico

Como anteriormente se ha mencionado, la principal forma de transmisión de la enfermedad de Chagas es por vectores (mayor de 80%) (Schofield, 1994). Pero existen otras formas de transmisión, entre ellas: transplante de órganos, transfusiones de sangre, transferencia de placenta y por ingestión accidental de reduvidos (García and Bruckner, 1998). Entre estas últimas la más importante es la segundo con un 16% de casos reportados (Schofield, 1994).

La prevalencia de la enfermedad en donantes de sangre en toda Centroamérica, hace que esta sea una forma importante de adquirir la

enfermedad. En países como Guatemala, Nicaragua, Honduras y El Salvador se han encontrado cifras de entre 5.2% hasta 28.0% de sangre infectada en bancos de sangre. Aunque en Belice, Panamá y Costa Rica se tienen índices menores de infección por transfusión de sangre, es una forma de transmisión importante. Es por esta razón que existen cada vez mas pruebas rigurosas de tamizaje sobre los donantes de sangre (Ponce, 1995).

Figura 4. Ciclo de vida del *Tripanosoma cruzi*



(OMS, 1998)

En relación a la forma de transmisión por vía congénita se tiene muy poca información. En un estudio en Honduras se observó a los recién nacidos de 107 mujeres embarazadas que tenían pruebas serológicas positivas, y se concluyó que cinco de estos recién nacidos resultaron positivos (Ponce, 1995)

En Guatemala también está comprobada la transmisión vía congénita. En un estudio realizado en Chiquimula, se colectaron 593 sueros de madres que asistieron al hospital a dar a luz y 600 sueros de neonatos. Del total de madres que asistieron al hospital a dar a luz, el 0.7% presentaron anomalías clínicas en el momento de parto y el 9% de los neonatos presentaron anomalías y signos sugestivos de infección congénita (Matta, 1992)

En el área centroamericana la enfermedad de Chagas es muy común en niños menores de cinco años y en ellos es donde predominan los síntomas que afectan el sistema nervioso central. Existen tres períodos de la enfermedad

- Período de incubación
- Período agudo
- Período crónico

(Fife, 1977)

El período de incubación dura entre 4 a 10 días después de la infección con el *Trypanosoma cruzi* y no existe una manifestación de síntomas solamente de molestias leves. Es en este período donde los amastigotes comienzan a reproducirse dentro de las células hospederas (Aguilar, 1987; Fife, 1977; Schofield, 1994)

En la fase aguda los primeros síntomas de la infección aparecen entre cuatro y diez días después de la infección, inclusive más. Los síntomas

principales de la fase aguda son: dolores de cabeza, cansancio, fiebres que puede llegar hasta 40°C, malestar general, escalofríos y dolores musculares. (Fife, 1977; Market et al, 1990)

A menudo aparece un pequeño edema llamado chagoma en el punto de entrada del parásito, el cual si aparece cerca del ojo produce una hinchazón ocular unilateral denominada signo de Romaña. La mortalidad durante este período puede ser entre un 10 a 15% en ciertas regiones y parece ser una función de cierto punto de la cepa particular del parásito (Schofield, 1994; Aguilar, 1997)

La fase crónica comienza después de dos a cuatro meses de la infección, pero sus síntomas pueden llegar a manifestarse hasta 10 o 20 años después del ingreso del *Trypanosoma cruzi* en el humano. El síntoma mas común de esta etapa es la cardiomiopatía y se pone de manifiesto con una cardiomegalia. Comienza con fallas en el corazón hasta la pérdida de la función cardiaca. En ciertas áreas del Sur de América, otra característica importante en este período crónico es la patología del esófago y el colón (Fife, 1977; Schofield, 1994).

La aparición del signo de Romaña es señal que el paciente se ha infectado con el *T. cruzi* y bastaría con aspirar los amastigotes y tripomastigotes del chagoma, aunque no se debe confundir con las lesiones producidas por las reacciones alérgicas como respuesta a las picaduras de insecto. (Garcia and Bruckner, 1998)

El tripomastigote puede ser detectado fácilmente en niños pequeños, pero en adultos es un poco mas complicado. Básicamente el diagnóstico de la enfermedad se efectúa por medio de la microscopía, aunque la observación de los síntomas propios de la enfermedad pueden llevar a un diagnóstico rápido. (Garcia and Bruckner, 1998)

Las técnicas para detectarlos microscópicamente son la de gota gruesa y frote, además del método de Strout, el cual consiste en dejar coagular la sangre colectada, se centrifuga, colectando el suero y se hace una tinción con Giemsa que puede detectar tanto a los tripomastigotes como a los amastigotes. Una técnica que no está ampliamente difundida pero tiene alta sensibilidad y especificidad es la de la reacción de la polimerasa en cadena (por sus siglas en inglés PCR) (García and Bruckner, 1998)

Existen otros métodos para la detección de infección con *Trypanosoma cruzi*, entre ellos: inmunodetección de anticuerpos contra el tripomastigote por el ensayo inmunoabsorbente de enzima conjugada (en inglés ELISA). El xenodiagnóstico es otra prueba que detecta *Trypanosoma cruzi* en vertebrados y consiste en la picadura de ninfas domésticas no infectadas a un vertebrado que se cree está infectado. Luego en un mes se examinan las ninfas para saber si están infectadas con el *T. cruzi*. (García and Bruckner, 1998)

5. Tratamientos

Aunque han sido probadas muchas drogas, incluyendo aquellas usadas para la tripanosomiasis africana y leishmaniasis, ninguna ha sido eficaz en la cura de la enfermedad (García and Bruckner, 1998). En los principios de los noventa, el único tratamiento efectivo en fases aguda y crónica temprana, era un derivado de la nitrofurilidina Bayer 2502. Este compuesto inhibe el desarrollo intracelular de *T. cruzi*, y se puede administrar durante un período prolongado, aunque es mejor tolerado por los jóvenes que por lo de mayor edad. (Market et al, 1990).

La generalidad es que el tratamiento farmacológico, tiende a disminuir su eficacia de una curación parasitológica a medida que se alarga el tiempo entre la infección y la administración de dicho tratamiento. Entre los compuestos que tienen buenas oportunidades de tener éxito durante la fase aguda está el

nifurtimox y el benznidazol. Ya en la fase crónica estos medicamentos raramente o nunca llevan hacia la eliminación del parásito. (Schofield, 1994)

Es importante mencionar que si bien existen tratamientos que no llevan a la curación parasitológica durante la fase crónica, si se puede usar drogas que lleven al alivio de ciertas dolencias tales como la administración de antiarrítmicos y/o vasolidadores para tratar de mejorar las dolencias cardiacas, la implantación de marcapasos e intervenciones quirúrgica. (Schofield, 1990) Muchos pacientes en fase crónica pueden recibir terapia de apoyo. (García and Bruckner, 1998).

B. TRIATOMINOS REDUVIDOS

1. Descripción

El *T. cruzi* y sus vectores están ampliamente difundidos a través de todo el continente americano. Se ha reportado la presencia de *T. cruzi* en 60 diferentes especies de triatóminos tanto en ambientes silvestres como en domiciliarios (Schofield, 1994) Una característica que unifica los 14 géneros de triatóminos es su capacidad de ser hematófagos y las adaptaciones asociadas con su hábitat (Stothard et al , 1998)

En América Central se han reportado 14 diferentes especies de triatóminos. Muchos tienen un hábitat silvestre y sin alguna incidencia epidemiológica. Existen tres especies de triatóminos que tienen importancia vectorial en el área centroamericana: *Rhodnius prolixus*, el cual esta restringido en áreas de Guatemala y Honduras así como el sur de México, además de parte de El Salvador y Nicaragua. Otra especie es *Triatoma dimidiata* el cual está ampliamente distribuido en América Central y el sur de México, además de Colombia, Ecuador y el norte de Perú; por último esta *Rhodnius pallescens* que es un vector importante en Panamá (Schofield, 2000; Zeledón, 1995; Ponce, 1995)

2. *Rhodnius prolixus*

Evidencias recientes sugieren que *R. prolixus* se originó en Venezuela. Se encuentran en áreas rurales y domésticas en Venezuela y Colombia, al igual que en el sur de México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua y el norte de Costa Rica. Nunca han sido encontrados en el sur de Costa Rica ni en Panamá. Esta discontinuidad geográfica fue posiblemente debido a un accidente. La explicación de Rodrigo Zeledón, científico costarricense, sugiere que *R. prolixus* de América Central provino de América Central provino de Venezuela. La reconstrucción histórica dice que unos especímenes de Venezuela fueron donados al laboratorio de un científico centroamericano, algunos de los cuales escaparon invadiendo lentamente los países vecinos. (Schofield, 2000)

R. prolixus puede realizar su desarrollo desde el huevo hasta el adulto de 3 a 4 meses y puede alcanzar densidades de población altísimas en las casas (Schofield, 1994). Las características que lo hacen un vector epidemiológicamente importante son: su ciclo de vida más corto, mayor agresividad y eficacia como transmisor. Esto hace que exista una mayor incidencia de la enfermedad en los países donde esta presente esta especie. (Zeledón, 1995)

Esta especie es un vector que se adapta mejor al domicilio humano, en relación a otras especies y tiene preferencia por los ranchos de paja o palma, con paredes de caña o tablas y con marcada tendencia a vivir en los techos. Esta característica lo hace mejor vector en comparación con *Triatoma dimidiata*. (Ponce, 1995). Ver foto en apéndice B.

A nivel de ADN, *R. prolixus* tiende a ser muy homogéneo en Centroamérica, en comparación con poblaciones de la misma especie de América del sur. Esta característica convirtieron a *R. prolixus*, genéticamente

restringido y de esta forma altamente vulnerable a cambios de hábitat y a intervenciones de erradicación. (Schofield, 2000; Dujardin et al, 1998)

3. *Triatoma dimidiata*

A diferencia de *R. prolixus*, parece ser que esta especie es nativa de la región centroamericana y es muy heterogénea. Se han encontrado en hábitat silvestres muy variados y en altitudes entre el nivel del mar y arriba de los 1500 metros (Schofield, 2000). Es una especie de gran tamaño y de colorido variado. (Schofield, 1994)

Es un vector importante de la enfermedad de Chagas en América Central, donde a menudo su distribución coincide con la de *R. prolixus*. *T. dimidiata* prefiere viviendas con piso de tierra, frecuentemente de paredes de barro o madera, ya que las ninfas encuentran un buen refugio en los pisos, al camuflarse cubriéndose de polvo ellas mismas (Ponce, 1995)

T. dimidiata ha sido encontrada en casas y dependencias peri domésticas del sur de México, en todos los países de Centroamérica, Colombia, Ecuador y ciertas partes de Venezuela. Ha sido encontrada tanto en áreas peri urbanas como urbanas. Aunque las poblaciones son raramente muy numerosas, puede ser encontrada en ladrillos, leña y otros lugares donde los animales domésticos descansan (Schofield, 2000). Ver foto en apéndice B.

