

**ANÁLISIS GENÉTICO DE *Triatoma dimidiata* MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN DE ADN RIBOSOMAL POR PCR.**

DIANA CAROLINA LÓPEZ FARFÁN

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA TROPICAL - CIMPAT
BOGOTA D.C.**

2004

**ANÁLISIS GENÉTICO DE *Triatoma dimidiata* MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN DE ADN RIBOSOMAL POR PCR.**

DIANA CAROLINA LÓPEZ FARFÁN

Trabajo de Grado para Optar el Título de Microbióloga

Director: Carlos Jaramillo

Profesor Titular

Codirector: Felipe Guhl N.

Profesor Titular

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA

Y PARASITOLOGÍA TROPICAL - CIMPAT

BOGOTÁ D.C.

2004

**ANÁLISIS GENÉTICO DE *Triatoma dimidiata* MEDIANTE
AMPLIFICACIÓN DE ADN RIBOSOMAL POR PCR.**

Nota de Aceptación

**Carlos Jaramillo Henao.
Director de Tesis**

**Felipe Guhl Nannetti.
Codirector de Tesis**

**Nhora Rodríguez de Sánchez.
Jurado**

DEDICATORIA

A mis padres José y Martha por su apoyo permanente, sus consejos y por el esfuerzo, dedicación y amor con que han construido esta familia, que es la base de lo que soy.

A mis hermanos Martha Liliana y Juan Sebastián, por su comprensión, compañía y amistad.

AGRADECIMIENTOS

A Carlos Jaramillo por sus valiosas enseñanzas, por la orientación en este trabajo, por confiar en mi y brindarme la oportunidad de trabajar con el.

A Felipe Guhl por sus conocimientos y apoyo, por darme la oportunidad de hacer parte de su equipo de trabajo en el CIMPAT.

A Néstor Pinto, German Aguilera y Andrés Cuervo por su colaboración en la recolección de los insectos.

A Brenda Turriago por el procesamiento de las muestras de preferencias alimentarias.

A todos mis compañeros del CIMPAT, por su amistad y su apoyo incondicional, en especial a Adriana y Mario.

Especial agradecimiento a COLCIENCIAS por la financiación de este trabajo

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABLAS	
RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN	8
2. OBJETIVOS	12
2.1. OBJETIVO GENERAL	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3. MARCO TEORICO	
3.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	13
3.1.1. Antecedentes e Historia	13
3.1.2. Agente causal y ciclo de vida	14
3.1.3. Patología de la enfermedad	16
3.2. ECOTOPOS DEL VECTOR Y EL PROCESO DE DOMICILIACIÓN	18
3.3. ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENION	19
3.4. INSECTOS VECTORES Y SU IMPORTANCIA	21
3.4.1. <i>Triatoma dimidiata</i> (Latreille, 1811)	22
3.5. AMPLIFICACIÓN DE GENES RIBOSOMALES POR PCR	24

4. MATERIALES Y METODOS	26
4.1. INSECTOS	26
4.2. EXTRACCION DE ADN	27
4.3. AMPLIFICACION DE ADN RIBOSOMAL POR PCR	28
4.3.1. Iniciadores	28
4.3.2. Condiciones de reacción	29
4.3.3. Perfil térmico	31
4.4. ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	32
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSIÓN	36
7. CONCLUSIONES	44
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. ANEXOS	52
A1. PROTOCOLOS Y REACTIVOS	52
Extracción de ADN con el kit Aquapure Genomic	52
Soluciones y reactivos para la electroforesis	53
Electroforesis en geles de agarosa.	54
A2. RESULTADOS DE ALINEAMIENTOS CON BLAST	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa de áreas de alto, mediano y bajo riesgo de transmisión vectorial de <i>Trypanosoma cruzi</i> en Colombia.....	9
Figura 2. <i>Trypanosoma cruzi</i> , estado infectivo del parásito (Tripomastigote Metacíclico).....	15
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 4: Vivienda en la vereda el Hatillo, Municipio de Soata, Boyacá. Sitio de captura de insectos <i>T. dimidiata</i>	19
Figura 5: Mapa de la distribución de <i>Triatoma dimidiata</i> en Colombia.....	22
Figura 6: Mapa del área de recolección de los insectos. Veredas: Centro, Hatillo, Espinal, Jabonera, Laguna, Llanogrande, Molinos y La costa. (Soata, Boyacá).....	23
Figura 7: <i>Triatoma dimidiata</i>	26
Figura 8: Fotografía panorámica del área de estudio.....	27
Figura 9: Esquema del ADN ribosomal de insectos y lugar de anillamiento de los iniciadores 5.8T y 28T, usados en el PCR para amplificar el ITS-2.....	29
Figura 10: Visualización de los productos de amplificación con los iniciadores 5.8T y 28T. Gel de agarosa al 1.5%.....	33-34
Figura 11: Comparación de los productos de amplificación de individuos de domicilio y peridomicilio de Soata, Boyacá e individuos silvestres capturados en SNSM. Gel de agarosa al 1.5%.....	35

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Secuencia de los iniciadores usados en el PCR	28
Tabla 2. Concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción de amplificación.....	30
Tabla 3. Perfil térmico del PCR.....	31
Tabla 4: Resultados de preferencias alimentarias de <i>T. dimidiata</i>	40

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es transmitida a los humanos de manera natural a través de las heces de triatomíneos infectados. En Colombia uno de los departamentos que presentan mayor endemia es Boyacá (Guhl *et al.*, 1998). Durante los últimos años las medidas de control y prevención de la enfermedad se centran en la interrupción de la transmisión vectorial del parásito, haciendo énfasis en la eliminación de poblaciones domiciliadas de triatomíneos como *T. infestans* y *R. prolixus*, a pesar de que se ha demostrado que es posible la eliminación de estos vectores, existen especies silvestres que pueden adaptarse al peridomicilio y al domicilio, y convertirse en nuevos vectores domiciliados, dos ejemplos en Colombia son: *T. dimidiata* y *T. maculata*.

El principal mecanismo de eliminación de los triatomíneos domiciliados en diferentes países de América Latina ha sido con insecticidas, en Brasil la transmisión vectorial por *T. infestans* ha sido interrumpida exitosamente (Moncayo, 2003), debido a que el vector es intradomiciliario, pero no en todos los países la medida ha sido efectiva, debido a que los vectores de la enfermedad en estos países no son estrictamente domiciliados, se ha observado la aparición de problemas de re-infestaciones por poblaciones residuales o por otras poblaciones de la misma especie u otras especies, provenientes de focos peridomésticos y silvestres. Por lo tanto es necesario adaptar las estrategias de control a las condiciones entomológicas de cada país.

De manera que se ha visto la necesidad de estudiar estas especies, para evaluar la dinámica poblacional y variabilidad genética, con el fin de entender su proceso de domiciliación, y de esta forma poder diseñar estrategias efectivas para el control de estos vectores.

Triatoma dimidiata es el segundo vector más importante del agente causal de la enfermedad de Chagas en Colombia y uno de los principales vectores de la enfermedad en México, América central y América del sur (Marcilla *et al* 2001). Posee un ciclo epidemiológico que involucra reservorios domiciliados y silvestres. Los perros y los roedores son los reservorios más importantes en el ciclo de transmisión intra y peri domiciliario, mientras que las zarigüeyas (*Dedelphis*) y los armadillos (*Dasyopus*) son los más importantes en el ciclo selvático. Las poblaciones no domiciliadas pueden representar un gran riesgo al ser focos de insectos que infestan las viviendas.

Se amplificó el ITS-2 del rADN de insectos *Triatoma dimidiata* capturados en diferentes ecotopos de Soatá, Boyacá, por medio de PCR. Para evaluar el flujo genético entre individuos provenientes de diferentes ecotopos y estimar el riesgo de invasión por insectos de peridomicilio. Todos los individuos de *T. dimidiata* presentaron una banda de 962 pb. No se detectaron polimorfismos de longitud en el ITS-2, entre individuos capturados en domicilios y peridomicilios en las veredas de Soata, lo que indica que existe flujo genético y por lo tanto homogeneidad genética entre estos insectos. Por lo tanto se debe realizar un control integrado sobre el domicilio y el peridomicilio, debido a que este ultimo puede representar un riesgo epidemiológico.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, constituye un severo problema de salud pública en gran parte del territorio colombiano. Se estima que el 7% de la población puede estar infectada y cerca del 23% está bajo riesgo de adquirir la infección, dependiendo de la distribución geográfica de los insectos vectores (Hemiptera: Reduviidae), que transmiten el agente causal de la enfermedad. (Guhl & Nicholls, 2001).

En el 2002, se reportó que alrededor de 40 millones de personas, es decir el 10% de los habitantes de Latino América, están en riesgo de contraer la infección. La prevalencia de la infección se estima de 16-18 millones de casos (Moncayo 2003).

La transmisión vectorial de *T. cruzi* en Colombia, se observa a lo largo del Valle del Río Magdalena, en la Región del Catatumbo, la Sierra Nevada de Santa Marta, el Piedemonte de los Llanos Orientales y la Serranía de la Macarena. Los departamentos que presentan una mayor endemia son: Arauca, Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Casanare, Tolima y Huila (Guhl, 2000) y en menor intensidad los departamentos de Antioquia, Cesar, Guajira, Magdalena, Sucre y Meta (Guhl & Nicholls, 2001).

