

Programa de pos-graduación en Genética

Tesis de Maestría

**DIVERSIFICACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES DE  
*Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (REDUVIIDAE:  
TRIATOMINAE) DE COLOMBIA Y VENEZUELA**

**Juan Carlos Londoño Alvarez**

Barraquilla (Atlántico), Colombia

2021

**Universidad Simón Bolívar**  
Programa de pos-graduación en Genética

**DIVERSIFICACIÓN GENÉTICA EN POBLACIONES DE  
*Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (REDUVIIDAE:  
TRIATOMINAE) DE COLOMBIA Y VENEZUELA**

Tesis presentada al Programa de  
Postgrado en Genética como  
requisito parcial para obtener  
el grado de Maestre.

**Juan Carlos Londoño Alvarez**

Tutores:

**PhD. Lisandro Alfonso Pacheco Lugo**

**MSc. Alveiro José Pérez Doria**

Barraquilla (Atlántico), Colombia

2021

## **Dedicatoria**

*Dedicado a mi amada hija Miranda, por quien vale la pena todo, y mi amada esposa y compañera de camino Carmen.*

## Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, cuya contribución fue vital para el desarrollo de este trabajo de investigación:

- Doctor Hernán Carrasco, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, por su aporte en la consecución de la muestra de vectores del centro-norte de Venezuela y su apoyo incondicional en la fase de laboratorio de gran parte de la muestra.
- Doctor Alfonso Bettin, Líder Grupo Caribe de Investigación de la Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia, por su valioso apoyo en la fase de laboratorio de las muestras del departamento de Sucre y parte de las muestras de Venezuela.
- MSc. Alveiro Pérez Doria, miembro del Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre (Sucre, Colombia), por el apoyo en la consecución de las muestras del departamento de Sucre y sus valiosos aportes en las fases de laboratorio y revisión del documento final de tesis.
- Doctor Lisandro Pacheco Lugo, Profesor Investigador de la Universidad Simón Bolívar de Barranquilla, por su incondicional apoyo en la dirección del presente trabajo de investigación, consecución de reactivos y revisión del documento final de tesis.

## Resumen

**Objetivo:** Determinar la diversificación genética en poblaciones de *Panstrongylus geniculatus* de Colombia y Venezuela.

**Metodología:** se analizaron 202 secuencias del gen Cyt-b de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela, a fin de calcular índices de diversidad genética, de estructura y flujo génico, evaluar hipótesis de evolución neutral y realizar inferencias filogenéticas.

**Resultados:** el conglomerado de *P. geniculatus* de Venezuela, presentó una diversidad haplotípica inferior ( $H_d = 0,73$ ) respecto al de Colombia ( $0,93$ ). Los pares de poblaciones Casanare-Leticia, Sucre-Santanderes y Libertador-La Guaira no presentaron estructuración genética ( $F_{ST} 0,05$  y  $N_m > 1$ ). Se registraron desviaciones de la hipótesis de evolución neutral en las poblaciones del Meta en Colombia ( $D^* = 1,44347$ ) y La Guaira en Venezuela ( $D = -1,67405$ ;  $D^* = 1,82716$ ). El análisis filogenético mostró tres grandes clados, uno exclusivo para Colombia, uno para Venezuela y uno mixto, la red de haplotipos permitió observar cuatro haplogrupos principales.

**Conclusiones:** El haplotipo ancestral de las poblaciones de *P. geniculatus* pudo estar distribuido en un corredor conformado por los departamentos de Sucre, Bolívar y Santander en Colombia.

**Palabras Clave:** *P. geniculatus*, diversidad genética, estructura poblacional, filogenia, filogeografía, Colombia, Venezuela.

## Abstract

**Objective:** To determine genetic diversification in of *Panstrongylus geniculatus* popilations from Colombia and Venezuela.

**Methodology:** 202 Cyt-b gene sequences of *P. geniculatus* from Colombia and Venezuela were analyzed in order to calculate genetic diversity, structure and gene flow indexes, make hypotheses of neutral evolution test and make phylogenetic inferences.

**Results:** The *P. geniculatus* cluster from Venezuela had a lower haplotypic diversity ( $Hd = 0.73$ ) than Colombia cluster ( $0.93$ ). The Casanare-Leticia, Sucre-Santanderes and Libertador-La Guaira population pairs did not show genetic structuring ( $F_{ST} 0.05$  and  $Nm > 1$ ). Deviations from the hypothesis of neutral evolution were recorded in the populations of Meta in Colombia ( $D^* = 1.44347$ ) and La Guaira in Venezuela ( $D = -1.67405$ ;  $D^* = 1.82716$ ). Phylogenetic analysis showed three major clades, one exclusive for Colombia, one for Venezuela and one mixed, the haplotype network allowed observing four major haplogroups.

**Conclusions:** The ancestral haplotype of *P. geniculatus* populations could be distributed in a corridor conformed by the departments of Sucre, Bolivar and Santander in Colombia.

**Key words:** *P. geniculatus*, genetic diversity, population structure, phylogeny, phylogeography, Colombia, Venezuela.

# Contenido

Resumen .....	V
Abstract .....	VI
Lista de Figuras .....	9
Lista de Tablas .....	10
Introducción .....	11
<b>1. Problema de Investigación .....</b>	<b>13</b>
1.1 Planteamiento del Problema .....	13
1.2 Justificación .....	13
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>15</b>
2.1 Objetivo General .....	15
2.2 Objetivo específicos .....	15
<b>3. Marco Teórico .....</b>	<b>16</b>
3.1 Enfermedad de Chagas .....	16
3.2 Evolución Biológica .....	18
3.2.1 Selección natural .....	19
3.2.2 Deriva génica .....	20
3.2.3 Mutaciones .....	21
3.2.4 Flujo génico .....	22
3.3 Teoría Neutral de la Evolución Molecular .....	25
3.4 Coalescencia .....	25
3.5 ADN Mitocondrial .....	26
3.5.1 Gen mitocondrial Citocromo b (Cyt-b) .....	27
3.6 Estado del Arte .....	27
<b>4. Diseño Metodológico .....</b>	<b>31</b>
4.1 Tipo de Estudio .....	31
4.2 Área de Estudio .....	31

4.3	Población y Muestra .....	33
4.4	Análisis de Datos .....	34
4.4.1	Extracción de ADN.....	34
4.4.2	Amplificación y secuenciación de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b ..	35
4.4.3	Análisis de secuencias .....	36
4.5	Marco ético .....	37
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>38</b>
5.1	Diversidad Genética .....	38
5.2	Estructura Poblacional .....	39
5.2.1	Estructura y flujo génico.....	42
5.2.2	Pruebas de neutralidad .....	44
5.3	Filogenia y Filogeografía .....	46
5.3.1	Análisis filogenético.....	46
5.3.2	Análisis de red de haplotipos .....	48
<b>6.</b>	<b>Discusiones .....</b>	<b>51</b>
6.1	Diversidad Genética .....	51
6.2	Estructura Poblacional .....	52
6.3	Filogenia y Filogeografía .....	55
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>59</b>
7.1	Conclusiones .....	59
7.2	Recomendaciones.....	60
<b>8.</b>	<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>61</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo .....</b>	<b>70</b>

## Lista de figuras

Ilustración 1	Área de estudio.	32
Ilustración 2	Frecuencia absoluta de haplotipos. del gen mitocondrial Cyt-b en poblacione de <i>P. geniculatus</i> de Colombia y Venezuela.	40
Ilustración 3	Haplotipos del gen mitocondrial Cyt-b de <i>P. geniculatus</i> de Colombia y Venezuela.	41
Ilustración 4	Árbol filogenético de ML de 202 secuencias de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b de <i>P. geniculatus</i> de Colombia y Venezuela, basado en el modelo Tamura 3-parámetros.	47
Ilustración 5	Red de haplotipos basada en parsimonia estadística obtenida a partir 202 secuencias de un fragmento de gen mitocondrial Cyt-b de <i>P. geniculatus</i> de Colombia y Venezuela.	50

## Lista de tablas

Tabla 1	Muestra <i>P. geniculatus</i> de Colombia y Venezuela.	33
Tabla 2	Índices de diversidad genética en poblaciones colombianas y venezolanas de <i>P. geniculatus</i> .	39
Tabla 3	Índice de estructuración genética y flujo genético en poblaciones colombianas y venezolanas de <i>P. geniculatus</i> .	42
Tabla 4	AMOVA de poblaciones colombianas y venezolanas de <i>P. geniculatus</i> .	44
Tabla 5	Pruebas de neutralidad D de Tajima y D* de Fu y Li para poblaciones de <i>P. geniculatus</i> de Colombia y Venezuela.	45
Tabla 6	Diversidad de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b en poblaciones de triatominos de Norte, Centro y Suramérica.	52

# INTRODUCCIÓN

Los miembros de la subfamilia Triatominae son insectos que tienen en común el hecho de ser hematófagos estrictos en ambos sexos y según la etología y ciertos rasgos fisiológicos de cada especie, presentan diferentes grados de importancia en la epidemiología de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas (ECh). La ECh es producida por el parásito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), un flagelado que se encuentra de forma exclusiva en América y tiene una distribución que se extiende desde el centro de Argentina hasta el sur de California, zona que coincide con el hábitat de sus vectores biológicos, insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Hemíptera: Reduviidae) (1), grupo taxonómico que contiene alrededor de 140 taxones (2). En Colombia *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *T. venosa* son consideradas como las especies de triatominos con mayor importancia epidemiológica en la ECh, mientras que a *Panstrongylus geniculatus* es considerado un vector secundario, importante en el ciclo enzoótico de la ECh (3,4), sin embargo, en Venezuela se ha registrado un incremento en la importancia epidemiológica de esta especie debido a una alta frecuencia intrusión en las viviendas urbanas y sub-urbanas (5–7), asociación con el *T. cruzi* y mamíferos y aves tanto silvestres como sinantrópicos (8,9), y su incriminación en brotes de la ECh en la ciudad de Caracas en Venezuela (10,11).

*P. geniculatus* presenta una amplia distribución respecto a otras especies dentro del género *Panstrongylus*, su distribución abarca 18 países latinoamericanos, desde México hasta Argentina, incluyendo algunas islas del Caribe (12). En Colombia se ha registrado en 19 de los 32 Departamentos del país (3,13), mientras que en Venezuela se distribuye en todo el territorio nacional a excepción de los Estados Apure y Nueva Esparta (2). En un estudio sobre variabilidad genética de este triatomino en dos municipios del Distrito Metropolitano

de Caracas (DMC) en Venezuela se registró el establecimiento de linajes a nivel local de *P. geniculatus* (14), mientras que un estudio que exploró la diversificación genético en norte de Suramérica del insecto, se pone de manifiesto la relación filogenética entre las poblaciones colombianas y venezolanas de *P. geniculatus* y su separación debida al levantamiento de la cordillera de los Andes (15).

En el presente trabajo de investigación se explora de forma conjunta la información de secuencias del gen mitocondrial Cyt-b de poblaciones colombianas y venezolanas de *P. geniculatus* y así poder brindar un panorama más amplio sobre las relaciones filogenéticas de estas poblaciones y los procesos de diversificación genética ocurridos en esta especie en esta región del continente americano.

# 1. Problema de Investigación

## 1.1 Planteamiento del Problema

El hecho de que *P. geniculatus* esté considerado como un vector secundario en la epidemiología de la tripanosomiasis americana, ha conllevado a que sean poco frecuentes los estudios sobre la variabilidad genética y relaciones filogenéticas en poblaciones de *P. geniculatus*, las investigaciones se han dirigido principalmente a establecer la filogenia del género *Panstrongylus*, así como la historia evolutiva de la subfamilia Triatominae (16–18), por tal motivo, el conocimiento sobre aspectos como diversidad genética, estructura poblacional y relaciones filogenéticas en poblaciones de *P. geniculatus* es incipiente, hecho que genera la siguiente interrogante: ¿Cuál es la diversidad genética, estructura poblacional y relaciones filogenéticas que exhiben poblaciones colombianas y venezolanas de *P. geniculatus*?

## 1.2 Justificación

La ECh se asocia particularmente a las condiciones de pobreza donde las condiciones precarias de construcción de las viviendas, brindan refugio seguro a los vectores biológicos de esta enfermedad, por esta razón, la ECh está ampliamente distribuida en Latinoamérica y se le ha asociado principalmente a áreas rurales, sin embargo, la enfermedad se ha descrito en zonas urbanas y suburbanas de ciudades del centro-norte de Venezuela al igual que en centros urbanos de diferentes ciudades de Bolivia (10,11,19), hecho que indica que el perfil rural de la enfermedad puede cambiar hacia un perfil urbano.

Por lo anterior, el conocimiento sobre todos los aspectos de la biología de esta especie cobra especial importancia en los ámbitos social, económico, ambiental y de políticas públicas, ya que a pesar de que este triatomino se considera como un vector secundario en la epidemiología de la ECh, *P. geniculatus* presenta una gran capacidad adaptativa a entornos periurbanos y peridomiciliarios, lo cual aumenta la frecuencia de contacto entre el triatomino y las poblaciones humanas, lo cual posibilita la aparición de brotes de la enfermedad de Chagas en estas comunidades.

Estudios sobre la genética de poblaciones de *P. geniculatus*, como el que se presenta en este trabajo de investigación, constituyen la base para realizar aproximaciones sobre la resistencia a insecticidas, adaptación a diferentes microhábitats, potencial de colonización de viviendas, preferencias alimenticias y capacidad vectorial entre otros aspectos relacionados con la importancia de esta especie en la epidemiología de la ECh en el norte de Suramérica, debido a la relevancia que ha tomado esta especie en brotes de la ECh en países como Venezuela y las posibles implicaciones en otras áreas geográficas como Colombia u otros países donde se distribuye la especie.

Por otro lado, uno de los objetivos de la genética de poblaciones es conocer la distribución y frecuencia de los alelos en una población, mientras que la filogeografía estudia el cambio y distribución de dichas frecuencias en función de la distribución geográfica de la especie, el estudio de ambos aspectos contribuye comprensión de la historia evolutiva de la especie. La justificación de este tipo de trabajos viene dada por el impacto esperado a nivel académico de la presente propuesta de investigación, donde se espera que sus resultados incentiven a otros investigadores a realizar estudios sobre la genética de poblaciones y relaciones filogenéticas de otras especies independientemente de la importancia económica o epidemiológica de la misma, ya que la naturaleza del hombre siempre ha sido la de conocer cómo funcionan las cosas y los fenómenos naturales, lo cual le brinda una importancia preponderante a la investigación básica.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo General**

Determinar la diversificación del gen mitocondrial Citocromo b en poblaciones de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela.

### **2.2 Objetivo específicos**

- Determinar la diversidad genética de la población de *P. geniculatus* en localidades de Colombia y Venezuela.
- Determinar la estructura poblacional de *P. geniculatus* en localidades de Colombia y Venezuela.
- Inferir las relaciones filogenéticas entre poblaciones de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela.

## 3. Marco Teórico

### 3.1 Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis americana (TA) o enfermedad de Chagas (ECh) es una parasitosis heteroxénica causada por el hemoflagelado *T. cruzi*, la cual se desarrolla entre un hospedador mamífero, (incluyendo a humanos) y hospedadores artrópodos, insectos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) que hacen las veces de vectores biológicos (20). El *T. cruzi* se encuentra distribuido desde el sur de California hasta el centro de Argentina, área que coincide con la distribución geográfica del vector biológico del parásito (1), la enfermedad se ha descrito en México, Centro y Suramérica, asociada generalmente a condiciones de pobreza, particularmente en áreas rurales, sin embargo dicho perfil rural ha evidenciado un cambio hacia áreas urbanas y suburbanas de países como Venezuela y Bolivia (7,11,19).

