

## IV. MATERIALES Y METODOS

**A. Selección de secuencias microsatélites** Para evaluar la estructura poblacional de *Anopheles albimanus* se utilizaron 11 secuencias de microsatélites. Siete de estos loci, denominados NP# (Cuadro 2), se seleccionaron de un conjunto de 43 secuencias de microsatélites descritos previamente como polimórficos para cepas de laboratorio pero que aún no habían sido descrito su uso como marcadores polimórficos en poblaciones naturales (comunicación personal Hilary Ranson, Liverpool School of Tropical Medicine). Estas secuencias microsatélites se obtuvieron de librerías genómicas de *Anopheles albimanus* enriquecidas, elaboradas previamente como parte del programa de investigación colaborativo entre el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle y la División de Entomología del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés «Centers for Disease Control and Prevention»). Las secuencias de los loci así como los sitios de hibridación de los iniciadores se muestran en el Apéndice A.

Los 4 loci denominados Aa# (Cuadro 2), fueron previamente descritos como polimórficos y utilizados para analizar la estructura poblacional de *Anopheles albimanus* a lo largo de su distribución geográfica en Cuba, México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela y Colombia; así como a través de Guatemala (Schoua, 2000; Mills, 2001). En este estudio estos microsatélites se evaluaron en una escala microgeográfica

Nombre del locus	Secuencia microsatélite	Peso esperado (pb)
NP94F	(CA) <sub>4</sub> T(AC) <sub>2</sub> (GC) <sub>5</sub>	143
NP106F	(GAT) <sub>2</sub> GCT(GAT) <sub>5</sub>	143
NP113F	(AC) <sub>5</sub> GCAT(AC) <sub>10</sub>	115
NP76consA	(AC) <sub>3</sub> CCAT(AC) <sub>16</sub>	144
NP128F	(CT) <sub>15</sub> TTCTCC(CT) <sub>2</sub>	138
NP81R	(GA) <sub>12</sub>	100
NP38F	(GA) <sub>7</sub> AA(GA) <sub>8</sub>	116
Aa6-41	(CA) <sub>12</sub>	184
Aa2-25	(TC) <sub>20</sub>	114
Aa2-14	(TC) <sub>14</sub>	193
Aa1-90	(CT) <sub>14</sub>	160

Cuadro 2. Secuencias microsatélites seleccionadas para describir su uso como marcadores polimórficos en poblaciones naturales de *Anopheles albimanus* del municipio de Ixcán, Quiché.

**B. Selección y colecta de *Anopheles albimanus*.** Para optimizar la reacción de PCR se utilizó el ADN de cuatro hembras adultas de *An. albimanus* provenientes de colonias del insectario que se mantiene en el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala. Las cepas utilizadas fueron: Nahua, Quinich y El Semillero.

Los mosquitos *Anopheles albimanus* que se utilizaron para caracterizar las 11 secuencias microsátélites en poblaciones naturales, fueron capturados en colectas que se realizaron durante los años 2000 y 2001, por técnicos de campo que pertenecen a la unidad de Entomología Médica de la Universidad del Valle de Guatemala. Las colectas se realizaron por el método de captura con cebo humano en 15 comunidades del municipio de Ixcán, departamento de Quiché (Figura 9). Las localidades muestreadas se encuentran en la Figura 10. En el Apéndice B, se presenta un listado completo de la localidad, y fecha en que se colectó cada individuo del estudio. Las muestras colectadas se encontraban almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El diseño experimental de las colectas permitió analizar patrones de flujo genético entre las comunidades de estudio, agrupadas en 4 grupos (Figura 10). Para definir cada grupo, primero se escogieron las comunidades en donde habían mosquitos a lo largo del año, y luego se definieron los grupos como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms.

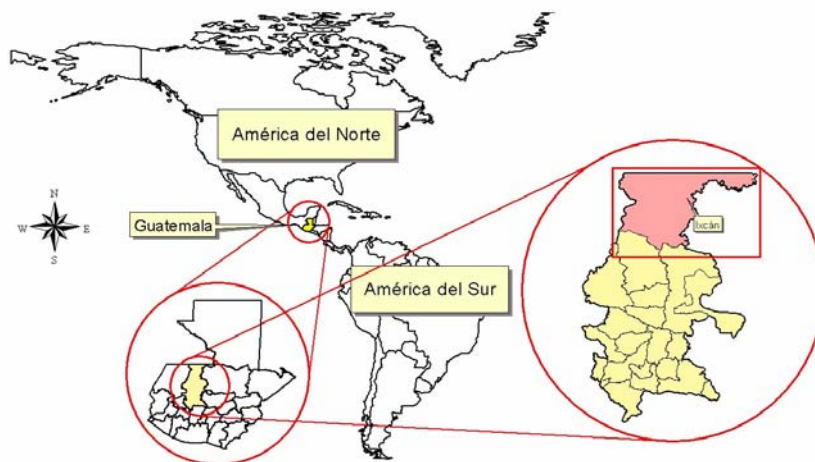


Figura 9. Localización del área de estudio. (Mapa producido por la Unidad de Mapeo del Centro de Estudio en Salud, 2003). Mapa de Guatemala indicando el municipio de Ixcán, departamento de Quiché, en donde se realizó el estudio.