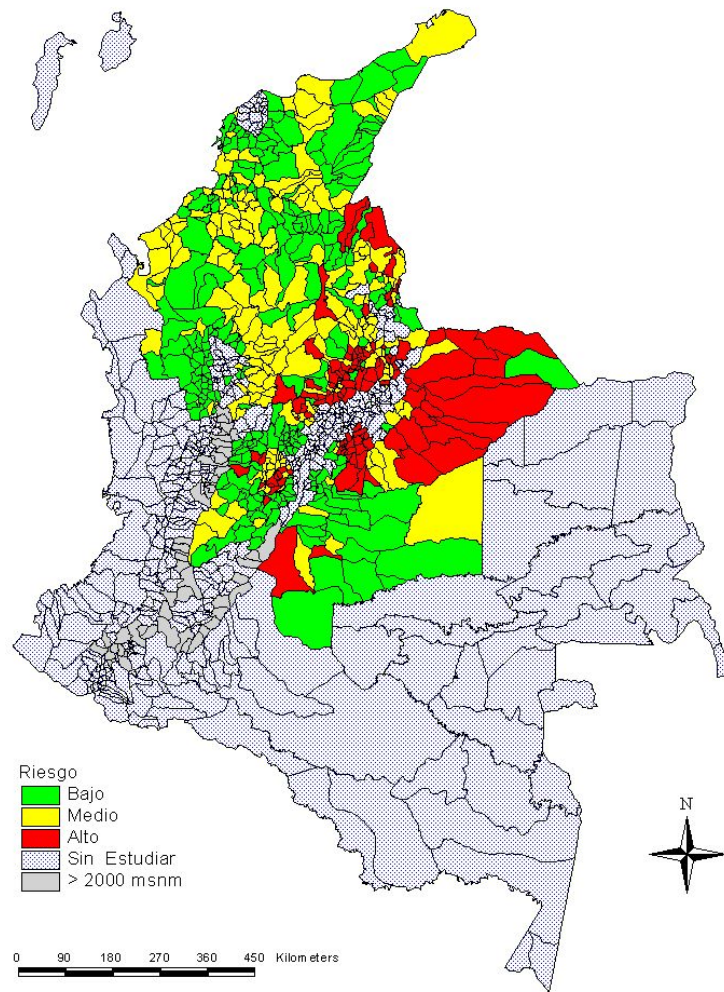


Figura 1. Mapa de áreas de alto, mediano y bajo riesgo de transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi* en Colombia (tomado de Guhl & Nicholls, 2001)

En el territorio colombiano se han reportado 23 especies de triatomíneos capaces de transmitir el parásito *T. cruzi* (Molina et al., 2000) sin embargo, de estas especies, las más importantes desde el punto de vista epidemiológico, son las que invaden el domicilio humano.

Triatoma dimidiata es el segundo vector mas importante de la enfermedad de Chagas en Colombia y uno de los principales vectores de la enfermedad en México, América central y América del sur (Marcilla *et al* 2001).

La caracterización genética de insectos *Triatoma dimidiata* capturados en diferentes ecotopos en una zona endémica en Soata, Boyacá, es importante para comprender su dispersión, distribución y flujo genético, para lo cual resulta valioso emplear técnicas moleculares que permitan evaluar marcadores genéticos, como la amplificación de regiones específicas del ADN ribosomal (rADN).

Las regiones del rADN que han demostrado ser blancos valiosos como marcadores moleculares para estudios sistemáticos y filogenéticos, son los espaciadores internos transcritos (ITS1 y ITS2), útiles para resolver relaciones entre taxa muy cercanos que han divergido relativamente hace poco tiempo (<50 millones de años atrás) (Marcilla *et al.*, 2001). Diferencias pronunciadas en la longitud de los ITS's revelan la presencia de microsatélites (Almeida–Artigas *et al.*, 2000), el análisis de uno de los dos espaciadores es suficiente debido al conservatismo estructural y la aparente co-evolución de las regiones ITS.

Esta técnica ha sido empleada en estudios entomológicos (Bargues *et al.*, 2000, Zapata *et al.*, 2001) para encontrar marcadores útiles en estudios sistemáticos y filogenéticos de triatomíneos. Mediante su aplicación es posible entender la estructura genética de este vector, estimar el riesgo de invasión de domicilios por poblaciones silvestres y del peridomicilio e incrementar el conocimiento biológico y ecológico del insecto para así contribuir al mejoramiento de las estrategias de control vectorial con insecticidas a nivel nacional.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento biológico y ecológico de *Triatoma dimidiata*, vector de la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), para estimar el riesgo de domiciliación por insectos provenientes del peridomicilio.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Amplificar el espaciador interno ITS2 del ADN ribosomal de insectos *Triatoma dimidiata* por medio de PCR.
- Analizar el tamaño de los productos obtenidos para detectar posibles polimorfismos de longitud en esta región del genoma.
- Buscar mediante amplificación de genes ribosomales posibles marcadores genéticos que permitan evaluar la variabilidad genética y dispersión de los insectos *T. dimidiata*.
- Establecer relaciones genéticas entre individuos de *T. dimidiata* capturados en ecotopos de domicilio y peridomicilio, en Soatá, Boyacá.
- Contribuir al mejoramiento de las estrategias de control de este vector a nivel nacional.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.1.1. Antecedentes e Historia

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana fue descrita por primera vez en el año 1909 por Carlos Chagas, quien en el año 1907 había sido encomendado para ejecutar una campaña antimalárica. Reportó la existencia de un insecto hematófago denominado por los campesinos como "Barbeiro", su picadura se localizaba usualmente en el rostro y era poco sintomática.

El insecto habitaba en las viviendas y atacaba al hombre en la noche, se ocultaba durante el día en las paredes y en los techos de las casas construidas de bahareque y paja. El insecto fue identificado como perteneciente a la familia Reduviidae, posteriormente en la sangre de individuos infectados se hallaron flagelados los cuales fueron identificados por el Dr. Chagas como *Schizotrypanum cruzi*.

Veinte años después, en Colombia en 1929, el Dr. César Uribe Piedrahíta, profesor de Parasitología y Medicina Tropical de la Universidad Nacional, reportó por primera vez el hallazgo de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*, en heces de *Rhodnius prolixus* domiciliados, en el departamento del Tolima (Uribe, 1929). Estudios posteriores realizados por los investigadores Ucros, Marinkelle, D`Alessandro, Corredor y Guhl (Ucros *et al* 1971, D`Alessandro *et al* 1972, Marinkelle, C.J., 1969, D`Alessandro *et al* 1981, corredor *et al* 1990, Guhl *et al* 1996), ampliaron los conocimientos epidemiológicos de diversos grupos de poblaciones de triatomíneos domiciliados, en diferentes zonas del país.

3.1.2. Agente causal y ciclo de vida

El parásito *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un protozoo flagelado, transmitido principalmente por varias especies de triatomíneos, que actúan como vectores. Las poblaciones del parásito circulan entre reservorios animales, humanos y vectores intradomiciliados y silvestres (Botero, 1998). El parásito también se transmite a través de transfusiones de sangre contaminada y congénitamente de madre a hijo, una vez en el cuerpo el parásito se anida en diferentes tejidos, presentando especial predilección por el tejido miocárdico, ocasionando cardiopatías. La enfermedad de Chagas es considerada la primera causa de lesiones cardiacas en los países endémicos de América Latina (Moncayo, 2003).

Las formas flageladas de *T. cruzi* llamadas tripomastigotes, se encuentran en la sangre de personas o de animales infectados en el periodo inicial de la enfermedad, el vector por lo tanto adquiere el parásito al chupar esta sangre. Los triatomíneos infectados, al picar nuevamente, después de alimentarse, defecan en la superficie, los tripomastigotes metacíclicos infectantes salen en las deyecciones del vector y pueden introducirse al organismo a través del orificio de la picadura, heridas o atravesando la mucosa ocular, nasal o bucal.



Figura 2. *Trypanosoma cruzi*, estado infectivo el parásito (Tripomastigote metacíclico).

Imagen de microscopía electrónica de barrido tomada de la página web:

www.cdfound.to.it/HTML/trip1.htm

Una vez en el organismo los parásitos son fagocitados por los macrófagos, pero escapan del fagosoma y se multiplican en el citoplasma de los macrófagos para luego lisis la célula y salir, posteriormente en la sangre se encuentran las formas flageladas conocidas como tripomastigotes y otras formas sin flagelos dentro de las células o tejidos denominadas amastigotes. El parásito en el huésped vertebrado tiene predilección por células del sistema retículo-endotelial, tejido muscular cardíaco, muscular estriado y muscular liso.

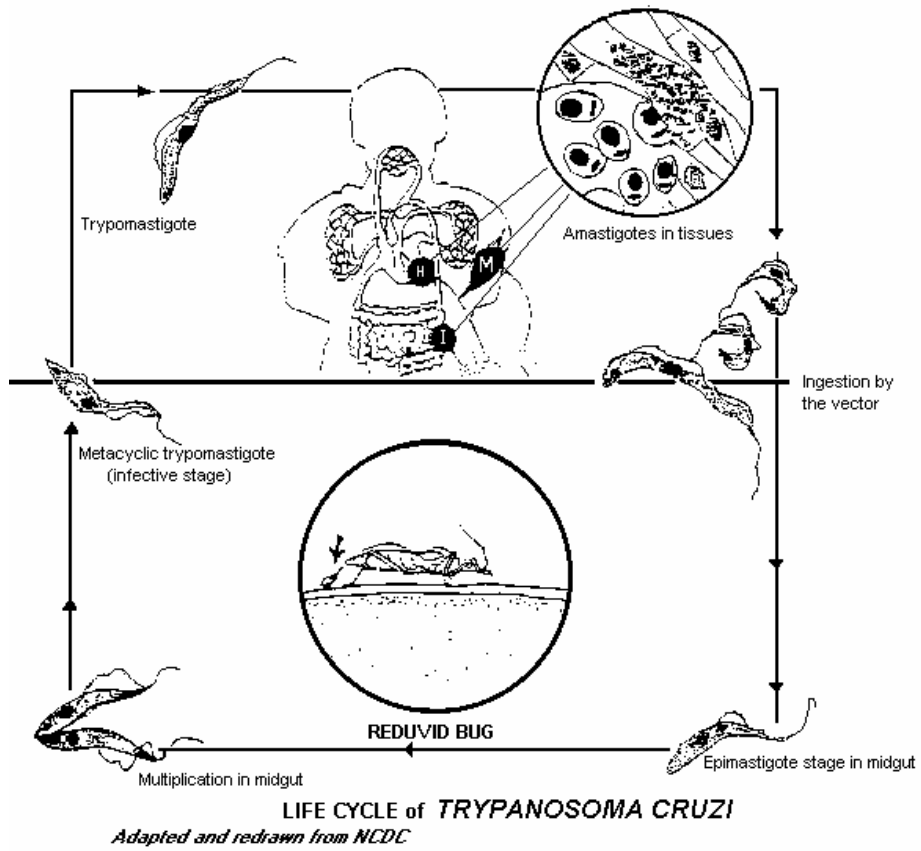


Figura 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Imagen Tomada de la pagina web: www.cdfound.to.it/img/tc6.gif

3.1.3 Patología de la enfermedad

La enfermedad se caracteriza por la existencia de tres fases: aguda, indeterminada o latente y crónica.