4. Dinámica de poblaciones

Las chinches triatóminas tiene un ciclo de vida mas largo y una tasa de reproducción menor a la de otros insectos de importancia médica (Schofield, 1994). Se les conoce como estrategias K, ya que la población alcanza la densidad máxima que puede ser sostenida por un ambiente estable como el nido de un mamífero o la casa de un ser humano, a diferencia de los estrategias

r (los mosquitos) que tienden a tener una mayor densidad cuando las condiciones les favorecen (Schofield, 1998)

La regulación natural en el tamaño de las poblaciones de triatominos esta mediada por una interacción dependiente de la densidad de sus huéspedes vertebrados. Al aumentar la población de chinches, generalmente el número de vertebrados se mantiene fijo, con lo cual los huéspedes se irritan fácilmente, logrando con esto que las chinches interrumpan su alimentación antes de rellenarse. (Schofield, 1998).

Las consecuencias de la competencia por la sangre de los huéspedes son: las hembras emergen más lentamente, ya que existe una disminución de la velocidad linfática y por consiguiente, de las etapas siguientes; al tener menos sangre las hembras depositan menos huevos; la reducción de la fuente de sangre hace que los adultos inicien un vuelo dispersivo (Schofield, 1998; Schofield, 1994)

5. Métodos de control

El control de la enfermedad de Chagas es una de las prioridades de los gobiernos latinoamericanos debido al gran impacto médico, social y económico en cada país. El control sobre los vectores cobra mayor importancia al no existir métodos eficaces para el tratamiento de la enfermedad y los que existen son muy costosos y tienen efecto solamente en fases tempranas de la infección. La transmisión en cambio, puede ser detenida mediante la eliminación de las poblaciones domésticas de los vectores, además de tener controles mas estrictos sobre los exámenes de sangre que es utilizada para transfusiones. (OMS, 1998)

Según Schofield (2000), los métodos básicos de control del vector involucran reconocimiento geográfico para identificar las áreas afectadas; el uso

de insecticidas de efecto residual para eliminar las poblaciones domésticas y las peri domésticas; y una vigilancia permanente con intervenciones selectivas, de ser necesario. Todo el personal debe ser capacitado para llevar a cabo estas tareas.

El reconocimiento geográfico, ayuda a identificar las áreas que necesitan mayor intervención. Es importante contar con personal técnico capacitado para que visiten las localidades donde existe o se tiene la sospecha que existen en estos insectos (Schofield, 2000)

En cuanto al rociamiento con insecticidas de efecto residual, las poblaciones domésticas de triatóminos puede ser eliminados efectivamente. (Schofield, 2000) Con el desarrollo de los insecticidas sintéticos en los años 40, los métodos químicos se han convertido en el arma mas eficiente para eliminar el vector. El insecticida DDT parece tener algún efecto latente en *R. prolixus* (Dias, 1995)

En la década de los ochenta, se utilizaron los piretroides. (Dias, 1995) Los primeros compuestos piretroides utilizados fueron permetrina y deltametrina, los cuales fueron mas efectivos en menor dosis comparados con otros insecticidas. Ahora existen otros compuestos piretroides: cipermetrina, ciflutrina y lambdacialotrina (Schofield and Dujardin , 1997)

En 1969 unos investigadores venezolanos detectaron la resistencia a algunos insecticidas en *R. prolixus* y *T. maculata*. (Schofield and Dujardin, 1997) En campañas de fumigación en Latinoamérica se ha encontrado un efecto positivo de los insecticidas piretroides sobre la eliminación de los triatóminos, pero en subsecuentes inspecciones de domicilios que fueron rociados, se encontró una aparente reinfestación, involucrando dos posibles fuentes: los triatóminos sobrevivieron al tratamiento con insecticida; los

insectos migraron desde lugares no rociados desde afuera hacia adentro de la casa rociada (Schofield, 2000)

La vigilancia epidemiológica se ha convertido en la más importante fase de los programas de control de vectores. La vigilancia se lleva a cabo en forma pasiva o activa. La activa, como en el reconocimiento, se lleva a cabo por personal técnico para buscar triatóminos en las casas rociadas. La pasiva incluye a los habitantes de las casas y hace que reporten la presencia de un triatómino después del rociamiento. Una mezcla de ambas formas suele ser más efectiva. (Schofield, 2000)

C. GENETICA DE POBLACIONES

1. Concepto

La genética de poblaciones involucra varios conceptos a definir: el gen, en términos generales, es la entidad física transmitida de padres a hijos durante el proceso reproductivo. Todas las variantes de el gen, que no es necesariamente la forma norma, son llamados alelos (Hartl, 1988)

Dentro de una célula viva, existe un ordenamiento de genes a lo largo de cuerpos microscópicos en forma de hilos, llamados cromosomas. Cada gen tiene una posición definida a lo cual se le denomina locus. En organismos diploides, cada célula contiene un par de copias de cromosomas, uno es heredado de la celular de la madre y otro de las células del padre. El locus de cada individuo normal debe contener exactamente dos alelos (debido a que provienen de la madre y el otro del padre). Si dos alelos en un locus tienen secuencia de nucleótidos iguales, se dice que el individuo es homocigoto en dicho locus. Si no tienen la misma secuencia se dice que es heterocigoto (Hartl, 1988)

La genética de poblaciones es el estudio de la variación genética en una población y del los factores que causan dicha variación. La genética de

poblaciones es una área crítica del estudio de la biología de los vectores. Entendiendo la variación genética en la población de vectores se puede comprender mejor la función del vector en la epidemiología de cierta enfermedad (Beatty and Marquadt, 1996)

Un concepto importante es el de población, la cual se refiere a un grupo de individuos de la misma especie que viven en un área geográfica restringida y en la cual el apareamiento entre cualquier miembro es posible. A esto se le llama población (Hartl and Clark, 1989)

Para medir la variación genética entre diferentes poblaciones es necesario contar con ciertas herramientas estadísticas. Una de ellas es la frecuencia alélica que compara las diferentes formas de un gen en las poblaciones. Entonces la frecuencia alélica entre un grupo de individuos es la proporción de cada alelo de un gen presente en dicha población (Hartl and Clark, 1989)

Cuando ya se tiene caracterizado una muestra de individuos de una población por medio de la variación de cualquier locus, es posible calcular la frecuencia tanto genotípica en ese locus como la frecuencia de alelos en la población. La idea de frecuencia alélica apoya la noción de polimorfismo, un gen que tiene una frecuencia alélica arbitraria por debajo de 0.95 se dice que es polimórfico, mientras que un valor mayor de éste número, al gen se le llama monomórfico (Hartl and Clark, 1989)

2. Medición de diferencias genéticas: Theta y Nm

Una forma de medir la similaridad entre individuos, es el índice de correlación de Wright (Apostol et al, 1993). Se define el índice de Θ_{st} (Theta) como "la correlación entre gametos dentro de una subpoblación con respecto a los gametos dentro de la población total" (Hartl and Clark, 1989). El theta es positivo donde existe flujo genético restringido entre subpoblaciones debido a

que los gametos de una subpoblación comparten alelos que son mas derivados de un ancestro común que de gametos de la población total (Tabachnick and Black IV, 1996)

Existe una gran variedad de métodos de medición para el índice Theta, pero solamente tres de ellos pueden medirlo sin información de frecuencia homocigotas. Los métodos son: de Wright, Weir and Cockerham y Lynch & Milligan. Weir and Cockerham describen la medida Θ_{st} (theta st): la cual estima la correlación entre individuos dentro de una subpoblación a través de un análisis de varianza de la frecuencia de alelos. En el caso especial cuando ambas tamaños de muestras n y el número de subpoblaciones estudiadas d_s , la estimación de Θ_{st} (theta st) puede ser reducido a:

$$\Theta_{st} = \frac{\sum_j n_j (p_j - p)^2}{(d_s - 1) n p (1 - p)}$$

donde p_j y n_j son las frecuencias observadas y el tamaño de la de la j -ésima población y p y n son los promedios de la frecuencia de alelos y el tamaño de la muestra de la población entera. De esta ecuación puede verse que como las frecuencias de los alelos en la subpoblación divergen, el valor de numerador tiende a incrementarse y el valor de Θ_{st} se aproximará a uno. Si se analizan subpoblaciones y el valor de Theta es muy cercano a cero, esto sugiere que la diferencia genética entre éstas es muy poca. Por el contrario, si el valor obtenido del índice es muy cercano a 1 entonces las subpoblaciones son muy diferentes entre sí. El índice Θ_{st} se utiliza para el estudio de poblaciones con un número distinto de individuos (Apostol et al, 1995)

El otro parámetro que sirve para definir la estructura poblacional de las poblaciones en general, es el Nm o número de migrantes total y este puede ser derivado directamente del valor de Theta. La fórmula es:

$$Nm = \frac{(1 - \Theta_{st})}{4 \Theta_{st}}$$

Y es necesaria poca migración para mantener la homogeneidad genética entre subpoblaciones. Mientras mas grande es el Nm, existe una mayor migración entre individuos de las subpoblaciones analizadas. (Apostol et al, 1995)

3. Detección de variación genética por la reacción en cadena e la polimerasa

Una técnica que se basa en la amplificación del ADN al azar es la llamada amplificación de ADN polimórfico al azar por la reacción de la polimerasa en cadena (por sus siglas en inglés RAPD-PCR). Esta técnica utiliza únicamente un oligonucleótido iniciador de 10 bases con una secuencia al azar y contiene un mínimo del 60% de contenido de guanina-citosina. También tiene una temperatura de hibridación entre 37°C a 40°C lo cual permite que el iniciador de la reacción en cadena de la polimerasa se una a regiones arbitrarias del genoma (Beatty and Marquadt, 1996; Apostol et al, 1993; Langsdorf, 1999; Old and Primrose, 1994)

La gran mayoría de polimorfismos obtenidos por esta técnica se segregan como dominantes. Esto quiere decir que el genotipo de un individuo heterocigoto con productos amplificados provenientes de un cromosoma no puede ser distinguido de productos que provengan de ambos cromosomas de un homocigoto (Apostol et al, 1996)

Entre las ventajas de esta técnica de amplificación al azar es que no requiere de información de la secuencia de ADN del organismo en estudio, contrario a la amplificación específica, ni tampoco el diseño de iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa, que resulta ser muy costoso. Tampoco utiliza marcadores radiactivos y los cambios genéticos pueden ser visualizados en un corto tiempo desde la extracción del material genético. Todas estas ventajas hacen que la técnica sea considerada con un bajo costo económico y con un alto grado de simplicidad en su ejecución si es comparada con otras técnicas de biología molecular aplicadas a la genética de poblaciones. (Pan, 1997)

Existen limitaciones que conlleva el uso de esta técnica. Todos los marcadores polimórficos son dominantes. Esto significa que cuando el fenotipo de un individuo que es analizado por RAPD-PCR es homocigoto o heterocigoto para secuencia amplificable, se produce un fragmento de un peso molecular específico. En cambio, cuando un individuo es homocigoto recesivo, no se produce el fragmento. Lo anterior presenta un problema para los estudios de genética de poblaciones ya que se asume que las poblaciones en estudio están en equilibrio, esto para determinar la frecuencia de los alelos recesivos dentro de las poblaciones. (Beatty and Marquadt, 1996; Pan, 1997)