El ciclo biológico del parásito inicia cuando un insecto triatomino pica a un mamífero infectado y toma junto a la ingesta de sangre, parásitos circulantes en sangre periférica durante la fase aguda de la infección, los cuales se denominan *tripomastigotes sanguíneos*, los cuales sufren cambios morfológicos a medida que recorren el tracto digestivo del parásito, presentando formas esféricas en el estómago (*esferomastigotes*), en el intestino medio predominan formas alargadas conocidas como *epimastigotes*, que se reproducen por fisión, presentan una membrana ondulante pequeña y no tienen flagelo, finalmente, en el intestino grueso se hallan formas también elongadas, pero delgadas y más largas en comparación con los epimastogotes, con una membrana ondulante que recorre todo el cuerpo y presencia de flagelo, la cual se considera la forma infectante del parásito, denominada *tripomastigote metacíclico* (21). El tripomastigote metacíclico sale junto a las

heces en el momento de la defecación después de una ingesta de sangre por parte del triatomino, el parásito penetra en el hospedador a través de varias vías posibles, puede entrar a través de la herida causada por la picadura del insecto, o a través de mucosas como la bucal, nasal o conjuntival (20,21). Una vez en la circulación sanguínea, el parásito invade múltiples tipos celulares con núcleo y en el citoplasma cambia a la forma amastigota, se reproduce (por fisión) y posteriormente cambia a la forma metacíclica sanguínea para romper la célula y repetir el ciclo de invasión celular. Durante la fase aguda es posible detectar al parásito en sangre periférica, si un insecto triatomino pica y se alimenta de un hospedador durante esta fase, el ciclo del parásito inicia nuevamente, mientras que, en la fase crónica de la infección, no es posible detectar al parásito en sangre periférica del hospedador (21).

En humanos se han descrito múltiples formas de transmisión del *T. cruzi*, estas comprenden la **transmisión vectorial**, la cual se presenta cuando una persona es picada por un triatomino infectado y el parásito en las defecaciones logra penetrar a través de la herida dejada por la picadura o a través de las diferentes mucosas; **transfusional**, cuando se adquiere el parásito por medio de transfusión de sangre proveniente de una persona infectada; **congénita**, madre a hijo; **Oral**, por consumo de alimentos o bebidas contaminadas con heces de triatominos; **accidental**, a nivel de laboratorios donde se trabaja con el parásito, **por trasplante de órganos**, en el caso de pacientes que reciben trasplantes procedentes de personas infectadas con el parásito (10,11,21–23).

El *T. cruzi*, causa destrucción celular a nivel de varios tejidos durante los diferentes ciclos de reproducción, ruptura celular e invasión de nuevas células durante la fase aguda, sin embargo, las mayores complicaciones de la enfermedad se presentan en la fase crónica, cuando debido a la respuesta inmune del hospedador, los parásitos abandonan la circulación periférica y se encuentran en nidos, o pseudoquistes, en diferentes tejidos, dando

origen a complicaciones particularmente graves a nivel cardíaco, en el que se presenta fibrosis e infiltrado, con predominio de células mononucleadas (21,22).

En Colombia se estima que existe una prevalencia de la ECh de un 5% y que de 3 a 5 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad, principalmente en los departamentos Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Casanare, Boyacá, Arauca, Meta y Magdalena, los cuales son considerados como regiones endémicas para la ECh y donde los principales vectores encontrados en hábitats humanos son *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *T. venosa* y *T. maculata* (21,22). En Venezuela, la población en riesgo para la ECh asciende aproximadamente a 6 millones de personas, donde los estados más afectados son: Trujillo, Lara, Portuguesa y Barinas, probablemente, debido a sus características geográficas de pie de monte, con zonas cafetaleras y viviendas de bahareque y paja donde los principales vectores asociados a los hábitats humanos son triatominos de la especie *R. prolixus*, *T. maculata*, y *P. geniculatus* (24,25).

### **3.2 Evolución Biológica**

La evolución biológica se define como *“la transformación en ciertas características genéticas o fenotípicas de las poblaciones o grupos de poblaciones de organismos, en el transcurso de sucesivas generaciones”* (26). La mecánica del desarrollo evolutivo se basa en tres puntos: (1) variabilidad heredable de ciertos rasgos, (2) variabilidad entre integrantes de la misma población respecto al éxito reproductivo y, (3) la correlación entre variabilidad heredable y éxito reproductivo. La correlación entre ambos tipos de variabilidad determinará el tipo de evolución al cual está sometida la población. Si la correlación entre la variabilidad de caracteres heredable y la variabilidad en éxito reproductivo es baja o nula, los cambios de una generación a otra fluctuarán al azar, y se produce lo que se conoce como *evolución neutra*. No obstante, si la correlación es elevada, el cambio evolutivo no será al

azar sino en la dirección del aumento en el éxito reproductivo, debido a la mejora en la eficacia adaptativa, dando lugar a lo que se conoce como *evolución adaptativa*" (27).

El modo y el tiempo en que operan y ocurren los procesos evolutivos, dan lugar a dos grandes categorías de análisis, éstas son: *la microevolución* y *la macroevolución*. La microevolución implica el surgimiento continuo de pequeñas variaciones en poblaciones actuales, las cuales están influenciadas principalmente por la selección natural, pero también por otras fuerzas evolutivas como la deriva genética, mientras que la macroevolución comprende la aparición de Novo, de rango de grupos taxonómicos superiores como familias y órdenes entre otros (28).

La evolución entendida como el cambio en las características de las poblaciones a través de sucesivas generaciones, no es el resultado de un único proceso, sino el de un conjunto de procesos, que pueden actuar de forma conjunta o que uno tenga mayor influencia que los otros. Este conjunto de procesos está conformado por las fuerzas que determinaran el destino evolutivo de una especie, estas fuerzas son la selección natural, la deriva génica, las mutaciones y el flujo genético.

### **3.2.1 Selección natural**

La selección natural es el mecanismo que condiciona o limita la tasa reproductiva o la eficacia biológica de los seres vivos en relación con características fenotípicas heredables, lo que origina cambios en las frecuencias de los fenotipos de la población en generaciones futuras (evolución). Se presenta cuando existe: (1) variabilidad individual, (2) una relación entre variabilidad en eficacia biológica y variabilidad fenotípica, y (3) una relación entre esas características fenotípicas y el genotipo del individuo (heredable). Los distintos tipos de selección (estabilizadora, direccional y disruptiva), tienen lugar debido a que la selección

natural afecta al valor medio y a la varianza del carácter en la población, (27). De acuerdo a Futuyma (26), estos tipos de selección se definen como:

- **Estabilizadora:** cuando los individuos que exhiben caracteres intermedios del rango de variación poblacional se ven favorecidos. Este tipo de selección actúa con caracteres morfológicos tanto continuos como discretos. En el caso de los caracteres continuos, un intervalo de valores intermedios entre los dos extremos se selecciona por ser más ventajoso.
- **Direccional:** cuando los individuos de un extremo de la población, o un tipo (conjunto de características particulares) se encuentran en ventaja.
- **Disruptiva:** también llamada diversificadora, cuando los individuos con formas extremas del rango de variación se ven favorecidos.

### 3.2.2 Deriva génica

La deriva genética es el producto de las fluctuaciones aleatorias de las frecuencias genéticas en una población. Estas fluctuaciones son consecuencia directa del encuentro al azar de los gametos en el proceso de reproducción sexual. La deriva genética hace referencia a un caso de error en el muestreo. La magnitud del error de muestreo, es inversamente proporcional al tamaño muestral, por lo tanto, cuanto menor es la muestra, mayores son sus efectos. En el caso de las poblaciones, a menor número de reproductores en una población determinada, mayores serán los cambios en las frecuencias alélicas a causa de la deriva genética (29).

### 3.2.3 Mutaciones

Las secuencias de ADN normalmente se copian de forma exacta durante el proceso de replicación, sin embargo, tanto en la replicación como en el proceso de reparación del ADN pueden surgir errores que dan como resultado nuevas secuencias, estos errores son llamados *mutaciones*, las cuales constituyen la fuente última de variación y novedades evolutivas (30). Las mutaciones se presentan tanto en células somáticas como en células germinales, pero solo las ocurridas en células germinales pueden ser heredadas. Las mutaciones se clasifican en:

- **Sustituciones:** se da cuando se reemplaza un nucleótido por otro. Las sustituciones pueden ser de dos tipos, **1- transiciones:** es el reemplazo de una base pirimídica por otra base pirimídica (C y T), o de una púrica por otra púrica (A y G). Hay cuatro tipos de transiciones,  $A \rightarrow G$ ,  $G \rightarrow A$ ,  $C \rightarrow T$ , y  $T \rightarrow C$ ; **2- transversiones:** es el reemplazo de una base pirimídica por una base púrica o viceversa. Hay ocho tipos de transversiones,  $A \rightarrow C$ ,  $A \rightarrow T$ ,  $C \rightarrow A$ ,  $C \rightarrow G$ ,  $T \rightarrow A$ ,  $T \rightarrow C$ ,  $G \rightarrow C$ , y  $G \rightarrow T$ .
- **Recombinaciones:** es un proceso que conduce a la obtención de un nuevo genotipo a través del intercambio de material genético entre secuencias homólogas de ADN de orígenes diferentes. Las recombinaciones pueden ser de dos tipos, **entrecruzamiento** (o recombinación recíproca), la cual involucra el intercambio de un par de secuencias homólogas entre cromosomas homólogos, produciendo así nuevas combinaciones de secuencias adyacentes mientras que al mismo tiempo se retienen ambas variantes involucradas en el evento de recombinación. El otro tipo de recombinación es **la conversión génica** (o recombinación no recíproca), la cual se caracteriza por el reemplazo de una de las secuencias homólogas por la otra, lo cual significa que una de las variantes (secuencias) se pierde el evento de recombinación.
- **Deleciones e Inserciones:** cuando se remueven uno o más nucleótidos de la secuencia de ADN, se habla de una deleción, si por el contrario se adicionan uno o

más nucleótidos a la secuencia, entonces se habla de una inserción. Ambos fenómenos se conocen en conjunto con el nombre de *indels* (abreviación del inglés insertion/deletion), debido a que cuando se comparan ambas secuencias homólogas, es imposible decir cual presenta la inserción y cual la delección.

- **Inversiones:** es el giro de 180° de un segmento de la doble hélice de la cadena de ADN, el cual involucra a dos o más nucleótidos. Las inversiones pueden ocurrir a través de dos procesos, **(1)** por rompimiento y reconexión del cromosoma y **(2)** por un entrecruzamiento intracromosómico entre dos segmentos homólogos orientados en direcciones opuestas.

### 3.2.4 Flujo génico

El flujo génico comprende todos los mecanismos de transferencia de genes de una población a otra, dicha transferencia de genes se puede presentar en mayor o menor grado, y abarca tanto genes nucleares como genomas uniparentales (mitocondria o el cloroplasto), debido al movimiento de gametos, semillas, individuos juveniles o adultos, y también comprende eventos de extinción y recolonización de poblaciones enteras (31).

La proporción con la que se presenta cada uno de los alelos en un gen dentro de una población se conoce como frecuencia alélica, ésta es usualmente diferente entre las poblaciones de una especie. El flujo génico o migración, previene la divergencia entre las poblaciones debido al intercambio genes, moviendo los genes en las poblaciones que forman a una especie, y con ello se logra la homogenización de las frecuencias alélicas (32). La tasa de migración  $m$  es el parámetro necesario para cuantificar la relevancia de este proceso en una población o conjunto de poblaciones;  $m$  se define como la probabilidad al tomar un gen al azar de una población, éste sea migrante. Si el flujo génico entre poblaciones es alto, todas las poblaciones evolucionan de como una sola unidad evolutiva,

pero, si es muy bajo, las poblaciones divergen y el proceso evolutivo se da de forma casi independientemente en cada subunidad.

**La estructura genética de las poblaciones** está determinada por la diferencia en las frecuencias alélicas entre poblaciones, y ésta a su vez, están determinadas por los niveles de flujo génico entre las poblaciones. El método más utilizado para estimar el nivel de flujo génico se basa en el estadístico  $F_{ST}$  de Wright, el cual es una medida de la correlación entre los genes en una subpoblación en relación a la población entera (33). El cálculo de  $F_{ST}$  está basado en el modelo de islas infinitas propuesto por Sewall Wright (34). El modelo implica la existencia de condiciones de equilibrio entre un número infinito de islas de igual tamaño (subpoblaciones), que intercambian, con igual probabilidad, migrantes entre cualquiera de las islas, a tasa constante. Las poblaciones representan réplicas, y el modelo se puede caracterizar con sólo dos parámetros: tamaño poblacional (N) y tasa de migración (m). La importancia de la deriva génica es proporcional a  $1/N$ , mientras que la importancia del flujo génico es proporcional a m (31).

El planteamiento de Sewall Wright se desarrolla de la siguiente manera: el coeficiente de endogamia en una población subdividida ( $F_{IT}$ ), se puede dividir entre el componente debido a apareamientos no aleatorios dentro de poblaciones ( $F_{IS}$ ) y el componente de la subdivisión entre poblaciones ( $F_{ST}$ ); de esta manera, la endogamia total tendrá un componente causado por el entrecruzamiento entre congéneres dentro de una población ( $F_{IS}$ ) y otro por el balance entre la deriva génica y el flujo génico ( $F_{ST}$ ). Los estadísticos F pueden ser entendidos como la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión respecto a cualquier otro nivel superior. La correlación entre los genes dentro de los individuos (I) respecto a los genes de la población total (T) está definida por  $F_{IT}$ , que se corresponde con la endogamia total; la correlación entre genes dentro de los individuos respecto a los de la subpoblación (S) está definida por  $F_{IS}$ , mientras que la correlación entre los genes dentro de la subpoblación respecto los de la población total está definida por  $F_{ST}$ ,

que es igual a la probabilidad de que dos alelos idénticos por descendencia se combinen en un cigoto(32).

$F_{st}$  es definido como:

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

donde  $H_T$  es el promedio de la heterocigosis esperada en la población total, para todos los loci, y  $H_S$  es el promedio de la heterocigosis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci (31).

$F_{ST}$  mide la diferenciación genética entre las poblaciones ya que mide la variación de las frecuencias alélicas entre ellas.  $F_{ST}$  se relaciona con la migración de la siguiente forma: la tasa a la que un alelo es fijado en una población, es inversamente proporcional al tamaño efectivo de la población,  $N_e$  ( $N$  por simplicidad). Esta tasa de fijación es contrarrestada por los migrantes (flujo genético) que llega de otras poblaciones a una tasa  $m$ . Estos factores llegan a un equilibrio en donde  $F_{st}$  es aproximadamente:  $F_{ST} \approx 1 / (4 Nm + 1)$ , para genomas diploides y  $F_{ST} \approx 1 / (2 Nm + 1)$  para genomas haploides.

$F_{ST}$  puede estimarse mediante aloenzimas o datos moleculares de ADN y el flujo génico efectivo puede posteriormente calcularse en el equilibrio de manera teórica como:  $Nm \approx \frac{1}{4} (1/F_{ST} - 1)$  para organismos diploides y  $Nm \approx \frac{1}{2} (1/F_{ST} - 1)$  para organismos haploides.