En la primera etapa o fase aguda, los parásitos se reproducen intracelularmente y posteriormente destruyen las células para salir, los parásitos liberados invaden otras células que también son lisadas causando una reacción inflamatoria localizada llamada Chagoma, cuando esta se presenta en el párpado se conoce como signo de Romaña. La fase aguda dura de 10 a 15 días aproximadamente y se caracteriza por una elevada parasitemia, el índice de mortalidad durante esta fase es bajo (<10%).

Después de la fase aguda, se presenta una etapa en la cual la parasitemia disminuye a causa de la respuesta inmune, pero el parásito persiste en focos selectivos, durante esta fase llamada indeterminada el paciente es asintomático y dura en promedio 10 años, aunque puede ser mucho mas larga.

En fase crónica la parasitemia es mínima y predomina el parasitismo tisular, lo que puede ocasionar lesiones en el corazón como miocarditis severa y de manera menos frecuente agrandamiento de vísceras como colon, esófago y estómago. Se presenta liberación de antígenos y sustancias toxicas, así como también hay producción de autoanticuerpos. (Botero & Restrepo, 1998).

3.2. ECOTOPOS DEL VECTOR Y EL PROCESO DE DOMICILIACIÓN

El hombre entró a formar parte de la cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas, cuando irrumpió en los focos selváticos naturales del insecto, obligando a los triatomíneos vectores a trasladarse a las viviendas humanas iniciándose de esta forma el proceso de domiciliación (Miles *et al*, 2003). La adaptación de los vectores al hábitat humano se favorece debido a que les brinda acceso a una fuente de alimento abundante y al mismo tiempo protección de cambios climáticos y predadores (Guhl *et al.*, 2000)

Los insectos domiciliados colonizan las casas, que por su tipo de construcción les permite vivir, como son las de bahareque o bambú, con pisos de tierra y techo de paja. Por esta razón la enfermedad se encuentra asociada a la pobreza y malas condiciones de vivienda.

Los insectos del peridomicilio se encuentran viviendo en los alrededores de las casas donde tienen contacto cercano con los humanos; se encuentran frecuentemente asociados a los animales de granja y al sitio donde ellos viven, como son los nidos, gallineros, corrales y montones de madera, cajas o tejas almacenados cerca de las viviendas.

Los triatomíneos silvestres ocupan diferentes tipos de hábitat generalmente alejados de las viviendas, como son árboles huecos, palmas, cactus, madrigueras de zorros y zarigüeyas, nidos de aves, cuevas de murciélagos y rocas.



Figura 4: Vivienda en la vereda el Hatillo, municipio de Soata, Boyacá.
Sitio de captura de insectos *T. dimidiata*.

3.3. ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCIÓN

Debido a la ausencia de una vacuna y de drogas profilácticas, además de la poca disponibilidad de drogas para el tratamiento como benznidazole, las medidas de control y prevención de la enfermedad se centran en la interrupción de la transmisión vectorial del parásito, por medio de la eliminación de las poblaciones domiciliadas de triatomíneos.

Una herramienta eficaz y económicamente accesible es la aspersión de viviendas infestadas con insecticidas piretroides de prolongado efecto residual; es importante realizar un control permanente para conocer si después del tratamiento hay re-invasión de las viviendas por los insectos silvestres o peridomiciliados.

El Ministerio de Salud implementó el programa de control de la transmisión transfusional de la enfermedad de Chagas en el año de 1995 (Resolución 1738 del Ministerio de Salud de Colombia), haciendo obligatorio el tamizaje en los bancos de sangre a nivel nacional. En la actualidad existe una cobertura del 100%. (Guhl, 2000)

A partir de 1997 se implementó el Programa de Prevención y Control de la infección por *T. cruzi* a nivel nacional, el cual consta de una fase exploratoria inicial para identificar la situación epidemiológica en todo el territorio, seguida de acciones de promoción, prevención y control para interrumpir la transmisión vectorial.

En la actualidad el programa ha cumplido en su fase exploratoria con cobertura del 55% del total del área endémica del país. Se han intervenido 25.000 viviendas con insecticidas piretroides y se ha logrado la asignación de fondos para reforma de vivienda rural dentro de un marco legal (Angulo, 2000., Michaels, 2002).

En 1998 fue creado el Programa Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas y Cardiopatía Infantil por el Ministerio de Salud, para el control vectorial y transfusional de la enfermedad, en el cual participaron tres centros de investigación de trayectoria, dentro de los cuales esta EL CIMPAT.

3.4. INSECTOS VECTORES Y SU IMPORTANCIA

Los triatominos son el principal mecanismo de transmisión de la enfermedad en condiciones naturales, estos vectores pertenecen al orden Hemiptera, que se caracterizan por tener un aparato bucal succionador, en la familia Reduviidae se ubican los tres géneros transmisores de la enfermedad de Chagas más importantes: *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*.

Los triatominos son insectos hematófagos, el tamaño de los adultos varia entre 1.5 y 3 cm. de longitud, el color varia entre las especies, de cabeza alargada y terminada en una probóscide recta, poseen alas dobles que se mantienen dobladas sobre el dorso. Se reproducen mediante huevos y hacen una metamorfosis incompleta, pasando por 5 estados ninfales, para su desarrollo necesitan de temperatura, humedad y alimentación adecuada.

3.4.1. *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811)

Triatoma dimidiata pertenece a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae y tribu triatomiini. Es el segundo vector mas importante de la enfermedad de Chagas en Colombia y uno de los principales vectores de la enfermedad en Méjico, América central y América del sur (Marcilla *et al* 2001).

En Colombia *T. dimidiata* se encuentra en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Meta, Huila, Cesar, Guajira, Magdalena, Santander, Nte. de Santander y Casanare.

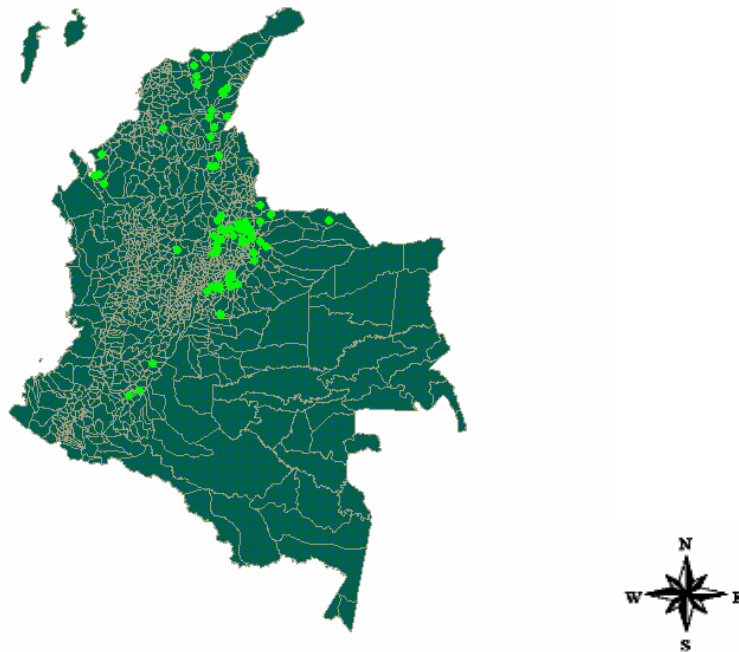


Figura 5: Distribución de *Triatoma dimidiata* en Colombia Reportado hasta Enero 2001. (Guhl F.).

T. dimidiata ha sido reportado en ecotopos silvestres en el sur de Méjico y en América Central, aunque ha sido raramente reportado en hábitat silvestres en Colombia y Ecuador (Días *et al.*, 2002).

Selváticamente se ha encontrado en montones de rocas, adobe, ruinas, en cuevas de armadillos, árboles huecos y cuevas ocupadas por murciélagos.



Figura 6 : *Triatoma dimidiata*.

En hábitat peridomésticos y domésticos se dispersa activamente atraído por la luz o pasivamente transportado en la madera por humanos. Se ha capturado en gallineros, bodegas, camas y paredes de dormitorios.

Los hábitos de *T. dimidiata* lo convierten en un insecto difícil de controlar debido a varios factores: Permanece oculto debajo de montones de leña a los que difícilmente se puede acceder con insecticidas, durante su fase de estadíos ninfales se oculta bajo la tierra en los pisos de las casas, camuflándose de los depredadores naturales (Zeledón 1973), puede ayunar por períodos de hasta diez meses lo cual le da tiempo hasta que los efectos residuales de los insecticidas desaparezcan (Zeledón 1970).

La caracterización genética de esta especie resulta de vital importancia para comprender la dispersión y flujo genético entre poblaciones provenientes de diferentes ecotopos, para lo cual resulta útil realizar estudios empleando técnicas moleculares como la amplificación de ADN ribosomal, que permitan aclarar la estructura genética del vector.