La forma más común de separar bandas de ADN es electroforesis con geles de agarosa. La agarosa es extraída de las algas, es un polímero lineal y es preparada calentando una solución de agarosa con una cantidad de solución amortiguadora. La solución fundida es puesta en un molde y se deja polimerizar. (Sambrook et al, 1989)

El principio de la electroforesis es que al aplicar un campo eléctrico a través del gel, el ADN que está cargado negativamente a pH neutro, migra hacia el ánodo (electrodo positivo). Siendo la agarosa una matriz semejante a una

red, es lógico pensar que, según la concentración de agarosa, las bandas que tiene mayor tamaño molecular migrarán mas rápido. (Sambrook et al, 1989)

El método más conveniente para visualizar el ADN en los geles de agarosa es la tinción con el colorante fluorescente, bromuro de etidio. Esta sustancia contiene un grupo plano que se intercala entre las base de ADN. La posición de este grupo y su proximidad a las bases causa que el colorante se adhiera al ADN. Al irradiar el gel con luz ultravioleta, el ADN absorbe dicha irradiación y la transmite al bromuro de etidio. El bromuro de etidio se puede usar tanto para ADN de hebra simple como para el de doble hebra bajo condiciones no desnaturalizantes (Sambrook et al, 1989)

Existe también la electroforesis de poliacrilamida. Básicamente tienen el mismo principio, pero difieren en el componente básico para realizar la separación. La acrilamida es un monómero de en presencia de radicales libres inicia una reacción en cadena en la cual los monómeros de acrilamida son polimerizados en una cadena larga. La ventaja de utilizar un gel de este tipo es que se obtiene una mayor resolución de bandas de ADN, si se compara con los geles de agarosa. Además se puede utilizar la tinción de plata que, aunque sube los costos, es muy sensible a fragmentos de bajo peso molecular de ADN (Sambrook et al, 1989, Carlton et al, 1995).

III. OBJETIVOS

A. GENERAL

- Analizar el efecto de la estructura y la dinámica poblacional de los triatóminos en la eficacia de las medidas de control vectorial

B. ESPECIFICOS

- Analizar la estructura poblacional de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* domiciliados a través de las estimaciones de Theta y Nm, comparando grupos de distinta regiones geográfica y casas distintas.
- Estimar el flujo genético en poblaciones de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, en las aldeas de Tituque y Tuticopote, antes y después del rociamiento con insecticida.

IV. HIPOTESIS

- Existen diferencias genéticas significativas en las poblaciones de *Rhodnius prolixus* dentro de las aldeas como entre las aldeas.
- Existen diferencias genéticas significativas en las poblaciones de *Triatoma dimidiata* dentro de las aldeas como entre las aldeas.

V. MATERIALES Y METODOS

A. METODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el presente estudio se escogieron diferentes lugares de colecta, con el propósito de determinar las diferencias genéticas de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Para una mejor identificación de estos lugares, se definieron tres poblaciones la cuales son mencionadas a continuación:

POBLACIÓN A: comprende la aldeas de Tituque y Tuticopote, municipio de Olopa, departamento de Chiquimula. Tiene una tasa de infestación domiciliar de 45%. Los cultivos predominantes en la localidad son café, los cuales generalmente rodean las casas, banano y maíz. La mayor parte de esta región es utilizada para la siembra de cultivos, pero también otra parte que tiene vegetación tipo sombra y algunos pastizales. En cuanto al tipo de vivienda, muchas casas tienen un techo de palma y pared de bajareque o palo pique, pero también existe un bajo porcentaje de casas cuyo techo es de teja o lámina.

En esta población, las chinches fueron colectadas en el período de febrero de 1994 hasta octubre de 1997. Las primeras colectas se hicieron antes del rociamiento domiciliar, es decir antes de noviembre de 1995. Luego se realizaron capturas de insectos en intervalos de tres a cuatro meses hasta dos años después de la aplicación del insecticida. La figura 11 Apéndice F muestra los lugares de las colectas y su posición geográfica en el mapa de Guatemala.

En ambas aldeas, se roció con dos insecticidas. Para la aldea Tituque, se utilizó el insecticida lambda cialotrina (30mg a. i./m²), mientras que para la aldea Tuticopote se utilizó propoxur (1 g a.i./m²) y en ambos casos el rociamiento de las poblaciones se hizo tanto adentro como en las áreas periféricas de los domicilios.

POBLACION B: incluye la aldea Las Palmas, municipio de Olopa, departamento de Chiquimula. Tiene una tasa de infestación domiciliar del 26% y este valor es correspondiente al 75% de la población ya que se descartaron las casas que tenían techo de lámina y/o teja. La gran mayoría de la población se dedica a la siembra y cultivo de café aunque existe un porcentaje mínimo que se dedica a la crianza de ganado vacuno. Al igual que en la anterior población tiene un tipo de vegetación tipo sombra. Predominantemente existen casas con techo de palma y pared de bajareque. También existe casas con pared de madera o palo de pique. Se encuentra aproximadamente a 4.0 Km. al sur-este de la población A.

POBLACIÓN C: esta incluye la aldea Sabanetas, municipio de Santa Rosa de Lima, departamento de Santa Rosa. En esta población predominan los pastizales ya que las personas se dedican mas a la crianza de ganado vacuno que al cultivo de la tierra. Existe un bosque de coníferas y parte de la tierra es cultivada para la cosecha de maíz. La mayoría de las casas están hechas de teja o lámina en el techo y de adobe en las paredes. Esta población esta separada de la población A aproximadamente 110 Km. hacia el sur y tiene una tasa de infestación domiciliar del 90%.

Para las tres poblaciones definidas anteriormente, se calculó el índice de diferenciación genética Theta y el número total de migrantes Nm, esto con el propósito de determinar y analizar la estructura poblacional de los vectores principales de la enfermedad de Chagas en Guatemala: *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Para las poblaciones B y C, se colectaron insectos en un tiempo comprendido entre noviembre de 1996 y marzo de 1998. En estas poblaciones no se aplicó insecticida alguno y se les denominó grupo control.

Las chinches fueron capturadas en diferentes lugares del domicilio: en las paredes, bajo los colchones de las camas, en el suelo, en techos de bajareque y paja. Se usó la forma de colección llamada hora-hombre la cual consistió en la

revisión de una vivienda por un hombre durante un tiempo definido de una hora. Después de ser capturada la chinche se introdujo en un recipiente de plástico cerrado y luego se trasladó al laboratorio donde se disecó separando la cabeza y patas del tórax. Tanto patas como cabeza se guardaron en un tubo eppendorff de 1.5 ml que contenía etanol al 70% y almacenadas a 4 °C hasta el análisis posterior.

2. POLIMORFISMO RAPD-PCR

A continuación se detalla el procedimiento completo para el análisis de las poblaciones de chinches por RAPD-PCR. NOTA: El detalle de la preparación de las soluciones utilizadas están en el apéndice C.

a. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se tomó en cuenta el peso de cada pata. En promedio se utilizaron tres patas de *Rhodnius prolixus* y una pata de *Triatoma dimidiata*. El criterio utilizado para escoger el número de patas según la especie fue que *R. prolixus* es una morfológicamente mas pequeña que *T. dimidiata* por lo cual se intentó tener una concentración similar de ADN para ambas especies.

Las patas se introdujeron en un tubo eppendorff de 1.5 ml y se agregó 50 µl de solución amortiguadora de lisado a la muestra. Con un pistilo de plástico estéril se maceró la mezcla. Al macerado se le agregó 50 µl de solución amortiguadora de lisado y 1 µl de proteinaza K (0.2 mg/ml). Toda la mezcla se incubó durante toda la noche a 56 °C.

Al día siguiente, se agregó 100 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (en proporción (25:24:1). Se colocaron los tubos en un agitador orbital por cinco minutos. Se centrifugo a 12,000 rpm

durante diez minutos y temperatura ambiente. La fase orgánica de dicha mezcla se descartó y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. A este nuevo tubo se le agregó 100µl de etanol frío al 70% y se centrifugo nuevamente bajo las condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante fue descartado. El sedimento formado en el fondo del tubo, se secó al medio ambiente durante cuatro horas. Luego se resuspendió en 50 µl de solución amortiguadora de Tris-EDTA.

b. Amplificación

Un problema muy común de la técnica de RAPD-PCR es la contaminación cruzada de los reactivos utilizados en ella. Para evitarla se siguió el siguiente procedimiento. El agua destilada desionizada se paso por un filtro de 0.2 micras (Nalgene, New York USA). Luego se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 lbs/plg² durante 20 minutos. Se alicuotó en tubos cónicos estériles bajo una campana de flujo laminar (Marca Forma Scientific, Ohio USA). La preparación de la solución para la amplificación de ADN se hizo adentro de la misma campana de flujo y en proporciones según Apéndice D.

La mezcla total se agitó en un Vortex y luego se alicuotó 23 µl de la mezcla en 20 tubos eppendorff. Para evitar reacciones secundarias, todos los tubos estaban en hielo. Se agregó 2 µl de una dilución 1 µl de ADN en 9 µl de agua destilada desionizada. Se introdujeron las muestras en el termociclador (Genius, Techne, United Kingdom). El programa de amplificación de ADN utilizado fue el que se detalla en el apéndice C.

c. Visualización del ADN

Se preparó un gel de agarosa al 2% en una solución amortiguadora de Tris-ácido acético-EDTA y luego se le agregó bromuro de etidio (concentración 0.2 µg/ml). Se cargó 2.5 µl de solución amortiguadora de

montaje y 12 μ l de producto de amplificación de ADN en cada pozo. En cada gel se corrió un control negativo y dos marcadores de tamaño molecular. La electroforesis se dejó correr durante 6 horas a 3.57 volts por centímetro de gel y 0.05 amperios. Se detectó con luz ultravioleta. Se tomó una foto del gel para la visualización de cada banda (Cámara Fotodyne, Modelo 3-3000, New Berlin, Wisconsin, USA).

En el caso de *R .prolixus* se utilizó geles de acrilamida para el análisis de bandas de ADN con un tamaño molecular por debajo de los 300 pares de bases. Este tipo de polímero tiene la característica de separar de mejor forma las bandas de ADN y una mayor sensibilidad en la detección del material genético, utilizando tinción con plata.