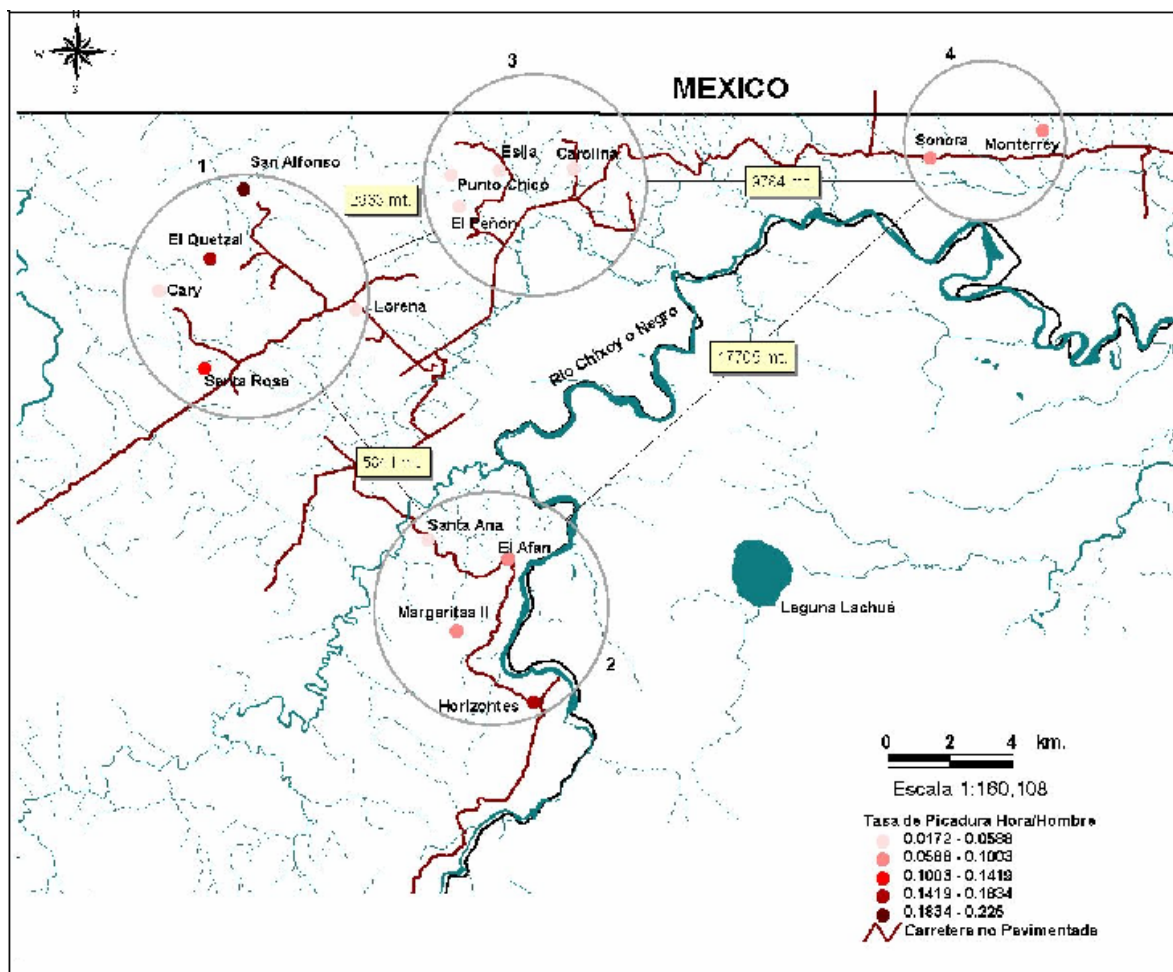


Figura 10. Sitios de colecta de *Anopheles albimanus* en las comunidades de Ixcán, Quiché (Mapa producido por la Unidad de Mapeo del Centro de Estudios en Salud, 2003). Los cuatro grupos de estudio están delimitados por un círculo. Los grupos se definieron como las comunidades donde había mosquitos a lo largo del año y que se encontraban dentro de un radio de 9 kms. Dentro de cada círculo se encuentran los nombres de las comunidades que se analizaron en cada grupo.

C. **Extracción de ADN.** El ADN fue extraído de cada mosquito mediante dos métodos:

D. 1. Procedimiento para la extracción de ADN mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 y el Kit comercial IsoQuick (Orca Research, WA). 142 muestras (ID análisis 1-142, Apéndice B) fueron extraídas utilizando el siguiente protocolo:

a. Cada mosquito se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y, se agregaron 50 uL de buffer de macerado conteniendo proteinasa K a una concentración final de 100 ug/mL (0.5 uL de solución stock a 20

mg/mL) y se maceró el mosquito, inmediatamente después de sacarlo del congelador, con un pistilo de teflón Kontes estéril hasta homogenizarlo. Se lavó el pistilo con 50 uL adicionales de buffer de macerado en el mismo tubo.

- a. El contenido de los tubos se centrifugó por unos segundos para que todo el contenido quedara disuelto en el buffer de macerado.
- b. Se incubaron los tubos a 65°C en un baño de agua por 30 min.
- c. Mientras los tubos estaban todavía tibios, se agregó a cada uno 18 uL de acetato de potasio 5M para alcanzar una concentración final de 1M. Se mezcló golpeando ligeramente el tubo en la parte inferior. Se incubaron los tubos en hielo por 30 min.
- d. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente y a máxima velocidad (12,000 X g) por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril.
- e. Se agregaron 100 uL de reactivo 1 (IsoQuick)<sup>®</sup>, seguido de 500 uL de reactivo 2 (IsoQuick)<sup>®</sup>.
- f. Se agregaron 400 uL de reactivo 3, se agitó en el agitador vortex por 10 s y se incubó en un baño de agua a 65°C por 10 min. Se agitó en agitador Vortex después de 5 min.
- g. Se centrifugaron a 12,000 X g, por 10 min.
- h. Se transfirió la fase superior a un nuevo tubo, estimando el volumen y se agregó, a cada tubo, 0.1 volúmenes de reactivo 4 (IsoQuick)<sup>®</sup> y se mezcló.
- i. Se agregó un volumen igual de isopropanol al 100% (v/v) y se agitó vigorosamente.
- j. Se centrifugaron a 12,000 X g, por 10 min.
- k. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente, con una micropipeta.
- l. Se agregó 1 mL de etanol al 70% (v/v), y se mezcló invirtiendo el tubo.
- m. Se centrifugaron a 12,000 X g por 5 min.
- n. Se removió el etanol con una micropipeta y se secó el sedimento, por vacío y calor, utilizando un SpeedVac Plus SC 110 A (Savant).
- o. Se resuspendió el pellet en 20 uL de reactivo 5 (IsoQuick)<sup>®</sup>, se agitó en Vortex y se centrifugaron los tubos por unos segundos. Se dejaron toda la noche a 4°C.
- p. Se almacenaron permanentemente a -20°C.

2. Procedimiento para la extracción de ADN con fenol/cloroformo, mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987. 90 muestras (ID análisis 143-232, Apéndice B) fueron extraídas utilizando el siguiente protocolo:

Durante este procedimiento se siguieron los mismos pasos de inciso a al inciso e que el método anterior. Luego se procedió de la siguiente forma:

- f. Se preparó una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) de la forma siguiente: a 1 mL de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (124:24:1) se le agregó 0.66 mL de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- g. Se agregó 100  $\mu$ L de solución bufferada de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) y se agitó en el agitador vortex por 5 min hasta que se formó una emulsión. Se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente y se transfirió la fase acuosa superior a un tubo estéril de 1.5 mL.
- h. Se volvió a extraer con 100  $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), como en el paso anterior.
- i. Al sobrenadante se le agregaron 250 mL etanol al 100% (v/v) y se colocó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 min a 1 hora.
- j. Se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se removió el etanol con una pipeta.
- k. Se agregaron 100  $\mu$ L de etanol 70% (v/v) y se centrifugó de nuevo a 12,000 rpm por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- l. Se removió el etanol con una micropipeta y se secó el sedimento, por vacío y calor, en el SpeedVac Plus SC 110 A (Savant).
- m. Se resuspendió el ADN en 50  $\mu$ L de TE y se dejó a  $4^{\circ}\text{C}$  toda la noche.
- n. Se almacenaron permanentemente a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**D. Amplificación de ADN.** Basándose en las secuencias de los loci se utilizó el programa Primer3, disponible en [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi), para diseñar los iniciadores denominados NP#. Los iniciadores se crearon a partir de las secuencias que enmarcaban al microsatélite identificado. Los iniciadores denominados Aa#, fueron diseñados por María Marta Yurrita y colaboradores. Las 11 parejas de iniciadores se marcaron con diferentes colorantes fluorescentes (Apéndice D) para poder analizar varios loci independientes en la misma línea, utilizando el color o el tamaño para distinguir entre diferentes fragmentos al realizar la electroforesis capilar. Los fragmentos de ADN se marcaron con fluorescencia mediante una reacción de PCR, utilizando iniciadores marcados con fluorescencia en el extremo 5' (Apéndice E). Se utilizaron 11 parejas de iniciadores (Cuadro 3), los cuales utilizaron la misma mezcla de reacción y programa en el termoreciclador RoboCycler® (Stratagene, TX).

Iniciador	Secuencia 5' ----- 3'	Peso Molecular (g/mol)	Tm ( $^{\circ}\text{C}$ )	Marcaje fluorescente (# pozo compartido)
NP76consA L	GGCTTACCGCCAGTGATAAT	6113	59	[FAM] (1)
NP76consA R	GAATCGGCCTTTTTCACAGA	6089	60	Amarillo

Iniciador	Secuencia 5' ----- 3'	Peso Molecular (g/mol)	Tm (°C)	Marcaje fluorescente (# pozo compartido)
NP113F L	CATCATTCAATGTTTCGATGGTC	6697	62	[HEX] (1)
NP113F R	AAACGCATGCGATACTGGTC	6122	61	Rojo
NP38F L	GCTGGACATGCTTGACATTG	6143	60	[HEX] (2)
NP38F R	GCGGAGAGGGCTCTGTTTAC	6182	61	Rojo
NP94F L	TCATCTCCTTTAGCGTTCGTG	6351	60	[FAM] (2)
NP94F R	TGCGTATGTGGCTGAGAAAG	6230	60	amarillo
NP81R L	CGACCGAAAGGTTTGTAAC	6161	59	[HEX] (3)
NP81R R	GTGAAGAGCCTTCCATCTCG	6089	59	rojo
NP106F L	TTAAAACCGCTCTCGACTCC	5996	59	[FAM] (3)
NP106F R	GCGTGGAGACTAACCGAGAG	6209	60	Amarillo
NP128F L	GTCATCGTGCTCTCGTGATG	6110	60	[HEX]
NP128F R	AATTTGGACGATTTCTCAAGG	6456	58	rojo
Aa6-41 L	CGGCATCCATCCTTTTCTCTG	5996	54	[HEX] (4)
Aa6-41 R	GACCTCGCGCCTTGTCATAA	6054	54	rojo
Aa2-25 L	GGTTTCCAGCCTCCATTCTC	5995	54	[FAM] (4)
Aa2-25 R	CCTTACTGTGCTGGAACACG	6093	54	amarillo
Aa2-14 L	GCCGTTGCCAAGATAAAATGGAAA	7380	54	[HEX] (5)
Aa2-14 R	TCAAATAATCCTAAAACACCGTCC	7250	52	rojo
Aa1-90 L	GCATAAATAATAGCCGAACA	6128	46	[FAM] (5)
Aa1-90 R	GTCACACTTCCGACTACAAA	6031	50	amarillo

Cuadro 3. Características y propiedades de los iniciadores utilizados para describir su uso como marcadores polimórficos en poblaciones naturales de *Anopheles albimanus* del municipio de Ixcán, Quiché.

Tm se refiere a la temperatura de desnaturalización. L se refiere a la secuencia *forward* del iniciador, y R a la secuencia *reverse* del iniciador para cada secuencia microsatélite. Solamente los iniciadores *forward* estaban marcados con fluorescencia. Estos iniciadores fueron sintetizados en el DNA Chemistry Section, Biotechnology Core Facility Branch, Scientific Resources Program. Se recibieron liofilizados y se reconstituyeron en TE. Se hicieron alícuotas en agua destilada-desionizada, de forma que su concentración final fuera de 12 pmol/μL, y se almacenaron a -20°C.

1. Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de ADN. Para establecer la concentración óptima de ADN genómico y la temperatura de hibridación, se realizó una

reacción en cadena de la polimerasa, PCR, con gradiente de temperatura (42 - 58°C) con cada pareja de iniciadores, utilizando el programa de PCR previamente establecido por Padilla *et al.*, no publicado. Como ya se mencionó anteriormente, para optimizar la reacción de PCR se utilizó ADN de cuatro mosquitos del insectario que se mantiene en el Centro de Estudios en Salud de la Universidad del Valle de Guatemala. El ADN de estas hembras fue extraído mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 y el Kit comercial IsoQuick® (Orca Research, WA). Antes de comenzar a trabajar se colocaron todos los reactivos en hielo, y toda la mezcla se hizo en frío. A continuación, Cuadro 4, se describen las condiciones de la mezcla de reacción que se utilizó para cada pareja de iniciadores.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (µL)
Buffer 10X	10X	1X	1.50
MgCl <sub>2</sub>	15.00 mM	1.00 mM	1.00
dNTPs	2.0 mM	0.20 mM	1.50
Iniciador izquierdo	12.00 pmol/µL	0.80 pmol/µL	1.00
Iniciador derecho	12.00 pmol/µL	0.80 pmol/µL	1.00
Taq	5 U/µL	0.03 U/µL	0.09
ADN	1:10		1.00
ddH <sub>2</sub> O			7.91
Total			15.00

Cuadro 4. Mezcla de reacción para el PCR de cada pareja de iniciadores. La reacción de PCR se realizó en el termociclador RoboCycler® (Stratagene, TX), utilizando el siguiente programa (Cuadro 5). ddH<sub>2</sub>O se refiere al agua destilada y desionizada.