3.5. AMPLIFICACIÓN DE GENES RIBOSOMALES POR PCR

El ADN ribosomal esta constituido por elementos de rápida evolución (dominios variables) ubicados entre elementos altamente conservados (Wheeler & Honeycutt, 1988). Diferentes regiones del ADN ribosomal (rADN) han demostrado ser blancos valiosos como marcadores moleculares para estudios sistemáticos y filogenéticos (Anderson *et al.*, 2002; Bargues *et al.*, 2002).

Los genes ribosomales procariotas 5.8S y 18S son las regiones mas conservadas debido a que la tasa de mutaciones es relativamente baja, por lo cual son usados para evaluar relaciones antiguas (> 100 millones de años). Los espaciadores internos ITS1 e ITS2 son mas útiles para estimar eventos más recientes como relaciones entre taxa muy cercanos, debido a que evolucionan mas rápido ya que no están bajo presión de selección (Bargues *et al*, 2000).

Las mutaciones que sufren estas regiones suelen ser neutras, de modo que la selección no las elimina y se pueden rastrear, estas son usadas en la estimación de relojes moleculares que permiten medir el grado de diferenciación molecular entre especies afines e incluso entre subespecies y poblaciones de la misma especie (Bargues *et al*, 2002).

Los ITS usualmente presentan cortas secuencias repetidas en tandem o microsatélites cuya unidad de repetición está entre 1 y 5 pb, estos pueden llegar a ser marcadores moleculares polimórficos para diferenciar poblaciones dentro de una especie, diferencias pronunciadas en la longitud de los ITS revelan la presencia de microsatélites (Almeida–Artigas *et al* 2000).

La amplificación de los ITS por medio de la reacción en cadena polimerasa (PCR, en ingles) y el uso de iniciadores específicos, constituye una herramienta molecular para el estudio y comparación de los mismos.

Debido a que con los iniciadores universales se tiene el riesgo de amplificar ADN de otros organismos y que no son específicos para amplificar rADN de insectos, se emplearon iniciadores diseñados en otro estudio para la amplificación de rADN de triatomíneos (Marcilla- Bargues, 2001).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 INSECTOS

Los especímenes *T. dimidiata* de este trabajo fueron capturados en veredas del municipio de Soata, en el departamento de Boyacá, en hábitat de domicilio y peridomicilio, no fueron capturados insectos en hábitats silvestres.

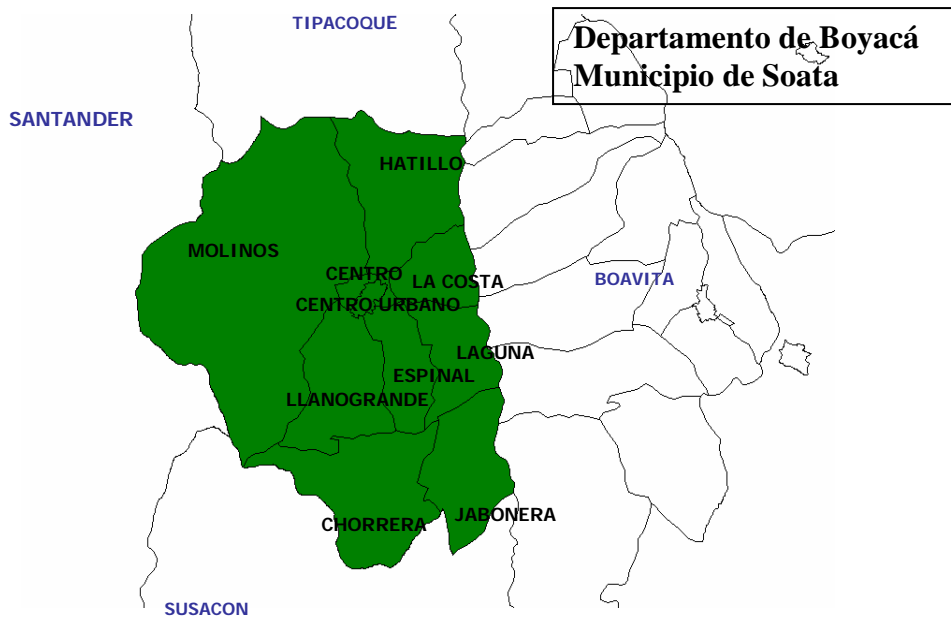


Figura 7: Mapa del área de recolección de los insectos. Veredas: Centro, Hatillo, Espinal, Jabonera, Laguna, Llanogrande, Molinos y La costa. (Soata, Boyacá.)

Se emplearon 30 individuos adultos (15 hembras y 15 machos) de domicilio y 32 individuos adultos (16 hembras y 16 machos) de peridomicilio. Se incluyeron también 4 Individuos silvestres (2 adultos y 2 ninfas de 5 estadio) capturados en la Sierra Nevada de Santa Marta.



Figura 8: Fotografía panorámica del área de estudio. Soata, Boyacá.

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de las 6 patas de cada insecto que fueron conservadas en alcohol en un tubo de microfuga de 1.5 ml, hasta su procesamiento.

Las patas fueron desinfectadas antes de la extracción con hipoclorito 1:5, alcohol al 70% y lavadas con agua destilada, para evitar la contaminación con ADN foráneo. Posteriormente se empleó el kit de extracción AquaPure Genomic de BIORAD®, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante con algunas modificaciones (ver anexo 1). El ADN extraído fue almacenado a -20 °C.

4.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN RIBOSOMAL POR PCR

4.3.1 Iniciadores

La amplificación fue realizada con los iniciadores 5.8T y 28T (Marcilla *et al.*, 2000) que amplifican un fragmento del gen 5.8S, el ITS-2 completo y un fragmento del gen 28T.

Tabla 1: Secuencia de los iniciadores usados en el PCR

Iniciador	Secuencia
5.8T	5`-CTA AGC GGT GGA TCA CTC GG-3´
28T	5´-GCA CTA TCA AGC AAC ACG ACT C-3´

El iniciador 5.8T es complementario al gen ribosomal 5.8S y amplifica 127pb del mismo (Marcilla *et al.*, 2000). y el iniciador 28T es complementario al gen ribosomal 28S, amplificando aproximadamente 300pb del mismo, según los alineamientos realizados con el programa BLAST de libre acceso en Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). **Ver anexo 2.**

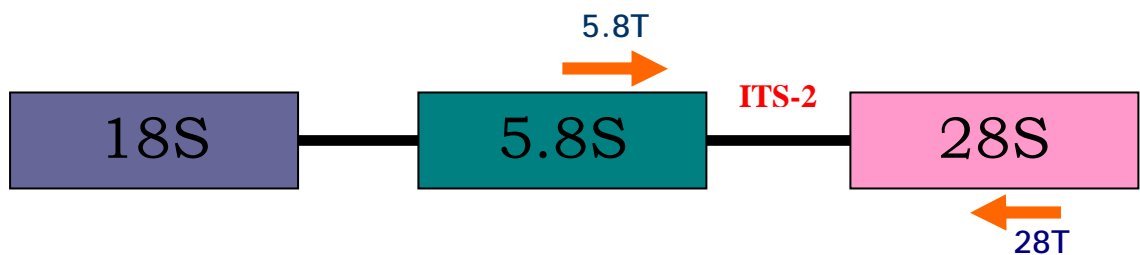


Figura 9: Esquema del ADN ribosomal de insectos y lugar de anillamiento de los iniciadores 5.8T y 28T usados en el PCR para amplificar el ITS-2.

4.3.2 Condiciones de reacción

La amplificación se llevo acabo usando las perlas de PCR Ready to go de *Amersham pharmacia*®. Cada perla contiene dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ~2.5 unidades de DNA Taq polimerasa, Tris-HCl, KCl, 1.5mM MgCl₂, buffer de reacción y estabilizantes.

Cada perla fue hidratada con 15.25 μl de agua destilada estéril, se adicionaron 0.5 μl de cada primer y 3.75 μl de MgCl_2 10mM, luego de mezclar bien por pipeteo, el volumen final de 20 μl se dividió en dos reacciones y se adicionaron 2.5 μl de ADN a cada reacción.

Tabla 2. Concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción de amplificación.

Reactivo	Volumen adicionado a 1 perla	Concentración final
dNTPs	-	200 μM
MgCl_2	3.75 μl	3 mM
Iniciador 5.8T	0.5 μl	1 pmol.
Iniciador 28T	0.5 μl	1 pmol.
Taq polimerasa	-	2.5 unidades
KCl	-	50 mM
Tris-HCl	-	10 mM
Agua destilada estéril	15.25 μl	

4.3.3 Perfil térmico

La reacción en cadena polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en un termociclador PTC-100 (Programable Thermal Controller) MJ Research, con el siguiente perfil térmico “Touchdown” (Jaramillo *et al.*, 2001).

Tabla 3. Perfil térmico del PCR

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	1 min.
2	92 °C	30 seg.
3	55 °C (-0.5 °C/ciclo)	30 seg.
4	72 °C	40 seg.
5	10 ciclos desde el paso 2	
6	92 °C	30 seg.
7	50 °C	30 seg.
8	72 °C	1 min.
9	28 ciclos desde el paso 6	
10	4 °C	indefinido

4.4 ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La electroforesis de los productos de PCR fue realizada en geles de agarosa al 1.5% (ver anexos). Los geles fueron precorridos 30 minutos a 70 voltios, en cada pozo se sembraron 12 μ l de muestra previamente mezclada con 5 μ l de buffer de carga. Los geles se corrieron 100 minutos a 70 voltios.