En el modelo de islas de Wright, si  $Nm$  es superior a 1, el flujo génico es capaz de superar los efectos de la deriva genética, por lo que se impide la diferenciación local de las poblaciones y por consiguiente, todas evolucionen cohesivamente como una sola unidad, contrariamente, si  $Nm$  es inferior a 1, la deriva actúa casi independientemente en cada población, lo que trae como consecuencia que las poblaciones divergen fuertemente con el paso del tiempo (32,33).

### **3.3 Teoría Neutral de la Evolución Molecular**

En esta teoría se propone que la mayoría del cambio a nivel molecular es adaptativamente neutro, principalmente porque las nuevas variantes o mutaciones no son más o menos adaptadas que las variantes reemplazadas, por lo tanto, son selectivamente neutras (35). Como funcionalmente las nuevas variantes son equivalentes, la selección natural no podría actuar en favor de unas sobre las otras, consecuentemente, fuerzas distintas a la selección, deberían ser las que generan el cambio. El neutralismo propone que las mutaciones y la deriva genética, son las principales fuerzas que rigen el cambio a nivel molecular, donde la selección actuaría eliminando las variantes deletéreas (selección negativa), pero la fijación de variantes beneficiosas mediante selección natural sería un evento poco frecuente.

### **3.4 Coalescencia**

Cuanto más grande es una población, más distante, en promedio, están relacionados sus miembros. La teoría coalescente cuantifica esta idea intuitiva, al relacionar los patrones de ascendencia común dentro de una muestra, con el tamaño y la estructura de la población en general (36). La esencia de la teoría coalescente implica ir hacia atrás en el tiempo, a partir de una muestra actual y así identificar eventos ocurridos en el pasado en el ancestro común más reciente de la muestra (37). La coalescencia es un proceso aleatorio que describe la manera en que los procesos genéticos poblacionales definen la forma de la genealogía de las secuencias de genes, está fundamentada en la hipótesis de que todos los individuos de una población natural coalescen (o descienden de) en un ancestro común.

### 3.5 ADN Mitocondrial

Las mitocondrias son organelas intracelulares que están presentes en plantas, hongos y animales. Las mitocondrias tienen como función la fosforilación oxidativa y producción de ATP, su ADN codifica proteínas propias y también es capaz de autoreplicarse. El ADN mitocondrial es una molécula de forma circular y de tamaño pequeño con entre 16 a 20 kilobases, está constituida por 37 genes, de los cuales, 13 son ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia, además, presenta una región conocida como región control o D-loop (en vertebrados y equinodermos) de aproximadamente 1 kb), la cual controla la replicación y transcripción en la molécula y tiene una tasa alta de mutación en muchos taxones como consecuencia del estrés oxidativo de la mitocondria y la falta de mecanismos de reparación del ADN mitocondrial (38).

En el núcleo se codifican alrededor de 90 proteínas para el ensamblaje de los ribosomas mitocondriales, 20 aminoacil sintetasas, y todas las enzimas necesarias para la replicación y transcripción del ADNmt, mientras que los complejos mitocondriales citocromo oxidasa c, ATP sintetasa y NADH deshidrogenasa b-c1 tienen subunidades que se codifican por genes mitocondriales y nucleares (39). El ADNmt presenta dos cadenas, una es llamada *cadena pesada*, rica en guanina, y la otra es la *cadena liviana*, rica en citosina; no posee intrones y todas las secuencias codificadoras se encuentran de forma contigua, solo el bucle de desplazamiento (región control D-loop) es un segmento no codificante (40). Propiedades particulares del ADN mitocondrial son: alto número de copias, alta tasa de sustitución, prácticamente nula recombinación y herencia materna (39–41).

### 3.5.1 Gen mitocondrial Citocromo b (Cyt-b)

El citocromo b es una proteína ampliamente secuenciada, es la principal subunidad de la ubiquinol citocromo c reductasa, una enzima mitocondrial de tipo redox que desempeña una función principal en la cadena respiratoria de todos los organismos eucariotas (a excepción de algunos protozoos que carecen de mitocondrias como por ejemplo: *Thrychomonas*) y en el ciclo de foto reducción de muchas bacterias (42,43). El gen Cyt-b es uno de los más usados en trabajos de filogenética ya que ha mostrado ser lo suficientemente variable como para resolver preguntas inherentes a las poblaciones y lo suficientemente conservado como para resolver preguntas sobre organismos más estrechamente relacionados (44). El gen del Cyt-b está presente en casi todos los organismos eucariotas y procariotas, lo cual es una evidencia de su aparición temprana durante la evolución, de tal manera que el gen ancestral debió haber existido antes de la separación de los principales linajes de organismos procariotas y haber evolucionado lentamente, presentando unas regiones muy conservadas y otras que presentan una variabilidad considerable, convirtiéndolo en un marcador valioso para determinar la distancia filogenética entre las especies (42).

### 3.6 Estado del Arte

La especie *P. geniculatus* es un insecto estrictamente hematófago, taxonómicamente ubicado dentro del orden Hemiptera, suborden Heteróptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. presenta la más amplia distribución geográfica dentro de los miembros del género *Panstrongylus*, se encuentra en 18 países latinoamericanos, desde México hasta Argentina, incluyendo algunas islas del Caribe (12). En Venezuela se ha registrado la presencia de esta especie en casi todo el territorio nacional (exceptuando los estados Apure y Nueva Esparta), con una distribución vertical que va de 0 a 2000 metros sobre el nivel del

mar (2,5). *P. geniculatus* es considerado una especie euritérmica, adaptado tanto a ecotopos muy secos como a ecotopos húmedos, donde es encontrado en madrigueras o lugares de descanso de armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos y aves, así como en huecos de árboles o debajo de su corteza, en bromélias y entre las estructuras foliares de algunas especies de palma (12). En Colombia, este triatomino se ha encontrado en los siguientes departamentos del territorio nacional: Atlántico, Chocó, Córdoba, Cundinamarca, Guainía, Guaviare, Huila, La Guajira, Magdalena, Meta, Norte de Santander, Putumayo, Risaralda, Santander, Sucre, Tolima, Valle del Cauca, Vaupés y Vichada, en total, 19 de los 32 departamentos que conforman el territorio nacional (3,13). En diversos estudios se ha encontrado a *P. geniculatus* infectado naturalmente por *T. cruzi* con índices de infección natural que sobrepasan el 80% de los insectos evaluados en algunos casos (45,46), de igual manera, se ha registrado infestación mixta de *P. geniculatus* junto a otros triatominos y evidencia de un proceso de domiciliación del insecto (6,25,47), y su incriminación en brotes de la ECh en Venezuela (10,11,48).

La literatura consultada, evidencia que los estudios más frecuentes donde se analizan secuencias de ADN, son realizados a niveles taxonómicos superiores al de especie, por ejemplo, en un estudio sobre género *Panstrongylus*, donde se utilizó el segundo espaciador del transcrito interno del ADNr nuclear (ITS-2), los autores encontraron evidencias de la polifilia del género, ya que al comparar las secuencias de ADN seis especies de *Panstrongylus* contra las secuencias de otros miembros de Triatomini, se encontró que las distancias genéticas obtenidas entre especies del género *Panstrongylus* fue mayor que la registrada entre especies de *Panstrongylus* y otras especies de la tribu Triatomini de Centro y Norteamérica (17).

*P. geniculatus* es considerado un vector secundario, en consecuencia, la mayoría de los estudios sobre variabilidad genética y estructura poblacional de triatominos se han concentrado en especies de mayor importancia en la epidemiología de la ECh (por ejemplo,

especies de los géneros *Rhodnius* y *Triatoma*), sin embargo, dichos estudios ofrecen un marco de referencia para el presente trabajo de investigación, ya que permiten observar cómo se estructuran las diferentes poblaciones de triatominos en función de la fragmentación del hábitat u otros elementos que afecten el flujo genético entre los componentes de la población. Por ejemplo, en un trabajo de variabilidad genética en poblaciones de *T. rubrovaria* provenientes de Brasil, Argentina y Uruguay, en el cual se empleó como herramienta molecular la técnica de polimorfismos del ADN amplificado aleatoriamente (RAPD) y secuencias de los espaciadores ITS-1 e ITS-2, los autores hallaron elementos que permitieron separar cada una de las poblaciones estudiadas (49). En otro estudio sobre variación genética en tres poblaciones colombianas de *T. dimidiata*, procedentes de los departamentos de la Guajira, Cesar y Santander, donde se analizó el gen mitocondrial ND4, se encontró una significativa estructuración entre las poblaciones estudiadas (50), de igual manera, una investigación sobre variabilidad genética en poblaciones colombianas de *R. prolixus* mediante análisis del ITS-2 por medio de RAPDs y PCR-RFLP, registró la variabilidad genética y estructuración poblacional de este triatomo ampliamente distribuido en Colombia (51).

Otros estudios han mostrado la presencia de haplotipos únicos, en especies separadas geográficamente cuando se analizan secuencias de genes o fragmentos de genes tanto nucleares como mitocondriales. Por ejemplo, se pueden citar los trabajos sobre variabilidad genética, relaciones filogenéticas y flujo genético en *T. infestans* del Chaco (52) usando ITS-1 y citocromo-oxidasa I (COI); variación genética, estructura poblacional y filogenia en *T. rubida* y *T. recurva* del Desierto de Sonora utilizando los genes mitocondriales citocromo b (Cyt-b) y COI (53); variabilidad genética en *T. sanguisuga* usando secuencias del Cyt-b y ADNr 16S (54); filogeografía de *T. brasiliensis* usando Cyt-b (55).

En Venezuela y Colombia son pocos los estudios realizados sobre variabilidad genética y estructura poblacional de *P. geniculatus*, la literatura consultada solo registra un estudio

realizado en el centro-norte de Venezuela (14), donde los investigadores evidencian la diversificación de linajes a nivel local de *P. geniculatus* en la ciudad de Caracas mientras que otro trabajo de investigación, pero llevado a cabo en Colombia sobre diversificación genética de poblaciones de *P. geniculatus* del norte de Suramérica, aportó evidencia sobre la monofilia de la especie y además que el proceso de cladogénesis observado es producto de la orografía de la cordillera de los Andes, donde se destaca que en uno de los clados estuvo conformado por individuos tanto de Venezuela como Colombia (15).

## **4. Diseño Metodológico**

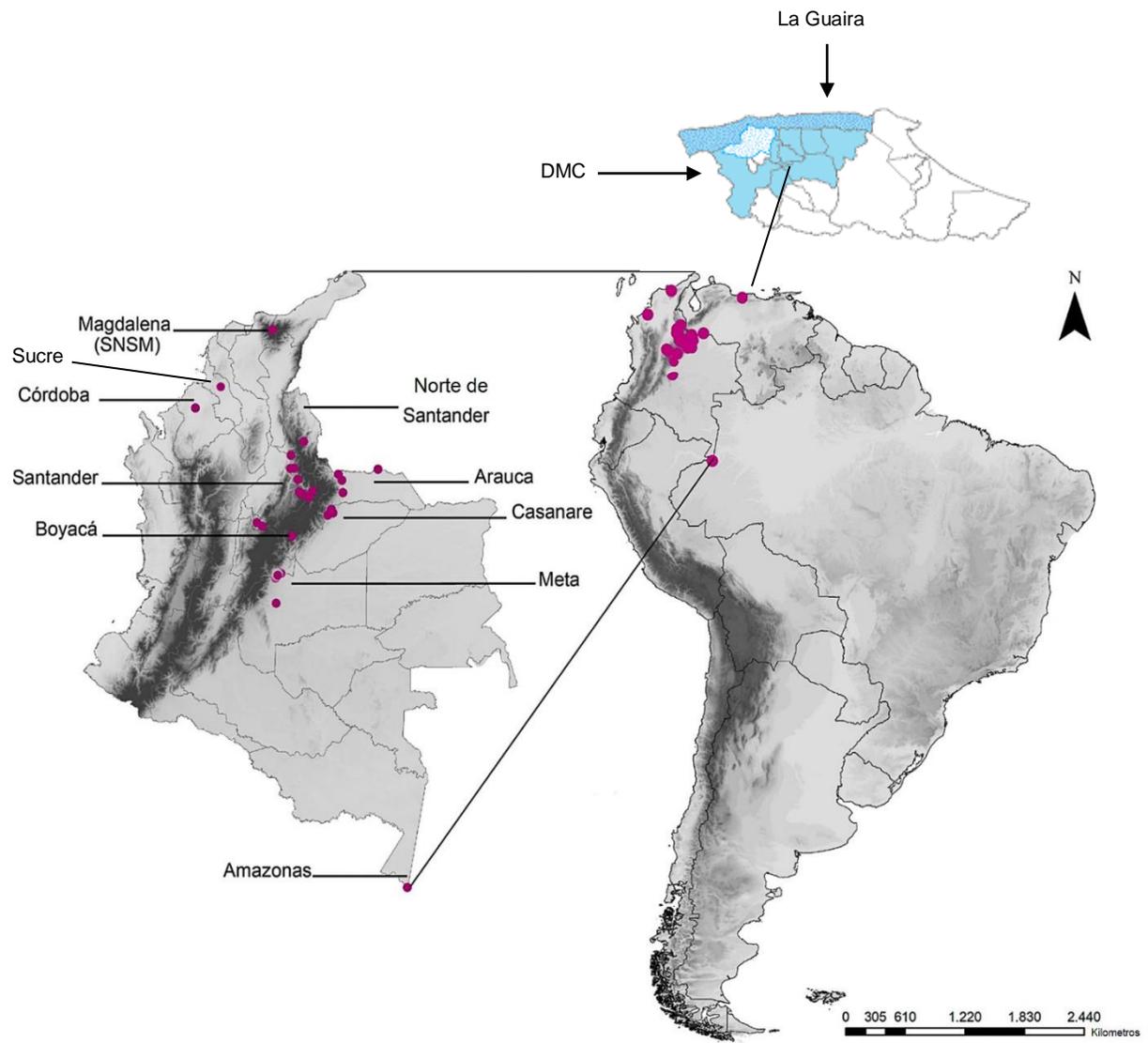
### **4.1 Tipo de Estudio**

Según la finalidad del estudio es de tipo descriptivo, respecto a la secuencia temporal es de corte transversal, según la asignación de los factores es de tipo observacional y respecto a la cronología de los hechos es de tipo retrospectivo.

### **4.2 Área de Estudio**

El área de estudio de la presente investigación corresponde a un espacio geográfico del norte de Suramérica (ilustración 1), representado por tres localidades del centro norte de Venezuela, con los municipios Libertador y Sucre del Distrito Metropolitano de la ciudad de Caracas (DMC) y el Estado La Guaira, y diez localidades de Colombia distribuidas de la siguiente manera:

- Costa Norte: departamentos de Córdoba, Sucre y Magdalena (Sierra Nevada de Santa Marta SNSM).
- Llanos Orientales: departamentos de Arauca, Casanare y Meta.
- Región Andina: departamentos de Boyacá, Santander y Norte de Santander.
- Amazonía: departamento del Amazonas (Leticia).



**Ilustración 1.** Área de estudio. Tomado y modificado de: Caicedo-Garzón et al (2019).

### 4.3 Población y Muestra

La población del presente estudio está integrada por individuos de *P. geniculatus* procedentes del centro norte de Venezuela y las regiones Costa Norte, Andina y Llanos Orientales de Colombia como lo indica la ilustración 1. La tabla 1 muestra el número y procedencia de la muestra (el anexo 1 muestra el listado de secuencias utilizadas en el presente trabajo de investigación).