Paso	Tiempo	Temperatura (°C)
1. Desnaturalización inicial	5 min	94
2. Desnaturalización	20 seg	94
3. Hibridación	28 seg	54/47/46
4. Extensión	30 seg	72
5. Repetición de ciclo	30 veces al paso 2	
6. Elongación final	45 min	72

Cuadro 5. Programa utilizado para la amplificación por PCR de cada pareja de iniciadores. La temperatura de hibridación es distinta según la secuencia a amplificar; para los microsatélites NP94F, NP106F, NP113F, NP128F, NP76consA, NP38F y NP81R se estandarizó a 54°C; para los microsatélites 6-41, 2-25 se estandarizó a 47°C ; y para los microsatélites 2-14, 1-90 se estandarizó a 46°C.

a. Detección del producto amplificado durante la optimización de la técnica de PCR. Para visualizar el producto amplificado mediante PCR y, corroborar que el programa utilizado era el adecuado, se separaron estos productos en geles de poliacrilamida («polyacrilamide gel electrophoreses, PAGE, por sus siglas en inglés») de concentración constante de monómero al 10% y una razón de acrilamida:bisacrilamida de 29:1. Las geles se corrieron en la cámara electroforética Miniprotean II cell (Biorad®) a 4°C, por 1 hora 40 minutos, a 15 mA de corriente constante, utilizando como fuente de poder la EC-600 (Aparatus Corporation). El buffer de corrida utilizado fue TBE 0.5X. En cada pozo se montaron 5 uL de producto de PCR, con 1 uL de buffer de montaje 6X (Promega, Cat. No. G4511). Se utilizó un marcador de masa molecular de 25 pb (Promega, Cat. No. G190A), que se corrió junto con las muestras en cada gel.

Las bandas separadas previamente por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, se visualizaron al revelar las geles por medio de una tinción con nitrato de plata, utilizando el procedimiento que se basa en el protocolo descrito por Black *et al.*, 1997:

- 1) Se colocaron las geles en solución fijadora de ácido acético 10% (v/v), durante 20 min con agitación constante.
- 2) Después de fijar la gel, se recolectó el fijador para ser utilizado en el último paso de la tinción.
- 3) Se lavó tres veces la gel con 200 mL de agua destilada desionizada, con 2 min de agitación por lavado. El uso de agua menos pura podría resultar en niveles dispares de coloración de fondo. Se usó agua destilada recientemente en cada lavado. Cuando se estaba haciendo el último lavado con agua destilada, después de fijar la gel, se agregaron 800 uL de formaldehído al 37% (v/v) a la solución de coloración (0.3g de nitrato de plata en 200 mL de agua destilada) y se homogenizó de nuevo la solución por 30 seg o menos. Se volvió a guardar la solución en un lugar oscuro para que no se descompusiera el nitrato de plata.
- 4) La gel se transfirió a la solución de coloración y se agitó durante 30 min en oscuridad. Para ello se tapó el recipiente con una tapadera plástica y cubrió con papel café tipo Kraft.
- 5) Terminados los 30 min se descartó la solución de coloración.

6) En el mismo recipiente donde se hizo la coloración de la gel, se lavó con agua destilada fría (la cual se debía guardar a 4°C desde el inicio del proceso de tinción) por 18 segundos, con agitación constante.

7) La gel se colocó en la solución reveladora de desarrollar fría (6.0g de carbonato de sodio, 200 mL de agua destilada) y se agitó. Antes de agregar la solución de desarrollar a la gel, se agregaron 800 uL de formaldehído al 37% (v/v) y 40 uL de solución de tiosulfato de sodio (0.01g/mL).

8) Tan pronto las bandas empezaban a aparecer (usualmente 4-6 min), se agregaba la solución fijadora del paso uno, directamente en el desarrollador y se agitaba hasta que desaparecieran las burbujas (aprox. 3 min).

9) Por último, se lavó la gel tres veces en agua destilada desionizada con agitación constante.

El procedimiento anterior se realizó en los laboratorios del Centro de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala, previo a analizar las muestras de poblaciones naturales.

Una vez optimizada la reacción de PCR, se realizó ésta con las muestras de ADN de poblaciones naturales extraídas mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 y el Kit comercial IsoQuick® (Orca Research, WA), en los laboratorios del CES, en el termociclador RoboCycler® (Stratagene, TX). En los laboratorios del CDC («Centers for Disease Control, CDC, por sus siglas en inglés»), Atlanta GA, se realizó la reacción de PCR, en un termociclador RoboCycler® (Stratagene, TX), de las muestras de poblaciones naturales extraídas con fenol/cloroformo, mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987.

### G. Análisis de fragmentos pequeños de ADN por electroforesis capilar.

Las secuencias microsátélites se amplificaron mediante la técnica de PCR, previamente optimizada para cada pareja de iniciadores. El producto de PCR se separó en el equipo de electroforesis capilar 3100 (Applied Biosystem, CA), en los laboratorios del CDC en Atlanta, GA. Se utilizó un arreglo de capilares de 36 cm 3100 (ABI, CA, p/n 4315931) (Apéndice F), polímero POP-4 3100 (ABI CA, p/n 4316355) y buffer 10X para análisis genético con EDTA (ABI, CA, p/n 402824). Se preparó la mezcla de reacción, para 98 reacciones, de la siguiente forma:

8.5 µL de Hi-Di™ Formamida (ABI, CA, p/n 4311320)

0.5 µL de GeneScan®-500[ROX]™ (ABI, CA, p/n 401734) (Apéndice G)

9.0 µL vol por reacción                      x # de reacciones

Se agregaron 9 µL de la mezcla en cada pozo de una placa de 96 pozos, seguido de 1 µL del producto de PCR obtenido de cada muestra a analizar. Para aprovechar al máximo el uso del polímero, en cada pozo se

corrió una mezcla de dos productos de PCR con tamaños y marcaje fluorescente diferente (ver Cuadro 3). Para los productos de PCR con ADN extraído mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 y el kit Comercial IsoQuick® (Orca Research) se utilizó una dilución de productos de PCR 1:10 de la siguiente forma: 8  $\mu$ L H<sub>2</sub>O dd + 1  $\mu$ L de cada producto de PCR = 10  $\mu$ L. Para los productos de PCR con ADN extraído mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 y fenol-cloroformo se utilizó una mezcla de los productos de PCR sin diluir de la siguiente forma: 1  $\mu$ L de cada producto de PCR = 2  $\mu$ L total. Una vez montada la placa de 96 pozos, se tapó con una tapadera septa 3100 (ABI, CA, p/n 4315933) y se agitó fuertemente en el agitador Vortex. Luego se incubó a 95°C por 3 minutos, y luego en hielo por otros 3 minutos. Al terminar el procedimiento, la placa se montó en el equipo. Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

- Project 3100
- Matriz D
- Autoanalysis
- Polymer POP-4
- Temperatura del horno 60°C

El resultado del análisis con el equipo de electroforesis capilar 3100 es un gráfico llamado electroferograma obtenido mediante el programa GeneScan® Analysis Software (figuras 11-16). El electroferograma es una representación gráfica de la separación de los fragmentos de ADN, que representan la secuencia microsatélite, por medio de la matriz del polímero POP-4. El electroferograma presenta el tamaño del alelo en el eje-x, en pares de bases (pb), y la señal de fluorescencia en el eje-y, en unidades de fluorescencia (uf). El programa también reporta una tabla con el tamaño (pb), la intensidad (uf) y el área del pico del fragmento de ADN en cuestión. Para el cálculo del tamaño del fragmento, el GeneScan® Analysis Software se basa en el método *Local Southern* (Apéndice H).