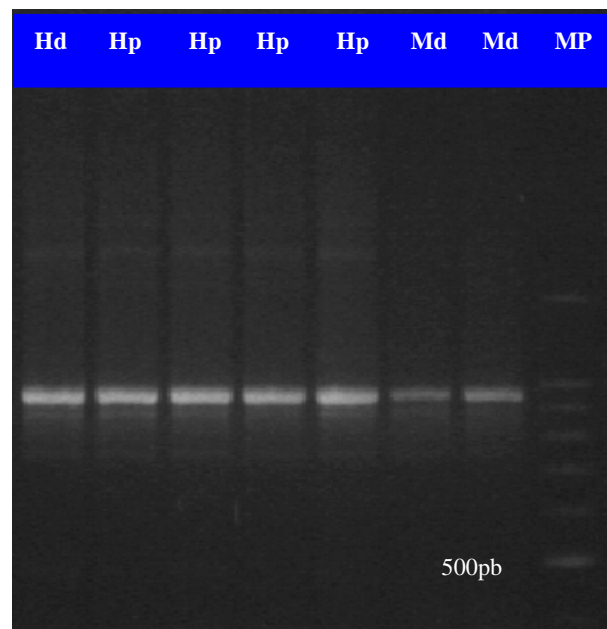
Una vez realizada la corrida electroforética, unos geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV y fotografiados con una cámara instantánea Polaroid DS 34 Direct Screen, otros fueron digitalizados con un documentador de geles CHEMI-DOC SYSTEM y analizados con el software Quantity One 1D de BIORAD®. Se empleo el modelo de regresión Cubic que trae el programa para calcular el tamaño de las bandas.

5. RESULTADOS

Se obtuvo amplificación del ADN ribosomal de los 62 insectos capturados, 30 en domicilio y 32 en peridomicilio, usando los iniciadores 5.8T y 28T (Marcilla *et al*, 2001).

No se encontraron diferencias en las posiciones de la banda del ITS2 amplificadas para los individuos *T. dimidiata* provenientes de diferentes ecotopos. Todos los individuos de *T. dimidiata* presentaron una banda de aproximadamente 962 pb. **(Figura 10).**

A.



B.

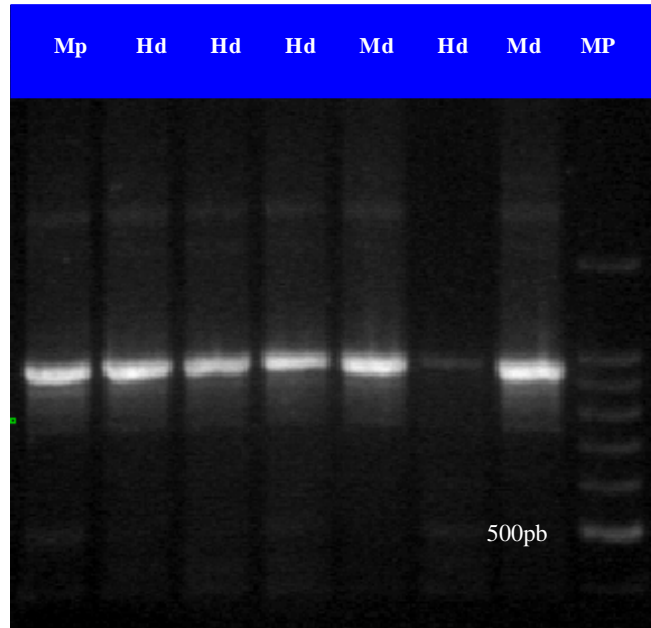


Figura 10. A y B: Productos de amplificación con los iniciadores 5.8T y 28T de individuos de domicilio y peridomicilio de Soata Boyacá. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Mp: macho de peridomicilio. Hd hembra de peridomicilio. Md: macho de domicilio. Hd: hembra de domicilio. MP: marcador de peso, señalada la banda de 500 pb del marcador.

Los 4 individuos silvestres incluidos en este estudio, capturados en la Sierra Nevada de Santa Marta (SNSM), presentaron la misma banda que los individuos procedentes de domicilio y peridomicilio de Soata, Boyacá. **(Figura 11).**

Por lo tanto no se observaron diferencias incluso entre poblaciones del vector separadas por grandes barreras geográficas.

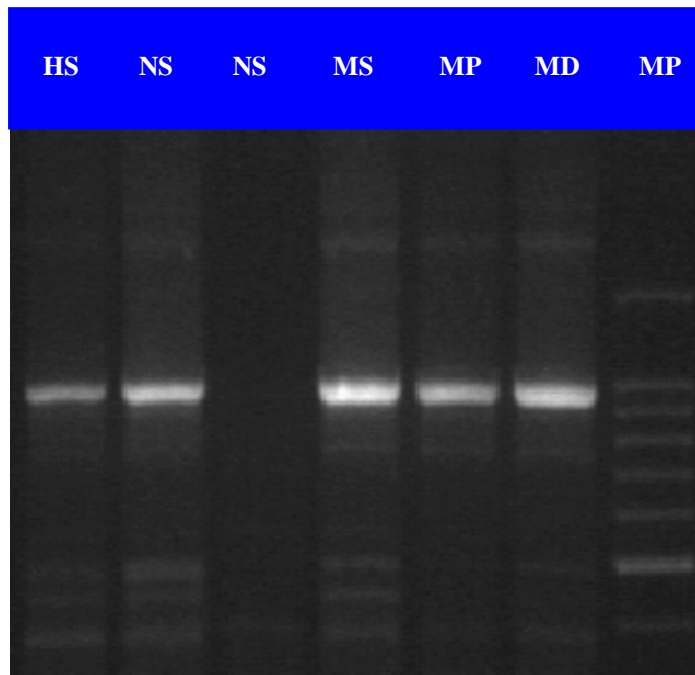


Figura 11: Comparación de los productos de amplificación de individuos de domicilio y peridomicilio de Soata Boyacá e individuos silvestres capturados en SNSM. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. HS: hembra silvestre. NS: ninfa silvestre. MS: macho silvestre. MP: macho de peridomicilio. MD: macho de domicilio. MP: marcador de peso molecular.

6. DISCUSIÓN

El fragmento del ADN ribosomal que teóricamente se amplifica con los iniciadores 5.8T y 28T, es de aproximadamente 903 pb, correspondiente a un fragmento del gen 5.8S, el ITS-2 completo y un fragmento del gen 28S.

El iniciador 5.8T anilla sobre el gen 5.8S, amplificando un fragmento de 127 pb del mismo, las seis secuencias del ITS-2 reportadas para *T. dimidiata* en GenBank tienen en promedio 476 pb y el iniciador 28T anilla sobre el gen 28S amplificando un fragmento de aproximadamente 300 pb del mismo, según los alineamientos realizados con el programa BLAST para buscar la región de anillamiento de este iniciador dentro del gen 28S. La única secuencia de gen 28S reportada hasta el momento para Triatomineos es de *Rhodnius prolixus* y debido que esta secuencia es parcial y muy corta, no se encontró homología con esta, el sitio de anillamiento del iniciador 28T se estimó por medio de alineamientos con secuencias del gen 28S de otros organismos **(Ver anexo 2)**.

Con los iniciadores empleados se obtuvo una sola banda, reproducible y de tamaño muy aproximado al esperado, 962 pb, lo que indica que se está obteniendo un anillamiento altamente específico.

No se detectó variación intra-específica en la región del ITS2. Todos los ejemplares *T. dimidiata* evaluados compartieron la misma banda independientemente de su procedencia. Se ha observado que las especies Rhodniini poseen un ITS-2 más largo que las especies Triatomiini, lo cual fue corroborado, debido a que en amplificaciones realizadas con ADN de *Rhodnius prolixus* en otro estudio con los mismos iniciadores, se obtiene un producto aproximadamente 220 pb más largo (Villalba, 2004. Tesis de grado, comunicación verbal), este hallazgo concuerda con la diferencia en el tamaño del ITS-2 reportado para *Rhodnius prolixus* que es de 694 pb (Marcilla *et al.*, 2001). Por lo tanto la amplificación del ITS-2 es útil para detectar variaciones entre especies relacionadas, pero presenta dificultad al evaluar variaciones entre individuos de la misma especie procedentes de diferente hábitat.

Se ha observado que diferencias pronunciadas en la longitud de los ITS's revelan la presencia de secuencias microsatélites (Almeida-Artigas *et al.*, 2000) pero debido a que el tamaño de la unidad de repetición de estas secuencias en los ITS's es de 1 a 5 pb, estas diferencias son difíciles de resolver en geles de agarosa, sugiriendo la necesidad de secuenciar estas regiones para encontrar microsatélites que puedan llegar a ser buenos marcadores polimórficos para evaluar el flujo genético entre las poblaciones dentro de una especie (Jane & Lagoda, 1996).

Recientemente el análisis de secuencias del ITS-2 rADN de insectos domésticos, peridomésticos y silvestres de *T. dimidiata* de Colombia (Bargues, 2002), mediante secuenciación, detección de microsatélites y reconstrucción filogenética por métodos de distancia, máxima parsimonia y máxima similitud, revelaron que existe un microsatélite discontinuo (AT)₅ TTT (AT)_n, presente en todos los individuos y con un número variable de repeticiones en las poblaciones analizadas que podría ser usado como indicador de flujo genético entre poblaciones silvestres, domésticas y peridomésticas.

En estudios anteriores se encontró que secuencias de *T. dimidiata* de Honduras y Ecuador fueron idénticas y diferían solo en 3 posiciones de la de Nicaragua (Marcilla et al., 2000), mientras que la secuencia de *T. dimidiata* de México difiere en 7-10 nt. de las de Honduras, Ecuador y Nicaragua. Como se observa las diferencias detectadas entre especímenes *T. dimidiata* de diferentes países es muy pequeña, lo que puede justificar que no se hayan encontrado diferencias entre individuos *T. dimidiata* capturados en diferentes ecotopos en Soata, dentro de un área de 3 Km. de radio, e incluso que los individuos silvestres capturados en palmas (*Atalea excelsa*) en la Sierra Nevada de Santa Marta presentaran la misma banda que individuos de domicilio y peridomicilio de Soata.