**Tabla1. Muestra *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela**

PAIS	POBLACIONES	n	Procedencia
Colombia	Arauca	12	Blast NCBI
Colombia	Boyacá	4	Blast NCBI
Colombia	Casanare	19	Blast NCBI
Colombia	Córdoba	3	Blast NCBI
Colombia	Sucre	6	C.V <sub>a</sub> *
Colombia	Meta	23	Blast NCBI
Colombia	Santander	4	Blast NCBI
Colombia	Norte de Santander	2	Blast NCBI
Colombia	SNSM	2	Blast NCBI
Colombia	Leticia	5	Blast NCBI
Venezuela	Libertador	48	C.V <sub>b</sub> **
Venezuela	La Guaira	8	C.V <sub>b</sub>
Venezuela	Sucre	66	C.V <sub>b</sub>
Colombia	...	80	
Venezuela	...	122	
Colombia-Venezuela	Total	202	

\*C.V<sub>a</sub>: Colección de vectores Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Colombia; \*\*C.V<sub>b</sub>: colección de vectores Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios, UCV-IMT, Venezuela.

Las muestras de origen venezolano hacen parte de la colección entomológica de vectores de la enfermedad de Chagas del Laboratorio de Biología Molecular de Vectores adscrito al Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de Venezuela. Como criterio de inclusión para las muestras del centro norte de Venezuela, se incorporaron a la muestra triatominos

capturados por muestreo pasivo, es decir, capturados por habitantes de los municipios Sucre y Libertador del DMC, luego de la intrusión del insecto en el domicilio o peridomicilio, los insectos debían estar en buen estado (completos y no en estado de putrefacción) y ser identificados como la especie *P. geniculatus* a través de las correspondientes claves taxonómicas (56).

En el caso de Colombia, la muestra del departamento de Sucre, hace parte de la colección de vectores del Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, las cuales fueron recolectadas en zona rural del municipio de Colosó con el uso de trampas de luz. El trabajo de captura de especímenes contó con el permiso *macro recolección de especímenes de la diversidad biológica*, otorgado mediante resolución 0391 del 11 de abril de 2016 por la *Autoridad Nacional de Licencias Ambientales*.

Las secuencias de los departamentos de Arauca, Boyacá, Casanare, Córdoba, Amazonas (Leticia), Meta, Norte de Santander, Santander y Magdalena (SNSM) (tabla 1) se obtuvieron a través de la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (57) de la página web de la Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU.: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

## **4.4 Análisis de Datos**

### **4.4.1 Extracción de ADN**

Como fuente de ADN se utilizaron dos patas del insecto, estas fueron depositadas en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL y lavadas con búfer fosfato salino (PBS 1X: 8,06 g de NaCl + 0,22 g de KCl + 1,15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,20 g de KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ajuste de pH con HCl y/o NaOH) para evitar contaminación, y posteriormente fueron criofracturadas en nitrógeno líquido y extracción con búfer de lisis (NaCl 50 mM; EDTA 50 mM; TRIS 50mM pH 8; SDS 1%) según método descrito previamente (58). La concentración de ADN se determinó por

espectrofotometría de luz ultravioleta, a través de la densidad óptica (DO) a 260 nm, donde una unidad (1) de DO equivale a 50 µg/mL.

#### **4.4.2 Amplificación y secuenciación de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b**

Para la implementación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron los cebadores de inicio sentido *Cytb-32F*: 5'-GGACGATGATATTATTATGGATC-3' y contrasentido *Cytb-82R*: 5'-ATTACTCCTCCTAGYTTATTAGGAATT-3' (59). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 20 µL, con una concentración final de los reactivos de: búfer 1x; cebadores a 0,5 pmol; MgCl<sub>2</sub> a 2 mM; DNTPs a 0,2mM y una unidad de Taq-polimerasa. El perfil térmico fue el siguiente: desnaturalización inicial durante 5 min a 95°C; 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, anillamiento a 55°C por 55 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos y extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (2 µl de 50ng/mL BrEt en 100 mL de agua destilada) por 10 min y lavados con agua destilada por 20 minutos, visualizados y fotografiados con un equipo de fotodocumentación transiluminador UV KODAK Digital Science y una cámara acoplada KODAK DC120.

La purificación de los productos de PCR para la remoción de cebadores, dímeros de cebadores, dNTPs y enzima polimerasa, se realizó mediante precipitación con isopropanol absoluto y etanol al 70%. El ADN fue resuspendido en 10 uL de agua desionizada. La secuenciación de 81 amplicones se llevó a cabo través de la automatización del método enzimático de Sanger (60,61) en el Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios (IMT-UCV), empleando el estuche comercial BigDye® Terminator v3.1 de Applied Biosystems, siguiendo las recomendaciones del fabricante. 47 amplicones del Cyt-b fueron enviados a

los Laboratorios Macrogen en Corea del Sur para su secuenciación.

#### **4.4.3 Análisis de secuencias**

La corrección de errores de secuenciación se llevó a cabo con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor V7.2.5 (62), y el alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con el programa Clustal W (63). Se calcularon los siguientes índices de diversidad genética: diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) (64), y haplotípica ( $H_d$ ), número de sitios polimórficos ( $S$ ) y número promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ). Para evaluar la hipótesis nula de evolución neutral en una población se implementó la prueba de neutralidad  $D$  de Tajima (65) y de  $D^*$  de Fu y Li (66). La estructura poblacional se determinó a través del cálculo del índice de fijación  $F_{ST}$  y la tasa de migración  $Nm$  (67,68), se realizó además un análisis de varianza molecular AMOVA para estimar la estructura genética a partir de la información contenida en las frecuencias haplotípicas. El cálculo de los índices de diversidad genética, pruebas de neutralidad e índices de estructuración genética se ejecutó en el programa DNA SP 6 (69). El AMOVA se implementó en el programa Arlequin 3.5.2.2 (70).

La historia evolutiva se dedujo mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de 3 parámetros de Tamura (71). El árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-1538,26) se muestra en los resultados del presente estudio. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan se muestra junto a las ramas (% de bootstrap). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias entre pares estimada mediante el enfoque de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL), y seleccionando a continuación la topología con un valor de probabilidad logarítmica superior. Se utilizó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasa evolutiva entre los sitios (5 categorías (+G, parámetro = 0,5041)). El modelo de tasa de sustitución permitió que algunos sitios fueran evolutivamente invariables ([+I], 42,38% de sitios). El análisis incluyó 203 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codones incluidas fueron  $1^a+2^a+3^a$ +no codificantes. Se

eliminaron todas las posiciones que contenían gaps y datos perdidos. El conjunto de datos final incluía un total de 374 posiciones. Los análisis evolutivos (modelo de sustitución nucleotídica y construcción de árbol filogenético) se realizaron en MEGA7 (72). Las inferencias filogeográficas se hicieron a través del análisis de red de haplotipos por parsimonia estadística (73,74). El análisis se llevó a cabo en el programa TCS (74), ejecutado como plugin en el programa PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) (75).

## **4.5 Marco ético**

El presente trabajo de investigación no involucró experimentación en humanos, por lo tanto, no se requirió de consentimiento informado para la recolección de muestra. Sin embargo, se observó y acató la normativa nacional vigente para acceder directamente a los especímenes silvestres de la diversidad biológica del territorio nacional, a través de solicitud de permiso *macro recolección de especímenes de la diversidad Biológica*, otorgado mediante resolución 0391 del 11 de abril de 2016 por la AUTORIDAD NACIONAL DE LICENCIAS AMBIENTALES, en esta resolución se encuentra listado el grupo de investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, institución de donde proceden las muestras del departamento de Sucre en Colombia.

## 5. Resultados

En el presente trabajo de investigación se analizaron un total de 203 secuencias de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b, 202 pertenecientes a especímenes de *P. geniculatus* procedentes de Colombia (n = 80) y Venezuela (n = 122), y una secuencia de *T. dimidiata* (número de acceso GenBank JN585850) como grupo externo en el análisis filogenético. En el estudio de genética de poblaciones se usaron 200 secuencias de *P. geniculatus*, mientras que en el análisis filogenético y de red de haplotipos se emplearon 202 secuencias.

### 5.1 Diversidad Genética

Las 200 secuencias analizadas presentaron una extensión final de 458 pares de bases. El alineamiento múltiple de las secuencias permitió observar 294 sitios conservados y 80 sitios variables en el total de las secuencias, mientras que este número varió para cada localidad en función de la extensión de las secuencias de cada población (tabla 2). Se observaron 50 haplotipos en total, mientras que los municipios de Libertador y Sucre en Venezuela presentaron el mayor número de haplotipos por población, la Hd fue alta para la mayoría de las poblaciones en estudio, a excepción Boyacá (0,5) y Córdoba (0,667) en Colombia y el Estado de la Guaira de Venezuela (0,643).

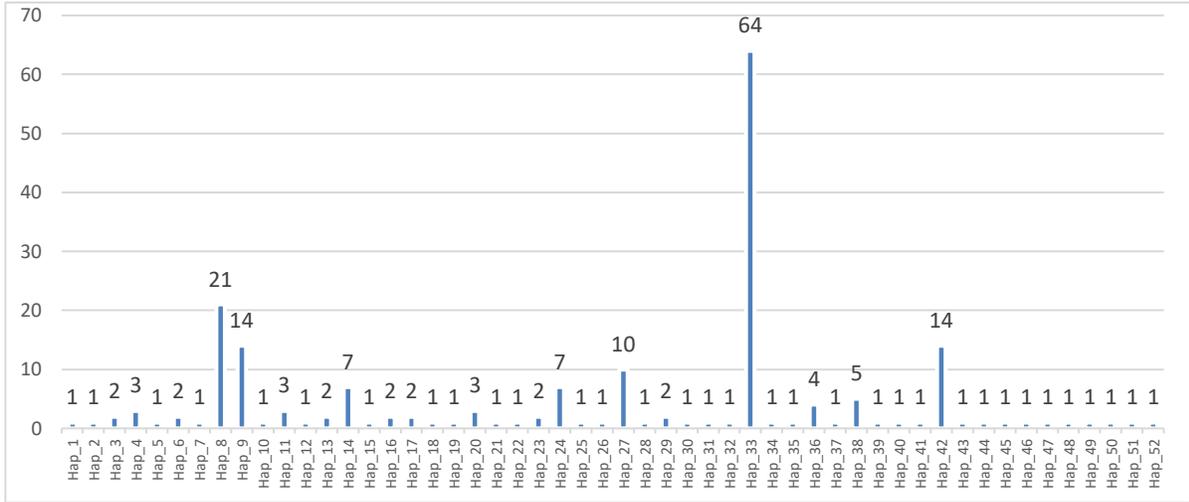
**Tabla 2. Índices de diversidad genética en poblaciones colombianas y venezolanas de *P. geniculatus*.**

Población	Secuencias	S	SV	SIP	Haplotipos	Hd
Arauca	12	9	1	8	7	0,909
Boyacá	4	13	13	0	2	0,5
Casanare	19	34	22	12	9	0,813
Cordoba	3	1	1	0	2	0,667
Sucre	6	62	20	42	5	0,933
Meta	23	25	1	24	8	0,791
Santanderes	6	75	25	50	4	0,867
Leticia	5	8	7	1	3	0,700
Libertador	48	42	7	35	14	0,697
La Guaira	8	7	7	0	4	0,643
Sucre-Ven	66	56	10	46	18	0,821
Colombia	80	95	15	80	34	0,929
Venezuela	122	43	13	30	27	0,73
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>80</b>	<b>17</b>	<b>63</b>	<b>50</b>	<b>0,873</b>

S = sitios polimórficos, SV = sitios únicos variables, SIP = sitios con información parsimoniosa, Hd = diversidad haplotípica.

## 5.2 Estructura Poblacional

La frecuencia haplotípica en una población es una de las principales fuentes de información para determinar los procesos de flujo génico y posible estructuración entre los miembros de dicha población. En el análisis de 202 secuencias (incluyendo dos de la SNSM) se determinó que el Hap33 fue el haplotipo más frecuente, y se encuentra exclusivamente en *P. geniculatus* de Venezuela, seguido en segundo lugar por el Hap8 con presencia exclusiva en *P. geniculatus* de Colombia y en tercer lugar los haplotipos Hap9, también presente solo en triatomíneos de origen colombiano y el Hap 42 presente solo en Venezuela (ilustraciones 2 y 3).



**Ilustración 2.** Frecuencia absoluta de haplotipos del gen mitocondrial Cyt-b en poblaciones de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela.

	10	20	30	40	50	60	70	80
	*	*	*	*	*	*	*	*
Hap_1	CAACTCATTCAAATCCCCCTTAACAAACAACCATCACTTCGGTAATCCCATATAGAGCCATCTACTTAAGAGCCGATTAAA							
Hap_2	.....G.....							
Hap_3	.....T.....							
Hap_4	T.....C.....T.....A.....C.....G.....G							
Hap_5	T.....T.....C.....C.....T.....A.....C.....G.....							
Hap_6	T.G.....C.....T.C.....T.C.....T.CG.....C.....CT.....							
Hap_7	T.....A.....							
Hap_8	T.....T.....C.....T.....A.....G.....							
Hap_9	T.....A.....G.....							
Hap_10	T.....C.....T.....A.....G.....							
Hap_11	T.....T.T.....C.....T.....A.....G.....							
Hap_12	T.....G.....CC.....A.....TGC.G.....T.....							
Hap_13	T.....A.....AG.....							
Hap_14	T.....A.....G.....							
Hap_15	T.....T.....AC.....A.....G.....							
Hap_16	T.....T.....C.....T.....A.....							
Hap_17	T.....T.....C.....T.....A.....							
Hap_18	T.....G.....CC.....A.....TGC.G.....TT.....							
Hap_19	T.....G.....T.....T.....A.....G.....A.....G.....							
Hap_20	T.....G.....T.....T.....A.....T.G.....A.....G.....C.....							
Hap_21	T.....T.....T.....C.....T.....A.....G.....							
Hap_22	T..A.G.CT...T..TT.CCT..C.....C.....TA.....T.CC.C..T..AG.TC..C.....T...C..CC.							
Hap_23	TG..A...CT...TTT.CCTG.C.....T.C.....TA.....T.T.C.....A.C.C.TC..G.....A.C..CC.							
Hap_24	T.....T.....G.....TC.....							
Hap_25	T.....T.....T.....T.....G.....TC.....							
Hap_26	T.....T.....G.....C.....							
Hap_27	T.....T.A.....T.....G.....							
Hap_28	T.....T.A.....T.....G.....G.....							
Hap_29	T.....T.A.....T.....G.....T.....							
Hap_30	T.....TTA.....T.....G.....T.....							
Hap_31	T.....G.....T.A.....T.....G.....							
Hap_32	T.....T.....T.A.....T.....							
Hap_33	T.....G.....GT.....C.TA...TTT...G..A.....A..T.A..C...							
Hap_34	T.....G.....GT.....C.TA...TTT...G..A.....A..T.A..C...							
Hap_35	T.....G.....TA...TTT...G..A.....A..T.A..C...							
Hap_36	T.....C..G.....GT.....C.TA...TTT...G..A.....A..T.A..C...							
Hap_37	T.....G.....GT.....C.TA...TTT...G..A.....A..AT.A..C...							
Hap_38	T.....G.....GT.....C.TA...TTT...G..A.....A..T.A..C...							
Hap_39	T.....G.....GT.....C.TA...TTT...G..A.....C.....A..T.A..C...							
Hap_40	T.....G.....GT.....C.TA..G.TTT...G..A.....A..T.A..C...							
Hap_41	T.....G.....GT.....TA...TTT...G..A.....A..T.A..C...							
Hap_42	T.....GC.....GT.....C.TA...TTT...G..A.....AG.T.A..C...							
Hap_43	T.....GC.....GT...C..C.TA...TTT...G..A.....AG.T.A..C...							
Hap_44	T.....G.....GT.....CC.TA...TTT...G..A.....A..T.A..C...							
Hap_45	T.....G.....GT.....TA...TTT...G..A.....A..T...C...							
Hap_46	T..AGA...G.....GT.....TA...TTT...G..A.....A..T...C...							
Hap_47	T.....G.....T.....A.....T.G.....A.....							
Hap_48	T.....C.....G.....T.....A.....T.G.....A.....							
Hap_49	T.....T.....A..T.C...G.....TA...A.G...T.....A...T.T.....							
Hap_50	T..A...C...T..TT.CCT..T..T..T...T..TA...T.C.....A..TC..C.....GC..CC.							
Hap_51	T..A...C...T..TT.CCT..T..T..T...T..TA...T.C.....A..TC..C.....T.GC..CC.							
Hap_52	TG..A...CT...TTT.CCTG.C.....T.C.....TA.....T.C.....A.C...C..G.....C...TCG							