**G. Determinación de herencia mendeliana de los microsatélites.** Con el fin de comprobar que los marcadores moleculares en estudio se heredan de forma mendeliana se hicieron cruces de mosquitos, por medio de inseminación natural, con cepas del insectario de la Universidad del Valle de Guatemala. Inicialmente se probó el método de copulación natural colocando 32 parejas de mosquitos en un vaso con tul, pero no copularon. Se decidió colocar 20 parejas de mosquitos en un recipiente mayor, para que tuvieran más espacio, pero tampoco copularon. Luego se inseminaron artificialmente 34 hembras que pusieron muy pocos huevos y no se obtuvo progenie. Por último se seleccionó el método de inseminación natural utilizando mosquitos de las cepas Zapote y Norte del insectario, Universidad del Valle de Guatemala. El procedimiento de inseminación natural que se siguió fue el siguiente:

1. Se prepararon frascos de 50mL con 1mL de agua. Se colocó una pupa en cada uno de estos frascos (preparar suficientes frascos para tener la mayor cantidad de adultos posibles). Se cerró cuidadosamente el frasco con una malla o tul (asegurando el tul con una banda de hule o con cinta adhesiva), para que al eclosionar, el mosquito no escapara.

2. Se prepararon vasos que contenían algodón húmedo en el fondo. Se colocó, sobre el algodón, papel filtro Whatmann No. 1. Esto para poder recoger la ovipostura posteriormente. Se tapó el vaso con una malla, o tul, de forma que quedara bien cerrado con cinta adhesiva o una banda de hule.

3. Los mosquitos adultos se trasladaron a recipientes, separando machos y hembras de cada cepa. Esto debe hacerse con mucho cuidado para no dañar a los mosquitos y también evitar que estos escapen. El procedimiento fue el siguiente: se quitó el hule que cubre la orilla del frasco; se sostuvo firmemente el tul (o malla), se usó el aspirador para capturar al mosquito (muy suavemente) y se trasladó al vaso previamente preparado. El recipiente se etiquetó con la información pertinente.

4. Se dejó a los mosquitos por dos días, para que alcanzaran la madurez y se pudieran aparear. Se humedeció pequeños trozos de algodón con agua miel al 7% (p/v) y colocaron sobre la malla o tul. Este algodón se retiró el día siguiente por la mañana, sustituyéndolo por algodón humedecido con agua.

5. Al siguiente día por la mañana, entre 7:00 y 9:00 am, se colocaron en una jaula machos de una cepa con hembras de otra cepa. Se observó atentamente a los mosquitos, y cuando una pareja copulaba y caía al suelo, se aspiraba inmediatamente con el capturador y se colocaba a la pareja en un vaso nuevo debidamente rotulado.

6. La alimentación con sangre se hizo directamente del brazo del técnico que estaba realizando el trabajo (o donde tenga menos sensibilidad al «pique» del mosquito). La alimentación con sangre se realizó con un intervalo de dos días aproximadamente. Fue importante asegurarse que las hembras estaban bien alimentadas con sangre, para que ovipositaran.

7. Al observar oviposición, se retiraron los mosquitos con mucho cuidado y se pasaron a un tubo cónico de 1.5mL. Estos tubos se colocaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los huevos se trasladaron a un recipiente, o charola, que contenía agua para que eclosionaran. La charola estaba rodeada por dentro con toallas absorbentes, para evitar que los huevos se adhirieran al metal o plástico del recipiente. Al eclosionar, las larvas se alimentaron con una solución de levadura y cereal para niño, hasta que llegaron a su etapa adulta. Se identificó el recipiente con huevos y las bandejas con larvas con la información pertinente. La primera eclosión de mosquitos adultos se le llamó «generación 1» o «F1».

8. Se apuntó toda la información por pareja y sus generaciones.

Con los cruces se obtuvieron dos familias formadas cada una por padre, madre y una progenie o F1 de 4 mosquitos, para un total de 12 mosquitos cuyo ADN se extrajo mediante una modificación del método de Collins *et al.*, 1987 y el Kit comercial IsoQuick® (Orca Research, WA). El ADN de estos mosquitos se amplificó con las 11 secuencias microsatélites (Cuadro 3), utilizando la mezcla de reacción de 15µL y el programa de PCR descritos previamente (Cuadros 4 y 5). Los productos de PCR se corrieron en el equipo de electroforesis capilar 3100 (ABI, CA).

**G. Identificación de alelos en cada locus.** Para identificar los alelos reales se tomó en cuenta que el mosquito vector de la malaria *Anopheles albimanus* es un organismo diploide (Angulo M., 1999) por lo que sólo se consideró válida la presencia de un máximo de dos alelos por muestra. El alelo está descrito como el tamaño del producto amplificado por PCR, en pares de bases. Las reglas que se siguieron para analizar los electroferogramas e identificar los alelos fueron las siguientes:

1. Presencia de un solo grupo de picos:

i) Se tomó como alelo real el pico predominante con mayor altura, y el individuo se consideró homocigoto (ver figuras 11 y 12). Los picos que se encuentran antes del pico predominante se consideraron como «*stutter bands*» o picos no esperados (comunicación personal, Tovi Lehmann, CDC, y Lisa Davis, ABI).