Se utilizó geles marca Bio-Rad. Estos geles fueron corridos en cámaras marca Bio-Rad Mini Transé-blot cell durante dos horas y 45 minutos. La detección se efectuó con el procedimiento de nitrato de plata. El primer paso de la detección fue poner los geles a agitar durante 30 minutos en 200 ml de solución fijadora (60 ml de etanol 100%, 20 ml de ácido acético y 120 ml de agua destilada desionizada) Luego cada gel se lavo se lavo tres veces con agua destilada desionizada, guardando la solución fijadora para parar la reacción final. Se agregó 150 ml de solución de coloración (0.15 g de nitrato de plata, 225 μ l de formaldehído al 37% y 150 ml de agua destilada desionizada) colocándolo por 30 minutos en un agitador orbital. En el último paso se utilizó 150 ml de solución de desarrollar (4.5 de carbonato de sodio, 1.5 μ l de tío sulfato de sodio, 225 μ l de formaldehído al 37% y 150 ml de agua destilada desionizada) La reacción se paró en un tiempo de 8 minutos hasta que apareció la banda de 50 pares de bases en el marcador de tamaño molecular. Se paró la reacción con la solución fijadora.

d. Construcción de bases de datos

El siguiente proceso fue el utilizado para la construcción de las bases de datos en FOX-PRO.

i. Bandas diagnósticas

En el caso de *T. dimidiata* se utilizó dos oligonucleótidos: OPB18 (CCACAGCAGT) y OPA 08 (GTGACGTAGG). Se seleccionaron tres muestras por cada oligonucleótido. A cada banda producida en cada muestra se le llamó banda diagnóstica ya que cada banda sirvió para analizar las bandas presentes en el resto de muestras del estudio. Para el caso del oligonucleótido OPB18 se obtuvieron 15 bandas diagnósticas las cuales estaban dentro del rango de 150 a 1000 pares de base de tamaño. Para OPA 08 se obtuvo 15 bandas diagnósticas todas en un rango de tamaño molecular de 150 a 1500 pares de bases.

Para *R. prolixus*, el análisis se realizó con OPA 08 únicamente ya que este produjo la mejor información acerca de las similitudes entre las muestras analizadas para esta especie. Se seleccionaron 23 bandas identificadas como diagnósticas y sirvieron de referencia para la presencia o ausencia de dichas bandas dentro de las poblaciones y subpoblaciones. El análisis de las bandas que estaban presentes entre 300 y 1500 pares de bases se analizaron con geles de agarosa y entre el rango de 50 a 300 pares de bases se analizaron con geles de acrilamida. En general, existió la tendencia de un mayor número de bandas en *T. dimidiata* que en *R. prolixus*. Según Schofield, 1994, la especie *R. prolixus* es una especie que se adapta más fácilmente a domicilios y no se han encontrado en focos silvestres lo cual es compatible con los resultados en el número de bandas en *R. prolixus* (5.8) que en *T. dimidiata*.

ii. Muestras

Se analizaron 227 muestras de *Triatoma dimidiata* y 163 de *Rhodnius prolixus* provenientes de las tres regiones descritas anteriormente.

Para cada muestra se comparó la presencia o ausencia de las bandas diagnósticas. Por cada grupo de muestras se corrieron 16 muestras, 3 controles de bandas diagnósticas y un control negativo además de dos líneas para marcadores de tamaño molecular.

iii. Control negativo

El control negativo se preparó con los mismos reactivos utilizados para las muestras y controles de bandas diagnósticas. A excepción del resto de muestras, este control negativo se le agregó agua en vez de la dilución del ADN.

iv. Calificación de bandas y construcción de bases de datos

El análisis para generar las base de datos se basó en los datos registrados en las fotos tanto con la detección con luz ultravioleta como con la luz normal para los geles de acrilamida. Se asignó con un valor de uno a las bandas que coincidían con el tamaño molecular de una banda diagnóstica y con un valor de cero a la no presencia de dicha banda en la población analizada. Todos estos valores de cero y uno se ingresaron en una base de datos creada en FoxPro. Estos datos fueron tabulados en un editor de palabras de la computadora, que luego sirvió para ingresar dichos datos a la secuencia de los programas de computación Phyllip y RAPD-Fst. El programa RAPD-Fst fue diseñado por William Black IV y como resultado del ingreso de las bases de datos a dicho programa se obtuvo los valores de heterogeneidad genética (θ) para los niveles de análisis de las poblaciones. Ver apéndice G para muestra de los resultados generados por el programa RAPD-Fst.

e. Análisis estadístico

Se evaluó cinco diferentes niveles de análisis. Los niveles de análisis Casas, agrupamiento de casas, localidad y países fueron dependientes de la

geografía donde se colectaron las muestras. El nivel pre y post rociamiento dependió del tiempo de colecta. Para el nivel casas solamente se tomó en cuenta aquellas casas con un mínimo de tres individuos colectados de la misma especie por cada vivienda y de estos tres individuos, se analizó solamente aquellos con mas de dos polimorfismos detectados. Para el nivel de antes y después del rociamiento se hizo el balance del número de casas, es decir, se tuvo el mismo número de casas antes como después de la campaña de rociamiento con insecticida.

B. MATERIALES

Ver Apéndice E para ver la lista detallada de materiales y aparatos utilizados.

VI. RESULTADOS

A. Muestras analizadas

En el presente estudio, el primero realizado para la determinación de la estructura poblacional de los principales vectores de la enfermedad de Chagas en Guatemala, se analizaron 227 muestras de *Triatoma dimidiata* y 163 muestras de *Rhodnius prolixus*. Las muestras fueron colectadas en el departamento donde existe una alta incidencia de casos de humanos infectados con el *Tripanosoma cruzi*, Chiquimula. Se definieron siguientes niveles de análisis para observar la estructura poblacional en ambas especies:

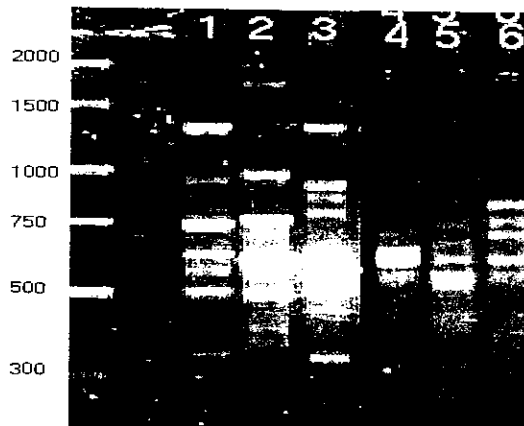
Nivel casas: este nivel se definió para los individuos colectados en la misma casa de habitación. Se tomó en cuenta solamente aquellas casas que contenían como mínimo tres individuos con por lo menos dos polimorfismos distintos detectados. Nivel Grupo de casas: para el caso de *Triatoma dimidiata* se tomaron como casas miembros del mismo grupo, aquellas que entraban en un diámetro de 4 Km. y para *R. prolixus* aquellos que entraron en un radio de 2 Km. Nivel Poblados: en este nivel se incluyeron en el mismo grupo, aquellos individuos que pertenecían al mismo poblado (ya sea Tituque, Tuticopote, Las Palmas y Sabanetas). Nivel Países: en este nivel se incluyeron los individuos que pertenecían al mismo país de origen y por último el nivel antes y después del rociamiento. Este último nivel es el único que dependió del tiempo del que fue colectado cada individuo. El análisis de los de los diferentes niveles dio como resultados las tablas del apéndice F.

B. Bandas diagnósticas

Para el análisis de la presencia o ausencia de polimorfismos en las muestras se escogieron tres muestras de cada especie que presentaron, en conjunto, la mayoría de bandas presentes en el resto de la población. Las bandas diagnósticas se definieron como las bandas presentes en tres muestras escogidas, según criterio anteriormente mencionado, y que sirvieron como referencia para detectar la presencia o ausencia de los polimorfismos en toda la

población. La figura 5 muestra un gel de agarosa para las diferentes bandas diagnósticas de *T. dimidiata*.

Figura 5. **Bandas diagnósticas para *T. dimidiata*.**



Líneas 1, 2 y 3 amplificadas con iniciador OPA08
 Muestras 1) 1-024-D4 2) 4-013-60-D4 3) 1-089-60-D3
 Líneas 3, 4 y 5 amplificadas con iniciador OPB18
 Muestras 4) 1-024-33-D4 5) 4-013-60-D4 6) 1-089-D2

Para un grupo de muestras, se corrió siempre las mismas tres muestras arriba mencionadas para cada iniciador de la reacción de la polimerasa en cadena. Luego se obtuvieron los tamaños moleculares de cada banda diagnóstica de acuerdo a la medida de una regla graduada.

En los cuadros 1 y dos se hace referencia a los tamaños moleculares de las bandas que sirvieron como referencia para la detección de polimorfismos. Como nomenclatura para nombrar a cada banda, se le asignó una letra del abecedario. Asignándole A la mas grande molecularmente y así sucesivamente hasta llegar a la de menor tamaño molecular.

Cuadro 1. **Tamaño molecular de las bandas diagnósticas para *T. dimidiata* con el iniciador de reacción OPB18**

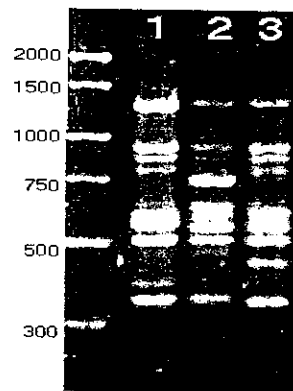
Banda diagnósticas	Tamaño molecular (pares de bases)
A	755
A0	799
A1	895
B	713
C	637
D	569
E	508
F	480
G	441
H	405
I	382
J	341
K	322
L	272
M	260

Cuadro 2 **Tamaño molecular de las bandas diagnósticas para *T. dimidiata* con el iniciador de reacción de la polimerasa OPA08**

Banda diagnóstica	Tamaño molecular (pares de bases)
A	1757
A0	1819
A1	1032
B	985
C	896
D	815
E	742
F	644
F1	586
G	559
H	462
I	452
J	441
K	365
L	332

Para *R. prolixus* se obtuvo 30 bandas diagnósticas analizadas con el iniciador OPA08. Para esta especie se hizo un análisis especial.. En un rango de 340 a 1300 pares de bases se utilizaron las bandas presentes en la muestras con las bandas de referencia. Debajo de 340 pares de base, se usaron geles de acrilamida para tener un mejor sensibilidad al momento de detectar polimorfismos en las muestras.

Figura 6. Bandas diagnósticas para *Rhodnius prolixus*



Para esta especie solamente se utilizó el iniciador OPA08
Muestras 1) 1-024-33-D4 2) 4-013-60-D4 3) 1-089-60-D3

Cuadro 3. Bandas diagnósticas para *R. prolixus* utilizando OPA08

Banda diagnóstica	Tamaño molecular (pares de base)
A	1235
B	1183
B1	1133
B2	996
C	914
D	839
E	804
F	706
F1	677
G	648
H	621
I	546
J	501
K	340

C. Estructura poblacional

Se extrajo ADN de las patas de las chinches ya que es un tejido que esta libre del contacto con la sangre del hospedero (García et al, 1998). El ADN extraído fue amplificado por la técnica RAPD-PCR lo cual dio como resultado que los productos finales se segregaran como dominantes. Luego de analizados todos los productos. En este estudio se tomó el índice de heterogeneidad genética Θ_{st} en vez del índice F_{st} , debido que el primero es el índice correcto para el caso de nuestro estudio, es decir, con un número de individuos diferentes para cada nivel de análisis. En el caso de *Triatoma dimidiata* se estimó la heterogeneidad genética (Θ) y el índice de migración efectiva ($Nm(\Theta)$), los cuales se muestran a en el cuadro 4.