**Ilustración 3.** Haplotipos del gen mitocondrial Cyt-b de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela.

### 5.2.1 Estructura y flujo génico

El índice de fijación  $F_{ST}$  y de flujo génico  $Nm$ , permitió observar una fuerte estructuración ( $F_{ST} > 0,25$ ) y un flujo génico restringido ( $Nm < 1$ ) entre el 89,1 % de las poblaciones evaluadas (49 de 55), lo cual evidencia que estas poblaciones evolucionan de forma casi independiente. Mientras que las poblaciones de Casanare-Leticia y Sucre-Santander en Colombia, mostraron un flujo génico elevado ( $Nm > 1$ ) y leve estructuración genética ( $F_{ST} < 0,05$ ) (cifras en rojo tabla), lo cual indica que dichas poblaciones se pueden entrecruzar libremente al azar, minimizando así los efectos de la deriva genética y la consecuente fragmentación de la población por cambios en las frecuencias alélicas, igual situación de evidenció en las poblaciones del municipio Sucre y Libertador en Venezuela. Las cifras en azul corresponden a poblaciones con una estructuración moderada con un flujo génico que no permite la fragmentación en poblaciones completamente diferenciadas en cuanto a sus frecuencias alélicas (Arauca-Casanare, Arauca-Leticia, Córdoba- Leticia).

Los análogos de los estadísticos  $F$  de Wright obtenidos a través del AMOVA, mostraron que la población bajo estudio no representa una población panmíctica donde todos sus miembros tienen la misma probabilidad de entrecruzarse al azar, lo cual da lugar a poblaciones claramente diferenciadas en cuanto a sus frecuencias haplotípicas, las cuales evolucionan de forma independiente (tabla 3).

**Tabla 3. Índice de estructuración genética y flujo genético en poblaciones colombianas y venezolanas de *P. geniculatus***

Población 1	Población 2	Fst	Nm
Arauca	Boyacá	0,6174	0,15
Arauca	Casanare	0,1624	1,29
Arauca	Cordoba	0,2744	0,66
Arauca	Sucre	0,5341	0,22
Arauca	Meta	0,4666	0,29
Arauca	Leticia	0,1209	1,82
Arauca	Santanderes	0,5059	0,24
Arauca	Libertador_Ven	0,7969	0,06
Arauca	La_Guaira_Ven	0,8382	0,05
Arauca	Sucre_Ven	0,8513	0,04
Boyacá	Casanare	0,4258	0,34
Boyacá	Cordoba	0,7226	0,1
Boyacá	Sucre	0,4720	0,28
Boyacá	Meta	0,4193	0,35
Boyacá	Leticia	0,5480	0,21
Boyacá	Santanderes	0,4451	0,31
Boyacá	Libertador_Ven	0,7369	0,09
Boyacá	La_Guaira_Ven	0,7382	0,09
Boyacá	Sucre_Ven	0,8069	0,06
Casanare	Cordoba	0,2875	0,62
Casanare	Sucre	0,4759	0,28
Casanare	Meta	0,2165	0,9
Casanare	Leticia	0,0492	4,83
Casanare	Santanderes	0,4633	0,29
Casanare	Libertador_Ven	0,7338	0,09
Casanare	La_Guaira_Ven	0,7304	0,09
Casanare	Sucre_Ven	0,7925	0,07
Cordoba	Sucre	0,5665	0,19
Cordoba	Meta	0,5878	0,18
Cordoba	Leticia	0,1757	1,17
Cordoba	Santanderes	0,5337	0,22
Cordoba	Libertador_Ven	0,8252	0,05
Cordoba	La_Guaira_Ven	0,9024	0,03
Cordoba	Sucre_Ven	0,8874	0,03
Sucre	Meta	0,3416	0,48
Sucre	Leticia	0,5226	0,23
Sucre	Santanderes	0,0069	36,2
Sucre	Libertador_Ven	0,4486	0,31
Sucre	La_Guaira_Ven	0,3527	0,46
Sucre	Sucre_Ven	0,5138	0,24
Meta	Leticia	0,3213	0,53
Meta	Santanderes	0,3704	0,42
Meta	Libertador_Ven	0,6297	0,15
Meta	La_Guaira_Ven	0,5157	0,23
Meta	Sucre_Ven	0,7351	0,09

Leticia	Santanderes	0,4983	0,25
Leticia	Libertador_Ven	0,7848	0,07
Leticia	La_Guaira_Ven	0,8145	0,06
Leticia	Sucre_Ven	0,8396	0,05
Santanderes	Libertador_Ven	0,4530	0,3
Santanderes	La_Guaira_Ven	0,3819	0,4
Santanderes	Sucre_Ven	0,5161	0,23
Libertador_Ven	La_Guaira_Ven	0,6326	0,15
Libertador_Ven	Sucre_Ven	0,0779	2,96
La_Guaira_Ven	Sucre_Ven	0,8000	0,06
TOTAL		0,5186	0,23

**Tabla 4. AMOVA de poblaciones colombianas y venezolanas de *P. geniculatus***

Fuente de variación	g.l	Sumatoria de cuadrados	Varianza	Porcentaje de variación
<b>Entre grupos</b>	1	431,9	3,95	50,08
<b>Entre poblaciones dentro de los grupos</b>	10	231,5	1,57	19,92
<b>Dentro de la poblaciones</b>	190	449,3	2,36	30
<b>Total</b>	201			
<b>Indices de fijación:</b>				
FSC : 0,39906		P-value = 0,00000+-0,00000		
FST : 0,70004		P-value = 0,00000+-0,00000		
FCT : 0,50084		P-value = 0,01564+-0,00419		

## 5.2.2 Pruebas de neutralidad

De acuerdo a los resultados de las pruebas de neutralidad D de Tajima y D\* de Fu y Li (tabla 5), a excepción de las poblaciones de Meta en Colombia y La Guaira en Venezuela, las poblaciones evaluadas no presentan desviaciones estadísticamente significativas de la hipótesis nula de evolución neutral. La población de *P. geniculatus* del Meta en Colombia, presentó un valor positivo de D\* de Fu y Li (1,44347 P < 0,05), lo cual es una desviación de lo esperado en una población que evoluciona neutralmente, lo cual sería evidencia de presiones selectivas dentro de esta población. Por otro lado, la población de La Guaira en Venezuela presentó valores negativos tanto de D de Tajima como de D\* de Fu y Li, de igual

manera, estadísticamente diferentes a lo esperado bajo la hipótesis nula de evolución neutral y compatibles con una población en expansión debido a un evento demográfico de cuello de botella poblacional en el pasado.

**Tabla 5. Pruebas de neutralidad D de Tajima y D\* de Fu y Li para poblaciones de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela**

PAIS	POBLACIONES	D de Tajima	P value	D* de FU Y LI	P value
Colombia	Arauca	0,85234	> 0.10	0,97656	> 0.10
Colombia	Boyacá	-0,84307	> 0.10	-0,84307	> 0.10
Colombia	Casanare	-0,94738	> 0.10	-1,96312	> 0.10
Colombia	Córdoba	NA	NA	NA	NA
Colombia	Sucre	0,45078	> 0.10	0,47642	> 0.10
Colombia	Meta	0,23902	> 0.10	1,44347	< 0.05
Colombia	Santanderes	0,57552	> 0.10	0,5828	> 0.10
Colombia	Leticia	-0,80734	> 0.10	-0,80734	> 0.10
Venezuela	Libertador	-0,32681	> 0.10	0,44115	> 0.10
Venezuela	La Guaira	-1,67405	< 0.05	-1,82716	< 0.05
Venezuela	Sucre	-1,55861	> 0.10	0,26595	> 0.10
Colombia	...	-1,27056	> 0.10	0,15498	> 0.10
Venezuela	...	-0,8881	> 0.10	-1,50766	> 0.10
Colombia-Venezuela	Total	-0,82203	> 0.10	-1,38964	> 0.10

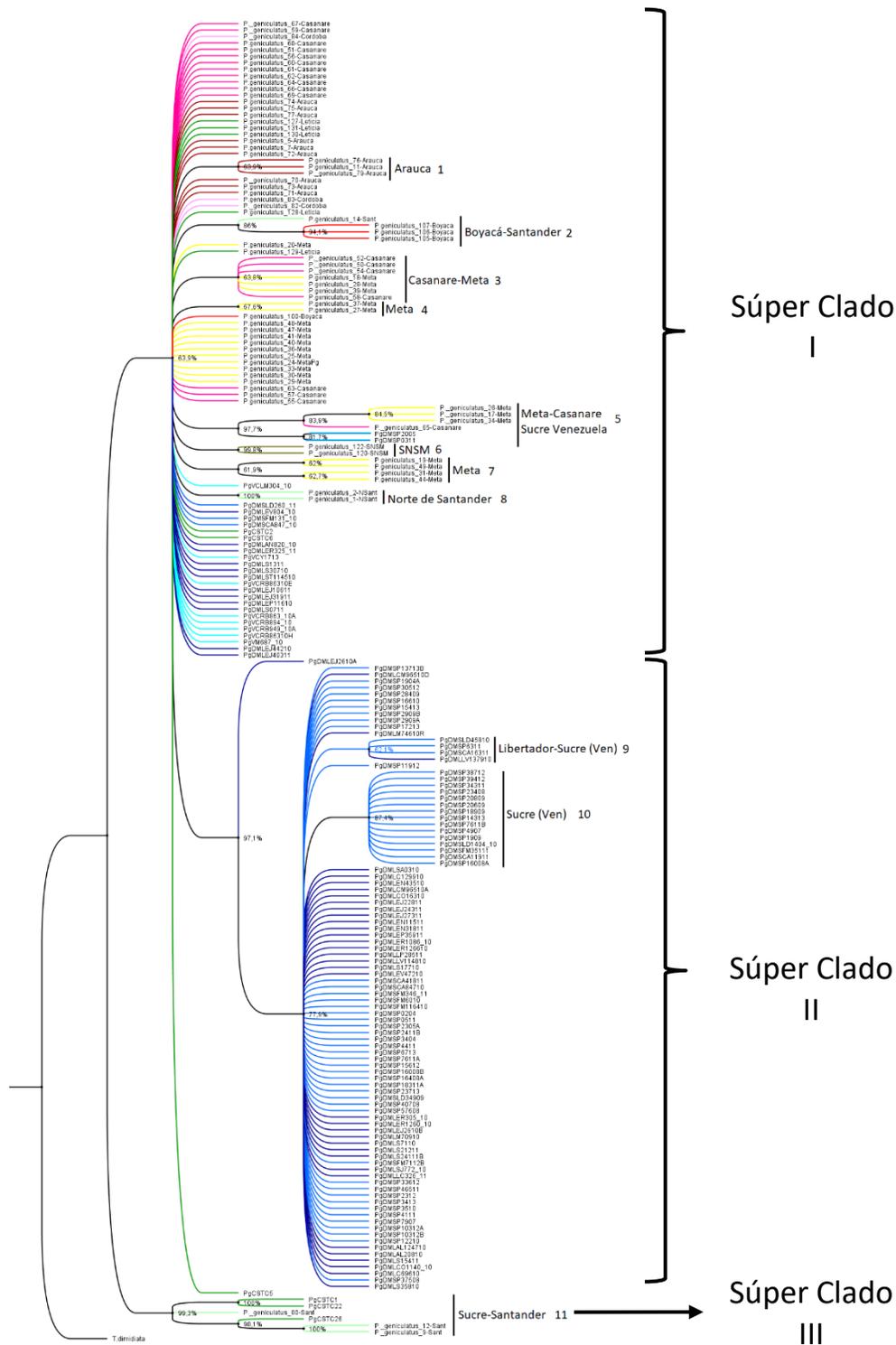
NA: no aplica, el programa DNAsp permite hasta un mínimo de cuatro secuencias para el caculo de las pruebas de neutralidad D de Tajima y D\* de Fu y Li, en el caso de Córdoba, solo se contó con tres secuencias de esta población.

## 5.3 Filogenia y Filogeografía

### 5.3.1 Análisis filogenético

El análisis filogenético de ML produjo la conformación de 11 clados que no guardan relación directa con la división político-territorial entre Colombia y Venezuela, pero que si muestra un proceso de cladogénesis del gen mitocondrial Cyt-b en las poblaciones estudiadas en función de su distribución geográfica. El colapso de ramas era de esperarse en un trabajo intraespecífico como el presente, donde la frecuencia de los haplotipos de las diferentes subpoblaciones de *P. geniculatus* origina cladogramas politómicos.

Todos los clados presentaron un soporte de ramas superior al 60%, y se encuentran incluidos dentro de tres súper clados (I, II, III, ilustración 4). En el súper clado I, se encuentran individuos de *P. geniculatus* de Venezuela y Colombia (clados 1 a 8), el súper clado II contiene individuos exclusivamente de Venezuela (clados 9 y 10), mientras que el súper clado III incluye individuos exclusivamente de Colombia (clado 11). Las abundantes ramas colapsadas presentes en los súper clados I y II se deben a individuos con secuencias de dos tipos, en primer lugar, secuencias pertenecientes a los haplotipos más frecuentes en cada súper clado, el Hap8 en el caso del súper clado I y el Hap33 en el súper clado II. Es importante señalar la inclusión de *P. geniculatus* de Venezuela en el clado 5, el cual contiene a su vez, individuos del Meta y Casanare (Colombia) con un soporte de rama del 97,7%.



**Ilustración 4.** Árbol filogenético de ML de 202 secuencias de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela, basado en el modelo Tamura 3-parámetros.