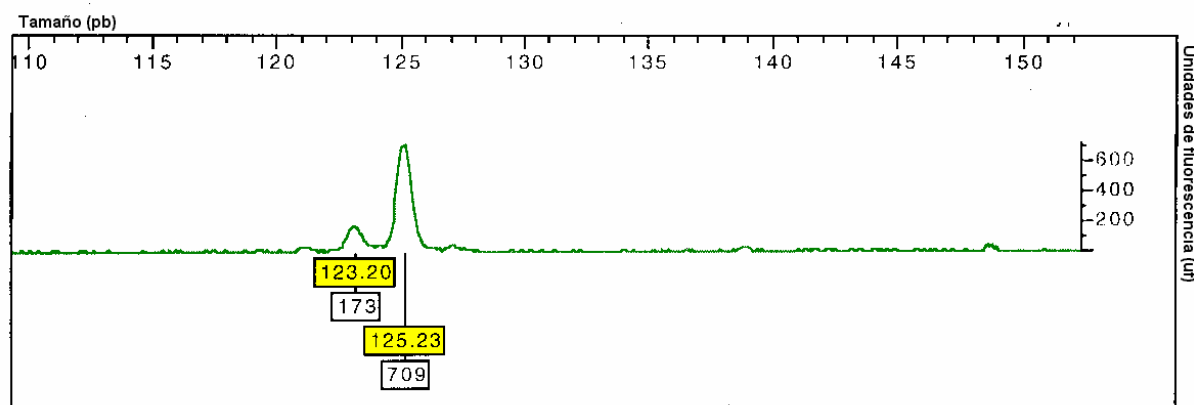


Figura 11. Electroferograma de microsatélite NP128F. Producto de PCR de *Anopheles albimanus* amplificado con el microsatélite NP128F marcado con HEX. En los rectángulos de color amarillo se muestra el tamaño de los alelos, tanto para el alelo real, (125.23pb), como para el pico no esperado (123.20 pb). En los rectángulos blancos se muestra la altura de cada pico que es indicador de la señal de fluorescencia (173 uf y 709 uf).

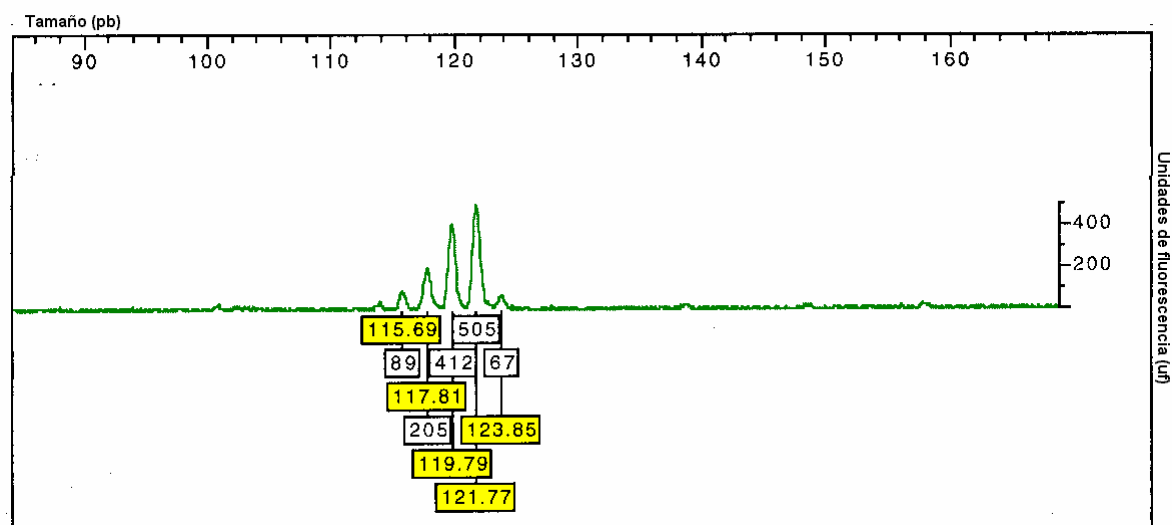


Figura 12. Electroferograma de microsatélite NP38F. Producto de PCR de *Anopheles albimanus* amplificado con el microsatélite NP38F marcado con HEX. En los rectángulos de color amarillo se muestra el tamaño de los alelos, tanto para el alelo real (119.79 pb), como para los picos no esperados (115.69, 117.81, 119.79, 123.85 pb). En los rectángulos blancos se muestra la altura de cada pico que es indicador de la señal de fluorescencia (89, 205, 412, 505 y 67 uf respectivamente).

ii) Si se encontraron dos picos con alturas similares, y parecen ser los predominantes, se consideró al individuo como heterocigoto si el segundo pico, o pico menor, tenía una altura  $\geq$  mayor que el 25% de la altura del primer alelo o pico predominante (Figura 13). Si el segundo pico tenía una altura menor del 25% del primer pico, se consideró un artefacto o pico no específico (Figura 14) (Anderson *et al.*, 1999). Se utilizó un punto de corte de 25%, como sugiere el mismo autor, ya que este valor evita que se confundan pequeños picos no específicos con alelos adicionales. Este procedimiento también proporciona mayor sensibilidad para poder detectar picos pequeños en todas las muestras, a pesar que la cantidad de ADN puede variar considerablemente entre las mismas.

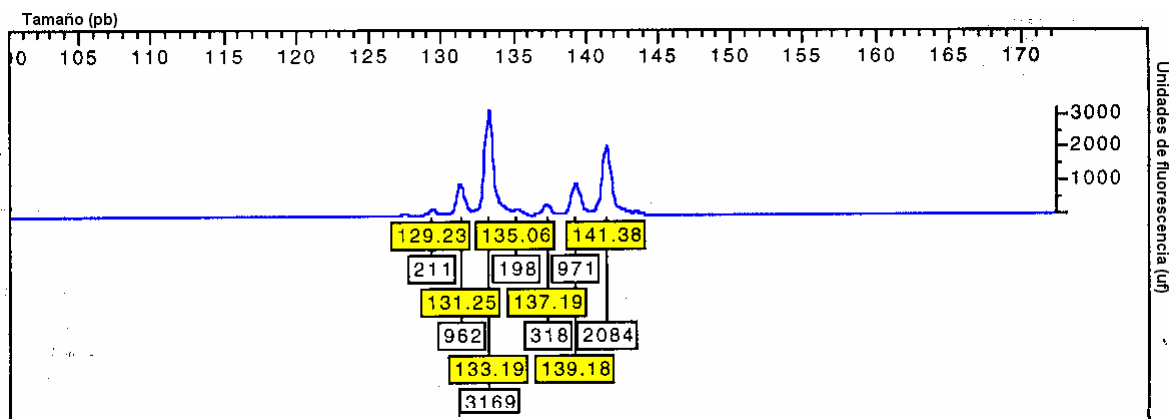


Figura 13. Electroferograma de microsatélite NP76consA. Producto de PCR de *Anopheles albimanus* amplificado con el microsatélite NP76consA marcado con 6-FAM. En los rectángulos amarillos se muestra el tamaño de los picos, tanto de los alelos reales (133.19, 141.38 pb) como de los picos no esperados (129.23, 131.25, 135.06, 137.19, 139.18 pb). En los rectángulos blancos se muestra la altura de cada pico que es indicador de la señal de fluorescencia (211, 962, 198, 318, 971, 3169 y 2084 uf).