Cuadro 4. Heterogeneidad genética y migración efectiva para poblaciones de *Triatoma dimidiata*

Nivel de análisis	No. de triatóminos	No. de grupos	Heterogeneidad Genética (Θ)	Migración efectiva $Nm(\Theta)$
Casas	207	20	0.176	1.2
Grupos de casas	208	8	0.058	4.1
Poblados	207	2	0.024	10.4
Antes y después rociamiento	74	2	0.009(0.027)	26.1

*NOTA: entre paréntesis el Θ para poblaciones no intervenidas

En el caso de *Rhodnius prolixus* se hizo incluyó los mismos niveles de análisis, pero también se determinó la heterogeneidad genética y la migración efectiva para el nivel de análisis antes y después del rociamiento. Los resultados se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Heterogeneidad genética y migración efectiva para poblaciones de *Rhodnius prolixus*

Nivel de análisis	No. de Triatóminos	No. de grupos	Heterogeneidad Genética (Θ)	Migración efectiva $Nm(\Theta)$
Casas	147	18	0.279	0.6
Grupo de casas	150	8	0.141	1.5
Poblados	147	2	0.056	4.2
Antes y después rociamiento	67	2	0.024 (0.061)	3.9

*NOTA: entre paréntesis el Θ para poblaciones no intervenidas

VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó la estructura poblacional de los dos vectores principales de la enfermedad de Chagas en Guatemala: *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. Los resultados obtenidos muestran que el flujo genético entre las poblaciones asociado con los domicilios es restringido, especialmente en el caso de *R. prolixus* debido a que el índice de migración efectiva $Nm(\Theta)$ es 0.6 y para *T. dimidiata* es 1.2. Esos resultados sugieren que el proceso de domiciliación se presenta más en la especie *R. prolixus*. Se observó que la homogeneidad genética aumentó en una relación proporcional al aumento de la extensión geográfica ocupada por las poblaciones colectadas para *Triatoma dimidiata*, en distancias no mayores a 110 Km.

En el caso de *R. prolixus* se observó la misma tendencia pero dentro de una distancia aproximada de 5 Km. La interpretación de estos resultados. Existió una población común que estaba distribuida ininterrumpidamente en el área pero debido a cambios en el medio ambiente (probablemente naturales o antropogénicas) las poblaciones fueron fragmentadas. También, para el caso específico de *T. dimidiata* puede ser especularse que el incremento en la homogeneidad genética es debido a la presencia de focos silvestres que se dispersan a las viviendas humanas afectando la composición de las poblaciones domiciliadas dentro del área.

Para *T. dimidiata* se encontró que la homogeneidad genética fue alta entre las poblaciones antes y después del rociamiento ($\Theta_{st} = 0.009$) comparada con las poblaciones que no fueron intervenidas ($\Theta_{st} = 0.027$). Esta observación, aunado al hecho que después de un año de tratamiento con

insecticida los hogares muestran reinfestación hasta en un 13% para *T. dimidiata* , indica que una fuente selvática de triatóminos que se dispersó a los hábitat domésticos para ambos períodos: antes y después del rociamiento y que sus contribuciones genéticas predominaron una vez las poblaciones domésticas han sido establecidas .

En contraste, para *R. prolixus* el análisis de las poblaciones en las cuales no existió una intervención, existió mayor homogeneidad en dichas poblaciones ($\Theta_{st} = 0.024$ contra $\Theta_{st} = 0.061$ para poblaciones intervenidas) indicando que no existe una fuente de infestación afuera del área domiciliar y que las infestaciones observadas después de la intervención podrían ser de naturaleza residual.

VIII. CONCLUSIONES

1. La estructura poblacional de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* esta asociada con las casas. Existe un flujo genético restringido entre las subpoblaciones asociadas con el nivel casas y para el caso de *Rhodnius prolixus* esta estructuración es más marcada.
2. El uso de insecticida como medio de control de la enfermedad de Chagas, fue mas efectiva para el caso de la especie *Rhodnius prolixus* que para *Triatoma dimidiata* en el estudio realizado con chinches colectadas durante marzo de 1994 y diciembre de 1997 en las localidades de Tituque, Tuticopote, Las Palmas y Sabanetas.
3. El flujo genético entre subpoblaciones de *Triatoma dimidiata* es mayor que en *Rhodnius prolixus*.

IX. RECOMENDACIONES

1. El uso de RAPD-PCR como herramienta principal para este estudio es la adecuada ya que se utilizó ADN genómico y se asumió que todos los marcadores amplificados son dominantes. Sin embargo, para darle consistencia a los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda utilizar, con las mismas muestras, un análisis de microsatélites, cuya técnica segrega marcadores co-dominantes.
2. Como complemento al estudio realizado en este trabajo, se recomienda un análisis mas completo para el nivel países. Es decir, colectando un número mayor de individuos de toda Centroamérica. Esto contribuiría a conocer si continua la homogeneidad de *Rhodnius prolixus* y el comportamiento heterogéneo en *Triatoma dimidiata*.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, F. 1987. Parasitología Médica. Guatemala. 123pp.
- Aguilar, F. 1997. Historia de la enfermedad de Chagas en Guatemala: 1932-1990. Guatemala. 1-23pp.
- Apostol B.L.; W.C. Black; P. Reiter and B. R .Miller. 1996. Population Genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*. 76: 325-334.
- Apostol B. L.; W.C. Black; B.R. Miller; P. Reiter and B.J. Beaty. 1993. Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theoretical and Applied Genetics*. 86: 991-1000.
- Beaty B.J. and W.C. Marquadt (Eds) . 1996. *The Biology of Disease Vectors* University Press of Colorado. USA. 632pp
- Black, W. C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molecular Biology*. 2(1):1-8
- Carlton, J.M.; J. Howard; J. Jensen and D. Willker. 1995. A Rapid Technique for the Detection of DNA Polymorphisms in Plasmodium. *Experimental Parasitology*. 80: 163-166.

- Cordón-Rosales, C. 1998. Experiencias sobre el control de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. En: Guhl, F. and C. Jaramillo (Eds). Curso Taller Control de Tripanosomiasis americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares. Santa Fe de Bogota, Colombia, julio de 1998.
- Dias, J. 1987. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today*. 9:336-341
- Dujardin, J.P.; M. Muñoz, T. Chavez; C. Ponce; J. Moreno and J. Schofield. 1998. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Medical and Veterinay Entomology*. 12: 113-115
- Fife, E. 1977. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. In: Kreier, J.(Ed) *Parasitic Protozoa. Volume I. Taxonomy, Kinetoplastids, and Flagelles of Fish*. Academic Press. USA. 441pp
- Garcia L. and D. Bruckner. 1998. *Diagnostic Medical Parasitology*. 3rd ed. ASM Press. USA. 937pp.
- Garcia, A. L.; H.J. Carrasco; C.J. Schofield; J. H. Stothard; I. A. Frame, S.A. Valente; and M.A. Miles. 1998. Random Amplification of Polymorphic DNA as a tool for Taxonomic Studies of Triatomine Bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Entomological Society of America*. 35(1):38-45
- Hartl, D. 1988. *A primer of Population Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates Inc. USA. 305pp.
- Hartl, D. and A. Clark. 1989. *Principles of Populations Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates Inc Publishers. USA. 682pp.

- Langsdorf, A. 1999. Seminario PCR Technique and Theory for analyzing the genetic structure of Populations. Universidad de San Carlos. Guatemala. 27 pp
- Market E. K.; M. Voge and D. T. John.1990. Parasitología Médica. 6a ed. Interamericana-McGraw-Hill. España. 393pp.
- Matta, V. 1992. Enfermedad de Chagas en Guatemala: Prevalencia y Transmisión congénita. En: Cosenza, H. y A. Kroeger (Eds). Enfermedades parasitarias de mayor prevalencia y transmitida por vectores en Centroamérica: Aspectos Microbiológicos, Moleculares, inmunológicos, Epidemiológicos, parasitológicos, sociales y de control, enero de 1992. 285pp.
- Ministerio de Salud Pública, 1998. Control de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala y Misión Japonesa 4pp.
- Montenegro, M.L. 1943. Consideraciones sobre la Tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas en Guatemala. Tipografía Nacional. Guatemala. 69pp
- Old, R. W. And S.B. Primrose . 1994. Principles of Gene Manipulation. 5th ed. Blackwell Scientific Publications. Great Britain. 471pp.
- Organización Panamericana de la Salud. 1987. Parásitos de la sangre comunes del hombre. Guías de adiestramiento en Infecciones Parasitarias. USA.

- Organización Mundial de la Salud. 1998. Bulletin Of the World Health Organization. Parasitic diseases. 76(2):144-146
- Pan, Y. B.; D.M. Burner; K.C. Ehnrllich; M. P. Grisham and Q. Wei. 1997. Analysis of Primed-derived, Nonspecific Amplification Products in RAPD-PCR. Biotechniques 22: 1071-1077.
- Ponce, C. 1995. La enfermedad de Chagas en Centroamérica. En: Schofield, C.; J. Dujardin; J. Jurberg (Eds).. Taller Internacional sobre Genética Poblacional y Control de Triatómineos. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, 24-28 de septiembre de 1995.
- Raad, P and Seed, J. 1977. Trypanosomas causing Disease in Man in Africa . In: Kreier, J.(Ed) Parasitic Protozoa. Volume I. Taxonomy, Kinetoplastids, and Flagelles of Fish. Academic Press. USA. 441pp
- Sambroock, J.; E.F. Fritsch; T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.. USA. 1:6.3
- Schofield, C.J. 1994. Triatominae Biología y Control. Zeneca Publications. Great Britain. 80pp.
- Schofield, C. and Dujardin, J. 1997. Chagas Disease vector control in Central America. Parasitology Today. 13, 141-144pp
- Schofield, C.J. 1998. Dinámica poblacional de triatómineos. En: Guhl, F. and C. Jaramillo (Eds). Curso Taller Control de Tripanosomosis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares. Santa fe de Bogota, Colombia, julio de 1998.

- Schofield, C.J. 2000. Challenges of Chagas disease Vector Control in Central America. Global Collaboration for development of pesticides for Public Health. World Health Organization Publication. 1-27 pp.
- Stothard, J.R., Y.Yahamoto, A. Cherchi, A., A.L. Garcia, S.A. Valente, C.J. Schofield and M.A. Miles. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bulletin of Entomological Research*. 88:553-560.
- Tabarú, Y., Monroy, C., Rodas, A., Mejía, M. and Rosales, R. 1999. The geographical distribution of vectors of Chagas Disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Medical Entomology and Zoology* 50, 9-17pp.
- Universidad de San Carlos de Guatemala. 1998. Control de la enfermedad de Chagas en Guatemala.. 5pp
- Zeledón, R. 1995. Enfermedad de Chagas en Centroamérica. . En: Schofield, C.; J.P. Dujardín; J. Jurberg (Eds). Taller Internacional sobre Genética Poblacional y control de Triatómineos. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador. 24-28 de septiembre de 1995.