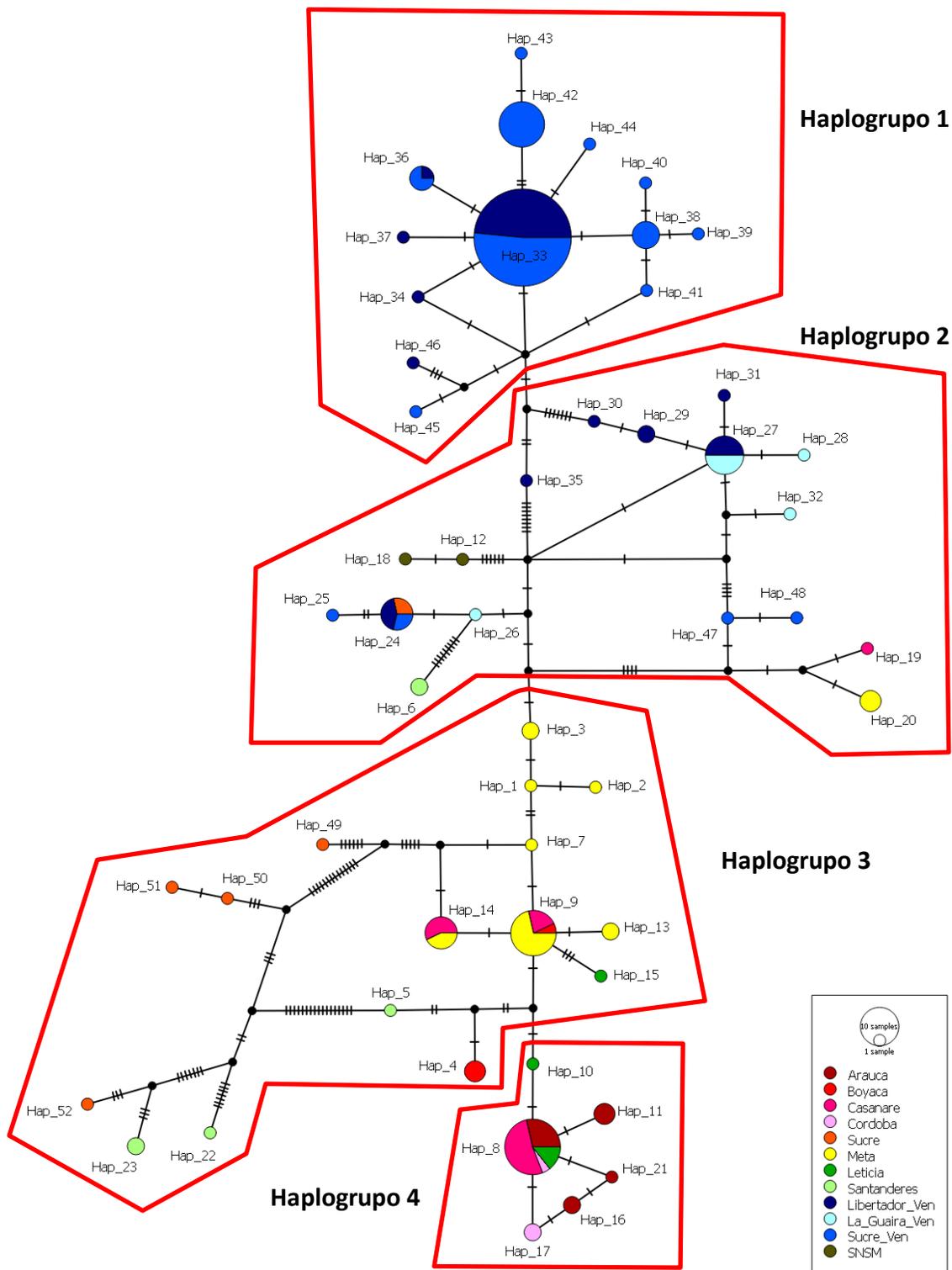
### 5.3.2 Análisis de red de haplotipos

Las características propias de los análisis filogenéticos a través de árboles bifurcados, son apropiados para inferir las relaciones evolutivas entre especies o a niveles superiores de especies, sin embargo, no son apropiados a nivel poblacional ya que a este nivel es posible encontrar ancestros y descendientes en una misma población (frecuencia de haplotipos), y además, la genealogía de la población es reticulada (procesos de recombinación e hibridación entre otros), lo cual disminuye la resolución del árbol. Una red de haplotipos presenta mayor poder de resolución para inferir las relaciones evolutivas dentro de una población y a su vez, inferir hipótesis filogenéticas de la especie en función de la distribución geográfica de la misma.

En el presente trabajo de investigación se construyó una red de haplotipos de MP con base en 202 secuencias de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b de poblaciones colombianas y venezolanas de *P. geniculatus* (Ilustración 5). En la red de haplotipos fue posible observar la conformación de cuatro haplogrupos, que muestran la dispersión y radiación de la especie en el área de estudio. El haplogrupo 1 está conformado por el Hap33, contiene individuos de los municipios Libertador y Sucre en Venezuela y es el haplotipo de mayor frecuencia en esa región geográfica. Del Hap33 derivan varios haplotipos únicos o raros (34, 37, 44) y haplotipos de mayor frecuencia (36, 38, 42) que constituyen subpoblaciones de la especie ubicadas particularmente en el municipio Sucre. El principal haplotipo del haplogrupo 2 es el Hap27, que al igual que el Hap33, presenta múltiples conexiones con otros haplotipos que derivan de él a través de un paso mutacional. Este haplogrupo presenta la particularidad de contener haplotipos de Venezuela y Colombia, los cuales se integran al conjunto por medio de múltiples mutaciones y haplotipos no muestreados como el Hap20 con *P. geniculatus* del Meta (Colombia), el Hap6 de los Santanderes y el Hap24 con

individuos de Sucre (Colombia), Libertador y Sucre (Venezuela), también se observa en este grupo, haplotipos de la Sierra Nevada de Santa Marta (haplotipos 12 y 18).

El haplogrupo 3 lo representa el Hap9 con una distribución exclusiva en el territorio colombiano, encontrado en *P. geniculatus* del Meta, Casanare y Boyacá. Del Hap9 descienden directamente los haplotipos Hap13 (Meta), Hap14 (Meta y Casanare) y Hap15 (Leticia) y haplotipos de Boyacá, Santanderes y Sucre forman un ciclo alrededor de este haplotipo. El haplogrupo 4 está representado por el Hap8, el cual presenta una amplia distribución geográfica, abarcando los departamentos de Arauca, Casanare, Córdoba y Amazonas (Leticia), y es el haplotipo ancestral de los haplotipos 11, 16, 17 y 21.



**Ilustración 5.** Red de haplotipos basada en parsimonia estadística obtenida a partir 202 secuencias de un fragmento de gen mitocondrial Cyt-b de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela. Las barras pequeñas indican los pasos o mutaciones entre haplotipos, los nodos en negro indican haplotipos no muestreados.

## 6. Discusiones

El presente trabajo constituye una aproximación a la genética de poblaciones y filogenia de la especie *P. geniculatus* donde a pesar de ciertas limitaciones como no presentar un número homogéneo de individuos por localidad, contraste entre localidades (Venezuela-urbano, Colombia-rural) y evaluación con un solo marcador molecular, los resultados plasmados en esta investigación permitieron ampliar el conocimiento sobre la diversificación genética de la especie en el norte de Suramérica y que además constituye la base para futuros estudios sobre la importancia epidemiológica de *P. geniculatus* en la ECh.

### 6.1 Diversidad Genética

En el presente estudio, se registró un alto número de haplotipos (50), lo cual se encuentra dentro de lo esperado para secuencias de genes mitocondriales hipervariables. Las poblaciones de Boyacá y Córdoba en Colombia y Libertador y La Guaira y Venezuela presentaron una  $H_d$  baja respecto a otros estudios en poblaciones de triatomíneos del continente americano (54) (tabla 6), lo que es un indicador de disminución de diversidad debido a procesos demográficos o pérdida del hábitat. En términos generales, la población de *P. geniculatus* de Venezuela presentó índices de diversidad genética menores a los registrados para el conjunto total de poblaciones colombianas de este triatómino. En este sentido, cabe destacar el origen de estos insectos; en el caso de *P. geniculatus* de las diferentes localidades colombianas, éstas proceden de áreas rurales y selváticas (15), mientras que los individuos de origen venezolano fueron capturados en el intra y peridomicilio de áreas urbanas de los municipios de Libertador y Sucre (DMC) y el Estado de la Guaira en el Centro-Norte de Venezuela, los cuales llegan a las viviendas atraídos por la luz en horas de la noche (5), adicionalmente, se ha registrado evidencia de la posible domiciliación de esta especie en áreas sub-urbanas del DMC (5,7,46). Las características de las poblaciones de *P. geniculatus* de Venezuela mencionadas anteriormente, son una

evidencia de la reducción del hábitat natural de los triatomos con la consecuente disminución de fuentes alimentarias, hechos que se ven reflejados a su vez en una pérdida de diversidad genética.

**Tabla 6. Diversidad de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b en poblaciones de triatomos de Norte, Centro y Suramérica**

Región	Especies	No. Poblaciones	n	% Sitios variables	Haplotipos	Hd	Referencia
Norte y Centroamérica	<i>T. dimidiata</i>	12	24	21,8	21	0,960	Dorn et al, (2009)
	<i>T. dimidiata</i>	7	58	10,1	15	0,901	Blandon-Naranjo et al, (2010)
	<i>T. rubida</i>	7	23	12,5	11	0,913	Pfeiler et al, (2006)
	<i>T. recurva</i>	3	8	2,2	5	0,857	Pfeiler et al, (2006)
	<i>T.sanguisuga</i>	1	54	14,7	37	0,978	De la Rúa et al, (2011)
Suramérica	<i>T. infestans</i>	43	98	4,1	11	0,731	Giordano et al, (2005)
	<i>R. prolixus</i>	33	551	11,1	15	0,518	Fitzpatrick et al, (2008)
	<i>T. brasiliensis</i>	4	361	6,7	29	0,905	Almeida et al, (2008)
	<i>T. brasiliensis</i>	17	136	19	35	0,920	Monteiro et al, (2004)
Colombia	<i>T. infestans</i>	20	223	9	19	0,727	Waleckx et al, (2011)
	<i>P. geniculatus</i>	8	80	20,7	34	0,929	Este estudio
Venezuela	<i>P. geniculatus</i>	3	122	9,4	27	0,730	Este estudio
Colombia-Venezuela	<i>P. geniculatus</i>	11	200	17,5	50	0,873	Este estudio

Tomado y modificado de: De la Rúa et al (2011).

## 6.2 Estructura Poblacional

El uso de un fragmento del gen mitocondrial Cyt-b permitió observar procesos de estructuración entre la mayoría de las poblaciones analizadas, hecho contrario a lo observado cuando se trabaja con marcadores de origen nuclear, donde en ocasiones no es posible realizar trabajos a nivel poblacional como lo demuestra un trabajo sobre diversificación genética de *P. geniculatus* en el norte de Suramérica (15), donde al emplear los genes nucleares (ARNr 28S y 18S), no fue posible observar estructuración en las poblaciones evaluadas. Los genes nucleares al ser mucho más conservados que genes

mitocondriales como el Cyt-b, suelen ser más apropiados para los estudios por encima del nivel de especie o poblaciones con mucho tiempo de separación a nivel filogenético, como se observó por ejemplo, en un estudio sobre variabilidad genética de *T. rubrovaria* de Brazil, Argentina y Uruguay (49), donde utilizaron secuencias de los espaciadores internos del transcrito primario del ADN ribosomal ITS-1 e ITS-2., En dicho estudio se encontraron siete haplotipos, donde tres fueron exclusivos para Brasil, tres exclusivos para Uruguay y uno fue común para los tres países. Por otro lado, en un trabajo sobre estructura genética de *T. brasiliensis* en tres localidades del estado de Paraíba en Brasil (76), en cual se utilizó secuencias del gen Cyt-b, los autores registraron estructuración de la población del triatomino tanto a nivel geográfico como ecológico, ya que observaron valores del índice de fijación  $F_{ST}$  entre 0,15 y  $> 0,25$  entre localidades y entre los ecotopos silvestres e intra y peridomiciliarios.

Cabe señalar que con el uso del Cyt-b en el presente estudio, fue posible registrar estructuración de la población entre localidades tanto cercanas (municipios Libertador y Sucre vs La Guaira en Venezuela), como distantes (tabla 3). Este hecho sugiere que las poblaciones de *P. geniculatus* del norte de Suramérica, al no evidenciar estructuración con el uso de genes nucleares como se observó en el estudio de Caicedo-Garzón y colaboradores (15), se han separado en un periodo de tiempo reciente respecto a las poblaciones del cono sur donde sí se ha demostrado estructuración poblacional con el uso de marcadores nucleares con una tasa de sustitución de nucleótidos lenta (49).

En la presente investigación se amplía la información registrada en un estudio sobre variabilidad genética de *P. geniculatus* en el Distrito Metropolitano de Caracas en Venezuela, donde solo se evalúan las poblaciones de los municipios Libertador y Sucre (14). En el presente estudio se incluyó individuos del Estado de Guaira, población contigua al DMC pero separada de éste por la Cordillera de la Costa, encontrándose una fuerte estructuración ( $F_{ST} > 0,25$ ) y un flujo genético restringido ( $Nm < 1$ ) entre La Guaira y ambos

municipios del DMC. *P. geniculatus* presenta una gran capacidad de dispersión al poder volar trayectos hasta de dos kilómetros, sin embargo, la Cordillera de la Costa representa una barrera geográfica con alturas superiores a los 2000 m.s.n.m., que ha restringido el flujo genético y originado cambios en las frecuencias alélicas entre dichas localidades, de tal manera que evolucionan como poblaciones independientes, con lo cual, los efectos de la deriva genética pueden ser más evidentes en algunas de estas localidades.

Se realizaron 55 comparaciones de a pares entre poblaciones para determinar la estructura y flujo genético entre ellas (tabla 3), se encontró que los pares Casanare-Leticia, Sucre-Santanderes y Libertador-Sucre (Venezuela) presentan un alto flujo genético entre ellas, lo que se traduce en una estructuración prácticamente nula entre ellas ( $F_{ST} \approx /< 0,05$ ), por lo tanto, se pueden considerar como poblaciones panmícticas (cada par) donde sus miembros tienen la misma posibilidad de entrecruzarse al azar y minimizar los efectos de la deriva genética. Los pares Arauca-Casanare, Arauca-Leticia y Córdoba-Leticia, presentaron valores moderados del índice de fijación (entre 0,12 y 0,17) y valores Nm entre 1,17 y 1,82, en consecuencia, estas poblaciones se encuentran en un proceso de estructuración que podría derivar en la separación completa de dichas poblaciones. El resto de las comparaciones mostraron que las poblaciones se comportan como unidades evolutivas independientes con valores de  $F_{ST}$  superiores a 0,25 y un flujo genético bastante restringido ( $Nm < 1$ ).

Las pruebas de neutralidad D de Tajima y  $D^*$  de Fu y Li mostraron que a excepción de las poblaciones del Meta en Colombia y La Guaira en Venezuela, para todas las poblaciones se puede aceptar la hipótesis nula de evolución neutral, donde éstas no han sido influenciadas por eventos de selección, contracción o expansión de la población ya que los resultados presentaron valores positivos o negativos, pero estadísticamente no significativos como es de esperarse en poblaciones que evolucionan neutralmente. En contraste, la población Meta presentó un valor positivo de la prueba de neutralidad  $D^*$  de Fu y Li (1,44  $P = < 0,05$ ) estadísticamente diferente a lo esperado bajo la hipótesis de evolución neutral, valores  $> 0$

de esta prueba indican un déficit de sitios únicos en las secuencias, debido a que han sido eliminadas por selección, por lo que se puede afirmar que la población de *P. geniculatus* del departamento del Meta en Colombia ha sido sometida a presiones selectivas. Por otro lado, la población de la Guaira en Venezuela presento valores negativos estadísticamente diferentes a los esperados bajo hipótesis de evolución neutral de las secuencias ( $D$  de Tajima = -1,67 y  $D^*$  de Fu y Li = -1,83;  $P < 0,05$  para cada estadístico), estos valores indican un exceso de haplotipos raros en el caso de la prueba de Tajima o un exceso de sitios únicos en la prueba de Fu y Li, lo que se traduce en un proceso de expansión poblacional por posibles cuellos de botella poblacionales en el pasado y por lo tanto dichos haplotipos no han sido eliminados por selección a causa de una aparición reciente.