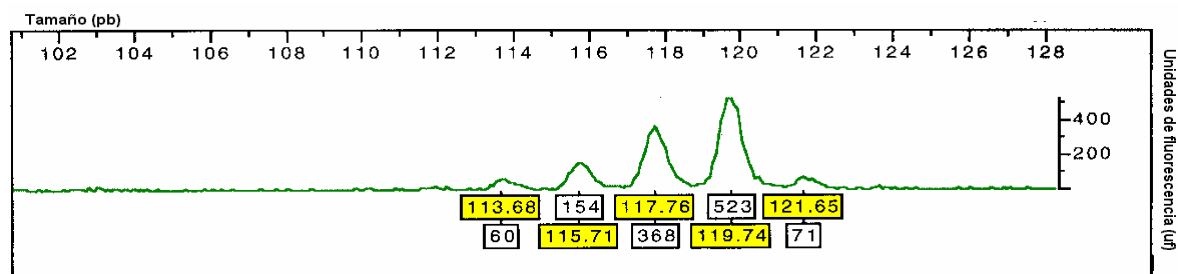


Figura 14. Electroferograma de microsatélite NP38F. Producto de PCR de *Anopheles albimanus* amplificado con el microsatélite NP38F marcado con HEX. En los rectángulos amarillos se muestra el tamaño de los alelos, tanto del alelo real (119.74 pb) como de los picos no esperados (113.68, 115.71, 117.76 y 121.65 pb). En los rectángulos blancos se muestra la altura de los picos que es indicador de la señal de fluorescencia (60, 154, 368, 71 y 523 uf).

## 2. Presencia de dos grupos de picos:

iii) Se consideró a cada grupo de picos como alelos diferentes, sólo si el patrón de repetición de los mismos era igual en cada grupo. Se tomaron los picos de mayor altura como los alelos (Figura 15),

en donde el pico predominante del primer grupo debía ser más alto que en el segundo grupo, sin importar que el pico predominante en el segundo grupo tuviera una altura  $\geq$  mayor del 25% de la altura del pico en el primer grupo (comunicación personal con Tovi Lehmann; Haberl and Tautz, 1999).

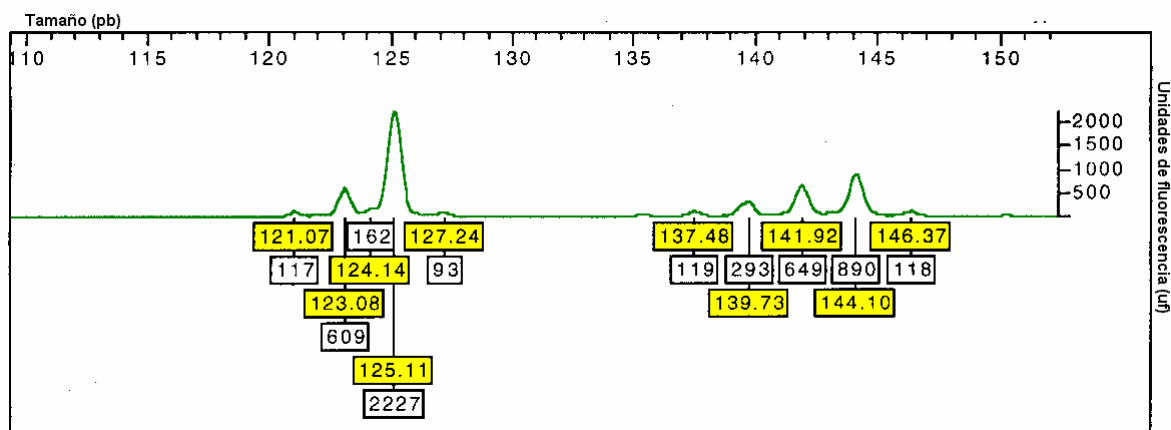


Figura 15. Electroferograma de microsatélite NP113F. Producto de PCR de *Anopheles albimanus* amplificado con el microsatélite NP113F marcado con HEX. En los rectángulos amarillos se muestra el tamaño de los alelos, tanto para los alelos reales (125.11 pb en el primer grupo, y 144.10 pb en el segundo grupo), como para los picos no esperados (121.07, 123.08, 124.14, 127.24 pb en el primer grupo, y 137.48, 139.73, 141.92 y 146.37 pb). En los rectángulos blancos se muestra la altura de cada pico que es indicador de la señal de fluorescencia (117, 609, 162, 93, 2227, 119, 293, 649, 118, y 890 uf).

Excepción a la regla 2. i): Si el patrón de los grupos se repite, pero el pico predominante en el primer grupo tiene menor altura que el del segundo grupo, se tomó como heterocigoto, Figura 16. Esto es porque están separados por dos o más repeticiones del microsatélite, y porque probablemente el primer grupo tiene el mismo patrón de repetición que el segundo grupo pero en menor escala (comunicación personal, Tovi Lehmann, CDC).

Luego de escoger los picos reales se utilizó el programa de computación *Allelogram* que funciona en el sistema operativo Unix (Apéndice I) para definir el tamaño de cada alelo, y luego automáticamente las cajuelas o *bins* (Idury and Cardon, 1997). Una cajuela o *bin* se refiere al número entero en el cual se agruparon los números con dos decimales estadísticamente cercanos a él. El tamaño de los alelos, en pb, se ingresaron según el formato 2 (Apéndice I). Con esta información el programa generó archivos de salida, entre los cuales encontramos un archivo de error «allelogram.err» en donde se listan los alelos que quedaron afuera del punto de corte que se asignó (Apéndice J). El punto de corte es la variabilidad que se va a permitir alrededor de cada valor de la media de tamaños del grupo de alelos que caen dentro de un

determinado *bin* (media +/- punto de corte). Para cada pareja de iniciadores se seleccionó el punto de corte para el cual presenten error el menor número de muestras posibles (Cuadro 6). También se generó un archivo de salida, «binstats.out», con los datos estadísticos para cada marcador (Apéndice K), y un archivo de gráficas, por cada alelo, por marcador, que proporciona únicamente una idea visual de la frecuencia acumulada de los datos que se están evaluando (Apéndice L).