APÉNDICE A

Cuadro No. 6 RESULTADOS DE AMPLIFICACION CON PCR DE MUESTRAS DE
Triatoma dimidiata

ID = IDENTIFICACION DE LA MUESTRA
REGION= REGION DE CAPTURA
LOCALI = LOCALIDAD DE CAPTURA
ROC = MUESTRA COLECTADA ANTES O DESPUES DEL ROCIAMIENTO

ID	REGION	LOCALI	ROC	ES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30				
				FECHA																																		
HN-001-D	Honduras	Honduras	Prero		1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0			
HN-002-D	Honduras	Honduras	Prero		1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0		
HN-003-D	Honduras	Honduras	Prero		1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HN-005-D	Honduras	Honduras	Prero		0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HN-015-D	Honduras	Honduras	Prero		1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HN-016-D	Honduras	Honduras	Prero		1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-030-100-D1	Olopa	Tituque	Prero	5/17/95	AD	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-030-100-D2	Olopa	Tituque	Prero	5/17/95	AD	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-030-100-D5	Olopa	Tituque	Prero	5/17/95		1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-030-100-D6	Olopa	Tituque	Prero	5/17/95		1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-030-105-D1	Olopa	Tituque	Prero	5/17/95	AD	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-030-105-D2	Olopa	Tituque	Prero	11/5/95	AD	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-059-106-D1	Olopa	Tituque	Postro	2/7/97		1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-084-108-D1	Olopa	Tituque	Postro	8/8/96		1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-058-108-D1	Olopa	Tituque	Postro	12/18/96		1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-058-108-D2	Olopa	Tituque	Postro	12/18/96		1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

APENDICE A cont.

CUADRO No. 7
 RESULTADOS DE AMPLIFICACION CON PCR DE LA ESPECIE *Rhodnius prolixus*

NOTA: REG= REGION DE CAPTURA
 LOCAL= LOCALIDAD DE CAPTURA
 FECHA= FECHA DE CAPTURA
 EST = ESTADIO

COLUMNAS 1 AL 23 = BANDAS DETECTADAS EN GEL DE AGAROSA COMO EN ACRILAMIDA

IDENTIFICACION	REG	LOCAL	FECHA	EST	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
HN-004-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-006-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-007-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-008-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-009-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-010-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-011-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-012-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-013-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HN-014-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NI-001-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NI-002-R	Honduras	Honduras			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-089-100-R1	Olopa	Las Palmas	5/6/97	N4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-089-100-R2	Olopa	Las Palmas	5/6/97	N3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-089-100-R3	Olopa	Las Palmas	5/6/97	N3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-121-100-R1	Olopa	Las Palmas	10/22/97	AD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-090-45-R6	Olopa	Las Palmas	5/6/97	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5-122-45-R2	Olopa	Las Palmas	5/6/97	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

5-092-18-R3	Olopa	Las Palmas	5/7/97	N3	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	
5-091-19-R1	Olopa	Las Palmas	5/7/97		0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	
5-091-19-R2	Olopa	Las Palmas	5/7/97		0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	
5-091-19-R3	Olopa	Las Palmas	5/7/97		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	
5-123-19-R1	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	
5-123-19-R3	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
5-093-30-R1	Olopa	Las Palmas	5/7/97		0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
5-093-30-R2	Olopa	Las Palmas	5/7/97		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
5-124-30-R1	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	
5-141-30-R2	Olopa	Las Palmas	3/18/98		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	
5-090-58-R1	Olopa	Las Palmas	5/6/97		0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
5-090-58-R2	Olopa	Las Palmas	5/6/97		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	
5-090-58-R3	Olopa	Las Palmas	5/6/97		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	
5-090-58-R4	Olopa	Las Palmas	5/6/97		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5-122-58-R1	Olopa	Las Palmas	10/22/97		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	
5-123-59-R20	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	
5-123-59-R21	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	
5-123-59-R23	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	
5-090-62-R9	Olopa	Las Palmas	5/6/97		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	
5-122-62-R12	Olopa	Las Palmas	10/22/97		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	
5-140-62-R1	Olopa	Las Palmas	3/17/98		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
5-140-62-R5	Olopa	Las Palmas	3/17/98		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
5-192-62-R6	Olopa	Las Palmas	9/16/98		0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
5-192-62-R7	Olopa	Las Palmas	9/16/98		0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	
1-026-219-R1	Olopa	Tuitcopote	4/20/95		0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	
1-026-219-R2	Olopa	Tuitcopote	4/20/95		0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	
1-036-219-R1	Olopa	Tuitcopote	6/21/95		0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	
1-036-219-R2	Olopa	Tuitcopote	6/21/95		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
5-125-1-R10	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
5-125-1-R11	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
5-125-1-R12	Olopa	Las Palmas	10/23/97		0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1

APÉNDICE B

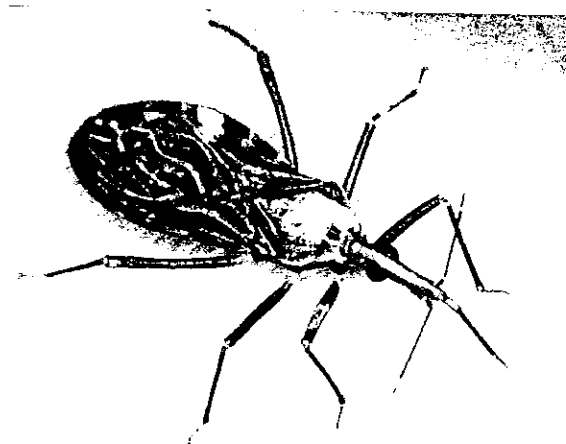
Figura 7. *Rhodnius prolixus*

Foto cortesía Mark Benedict, 1999

Figura 8. *Triatoma dimidiata*

Foto cortesía Mark Benedict, 1999

APENDICE C SOLUCIONES UTILIZADAS

1. BUFFER DE LISADO

50 mM de Cloruro de Sodio
50 mM de EDTA
1% de dodecyl sulfato
50 mM de Tris básico pH 8

2. TRIS-EDTA

100 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

3. BUFFER DE REACCION 10X

50 mM KCl
10 mM Tris-HCl
0.1% Triton X-100
1.5 mM de Cloruro de Magnesio

4. BUFFER B DE Taq POLIMERASA 10X

50 mM Tris HCl
10 mM KCl
0.1 mM EDTA
1 mM DIT
50% glicerol
1% Triton X-20
0.5% Nonidet P40 PROMEGA

5. TRIS-ACIDO ACETICO-EDTA (10XTAE)
40mM Tris-acetato
10mM.EDTA

6. BUFFER DE MONTAJE 6X
0.25% de bromofenol
0.25% de Xylene Cyanol
30% de glicerol.

7. TRIS-ACIDO BORICO-EDTA (10XTBE)
0.89M Tris-base
0.89M ácido bórico
0.02M EDTA 0.5M pH 8.

7. SOLUCION FIJADORA
60 ml de etanol 100%
20ml de ácido acético
120ml de agua destilada desionizada

8. SOLUCION DE COLORACIÓN
0.15g nitrato de plata
225 ul de formaldehído 37%
150ml de agua

9. SOLUCION DESARROLLADORA
4.5g de carbonato de sodio
1.5 ul de tiosulfato de sodio
225ul de formaldehído 37%
150ml de agua destilada desionizada

10. SOLUCION PARA GELES DE ACRILAMIDA

3.3 ml de acrilamida 38.3%

1.2 ml de 10X TBE

7.7 ml agua destilada desionizada

12 ul de solución tiosulfato (0.045g/250 ul agua destilada desionizada)

12 ul de TEMED

para la gelificación de la acrilamida, se desgasificó en una desecadora conectada al vacío durante 15 minutos. Agregar 12 ul de una solución de TEMED y 12 ul de una solución de persulfato de amonio cuya concentración es 0.045g/250 ul

MEZCLA DE REACCION DE LA POLIMERASA EN CADENA

REACTIVO	CANTIDAD (µl) Por cada tubo	VOLUMEN (µl) TOTAL EN 20 MUESTRAS	CONCENTRACION
Agua destilada	13.3	266	-
Cloruro de Magnesio	2.5	50	1 mM
Buffer de Reacción	2.5	50	10X
DNTPs	2.0	40	2.5 mM cada uno
OPA08 u OPB18	2.5	50	10 pmol/µl
Taq Polimerasa	0.2	4.0	5X

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

PASO	TEMPERATURA EC	TIEMPO (min)	
<i>Desnaturalización inicial</i>	94	5	
<i>Desnaturalización</i>	94	1	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 10°C /min ciclos </div>
<i>Annealing</i>	30	1	
<i>Extensión</i>	72	2	
<i>Extensión final</i>	72	7	45

APÉNDICE D

CUADRO 8 GRUPOS DE TITUQUE Y TUTICOPOTE; OLOPA CHIQUIMULA

Grupo	Casas *	Origen	No. de individuos Analizados
1	11(3), 48(3), 54(4)	Tituque	10
2	100(4), 105(2), 106(1), 108(5), 228(4), 239(6)	Tituque	22
3	141(3), 178(3), 179(5)	Tituque	11
4	12(16), 11(22), 33(19), 27(1), 26(1), 20(7)	Tuticopote	80
5	238(6), 237A(6), 259(26)	Tuticopote	38
6	60(13)	Tuticopote	13
7	219(4)	Tuticopote	4

CUADRO 9 DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS EN LAS PALMAS

Grupo	Casa	Origen	No. Total de Individuos analizados
1	1(9), 2(3), 3(7), 4(2), 5(6)	Las Palmas, Chiquimula	27
2	30(4), 18(3), 19(5)	Las Palmas, Chiquimula	12
3	45(8), 98(7), 99(6), 100(4)	Las Palmas, Chiquimula	25
4	62(6), 58(5), 59(3)	Las Palmas, Chiquimula	14

- Los números que aparecen entre paréntesis en la columna de casas es el número de individuos que se lograron amplificar por RAPD-PCR en dicha casa..