Los resultados del presente estudio contrastan con los registrados en el estudio de variabilidad genética de *P. geniculatus* de Caracas en Venezuela (14), en dicho trabajo se evidenció un proceso de expansión poblacional en la población del municipio Sucre, en el presente estudio se observó un valor negativo de  $D$  de Tajima (-1,56;  $P = > 0,10$ ), pero dentro de lo esperado estadísticamente para poblaciones que evolucionan neutralmente.

### **6.3 Filogenia y Filogeografía**

El análisis de secuencias del gen Cyt-b de *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela produjo un árbol en que se pudo observar procesos de cladogénesis del gen a nivel local y regional que coinciden con los clados observados en los trabajos sobre *P. geniculatus* del norte de Suramérica y del centro-norte de Venezuela (14,15). Sin embargo, en esta investigación se contó con un conglomerado de muestras superior al de ambos trabajos, lo que incidió en la observación de un panorama filogenético distinto al registrado en esas investigaciones. El súper clado I (Ilustración 4) concentra *P. geniculatus* de Colombia y Venezuela y dentro de éste, el clado 5 presenta individuos del Meta, Casanare y Venezuela con un soporte de rama

del 97%. Esto podría indicar que el súper clado I contiene haplotipos procedentes de un centro de origen y dispersión de especies a partir del cual ocurrió la separación de las poblaciones de *P. geniculatus* de Venezuela y otras localidades de Colombia.

La literatura consultada registra pocos trabajos filogenéticos y de variabilidad genética a nivel poblacional de la especie *P. geniculatus*, situación originada por ser considerada un vector secundario en la epidemiología de la tripanosomiasis americana. No obstante, otros trabajos han abordado aspectos morfológicos o bioquímicos para indagar la posible diferenciación de poblaciones con diferente origen geográfico. Es así como en un estudio sobre perfiles electroforéticos de la hemolinfa de *P. geniculatus* de diferentes regiones del centro-norte de Venezuela (sabanas, piedemontes, bosque tropical y zonas urbanas), se registró gran homogeneidad dentro de la especie independientemente de la población de origen, en dicha investigación solo se encontraron diferencias entre los perfiles de hembras y machos (77). En contraste, el análisis filogenético realizado en la presente investigación, registró la estructuración filogenética de la especie *P. geniculatus* con la formación de clados y subclados en las mismas localidades abordadas por el estudio de perfiles electroforéticos de la hemolinfa de este triatomino, los resultados obtenidos en dicho estudio pueden ser consecuencia de que la fuente de información elegida por los autores haya sido muy conservada como para poder capturar variaciones a nivel intraespecífico.

Otro estudio abarcó aspectos relacionados con la morfometría geométrica de *P. geniculatus* de Caracas (centro-norte de Venezuela) y Sanare en el estado Lara (occidente de Venezuela) (78), los autores de ese estudio encontraron que las alas y cabeza de las hembras de esta especie en Caracas, eran más pequeños que en hembras de Sanare. Si bien el estudio mencionado anteriormente pone al descubierto la diferenciación morfológica de *P. geniculatus* en áreas geográficas distantes, a nivel molecular se encontró diferenciación de poblaciones dentro de una misma área geográfica, hecho evidenciado por la conformación de subclados integrados principalmente por *P. geniculatus* de la Parroquia conocida como

Petare en el municipio Sucre del DMC, la favela más grande de América Latina. Cabe destacar también que la población de *P. geniculatus* del departamento del Meta también presenta diferenciación a nivel local, ya que conforma cuatro clados en esta localidad (clados 3, 4, 5 y 7).

A través del análisis de red de haplotipos fue posible observar cuatro haplogrupos (ilustración 5), que muestran la posible dispersión de *P. geniculatus* en el norte de Suramérica, el haplogrupo 1 presenta individuos procedentes exclusivamente de poblaciones venezolanas, mientras que el haplogrupo 2 presenta individuos de poblaciones colombianas y venezolanas (Venezuela: Libertador, Sucre y la Guaira; Colombia: Meta, Sucre, Norte de Santander y Casanare), el haplogrupo tres contiene individuos exclusivamente de Colombia, pero tiene la particularidad de incluir individuos de poblaciones igualmente presentes en el haplogrupo 2 (Meta, Casanare, Santanderes y Sucre), mientras que el haplogrupo 4 solo comparte individuos de la población del Casanare con los haplogrupos 2 y 3. Este escenario plantea que la región geográfica comprendida por los departamentos del Meta, Santander, Norte de Santander y Sucre, representaron una zona de dispersión y separación de las poblaciones de *P. geniculatus* hacia ambos lados de la Cordillera Central de Los Andes.

En un estudio sobre poblaciones silvestres de *T. infestans* de Bolivia, donde también se usó el gen mitocondrial Cyt-b, se planteó una hipótesis similar a la propuesta en la presente investigación respecto al origen de las poblaciones de *P. geniculatus* de Venezuela y Colombia (79), en dicho estudio, los autores proponen que en la región central de los Andes Bolivianos se originaron las poblaciones de *T. infestans*. La evidencia encontrada en la presente investigación sugiere que las poblaciones de *P. geniculatus* del norte de Suramérica tienen un origen en la región geográfica de la Cordillera Oriental de Los Andes, y la separación de las poblaciones tuvo lugar una vez se produjo el levantamiento de dicha cordillera como lo plantea un estudio sobre filogeografía de triatominos del género *Meparia*

en Chile (80) y un estudio sobre diversificación genética de *P. geniculatus* en el norte de Suramérica (15), sin embargo, el elevado número de mutaciones que une a los haplotipos de Santander y Sucre (haplotipos 5, 22, 23,49, 50, 51 y 52) con el Hap9 (Casanare, Meta y Boyacá) sugiere que el tiempo separación de estas poblaciones es mucho mayor respecto al tiempo de separación de los haplotipos más frecuentes y que conforman los haplotipos centrales de los cuatro haplogrupos descritos en esta investigación (Hap8, Hap9, Hap27 y Hap33). Esta evidencia permite sugerir una segunda hipótesis, la cual plantea que el haplotipo ancestral de todas poblaciones pudo estar distribuido en el área geográfica comprendida por los departamentos de Santander, Bolívar y Sucre en Colombia.

## 7. Conclusiones y Recomendaciones

### 7.1 Conclusiones

La conformación de subclados dentro de una misma población como se evidenció en la población del departamento del Meta en Colombia y el DMC en Venezuela muestran la gran capacidad adaptativa de la especie *P. geniculatus* a diferentes hábitats y micro-hábitats, ya que a pesar de ser un insecto capaz de volar trayectos hasta de dos Km, si este consigue un lugar que le brinde refugio y protección contra depredadores y una fuente de alimentos, éste adquiere hábitos sedentarios y restringe su desplazamiento, lo que trae como consecuencia una restricción en el flujo genético a nivel local, dando lugar a procesos de cladogénesis en simpatria.

La evidencia aportada por esta investigación sugiere que el haplotipo ancestral de las poblaciones de *P. geniculatus* pudo estar distribuido en un corredor conformado por el área geográfica que componen los departamentos de Sucre, Bolívar y Santander, posteriormente con el levantamiento de la cordillera de los Andes, se produjo una rápida diversificación de la especie conformando las poblaciones actuales del Este y Sur de Colombia y su dispersión en el centro norte de Venezuela, donde otro proceso de divergencia dio origen al aislamiento de las poblaciones de la Sierra Nevada de Santa Marta, Norte de Santander y zonas del Departamento de Sucre, las cuales se encuentran filogenéticamente más próximas a las poblaciones del centro norte de Venezuela que a las poblaciones del Este y Sur de Colombia.

El presente trabajo de investigación constituye un valioso aporte a la comprensión de la biología de la especie *P. geniculatus* y un aporte como punto de partida para estudios en epidemiología molecular y abordar aspectos como el potencial colonizador de viviendas,

capacidad vectorial y adaptación a micro-hábitats entre otros, ya que esta especie ha mostrado tener un rol cada vez más importante en la epidemiología de la ECh.

## **7.2 Recomendaciones**

Se recomienda realizar un estudio donde se incluyan muestras de los departamentos del Atlántico y Bolívar a fin de evaluar la hipótesis propuesta en la presente investigación, la cual plantea que el haplotipo ancestral de las poblaciones de *P. geniculatus* de la región Norte de Suramérica se encuentra o estuvo distribuido en un corredor conformado por los Departamentos de Sucre, Bolívar y Santander.

## 8. Referencias Bibliográficas

1. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2012;12(2):240–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
2. Cazorla-Perfetti DJ, Nieves-Blanco EE. Triatomíneos de Venezuela: aspectos taxonómicos, biológicos, distribución geográfica e importancia médica. *Av cardiológicos*. 2010;30(4):347–69.
3. Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatomíneos (reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomedica*. 2007;27(SUPPL. 1):143–62.
4. Esteban L, Montes JM, Angulo VM. Diversidad de Triatominae ( Hemiptera : Reduviidae ) en Santander , Colombia : implicaciones epidemiológicas. *Biomedic*. 2017;37:42–52.
5. Reyes-Lugo M. *Panstrongylus geniculatus* Latreille 1811 ( Hemiptera : Reduviidae : Triatominae ), vector de la enfermedad de Chagas en el ambiente domiciliario del centro-norte de Venezuela. *Rev Biomed*. 2009;20(3):180–205.
6. Reyes-Lugo M, Rodríguez-Acosta A. Domiciliation of the sylvatic Chagas disease vector *Panstrongylus geniculatus* ( Triatominae : Reduviidae ) in Venezuela. *T Roy Soc Trop Med H*. 2000;94(318):508.
7. Carrasco J, Torrellas A, Garcı C, Segovia M, Feliciangeli MD. Risk of *Trypanosoma cruzi* I ( Kinetoplastida : Trypanosomatidae ) transmission by *Panstrongylus geniculatus* ( Hemiptera : Reduviidae ) in Caracas ( Metropolitan District ) and neighboring States , Venezuela. *Int J Parasitol*. 2005;1–6.

8. Molinari J, Aladana E, Nassar JM. *Panstrongylus geniculatus* (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae): natural infection with *Trypanosoma cruzi* under cavernicolous conditions in Paraguaná Peninsula, Venezuela. *J Cave Karst Stud.* 2007;69(2):285–7.
9. Maes JM. Maes1992Triatominae.pdf. *Rev Nica Ent.* 1997;21:1–8.
10. Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Zavala-Jaspe R, Mauriello L, Díaz MP, et al. Transmisión urbana de la enfermedad de Chagas en Caracas , Venezuela : aspectos epidemiológicos , clínicos y de laboratorio. *Rev Biomed.* 2009;20(3):158–64.
11. Alarcón de Noya B, Díaz Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas , Venezuela. *J Infect Dis.* 2010;201(9):1308–15.
12. Patterson JS, Barbosa SE, Feliciangeli MD. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879 : Evolution , ecology and epidemiological significance. *Acta Trop.* 2009;110:187–99.
13. Maestre Serrano R, Eyes Escalante M. Actualización de la presencia y distribución de triatominos en el departamento del Atlántico-Colombia : 2003-2010 Actualización de la presencia y distribución de triatominos en el departamento del Atlántico-Colombia : 2003-2010. *Boletín Malariol y Salud Ambient.* 2012;52(1):125–8.
14. Nakad Bechara CC, Londoño JC, Segovia M, Leon Sanchez MA, Martínez P CE, Rodríguez R MM, et al. Infection , Genetics and Evolution Genetic variability of *Panstrongylus geniculatus* ( Reduviidae : Triatominae ) in the Metropolitan District of Caracas , Venezuela. *Infect Genet Evol.* 2018;66(June):236–44.
15. Caicedo-Garzón V, Salgado-Roa FC, Sánchez-Herrera M, Hernández C, Arias-Giraldo LM, García L, et al. Genetic diversification of *Panstrongylus geniculatus* (Reduviidae: Triatominae) in northern South America. *PLoS One.* 2019;14(10):1–18.
16. Patterson JS, Gaunt MW. Molecular Phylogenetics and Evolution Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of

- haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. *Mol Phylogenet Evol* [Internet]. 2010;56(2):608–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.038>
17. Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, et al. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol*. 2002;1(3):225–35.
  18. Bargues MD, Marcilla a, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of triatominae (Hemiptera: reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2000;95(4):567–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904416>
  19. Araújo-Jorge TC De, Medrano-Mercado N. Chagas disease in Bolivia : a brief review of the urban phenomena. *Rev Biomed*. 2009;20(3):236–44.
  20. Herrera L. Tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas : Desde el triángulo equilátero al escaleno. *Trib del Investig*. 2016;17(2):75–87.
  21. Palmezano Díaz JM, Plazas Rey LK, Rurda Rojas VP. Enfermedad de chagas: realidad de una patología frecuente en Santander, Colombia Revisión de Tema Infectología Chagas disease: reality of a frequent pathology in Santander, Colombia. *Med UIS*. 2015;28(1):81–90.
  22. Rosas F, Vanegas DI, Cabrales MF. Enfermedad de Chagas. Colombia: Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular; 2007. 224 p.
  23. Herrera L, Aguilar CM, Morocoima A. Conocimiento y riesgo de infección para la Tripanosomosis Americana o Enfermedad de Chagas en áreas rurales de Venezuela . *Salus*. 2007;11(1):27–31.
  24. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Guía para el Diagnóstico , Manejo y Tratamiento de Enfermedad de Chagas en fase Aguda a nivel de los Establecimientos de Salud [Internet]. Venezuela; 2007. 1–32 p. Available from:

[http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE\\_1163.pdf](http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_1163.pdf)

25. Feliciangeli MD, Carrasco HJ, Patterson JS, Martínez C, Medina M. " L , 1859 AND MIXED DOMESTIC INFESTATION BY RHODNIUS PROLIXUS STA PANSTRONGYLUS GENICULATUS LATREILLE , 1811 , VECTOR INCRIMINATION , AND SEROPREVALENCE FOR TRYPANOSOMA CRUZI AMONG INHABITANTS IN. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(4):501–5.
26. Futuyma D. *Futuyma Douglas.pdf*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.; 2005. 656 p.
27. Soler M. La base de la Biología. In: Soler M, editor. *Evolución, la base de la biología. Proyecto Sur*; 2002. p. 21–7.
28. Rosso C. Rosso C. Tiempo y modo de evolución. En: Soler M, editor. *Evolución: la base de la biología. España: Proyecto Sur*; 2002. p. 67–80. In: Soler M, editor. *Evolución: la base de la biología. España: Proyecto Sur*; 2002. p. 67–80.
29. Cabrero J, Camacho J. Cabrero J. Camacho JP. *Fundamentos de Genética de Poblaciones*. En: Soler Cruz M. *Evolución: La Base de la Biología. España. Proyecto Sur de Ediciones, S.L*; 2002. p. 83–126. In: Soler M, editor. *Evolución: La Base de la Biología. Proyecto Sur*; 2002. p. 83–126.
30. Grauer D, Li WH. *Fundamentals of molecular evolution*. 2nd ed. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates, Inc; 2000. 481 p.
31. Aguirre Planter E. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. In: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X, editors. *Ecología Molecular*. México: Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO.; 2007. p. 49–61.
32. Eguiarte LE, Aguirre Planter E, Scheinvar E, González González A, Souza V. Coordinadores : Arturo Becerra Bracho América Castañeda Sortibrán Daniel Piñero Dalmau. In: Becerra Bracho A, Castañeda Sortibrán A, Piñero Dalmau D, editors. *Evolución Orgánica*. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015. p. 77–108.
33. Slatkin M. Flujo Génico y Estructura de las Poblaciones. *Gene*. 1994;34:1–11.