Lo observado en este estudio es apoyado con los resultados de análisis por RAPD's realizados con los mismos insectos (Higuera, 2004. Trabajo de tesis.

comunicación verbal). Mediante RAPD's, que a diferencia del PCR evalúa varias regiones del genoma, se encontró diferenciación genética moderada entre los individuos capturados en domicilio y peridomicilio de *T. dimidiata*, lo que indica que hay flujo genético.

Resultados similares se habían obtenido anteriormente en un estudio realizado con *T. dimidiata*, en otro municipio de Boyacá, en Boavita, se encontró poca diferenciación genética entre las poblaciones silvestres, domésticas y peridomésticas. Siendo la distancia genética entre domésticas y peridomésticas mas corta que entre estas dos y la silvestre (Ramírez, 2002).

Otro estudio realizado en la misma zona de Boavita, Boyacá, en el cual se evaluó la procedencia y dinámica de dispersión de poblaciones de *T. dimidiata*, mediante marcaje y análisis morfométrico, reveló una alta movilidad y dispersión de este vector en diferentes ecotopos (Aguilera, 2001).

Muestras del contenido del promesenteron de algunos de los insectos capturados en Soatá, fueron enviadas al instituto Oswaldo Cruz en Brasil (Dr. Cléber Galvão), para ser analizados por inmunodifusión doble con antisueros e identificar la fuente de alimento del insecto. Los resultados de este estudio cuyo objetivo era evaluar las preferencias alimentarias de insectos capturados en diferentes habitas, arrojó los siguientes resultados.

Tabla 4: Resultados de preferencias alimentarias de *T. dimidiata*.

Instituto Oswaldo Cruz, Brasil.

Sitio de Captura	Fuente de alimentación
<p style="text-align: center;">Domicilio Soata, Boyacá (n= 7)</p>	<p>2 ave 1 roedor 1 ave y gato 1 ave y roedor 1 gato y perro 1 ave, roedor y perro</p>
<p style="text-align: center;">Peridomicilio Soata, Boyacá (n= 21)</p>	<p>1 humano 1 gato 4 ave 6 roedor 2 ave y perro 1 caballo y perro 2 ave y roedor 1 ave y zarigüeya 3 no identificados</p>
<p style="text-align: center;">Silvestres Sierra Nevada de Santa Marta, Guajira (n= 17)</p>	<p>5 ave 3 roedor 3 perro 1 ave y caballo 1 armadillo y zarigüeya 2 roedor y zarigüeya 2 no identificados</p>

N= 45 insectos

Como se observa no hay una fuente de alimentación precisa para los insectos capturados en determinado hábitat, las fuentes de alimentación son muy variadas y no están estrechamente relacionadas con el sitio de captura, es decir insectos capturados en hábitat domésticos no se habían alimentado de sangre humana e individuos silvestres se habían alimentado de animales asociados al domicilio y peridomicilio. Lo que indica una alta movilidad de los insectos hacia diversas fuentes de alimentación, sin preferencia hacia la sangre humana de fácil acceso en el domicilio.

La homogeneidad genética entre insectos capturados dentro de la casa y en su periferia, indica que existe un flujo genético entre estos, generado por un desplazamiento constante de insectos hacia adentro y fuera del domicilio. La presencia de sangre de diferentes fuentes animales en el contenido estomacal de insectos capturados en diversos ecotopos parece demostrarlo, como el caso de insectos capturados dentro de las casas con sangre de zarigüeya, el cual es un animal asociado al peridomicilio. (Zeledon, 1981).

Los resultados obtenidos en este estudio son muy útiles, teniendo en cuenta que las medidas de control de la enfermedad de Chagas, actualmente se centran en la interrupción de la transmisión vectorial mediante la aspersion de las viviendas con insecticidas para eliminar los vectores domiciliados.

En los estudios entomológicos, es importante conocer la estructura poblacional de una especie, es decir, si dentro de la continuidad aparente de su distribución geográfica en un área definida, existen o no poblaciones físicamente aisladas entre ellas, conocer esto es importante para el control debido a que puede haber un menor riesgo de infestación por poblaciones aisladas, mientras que si las poblaciones son homogéneas es decir que existe flujo genético entre ellas, todas representan igual riesgo de infestación y se deben tener en cuenta al momento de diseñar las estrategias de control.

En el caso de *T. dimidiata*, se debe realizar por lo tanto, una vigilancia y control permanente no solo sobre el domicilio, si no también sobre el peridomicilio, debido a que existe un riesgo epidemiológico de infestación de la vivienda por insectos del peridomicilio, en Soatá.

Es importante implementar medidas o campañas para promover la re-organización de las viviendas en Soatá, en domicilio y peridomicilio, y de esta manera establecer un control sobre los hospederos en el peridomicilio, reubicando corrales, animales domésticos y sus camas, para evitar que los insectos que se están alimentando de estos migren al domicilio.

La leña es un medio favorable para el desarrollo del insecto (Chinchilla y Monteiro, 1967), por lo tanto se debe evitar en lo posible almacenar dentro del domicilio y en

el peridomicilio. Además la leña puede ser un medio pasivo de transporte de insectos del hábitat silvestre al domicilio.

Se ha demostrado una relación epidemiológica entre piso de tierra y presencia del insecto (Costa Rica), el piso de cemento disminuye la facilidad de *T. dimidiata* de formar colonias en las casas. Por esta y otras razones el mejoramiento de la vivienda es otro de los aspectos importantes en el control de la infestación de las viviendas por triatomíneos. Evitar que los insectos formen colonias dentro de las viviendas o en su peridomicilio, disminuye el riesgo de los habitantes a infectarse con *T. cruzi*.

Debido a que en el área de estudio no se encontraron individuos *T. dimidiata* en hábitat silvestre, no fueron evaluados, pero es importante corroborar si no existen individuos silvestres en Soata, porque de lo contrario podrían ser un factor de riesgo que potencialmente puede llegar al domicilio y peridomicilio, de forma activa o pasiva.

Los individuos silvestres capturados en Santa Marta, evaluados en este estudio, no mostraron ninguna diferencia en la posición de la banda, comparados con un individuo de domicilio y otro de peridomicilio de Soata, que se sembraron en el mismo gel. Lo cual es otro indicio de la homogeneidad genética intra-específica que presenta esta especie, inclusive superando barreras y distancias geográficas.

7. CONCLUSIONES

No se detectaron polimorfismos de longitud en el ITS-2 del rADN por medio de amplificación por PCR, entre individuos *T. dimidiata* capturados en domicilio y peridomicilio en las veredas de Soatá, Boyacá, todos compartieron la misma banda sin importar su procedencia, lo cual indica que hay flujo genético entre estos individuos y por lo tanto homogeneidad genética.

La homogeneidad genética encontrada entre individuos capturados en diferentes hábitat y las variadas fuentes de alimentación de los mismos, indican que existe una única población de *T. dimidiata* que se encuentra desplazándose entre diferentes ecotopos (domicilio y peridomicilio) y no que se trata de poblaciones adaptadas y aisladas en hábitat diferentes.

Diferencias en la longitud de ITSs revelan la presencia de secuencias microsatélites, pero debido a que el tamaño de estos microsatélites es de 1 a 5 pb, diferencias a ese nivel son difíciles de resolver en geles, sugiriendo la necesidad de secuenciar para encontrar microsatélites que puedan llegar a ser buenos marcadores polimórficos.

La homogeneidad genética detectada en las poblaciones de *T. dimidiata* en dos municipios de Boyacá, Soata y Boavita, nos orienta acerca del diseño y establecimiento de las medidas de control que se deben tomar para interrumpir la transmisión por este vector en el departamento. Se debe realizar por lo tanto un control integrado sobre el domicilio y peridomicilio, estableciendo vigilancia permanente sobre los dos ecotopos, debido a que existe un riesgo epidemiológico de infestación de vivienda por insectos del peridomicilio.

Es importante la búsqueda de insectos en focos silvestres como nidos de aves, árboles, cactus, arrumes de madera y piedra, para verificar la ausencia de especímenes en este ecotopo, observada en este estudio, en Soatá, y de esta manera prevenir la aparición de estos focos.

El mejoramiento de las viviendas rurales contemplado dentro del Programa Nacional de Prevención y Control de la enfermedad es primordial ya que disminuiría la infestación por *T. dimidiata* al eliminar condiciones que favorecen su establecimiento como son las paredes de bahareque y los pisos de tierra.

Es necesario implementar campañas para promover la re-organización de las viviendas y los peridomicilios, reubicando corrales, animales domésticos y removiendo los arrumes de madera para evitar que los insectos que habitan allí migren al domicilio.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeyda-Artigas, R.J., Barges, M.D., and Mass-Coma, S. 2000. ITS-2 rDNA sequencing on *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *J Parasitol.* 86: 537-544.

Anderson, J.M., Lai J.E., Dotson, M., Cordon, C., Ponce, C., Norris, D.E., Beard C.B. 2002 . Identification of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *Infection Genetics and Evolution*, 1: 230-24.

Angulo, V.M. 2000. Mejoramiento de la vivienda como estrategia de control de Chagas. Academia Nacional de Medicina de Colombia. Publicaciones conmemoración del descubrimiento de la enfermedad de Chagas (90 años). Vol. 22 Número 2 [53]. (<http://www.encolombia.com/medicina/academedicina>).

Barges, M.D., Marcilla, A., Ramses, J.M., Dujardin, J.P., Schofield, C.J. 2000. Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 95(4). Jul./Aug.

Barges, M.D., Guhl, F., Mas-Coma, S. 2002. Genetic characterization of domestic, peridomestic and sylvatic *Triatoma dimidiata* populations from Colombia by ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Acta Trópica*, 83 (suppl 1): S149.

