

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DEL MOSQUITO
Aedes Aegypti EN MÉXICO, AMÉRICA CENTRAL Y EL CARIBE

María Reneé López Bolaños

Guatemala

2005

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DEL MOSQUITO *Aedes*
Aegypti EN MÉXICO, AMÉRICA CENTRAL Y EL CARIBE

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Bioquímica y Microbiología

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DEL MOSQUITO *Aedes*
Aegypti EN MÉXICO, AMÉRICA CENTRAL Y EL CARIBE

Trabajo de investigación presentado por María Reneé López Bolaños para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica

Guatemala

2005

CUADRO DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE GRÁFICAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
A. Dengue	2
1. Descripción y patología	
a. Fiebre del dengue clásico	3
b. Fiebre del dengue hemorrágico	3
c. Síndrome de choque del dengue	4
2. Ciclo de transmisión de la enfermedad	4
a. Virus	5
b. Vector	6
1) <i>Aedes aegypti</i>	6
2) <i>Aedes albopictus</i>	12
c. Hospedero	13
B. Epidemiología y control del dengue	13
1. Distribución geográfica	14
a. Región centroamericana	17
1) Guatemala	18
2. Factores de riesgo determinantes de la transmisión del dengue	19
a. Macrofactores	19
b. Microfactores	20
3. Estrategias de control y prevención del dengue	21
a. Control del vector	22
1) Control físico	22
2) Control químico	24
3) Control biológico	25
4) Control genético	26

5) Métodos de control en Guatemala	26
C. Genética de poblaciones	26
1. Poblaciones naturales	27
2. Variación genética	27
a. Equilibrio Hardy-Weinberg	27
b. Factores que influyen la variación genética	27
1) Apareamiento	28
2) Tamaño de la población	28
3) Migración	28
4) Mutación	28
5) Selección	28
c. Métodos moleculares utilizados para el estudio de variaciones genéticas	28
1) Polimorfismo en la conformación de banda simple	29
d. Variaciones en el ADN mitocondrial	29
e. Medición de la variación genética	30
1) Estadística F de Wright	30
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	33
A. Objetivos	33
1. Generales	33
2. Específicos	33
B. Hipótesis	33
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	34
A. Colecta de mosquitos	34
B. Extracción de ADN	34
C. Amplificación de ADN	34
D. Electroforesis en gel de agarosa	37
E. Electroforesis en gel de poliacrilamida	37
1. Preparación del sistema	37
2. Preparación del gel	37
3. Montaje del gel	38
4. Tinción del gel	38
5. Lectura del gel	38
F. Purificación de producto de PCR	39

G. Análisis de datos	39
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
A. Frecuencias de haplotipos de ADN mitocondrial	40
B. Análisis estadístico AMOVA	43
C. Análisis filogenético	49
VI. CONCLUSIONES	50
VII. RECOMENDACIONES	51
VIII. FUENTES CITADAS	52
APÉNDICES	55
A. Glosario	56
B. Secuencias de los haplotipos encontrados	58
C. Ejemplos de geles SSCP después de tinción con nitrato de plata	59
D. Tablas de números de casos reportados de dengue y DH en América y el Caribe, por ciudad.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Manifestaciones del síndrome del dengue	2
2. Genoma y proteínas del virus del dengue	6
3. Mosquito <i>Aedes aegypti</i> adulto	7
4. Diseminación del virus del dengue en el vector <i>Aedes aegypti</i>	8
5. Diseminación de la infección por el virus del dengue en el hospedero	9
6. Ciclo de vida del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	10
7. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	11
8. Mosquito <i>Aedes albopictus</i>	13
9. Distribución de <i>Aedes aegypti</i> en América; años 1970-1997	16
10. Países americanos con casos confirmados de dengue hemorrágico; años 1981-1997	18
11. Sitios de colecta de mosquitos en México, Centro América y el Caribe	36
12. Flujo genético entre las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i>	48
12. Relación filogenética entre los haplotipos ND4	49