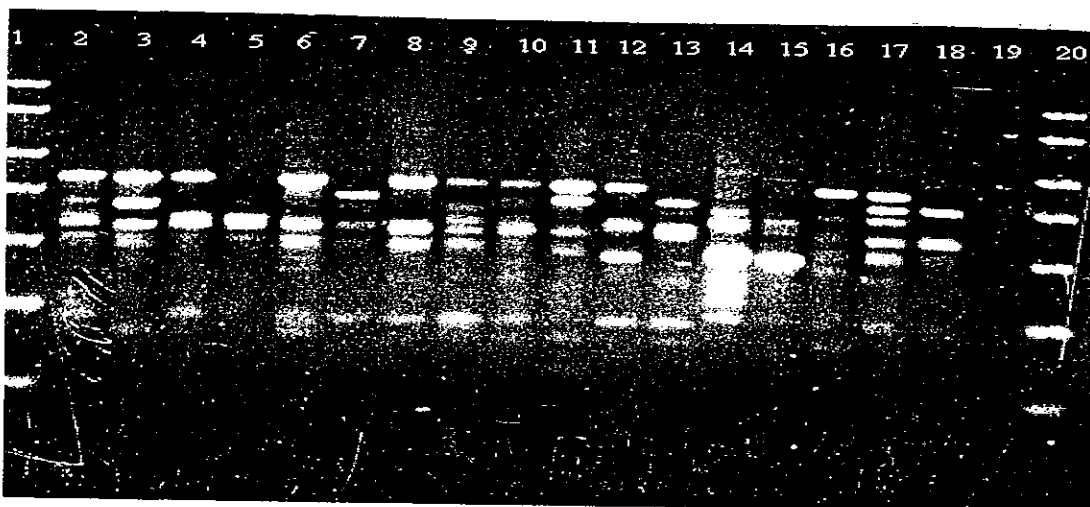
CUADRO 10 DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS EN SABANETAS

Grupo	Casas	Origen	No. Total de Individuos Analizados
1	3(5)	Sabanetas, Santa Rosa	5
2	10(18), 11(18), 12(19)	Sabanetas Santa Rosa	55
3	37(5), 38(16), 39(6)	Sabanetas Santa Rosa	27
4	54(12), 55(17)	Sabanetas Santa Rosa	29

* Los números que aparecen entre paréntesis en la columna de casas es el número de individuos que se lograron amplificar por RAPD-PCR en dicha casa

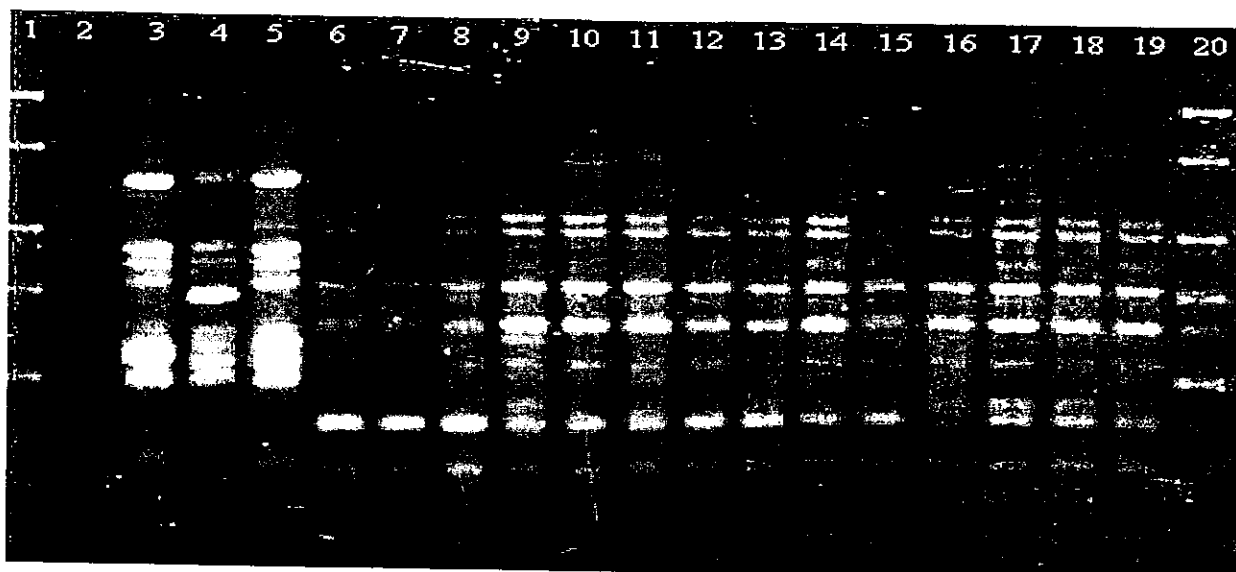
APENDICE E
GELES DE AGAROSA

FIGURA 9 MUESTRAS AMPLIFICADAS POR RAPD-PCR
PARA *Triatoma dimidiata*



Línea 1 y 20 marcadores de tamaño molecular de 2000 bp; **línea 2** muestra 1-024-33-D1; **línea 3** 1-024-33-D2; **línea 4** muestra 1-024-33-D3; **línea 5** muestra 1-024-33-D4; **línea 6** muestra 1-024-33-D5; **línea 7** muestra 1-076-33-D1; **línea 8** muestra 1-076-33-D2; **línea 9** muestra 1-076-33-D3; **línea 10** muestra 1-076-33-D4; **línea 11** muestra 4-013-60-D1; **línea 12** muestra 4-013-60-D2; **línea 13** muestra 4-013-60-D3; **línea 14** muestra 4-013-60-D4; **línea 15** muestra 4-013-60-D5; **línea 16** muestra 1-089-60-D1; **línea 17** muestra 1-089-60-D2; **línea 18** muestra 1-089-60-D3; **línea 19** control negativo.

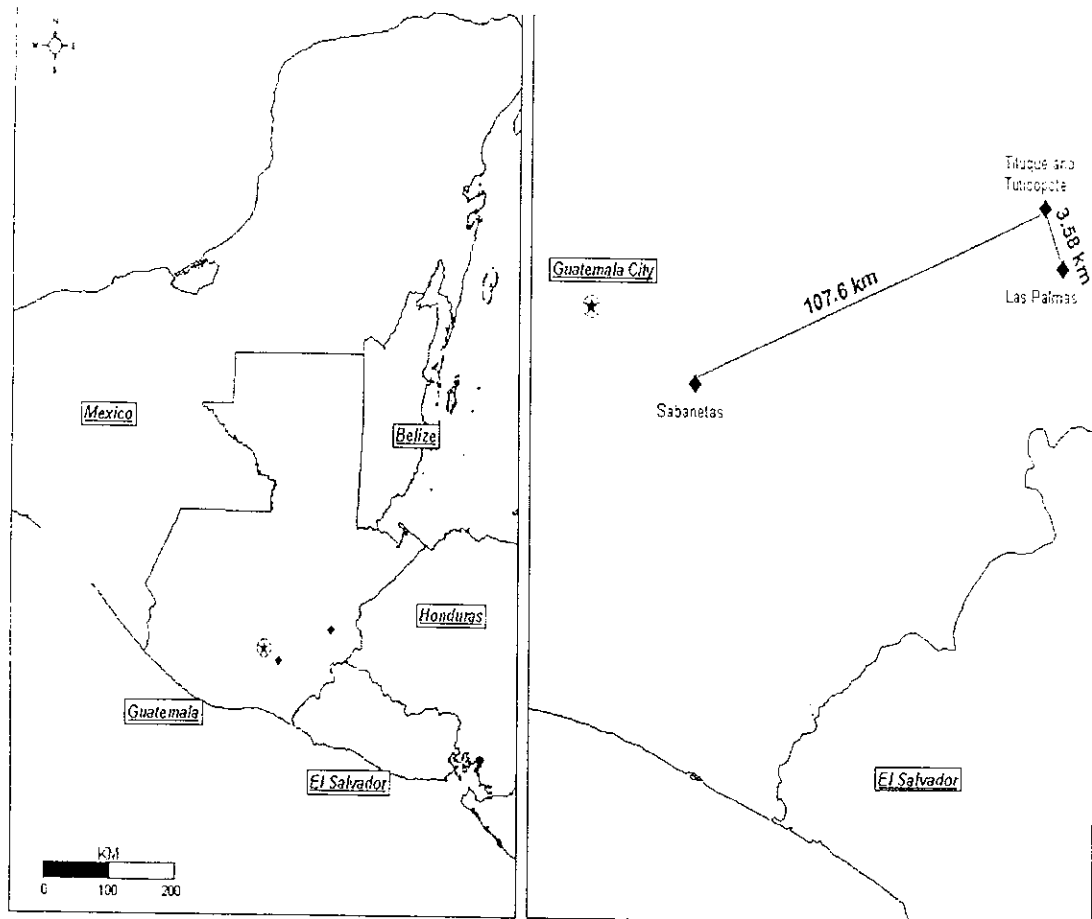
Figura 10. MUESTRA AMPLIFICADAS POR RAPD-PCR
PARA *Rhodnius prolixus*



Líneas 1 y 20 marcador de tamaño molecular; línea 2 control negativo; líneas 3, 4 y 5 bandas diagnósticas (1-024-33-D2, 1-024-33-D3 y 1-089-60-D3 respectivamente); línea 6 muestra 5-125-1-R4; línea 7 muestra 5-125-1-R6; línea 8 muestra 5-125-1-R5; línea 9 muestra 5-125-1-R7; línea 10 muestra 5-125-1-R8; línea 11 muestra 5-125-1-R9; línea 12 muestra 5-125-1-R10; línea 13 muestra 5-125-1-R11; línea 14 muestra 5-125-1-R12; línea 15 muestra 5-125-2-R1; línea 16 muestra 5-125-2-R2; línea 17 muestra 5-125-2-R3; línea 18 muestra 5-094-3-R1; línea 19 muestra 5-094-3-R2

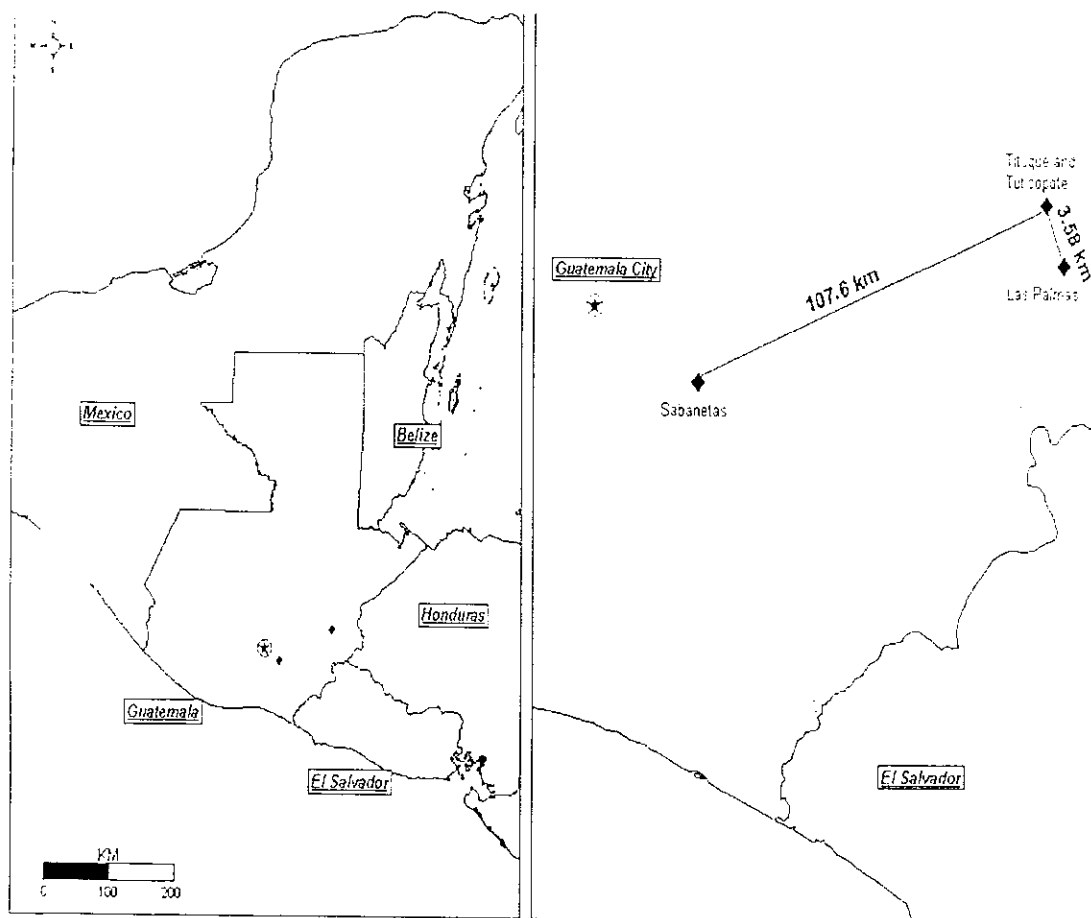
APÉNDICE F LUGARES DE COLECTA

Figura 11. Lugares de colecta para el estudio de genética de poblaciones de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*.