34. Wright S. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution* (N Y). 1965;19(3):395.
35. Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. A review of recent evidence. *Jpn J Genet*. 1991;66:367–86.
36. Kuhner MK. History. *Trends Ecol Evol*. 2009;24(2):86–93.
37. Fu YX, Li WH. Coalescing into the 21st century: An overview and prospects of coalescent theory. *Theor Popul Biol*. 1999;56(1):1–10.
38. Vázquez-Domínguez E, Castañeda-Rico S, Garrido-Garduño T, Gutiérrez-García TA. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Rev Chil Hist Nat*. 2009;82(2):277–97.
39. Castro Antônia JA, Ramon PM. Mitochondrial DNA: A tool for populational genetics studies. *Int Microbiol*. 1998;1(4):327–32.
40. Finnilä S. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA. Detection of mutations in patients with occipital stroke [Internet]. University of Oulu, Finland; 2000. Available from: url: <http://herkules.oulu.fi/issn03553221/>
41. Pakendorf B, Stoneking M. Mitochondrial Dna and Human Evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6(1):165–83.
42. Esposti MD, De Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *BBA - Bioenerg*. 1993;1143(3):243–71.
43. von Jagow G. b-Type Cytochromes. *Ann Rev Biochem*. 1980;49:281–314.
44. Meyer A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends Ecol Evol*. 1994;9(8):278–80.
45. Ayala Hoyos CJ, Hernández Mendoza CM, Eyes Escalante M, Romero Ricardo LR, Alvarez Rodriguez RA, Blanco Tuirán P. Detección de infección natural por *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) en triatomos del municipio de Colosó, Colombia. *Acta Biológica Colomb*. 2019;24(1):180–4.

46. Carrasco HJ, Segovia M, Londoño JC, Ortegoza J, Rodríguez M, Martínez CE. *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle : high risk factors for Chagas ' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas , Venezuela. *Parasites and Vectors*. 2014;7:1–15.
47. Wolff M, Castillo D. Evidencias de domesticación y aspectos biológicos de "*Panstrongylus Genuiculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera: Reduviidae). *Acta entomológica Chil*. 2000;24:77–83.
48. Alarcón de Noya B, Ruiz-Guevara R, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Muñoz-Calderón A, Mauriello L, et al. En Venezuela la enfermedad de Chagas de transmisión oral llegó para quedarse. *Trib del Investig*. 2016;17(2):62–74.
49. Pacheco RS, Almeida CE. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. 2007;(May 2014).
50. Grisales N, Triana O, Angulo V, Jaramillo N, Parra-Henao G. Diferenciación genética de tres poblaciones colombianas de *Triatoma dimidiata* ( Latreille , 1811 ) mediante análisis molecular del gen mitocondrial ND4. *Biomédica*. 2010;30:207–14.
51. López DC, Jaramillo C, Guhl F. Estructura poblacional y variabilidad genética de *Rhodnius prolixus* ( Hemiptera : Reduviidae ) procedente de diferentes áreas geográficas de Colombia. *Biomédica*. 2007;27:28–39.
52. Piccinali R, Marcet P, Ceballos L, Kitron U, Gürtler R, Dotson E. Genetic variability, phylogenetic relationships and gene flow in *Triatoma infestans*.pdf. *Infect Genet Evol*. 2011;11:895–903.
53. Pfeiler E, Bitler BG, Ramsey JM, Palacios-cardiel C, Markow TA. Genetic variation , population structure , and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T . recurva* ( Hemiptera : Reduviidae : Triatominae ) from the Sonoran Desert , insect vectors of the Chagas ' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biosystems*. 2006;41:209–21.

54. de la Rúa N, Stevens L, Dorn PL. High genetic diversity in a single population of *Triatoma sanguisuga* (LeConte, 1855) inferred from two mitochondrial markers: Cytochrome b and 16S ribosomal DNA. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2011;11(3):671–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.009>
55. Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol*. 2004;32:46–56.
56. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae ( Hemiptera , Reduviidae ), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull American Museum Nat Hist*. 1979;163(3):123–520.
57. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *J Comput Biol*. 2000;1/2(February):203–2014.
58. Garcia AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Stothard JR, Frame IA, Valente SA, et al. Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* [Internet]. 1998 Jan;35(1):38–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9542343>
59. Justi SA, Russo CAM, Reis J, Obara MT, Galvão C. Molecular phylogeny of Triatomini ( Hemiptera : Reduviidae : Triatominae ). *Parasites and Vectors*. 2014;7:1–12.
60. Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977;74(12):5463–7.
61. Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res*. 2005;15:1767–76.
62. Hall TA. *BioEdit\_a\_user-friendly\_biological\_seque.pdf*. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1997;41:95–8.
63. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673–80.

64. Nei M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci.* 1979;76(10):5269–73.
65. Tajima F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. 1989;595(3):585–95.
66. Li W. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics.* 1993;133:693–709.
67. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution (N Y).* 1965;19(3):395–420.
68. Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Hum Genet.* 1977;41:225–33.
69. Rozas J, Ferrer-mata A, S JC, Guirao-rico S, Librado P, Ramos-onsins E, et al. DnaSP 6 : DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. 2017;1–4.
70. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3 . 5 : a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10:564–7.
71. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol.* 1992;9(4):678–87.
72. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7 . 0 for bigger datasets. *MBE.* 2016;1–11.
73. Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics.* 1992;132(2):619–33.
74. Clement M, Crandall KA. TCS : A computer program to estimate gene genealogies TCS : a computer program to estimate gene genealogies. 1999;(November):3–6.
75. Leigh JW, Bryant D. POPART : full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.* 2015;6:1110–6.
76. Almeida CE, Pacheco RS, Haag K, Dupas S, Dotson EM, Costa J. Inferring from the Cyt B gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae:

- Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the State of Paraíba, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(5):791–802.
77. Reyes-Lugo M, Girón ME, Kamiya H, Rodríguez-Acosta A. A preliminary study of haemolymph from four Venezuelan populations of *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811 (Hemiptera: Reduviidae) and its epidemiological significance. *Rev Cubana Med Trop.* 2006;58(2):134–8.
  78. Aldana E, Heredia-Coronado E, Avendaño-Rangel F, Lizano E, Concepción JL, Bonfante-Cabarcas R, et al. Análisis morfométrico de *Panstrongylus geniculatus* de Caracas, Venezuela. *Biomedica.* 2011;31:108–17.
  79. Waleckx E, Salas R, Huamán N, Buitrago R, Bosseno M-F, Aliaga C, et al. Infection, Genetics and Evolution New insights on the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) brought by the genetic analysis of Bolivian sylvatic populations. *Infect Genet Evol.* 2011;11:1045–57.
  80. Campos R, Torres-pérez F, Botto-mahan C, Solari A. High phylogeographic structure in sylvatic vectors of Chagas disease of the genus *Mepraia* (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.036>

## A. Anexo

Anexo 1. Secuencias del gen Cyt-b de <i>P. geniculatus</i> de Colombia y Venezuela			
País	Población	Aislado	Código GenBank
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 77-AraucaPgCytb	MK829916.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 75-AraucaPgCytb	MK829915.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 74-AraucaPgCytb	MK829914.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 73-AraucaPgCytb	MK829899.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 71-AraucaPgCytb	MK829898.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 72-AraucaPgCytb	MK829890.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 7-AraucaPgCytb	MK829889.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 5-AraucaPgCytb	MK829901.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 70-AraucaPgCytb	MK829897.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 76-AraucaPgCytb	MK829892.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 11-AraucaPgCytb	MK829891.1:8-458
Colombia	Arauca	<i>P. geniculatus</i> 79-AraucaPgCytb	MK829893.1:8-458

Colombia	Boayacá	<i>P. geniculatus</i> 100-BoyacaPgCytb	MK829936.1:8-458
Colombia	Boayacá	<i>P. geniculatus</i> 107-BoyacaPgCytb	MK829888.1:8-456
Colombia	Boayacá	<i>P. geniculatus</i> 106-BoyacaPgCytb	MK829887.1:8-456
Colombia	Boayacá	<i>P. geniculatus</i> 105-BoyacaPgCytb	MK829886.1:8-456
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 54-CasanarePgCytb	MK829927.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 52-CasanarePgCytb	MK829926.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 50-CasanarePgCytb	MK829925.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 69-CasanarePgCytb	MK829913.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 66-CasanarePgCytb	MK829912.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 64-CasanarePgCytb	MK829911.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 62-CasanarePgCytb	MK829910.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 61-CasanarePgCytb	MK829909.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 60-CasanarePgCytb	MK829908.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 56-CasanarePgCytb	MK829907.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 51-CasanarePgCytb	MK829906.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 58-CasanarePgCytb	MK829928.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 57-CasanarePgCytb	MK829921.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 55-CasanarePgCytb	MK829920.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 67-CasanarePgCytb	MK829903.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 59-CasanarePgCytb	MK829902.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 68-CasanarePgCytb	MK829900.1:8-458
Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 65-CasanarePgCytb	MK829873.1:8-458

Colombia	Casanare	<i>P. geniculatus</i> 63-CasanarePgCytb	MK829932.1:8-458
Colombia	Córdoba	<i>P. geniculatus</i> 84-CordobaPgCytb	MK829904.1:8-458
Colombia	Córdoba	<i>P. geniculatus</i> 83-CordobaPgCytb	MK829895.1:8-458
Colombia	Córdoba	<i>P. geniculatus</i> 82-CordobaPgCytb	MK829894.1:8-458
Colombia	Norte de Santander	<i>P. geniculatus</i> 2-NSantPgCytb	MK829869.1:8-458
Colombia	Norte de Santander	<i>P. geniculatus</i> 1-NSantPgCytb	MK829868.1:8-458
Colombia	Santander	<i>P. geniculatus</i> 14-SantPgCytb	MK829885.1:8-458
Colombia	Santander	<i>P. geniculatus</i> 12-SantPgCytb	MK829866.1:8-458
Colombia	Santander	<i>P. geniculatus</i> 9-SantPgCytb	MK829865.1:8-458
Colombia	Santander	<i>P. geniculatus</i> 80-SantPgCytb	MK829867.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 44-MetaPgCytb	MK829884.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 19-MetaPgCytb	MK829882.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 49-MetaPgCytb	MK829883.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 37-MetaPgCytb	MK829931.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 27-MetaPgCytb	MK829930.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 20-MetaPgCytb	MK829929.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 31-MetaPgCytb	MK829881.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 48-MetaPgCytb	MK829943.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 47-MetaPgCytb	MK829942.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 41-MetaPgCytb	MK829941.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 40-MetaPgCytb	MK829940.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 36-MetaPgCytb	MK829939.1:8-458

Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 25-MetaPgCytb	MK829938.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 24-MetaPgCytb	MK829937.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 33-MetaPgCytb	MK829935.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 30-MetaPgCytb	MK829934.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 29-MetaPgCytb	MK829933.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 39-MetaPgCytb	MK829924.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 28-MetaPgCytb	MK829923.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 18-MetaPgCytb	MK829922.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 34-MetaPgCytb	MK829872.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 26-MetaPgCytb	MK829871.1:8-458
Colombia	Meta	<i>P. geniculatus</i> 17-MetaPgCytb	MK829870.1:8-458
Colombia	Magdalena	<i>P. geniculatus</i> 122-SNSMPgCytb	MK829880.1:8-458
Colombia	Magdalena	<i>P. geniculatus</i> 120-SNSMPgCytb	MK829879.1:8-458
Colombia	Amazonas	<i>P. geniculatus</i> 129-LeticiaPgCytb	MK829919.1:8-458
Colombia	Amazonas	<i>P. geniculatus</i> 128-LeticiaPgCytb	MK829896.1:8-458
Colombia	Amazonas	<i>P. geniculatus</i> 130-LeticiaPgCytb	MK829905.1:8-458
Colombia	Amazonas	<i>P. geniculatus</i> 131-LeticiaPgCytb	MK829918.1:8-458
Colombia	Amazonas	<i>P. geniculatus</i> 127-LeticiaPgCytb	MK829917.1:8-458
Colombia	Sucre	PgCSTC1	N/A
Colombia	Sucre	PgCSTC2	N/A
Colombia	Sucre	PgCSTC5	N/A
Colombia	Sucre	PgCSTC6	N/A
Colombia	Sucre	PgCSTC22	N/A
Colombia	Sucre	PgCSTC26	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEV804_10	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLAN820_10	N/A

Venezuela	Libertador	PgDMLER325_11	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ10611	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ31911	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEP11610	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLS0711	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ44210	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLS1311	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLS30710	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ114510	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ40311	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ129910	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEN43510	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ96510A	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ16310	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ22811	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ24311	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ27311	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ11511	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ31811	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ35911	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLER1086_10	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLER126610	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ28511	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ114810	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ17710	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ47210	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLER305_10	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLER1260_10	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ2610B	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ70910	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ7110	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ21211	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ24111B	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ772_10	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ326_11	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ124710	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ74610R	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ2610A	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ20810	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLEJ15411	N/A

Venezuela	Libertador	PgDMLCO1140_10	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLLV137910	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLSA0310	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLC69610	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLCM96510D	N/A
Venezuela	Libertador	PgDMLS35810	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSFM131_10	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSCA847_10	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSLD260_11	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSCA41811	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSCA84710	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSFM346_11	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSFM6010	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSFM116410	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP0204	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP0511	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP2305A	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP2411B	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP3404	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP4411	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP6713	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP7611A	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP15612	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP16008B	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP16408A	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP18311A	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP23713	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSLD34909	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP40708	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP57608	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSFM7112B	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP33612	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP46511	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP2312	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP3413	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP3510	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP4111	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP7907	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP10312A	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP10312B	N/A

Venezuela	Sucre	PgDMSP12210	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSCA16311	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSLD45810	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP2909A	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP2909B	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP15413	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP16610	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP30512	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP17213	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP28409	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP6311	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP1904A	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSCA11911	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSFM35111	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSLD1404_10	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP1909	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP4907	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP7611B	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP14313	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP18909	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP20609	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP20809	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP23408	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP34311	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP38712	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP39412	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP16008A	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP11912	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP37508	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP13713B	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP2005	N/A
Venezuela	Sucre	PgDMSP0311	N/A
Venezuela	La Guaira	PgVCLM304_10	N/A
Venezuela	La Guaira	PgVCRB863_10A	N/A
Venezuela	La Guaira	PgVCRB894_10	N/A
Venezuela	La Guaira	PgVCRB949_10A	N/A
Venezuela	La Guaira	PgVCRB86310H	N/A
Venezuela	La Guaira	PgVM687_10	N/A
Venezuela	La Guaira	PgVCRB86310E	N/A
Venezuela	La Guaira	PgVCY1713	N/A

---