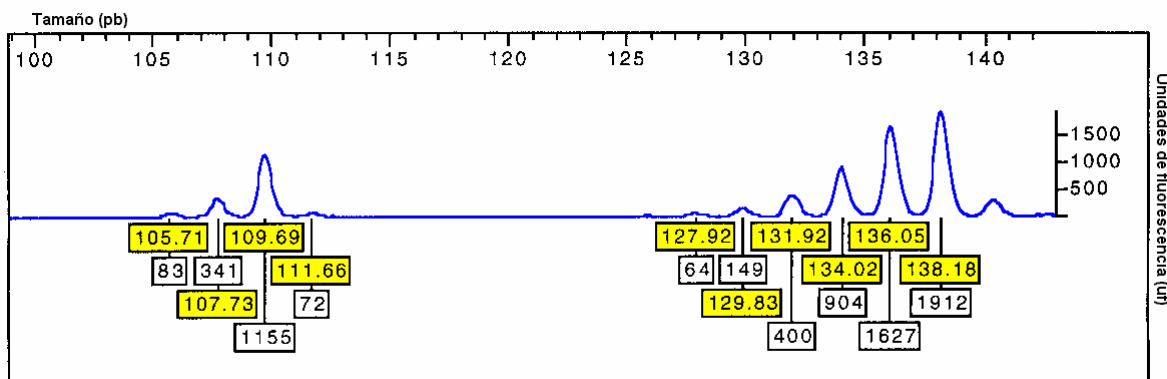


Figura 16. Electroferograma de microsatélite Aa2-25. Producto de PCR de *Anopheles albimanus* amplificado con el microsatélite Aa2-25 marcado con 6-FAM. En los rectángulos amarillos se muestra el tamaño del alelo, tanto de los alelos reales (en el primer grupo 109.69, y en el segundo grupo 138.18pb), así como de los picos no esperados (105.71, 107.73, 111.66, 127.92, 129.83, 131.92, 134.02 y 136.05 pb). En los rectángulos blancos se muestra la altura de cada pico que es indicador de la señal de fluorescencia (83, 341, 72, 1155, 64, 149, 400, 904, 1627 y 1912 uf).

Microsatélite	Punto de corte (pb)
NP76consA	0.25
NP38F	0.25
Aa2-25	0.25
NP94F	0.30
NP113F	0.40
NP128F	0.40
NP81R	0.50

Cuadro 6. Punto de corte utilizado para definir los grupos de alelos que pertenecen a cada microsatélite

H. Análisis genético de las secuencias microsatélites. Con los resultados anteriores se determinó cuales de las 11 secuencias microsatélites son útiles como marcadores moleculares

para futuros estudios poblacionales. Los parámetros de diversidad genética para cada locus se establecieron utilizando el programa Genetic Analysis in Excel (GenAlEx) versión 5.04 para PC abril 2002 proporcionado por la Universidad Nacional de Australia y disponible en línea: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.

Con las secuencias microsatélites NP38F, NP113F y Aa2-25 se calcularon los siguientes parámetros, utilizando el programa GenAlEx:

1. Frecuencia alélica,

$$P_i = \frac{2N_{xx} + N_{xy}}{2N}$$

donde,  $N_{xx}$  = número de genotipos homocigotos

$N_{xy}$  = número de genotipos heterocigotos

$N$  = número de muestras (Hartl and Clark, 1997)

2. Número de alelos,  $N_a$ , el cual se determina por conteo directo.
3. Heterocigosidad observada,

$$H_o = \frac{H}{N}$$

donde,  $H$  = número de heterocigotos determinado por conteo directo

$N$  = número de muestras (Hartl and Clark, 1997)

4. Heterocigotos esperados, o diversidad genética,

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

donde,  $p_i$  = frecuencia del alelo  $i$ th (Hartl and Clark, 1997)

5. Índice de fijación,

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e} = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

donde,  $H_e$  = heterocigosidad esperada

$H_o$  = heterocigosidad observada

(Hartl and Clark, 1997)

6. Número efectivo de alelos,

$$N_e = \frac{1}{1 - H_e}$$

donde,  $H_e$  = heterocigosidad esperada

(Hartl and Clark, 1997)

Estas cuantificaciones se calcularon primero tomando las 15 comunidades como una sola población, luego agrupando las comunidades en 4 poblaciones o grupos (Cuadro 7, FGigura 10), y por último se hizo el análisis comparando las comunidades dentro de cada grupo para analizar la variabilidad genética de los loci en una escala microgeográfica.

Número de grupo	Comunidades	Número de mosquitos
1	Cari	2
	El Quetzal	22
	Lorena	6
	San Alfonso	16
	Santa Rosa	13
	Total	59
2	El Afán	8
	Horizontes	10
	Margaritas II	14
	Santa Ana	8
	Total	40
3	Carolina	9
	El Peñón	13
	Esija	3
	Punto Chico	15
	Total	40

Número de grupo	Comunidades	Número de mosquitos
4	Monterrey	9
	Sonora	15
	Total	24

Cuadro 7. Número de mosquitos capturados por grupo y por comunidad en el municipio de Ixcán, Quiché.

Los grupos se definieron como las comunidades más cercanas que se encontraban en un radio de 9 kms. Las colectas se realizaron por el método de captura con cebo humano.

Para establecer si los grupos de comunidades se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg, se calcularon los siguientes parámetros, utilizando el programa PopGene versión 1.31:

1. Prueba de  $\chi^2$ :

$$X^2 = \sum \frac{(\text{obs} - \text{exp})^2}{\text{Exp}}$$

La prueba de  $\chi^2$  se calcula para obtener una probabilidad, P, con la cual se pueda decidir si el modelo de Hardy-Weinberg es válido para los datos en estudio. Si  $P > 0.05$ , la población está en equilibrio Hardy-Weinberg. Si  $P < 0.05$ , la población no está en equilibrio Hardy-Weinberg.

(Hartl and Clark, 1997)

Para establecer si los cuatro grupos eran similares entre sí, se calculó la identidad y distancia genética de Nei *unbiased*, utilizando el programa PopGene:

1. Identidad genética de Nei:

$$I = \frac{\bar{I}_{ab}}{\sqrt{I_a \times I_b}}$$

donde  $I_{ab}$ ,  $I_a$ ,  $I_b$  son los promedios aritméticos sobre todos los locus de  $\sum a_{bi}$ ,  $\sum a_i^2$  y  $\sum b_i^2$

(Tabashnik and Black, 1996)

2. Distancia genética de Nei:

$$D = - (2N - 1) \ln I$$

donde, I = identidad genética de Nei

N = tamaño de la muestra

(Tabashnik and Black, 1996)

Para saber si existe flujo de genes entre los cuatro grupos definidos en la región de Ixcán, y dentro de ellos, se calcularon los siguientes parámetros, utilizando el programa PopGene:

#### 1. Índice de fijación total

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

donde,  $H_T$  = heterocigosidad entre organismos dentro del área total

$H_S$  = heterocigosidad entre organismos dentro de subpoblaciones

(Hartl and Clark, 1997)

#### 2. Flujo de genes

$$Nm = \frac{0.25 (1 - F_{ST})}{F_{ST}}$$

donde,  $F_{ST}$  = índice de fijación total

(Hartl and Clark, 1997)