Botero, D., Restrepo, M. 1998. Parasitosis Humanas. Corporación para Investigaciones Biológicas, 3ª edición. Colombia- Medellín. pp, 203-223.

Caldeira, R., Carvalho, O., Mendonça, C., Graeff-Teixeira, C., Silva, M., Ben, R., Maurer, R., Lima, W., Lenzi. H. 2003. Molecular differentiation of *Angiostrongylus costaricensis*, *A. Cantonensis*, and *A. Vasorum* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol 98 (8).

Chagas, C. 1909. Nova tripanozomia humana. *Mem.inst. Oswaldo Cruz*, 16.-216.

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.G., Higgins, D., Thompson, J. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, No. 13.

Corredor, A., Santacruz, M.M., Páez, S., Guatame, L.A. 1990. Distribución de los Triatomos Domiciliarios en Colombia. Instituto Nacional de Salud.

D'Alessandro, A., Barreto, P., Duarte, R. 1972. Distribution of Triatomine - transmitted Trypanosomiasis in Colombia and new records of the bugs and infection. *J. Med. Ent.* Vol. 8. No. 2: 159-172.

D'Alessandro, A., Barreto, P., Thomas, M. 1981. Nuevos registros de triatomos domiciliarios y extradomiciliarios en Colombia. *Colombia Médica* Vol. 12 No. 2.

Dias, J.C.P., Silverio, A.C., Schofield, C.J. 2002. The impact of Chagas disease controls in Latin America - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* Vol. 97 (5): 603-612.

Guhl, F., Nicholls, S. 2001. Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes -CIMPAT, Bogotá.

Guhl, F., Jaramillo, C. 2002. Memorias curso taller internacional: Sistemas de Información Geográfica, Sensores Remotos Y Genética Poblacional de Vectores y Parásitos Aplicados al Control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los andes-CIMPAT.

Guhl, F. 2000. Programa nacional de control y prevención de la enfermedad de Chagas en Colombia, antecedentes, estado actual del programa y perspectivas futuras. Curso taller de Biología, Epidemiología y Control de la Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis. Universidad del Tolima.

Guhl, F., Shofield, C.J. 1996. Population genetics and control of triatominae. *Parasitology Today.* 12 (5).

Guhl, F., Shofield, C.J. 2004. Proceedings ECLAT-AMCHA International Workshop on Chagas Disease Surveillance in Amazon Region. (Brasil 2002). Publicado por CIMPAT, Universidad de los Andes.

Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G., Cardenas, F., Arroyo, A., Aufderheide, A. 2000. Chagas disease and human migration. Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 95(4) 553-555.

Guhl, F., Garcia, M., Ching, R., Juliao, O., Jaramillo, C., Pachon, D., Molina, S., Barrios, D. 1995. Enfermedad de Chagas transfusional en Colombia. Tribuna Medica. 91(3) 129-136.

Guhl, F. & Jaramillo, C. 1998. Estado actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia. Curso-taller Control de tripanosomiasis americana y Leishmaniosis. Universidad de los Andes. 47-60.

Jaramillo, C., Montaña, M.F., Castro, L.R., Vallejo G.A., Guhl, F. 2001. Differentiation and Genetic analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD Amplificación. Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 96: 1043-1048.

Jaramillo, C., Guhl, F., Vallejo G. A., Montaña, M.F., Castro, L. R. 2002. Búsqueda de marcadores moleculares para la diferenciación entre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius colombiensis* vectores de la enfermedad de Chagas. Memorias Curso Taller Internacional-CIMPAT, Universidad de los Andes. p. 33- 41

Marcilla, A., BARGUES, M, D., Ramsey, M. J., Magallon-Gastelum, E., Salazar- Shettino, P.M., Abad-Franch, F., Dujardin, J. P., Shofield, J. C., and Mas-Coma, S. 2001. The ITS2 of the nuclear rDNA as a Molecular Marker for Populations, Species, and Phylogenetic Relationships in Triatomine (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. Molecular Phylogenetics and Evolution. 18, Nº1, January: 136-142.

Marinkelle, C.J. 1972. Colombian Triatominae and their infestation with Trypanosomatid Flagellates. Mitt Inst. Aleman Invest. Cient. 6:13-29.

Michaels, F. 2002. Protocolo de Integración del Programa Nacional del Control de la enfermedad de Chagas y el Programa Nacional de Subsidio de Vivienda Rural en Colombia. Instituto Nacional de Salud. Septiembre 13/ 2002. (http://www.ins.gov.co/epidemiologia/psp/etv/chagas_protocolo.pdf).

Miles, M., Feliciangeli, M.D., Rojas de Arias, A. 2003. American Tripanosomiasis (Chagas` disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ*, Vol 326, June.

Molina, J., Gualdrón, Luis E., Brochero, H., Olano, V., Barrios, D., Guhl, F. 2000. Distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomedica* 20: 344-60.

Moncayo, A. 2003. Chagas disease: Current Epidemiological Trends alter the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. 98(5): 577-591.

Ramírez, C. 2002. Estudio de la estructura genética de poblaciones silvestres, peridomesticas y domesticas de *Triatoma dimidiata* de una zona endémica del departamento de Boyacá. Tesis de grado, Universidad de los Andes. Bogotá.

Schofield, C.J. 2002. Evolution and control of *Triatoma dimidiata*. Taller para el establecimiento de pautas técnicas en el control de *Triatoma dimidiata*., OPS El Salvador.

Stephen, A., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Stothard, J.R., Yamamoto Y., Cherchi, A., García, A.L., Valente, S., Schofield, C.J., Miles, M.A. 1998. 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. *Bull. Entomol. Res.* 88:553-560.

Ucrós, H., Rocha, H., Duque, M. 1971. Distribución de los Triatomíneos en Colombia-Antioquia Médica Vol. 21. No. 8.

Uribe, C. 1929. Infección del *Rhodnius prolixus* Stahl por *Trypanosoma Cruzi* y *Trypanosoma Rangeli*. Bogotá. Editorial Minerva.

Vallejo, G.A., Lozano, L.E., Carranza, J.C., Sanches J.L., Jaramillo, J.C., Guhl, F., Jaramillo, C.A., Marinkelle, C.J. 2000. Ecología de los triatóminos no domiciliados en Colombia con especial referencia a *Rhodnius colombiensis* en el departamento del Tolima. Curso-taller internacional de Biología, Epidemiología y control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis. Universidad el Tolima. 22-28

Vergel, C. 2002. Marcadores Moleculares Especie-Específicos para la diferenciación entre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius colombiensis* Vectores de la Enfermedad de Chagas. Tesis de grado. Universidad de los Andes. Bogotá.

Zeledón, R. 1981. El *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) y su relación con la enfermedad de Chagas. Editorial Universidad Estatal a Distancia San Jose. Costa Rica.

Zapata, M.A., Bedoya, A.M., Quirós, O., Zuluaga, J.S., Quiñones, M.L., Tu, Z., Luckhart, S. 2003. Análisis de secuencias ITS2 por PCR-RFLP para diferenciar especies de *Anopheles* recolectados en Nechi y San Pedro de Uraba. 2001. BIOMÉDICA. Revista del Instituto Nacional de Salud. Vol. 23, suplemento Octubre.

9. ANEXOS

A1. PROTOCOLOS Y REACTIVOS

Extracción de DNA con el Kit AquaPure Genomic

1. Lisis Celular: En un tubo de microfuga de 1.5ml, adicionar 150µl de solución de lisis al tejido (patas) y macerar con un pestle plástico, luego adicionar otros 150µl de la misma solución. Agregar 1.5µl de proteinasa K, mezclar por inversión 25 veces e incubar toda la noche en baño maría a 55°C. Adicionar 1.5µl de solución RNasa y mezclar 25 veces, incubar a 37°C, 15-60 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
2. Precipitación de Proteínas: Agregar 100µl de solución para precipitar proteínas, mezclar con vortex 20 segundos y centrifugar 3 minutos.
3. Precipitación del ADN: Recolectar el sobrenadante en un tubo nuevo de 1.5ml con 300µl de isopropanol al 100% frío, mezclar 50 veces por inversión y centrifugar 1 minuto. Adicionar 300µl de etanol al 70% frío, mezclar por inversión 10 veces y centrifugar 1 minuto. Luego invertir el tubo y dejar secar.
4. Hidratación del ADN: Adicionar 80µl de solución de hidratación de ADN, incubar 1 hora a 65°C, mezclar en vortex 5 segundos y centrifugar un pulso.

Soluciones y Reactivos para la Electroforesis

Buffer TBE 10X

Para preparar 1 litro, disolver 7.4 g de EDTA en medio básico pH 8 (~5 perlas de NaOH disueltas en 100 ml de agua destilada). Adicionar 108 g de Tris-base y 56 g de ácido bórico. Mezclar bien y llevar a 1 L con agua destilada.

Buffer TBE 1X

Medir 50 ml de TBE 10X y llevar a 500 ml con agua destilada.

Solución Stock de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

Disolver 1 g de bromuro de etidio en 100 ml de agua destilada. Mezclar y calentar ligeramente. Almacenar a 4°C en envase oscuro.

Solución de Bromuro de Etidio (5 µg/ml)

En 300 ml de agua destilada diluir 150 µl de la solución stock de bromuro de etidio. Almacenar a 4°C en envase oscuro.

Buffer de carga 6X

Mezclar 0.25% de azul de bromofenol con sucrosa (p/v) 40% en agua destilada. Almacenar a 4 °C.

Electroforesis en Geles de Agarosa

Preparación del gel de agarosa al 1.5%: Disolver 0.45 g de agarosa en 30 ml de buffer TBE 1X, calentar en hasta ebullición, adicionar 2 μ l de bromuro de etidio (5 μ l/ml). Mezclar bien, servir en una cubeta de electroforesis, poner el peine para hacer los pozos y dejar gelificar a temperatura ambiente.