APÉNDICE F LUGARES DE COLECTA

Figura 11. Lugares de colecta para el estudio de genética de poblaciones de *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*.



APÉNDICE G

PROGRAMAS PARA EL ANÁLISIS DE LA HETEROGENEIDAD GENÉTICA
Y MIGRACIÓN EFECTIVA CON RAPD-Fst

NUMBER OF INDIVIDUALS: 54

TITLE: *R. prolixus* from 5 houses in community (Tituque y Tuticopote)

NUMBER OF FRAGMENTS: 23

(3 (6 (1X, A5) /), 5 (1X, A5))

A0801 A0802 A0803 A0804 A0805 A0806

A0807 A0808 A0809 A0810 A0811 A0812

A0813 A0814 A0815 A0816 A0817 A0818

A0819 A0820 A0821 A0822 A0822

(A7, 5X, 23A1)

```

Tuti259      00001000100111111010110
Tuti259      00001010100111111010110
Tuti259      00001010100111011010110
Tuti259      00001000100111110010000
Tuti259      00001000100111010001000
Tuti259      0000000000000000010010
Tuti259      00101010000111010110110
Tuti259      00011010100111111101100
Tuti259      00011010100111111010100
Tuti259      00001010100011011110110
Tuti259      00001101000010010110000
Tuti259      00010001000000000001000
Tuti259      00001000000000000001000
Tuti259      00011110100101011010010
Tuti259      00001000000101010110100
Tuti259      00011010100111111110011
Tuti259      00011010110111111110111
Tuti259      00001000100101110110110
Tuti259      00000100110001000110100
Tuti259      00011000000101000001111
Tuti259      00001110110111011101111
Tuti259      00001010110111010001111
Tuti259      00001010110111011101111
Tuti259      00001010100101010101111
Tuti259      000000000000000010001000
Tuti259 26   00000000000000000001000
Tuti12       00001000100101100000000
Tuti12       00001000100111110000000
Tuti12       00001000000001110000000
Tuti12       00001000100101100000000
Tuti12       00001000100111110000000
Tuti12       00001000010001110000000
Tuti12       00001000000111100000000
Tuti12       00000100100010010000000
Tuti12       00001100000001100000000
Tuti12       00011000000111100000000
Tuti12       00001010010001110000000

```

```
Tuti12      00100000000011110000000
Tuti12      0000000010000000000000
Tuti12      0000100010000000000000
Tuti12      00011000100001100000000
Tuti12  16   00010000000000000000000
Tuti219     00000111111000111010110
Tuti219     00100111011000110010010
Tuti219     00000100010000110010010
Tuti219  4   00000001000000000000010
Titu11      00000010110111111001100
Titu11      00000010110111110110110
Titu11  3   00000010100111110110110
Tuti11      00000010100111110001000
Tuti11      00000000000000010000010
Tuti11      00000000000000110001000
Tuti11      00001000100111110110100
Tuti11  5   00011000100111011101000
```

APENDICE G cont.

:T. dimidiata from 3 different regions.

LOCUS	FST	Nm	Prob.	Theta	Nm(Theta)	FST(Lynch)	Nm(Lynch)
B1801	.033	7.4	.0670	.042	5.7	-.068	-3.9
B1802	.018	13.7	.2249	.012	20.1	-.053	-5.0
B1803	.007	38.0	.5810	-.012	-21.3	-.124	-2.3
B1804	.015	16.4	.2873	.006	40.5	.096	2.3
B1805	.014	17.6	.3129	.004	62.8	-.036	-7.1
B1806	.034	7.0	.0571	.046	5.2	-.065	-4.1
B1807	.009	29.0	.4915	-.008	-33.3	-.056	-4.7
B1808	.070	3.3	.0029	.116	1.9	.020	12.4
B1809	.034	7.0	.0579	.046	5.2	.024	10.1
B1810	.062	3.8	.0059	.100	2.3	.049	4.9
B1811	.038	6.3	.0430	.053	4.5	-.024	-10.7
B1812	.036	6.8	.0518	.049	4.9	-.061	-4.4
B1813	.038	6.4	.0435	.053	4.5	.097	2.3
B1814	.017	14.9	.2537	.009	26.7	-.068	-3.9
B1815	.010	25.1	.4406	-.005	-52.7	.017	14.1
A0801	.004	56.5	.6939	-.016	-15.4	-.109	-2.6
A0802	.000	1069.4	.9808	-.025	-10.1	-.133	-2.1
A0803	.015	15.9	.2764	.007	34.9	-.102	-2.7
A0804	.007	34.2	.5480	-.010	-24.4	-.107	-2.6
A0805	.042	5.6	.0297	.062	3.8	.179	1.1
A0806	.042	5.7	.0310	.061	3.9	.026	9.5
A0807	.066	3.6	.0043	.107	2.1	.049	4.9
A0808	.017	14.6	.2465	.010	24.8	.017	14.6
A0809	.000	1541.0	.9866	-.026	-10.0	-.129	-2.2
A0810	.011	22.8	.4067	-.003	-92.4	-.005	-49.9
A0811	.040	6.0	.0364	.057	4.1	.182	1.1
A0812	.025	9.8	.1281	.026	9.2	.166	1.3
A0813	.008	31.4	.5189	-.009	-28.1	-.116	-2.4
A0814	.004	70.0	.7442	-.018	-13.9	.011	22.1
A0815	.002	136.7	.8594	-.022	-11.6	-.007	-33.6
Avg.	.024	10.2	.0000	.024 (.024)	9.0	.032	7.6
St.Dv.	.020			.040 (.008)		.090	
				(Jackknife)			

Frequency distribution of FST Values (0.005 classes)

FST Class	Wrights`s FST		Theta		Lynch & Milligan`s FST	
	#	%	#	%	#	%
-.035 to-.030	0	.0% (.0%)	0	.0% (.0%)	0	.0% (.0%)
-.030 to-.025	0	.0% (.0%)	2	6.7% (6.7%)	0	.0% (.0%)
-.025 to-.020	0	.0% (.0%)	1	3.3% (10.0%)	1	3.3% (3.3%)

-.020 to-.015	0	.0% (.0%)	2	6.7% (16.7%)	0	.0% (3.3%)
-.015 to-.010	0	.0% (.0%)	2	6.7% (23.3%)	0	.0% (3.3%)
-.010 to-.005	0	.0% (.0%)	2	6.7% (30.0%)	2	6.7% (10.0%)
-.005 to .000	0	.0% (.0%)	2	6.7% (36.7%)	0	.0% (10.0%)
.000 to .005	5	16.7% (16.7%)	1	3.3% (40.0%)	0	.0% (10.0%)
.005 to .010	5	16.7% (33.3%)	4	13.3% (53.3%)	0	.0% (10.0%)
.010 to .015	2	6.7% (40.0%)	1	3.3% (56.7%)	1	3.3% (13.3%)
.015 to .020	5	16.7% (56.7%)	0	.0% (56.7%)	3	10.0% (23.3%)
.020 to .025	1	3.3% (60.0%)	0	.0% (56.7%)	1	3.3% (26.7%)
.025 to .030	0	.0% (60.0%)	1	3.3% (60.0%)	1	3.3% (30.0%)
.030 to .035	3	10.0% (70.0%)	0	.0% (60.0%)	0	.0% (30.0%)
.035 to .040	4	13.3% (83.3%)	0	.0% (60.0%)	0	.0% (30.0%)
.040 to .045	2	6.7% (90.0%)	1	3.3% (63.3%)	0	.0% (30.0%)
.045 to .050	0	.0% (90.0%)	3	10.0% (73.3%)	2	6.7% (36.7%)
.050 to .055	0	.0% (90.0%)	2	6.7% (80.0%)	0	.0% (36.7%)
.055 to .060	0	.0% (90.0%)	1	3.3% (83.3%)	0	.0% (36.7%)
.060 to .065	1	3.3% (93.3%)	2	6.7% (90.0%)	0	.0% (36.7%)
.065 to .070	1	3.3% (96.7%)	0	.0% (90.0%)	0	.0% (36.7%)
.070 to .075	1	3.3% (100.0%)	0	.0% (90.0%)	0	.0% (36.7%)
.075 to .080	0	.0% (100.0%)	0	.0% (90.0%)	0	.0% (36.7%)
.080 to .085	0	.0% (100.0%)	0	.0% (90.0%)	0	.0% (36.7%)
.085 to .090	0	.0% (100.0%)	0	.0% (90.0%)	0	.0% (36.7%)
.090 to .095	0	.0% (100.0%)	0	.0% (90.0%)	0	.0% (36.7%)
.095 to .100	0	.0% (100.0%)	1	3.3% (93.3%)	2	6.7% (43.3%)
.100 to .105	0	.0% (100.0%)	0	.0% (93.3%)	0	.0% (43.3%)
.105 to .110	0	.0% (100.0%)	1	3.3% (96.7%)	0	.0% (43.3%)
.110 to .115	0	.0% (100.0%)	0	.0% (96.7%)	0	.0% (43.3%)
.115 to .120	0	.0% (100.0%)	1	3.3% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.120 to .125	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.125 to .130	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.130 to .135	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.135 to .140	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.140 to .145	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.145 to .150	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.150 to .155	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.155 to .160	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.160 to .165	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.165 to .170	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (43.3%)
.170 to .175	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	1	3.3% (46.7%)
.175 to .180	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (46.7%)
.180 to .185	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	1	3.3% (50.0%)
.185 to .190	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	1	3.3% (53.3%)
.190 to .195	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.195 to .200	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.200 to .205	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.205 to .210	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.210 to .215	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.215 to .220	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.220 to .225	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.225 to .230	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.230 to .235	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.235 to .240	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.240 to .245	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.245 to .250	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.250 to .255	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.255 to .260	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.260 to .265	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.265 to .270	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)

.850 to .855	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.855 to .860	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.860 to .865	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.865 to .870	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.870 to .875	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.875 to .880	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.880 to .885	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.885 to .890	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.890 to .895	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.895 to .900	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.900 to .905	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.905 to .910	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.910 to .915	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.915 to .920	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.920 to .925	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.925 to .930	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.930 to .935	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.935 to .940	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.940 to .945	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.945 to .950	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.950 to .955	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
<hr/>						
.955 to .960	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.960 to .965	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.965 to .970	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.970 to .975	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.975 to .980	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.980 to .985	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.985 to .990	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)
.990 to .995	0	.0% (100.0%)	0	.0% (100.0%)	0	.0% (53.3%)