Sumergir el gel en una cámara de electroforesis con TBE 1X. Conectar a una fuente de poder y pre-correr el gel 30 minutos a 70 voltios.

En los pozos del gel pre-corrido, servir 12 μ l de cada muestra previamente mezclada con buffer de carga a una concentración final de 1X. Conectar a la fuente de poder y correr 100 minutos a 70 voltios.

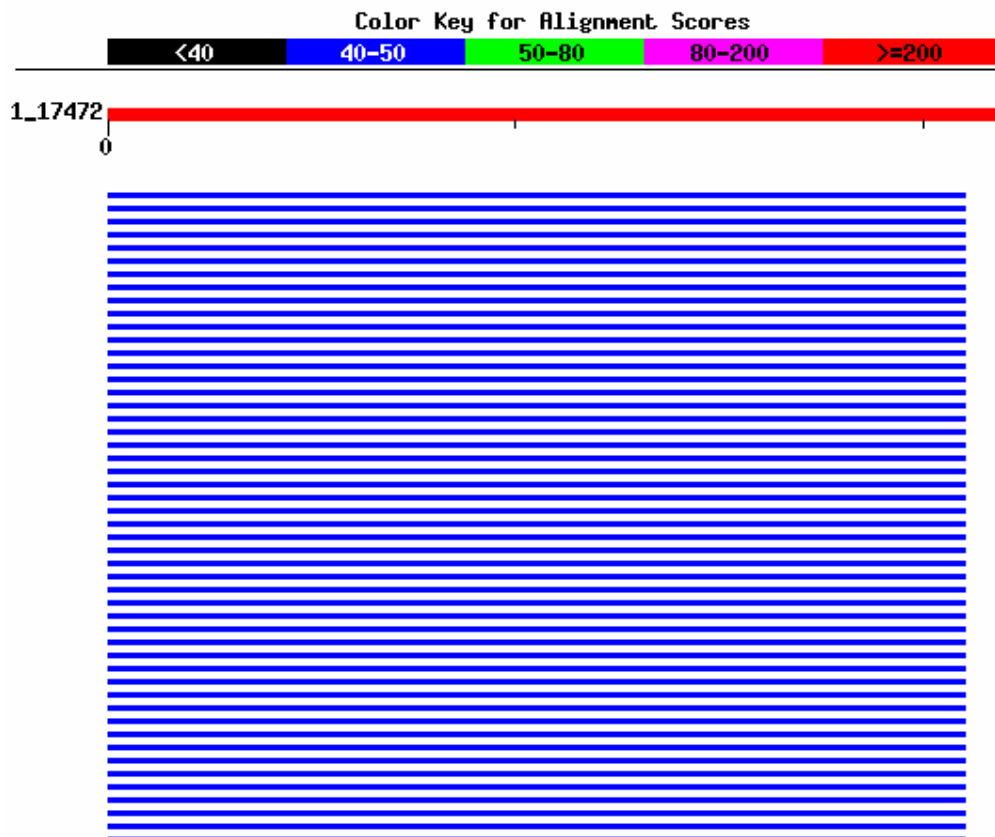
A2. RESULTADO DE ALINEAMIENTOS CON BLASTN 2.2.9

Alineamiento del primer 28T con la base de datos el GenBank en busca de la región de anillamiento sobre el gen rADN 28S.

Query= GCA CTA TCA AGC AAC ACG ACT C (22 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 2,280,493 sequences; 11,051,402,435 total letters

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence



Score E

Algunas secuencias que producen alineamientos significativos (bits) Value

gi 19908625 gb AF366692.1 	Winthemia rufonotata isolate 28S...	44	0.002
gi 19908624 gb AF366691.1 	Vibrissina aurifrons isolate 28S...	44	0.002
gi 19908623 gb AF366690.1 	Trichopoda indivisa isolate 28SV...	44	0.002
gi 19908622 gb AF366689.1 	Siphosturmia sp. JOS-2001 isolat...	44	0.002
gi 19908621 gb AF366688.1 	Pseudochaeta siminina isolate 28...	44	0.002
gi 19908620 gb AF366687.1 	Phyllophilopsis sp. JOS-2001 iso...	44	0.002
gi 19908619 gb AF366686.1 	Phormia regina isolate 28SPhyll ...	44	0.002
gi 19908618 gb AF366685.1 	Peleteria biangulata isolate 28S...	44	0.002
gi 19908617 gb AF366684.1 	Patelloa facialis isolate 28SPb ...	44	0.002
gi 19908616 gb AF366683.1 	Orasturmia vallicola isolate 28S...	44	0.002
gi 19908615 gb AF366682.1 	Mystacella frioensis isolate 28S...	44	0.002
gi 19908614 gb AF366681.1 	Myiopharus doryphorae isolate 28...	44	0.002
gi 19908613 gb AF366680.1 	Muscopteryx sp. JOS-2001 isolate...	44	0.002
gi 19908612 gb AF366679.1 	Metoposarcophaga sp. JOS-2001 is...	44	0.002
gi 19908611 gb AF366678.1 	Masiphya townsendi isolate 28sMe...	44	0.002
gi 19908610 gb AF366677.1 	Lespesia archippivora isolate 28...	44	0.002
gi 19908609 gb AF366676.1 	Leschenaultia adusta isolate 28s...	44	0.002
gi 19908608 gb AF366675.1 	Orasturmia vallicola isolate 28s...	44	0.002
gi 19908607 gb AF366674.1 	Heliodorus cochisensis isolate 2...	44	0.002
gi 19908606 gb AF366673.1 	Chetogena parvipalpis isolate 28...	44	0.002
gi 19908605 gb AF366672.1 	Gonia brevipulvilli isolate 28SC...	44	0.002
gi 19908604 gb AF366671.1 	Gaediopsis setosa isolate 28SGb ...	44	0.002
gi 19908603 gb AF366670.1 	Frontiniella parancilla isolate ...	44	0.002
gi 19908602 gb AF366669.1 	Exorista mella isolate 28SFp 28S...	44	0.002
gi 19908601 gb AF366668.1 	Zizyphomyia crescentis isolate 2...	44	0.002
gi 19908600 gb AF366667.1 	Eucelatoria armigera isolate 28S...	44	0.002
gi 19908599 gb AF366666.1 	Drino incompta isolate 28SEa 28S...	44	0.002
gi 19908598 gb AF366665.1 	Frontiniella regilla isolate 28S...	44	0.002
gi 19908597 gb AF366664.1 	Cylindromyia euchenor isolate 28...	44	0.002
gi 19908596 gb AF366663.1 	Cryptomeigenia n. sp. JOS-2001 i...	44	0.002
gi 19908595 gb AF366662.1 	Chrysoexorista sp. JOS-2001 isol...	44	0.002
gi 19908594 gb AF366661.1 	Myiopharus moestus isolate 28SMm...	44	0.002
gi 19908593 gb AF366660.1 	Chetogena tachinomoides isolate ...	44	0.002
gi 19908592 gb AF366659.1 	Chaetogaedia monticola isolate 2...	44	0.002
gi 19908591 gb AF366658.1 	Siphona n. sp. JOS-2001 isolate ...	44	0.002
gi 19908590 gb AF366657.1 	Ceracia dentata isolate 28SCd 28...	44	0.002
gi 19908589 gb AF366656.1 	Carcelia reclinata isolate 28SCr...	44	0.002
gi 19908588 gb AF366655.1 	Blondelia eufitchiae isolate 28S...	44	0.002
gi 19908587 gb AF366654.1 	Blepharomyia sp. JOS-2001 isolat...	44	0.002
gi 19908586 gb AF366653.1 	Austrophorocera sp. JOS-2001 iso...	44	0.002
gi 19908585 gb AF366652.1 	Aplomya theclarum isolate 28Sat ...	44	0.002

Lugar detallado de alineamiento con algunas secuencias

- *Aedes aegypti* ASAP

Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Culicoidea; Aedes; Stegomyia.

Secuencia de rRNA

Longitud = 327 nt

Alineamiento del 100% = 22/22

```
Query: 1 gcactatcaagcaacacgactc 22
          |||
Sbjct: 258 gcactatcaagcaacacgactc 237
```

- *Pollenia rudis* isolate Exeter 1999

Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Brachycera; Muscomorpha; Oestroidea; Calliphoridae; Pollenia.

Secuencia parcial de gen 28S

Longitud= 2178 nt

Alineamiento del 100% = 22/22

```
Query: 1 gcactatcaagcaacacgactc 22
          |||
Sbjct: 256 gcactatcaagcaacacgactc 235
```

- *Hemipyrellia fernandica*, isolate Tanzania 1994

Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Brachycera; Muscomorpha; Oestroidea; Calliphoridae; Hemipyrellia.

Secuencia parcial de gen 28S

Longitud = 2185 nt

Alineamiento del 100% = 22/22

Query: 1 gcactatcaagcaacacgactc 22
 |||||
Sbjct: 273 gcactatcaagcaacacgactc 252

El alineamiento del gen 28S del rADN de *Rhodnius prolixus* con iniciador 28T por medio del programa BLAST2 no genero ninguna homología debido a que la secuencia parcial que existe de este gen es de solo 54 nucleotidos.

-Rhodnius prolixus

Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Paraneoptera; Hemiptera; Euhemiptera; Heteroptera; Panheteroptera; Cimicomorpha; Reduviidae; Triatominae; Rhodnius

Secuencia parcial del gen ribosomal 18S, secuencia del ITS-1, secuencia parcial del gel ribosomal 5.8S, secuencia completa del ITS-2, y secuencia parcial del gen ribosomal 28S

Longitud= 1103 nt

<1..27 /product="18S ribosomal RNA"
28..192 /product="internal transcribed spacer 1"
98..130 /rep_orig evidence=not_experimental
193..346 /product="5.8S ribosomal RNA"
347..1048 /product="internal transcribed spacer 2"
1049..>1103 /product="28S ribosomal RNA"