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Reporte de la circulación de múltiples serotipos del dengue en América	15
2. Macrofactores de riesgo determinantes de la transmisión del dengue	20
3. Microfactores de riesgo determinantes de la transmisión del dengue	21
4. Insecticidas seleccionados para usar en forma de niebla fría, contra <i>Aedes aegypti</i> .	25
5. Métodos utilizados para determinar variaciones genéticas en una población natural	29
6. Regiones de colecta de <i>Aedes aegypti</i> y número de individuos trabajados	35
7. Distribución de los grupos analizados por AMOVA para poblaciones de México y Centroamérica.	44
8. Análisis de varianza AMOVA para las poblaciones de México y Centroamérica	44
9. Índice de fijación Wright para las poblaciones de México y Centroamérica	44
10. Distribución de los grupos analizados por AMOVA para poblaciones de Cuba y República Dominicana.	45
11. Análisis de varianza AMOVA para las poblaciones de Cuba y República Dominicana.	45
12. Índices de fijación de Wright para las poblaciones de Cuba y República Dominicana	45
13. Distribución de los grupos analizados por AMOVA para poblaciones de Centroamérica, Chiapas y El Caribe.	46
14. Análisis de varianza AMOVA entre las poblaciones de México, Centroamérica y el Caribe.	46
15. Índices de fijación de Wright para las poblaciones de México, Centroamérica y el Caribe	46

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Frecuencias de los haplotipos ND4 de <i>Aedes aegypti</i> agrupados por país	40
2. Comparación de las frecuencias de haplotipos ND4 agrupados por ciudad	41
3. Comparación de las frecuencias de haplotipos ND4 entre las ciudades de Guatemala, El Salvador, Nicaragua y México	42
4. Frecuencias de haplotipos ND4 entre las ciudades de Cuba y República Dominicana	42
5. Número de haplotipos encontrados en cada país	43

RESUMEN

Se realizó un estudio de genética de poblaciones del mosquito *Aedes aegypti*, para los países de Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Panamá, México, Cuba y República Dominicana. Se utilizó una región de la subunidad 4 del gen de NADH deshidrogenasa (ADN mitocondrial) como marcador molecular para poder determinar si existe flujo genético o si hay aislamiento reproductivo entre las poblaciones estudiadas.

El ADN de los mosquitos fue extraído y amplificado por medio de la reacción en cadena de las polimerasa. Para determinar los diferentes haplotipos presentes en las poblaciones se utilizó la técnica de SSCP (single strand conformational polimorfism).

Se encontraron siete diferentes haplotipos y se determinaron las frecuencias de éstos. El análisis de frecuencias detectó muy poca variación de poblaciones entre países centroamericanos pero las poblaciones del Caribe si mostraron diferencias con las poblaciones de Centroamérica. Además, también se pudo detectar diferencias genéticas entre las poblaciones Cuba y República Dominicana.

Para verificar los resultados obtenidos con las frecuencias de los haplotipos se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA) para determinar si existe correlación entre distancia genética y distancia geográfica. Por medio de este análisis no se detectó ninguna correlación en los países centroamericanos pero si detectó una pequeña distancia genética entre las poblaciones de Cuba y República Dominicana. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos con el análisis de frecuencias y sugieren que el mar Caribe podría estar sirviendo de barrera geográfica debido a las diferencias genéticas encontradas entre las poblaciones de Cuba y República Dominicana.

Finalmente se realizó un análisis filogenético, el cual mostró poca diferenciación entre haplotipos. Este análisis sugiere la presencia de dos haplotipos ancestrales (H1 y H2), los cuales son los más frecuentes en Centroamérica y dos haplotipos recientes (H6 y H7) que son los menos frecuentes en República Dominicana.

El mosquito *Aedes aegypti* en Centroamérica parece ser genéticamente similar al del sur de México pero levemente diferente al encontrado en el Caribe.

I. INTRODUCCIÓN

El mosquito hematófago del género *Aedes* y de la especie *aegypti* es el vector primario responsable de la transmisión del dengue y de la fiebre amarilla. Antes de la Segunda Guerra Mundial el dengue se había mantenido como una enfermedad endémica en algunos países del sudeste asiático, pero después de 1944 se propagó a otras regiones del mundo, incluyendo América. El mosquito vector se encuentra en regiones tropicales y sub-tropicales, principalmente en islas del Pacífico, El Caribe, América Central, gran parte de Sudamérica, México y el sur de los Estados Unidos (USAC 1994).

A medida que se deterioraron las campañas de erradicación de *Aedes aegypti* durante las décadas de 1970 y 1980, este mosquito proliferó y se propagó por casi todos los rincones de América. En los años ochenta, Bolivia, Brasil, Ecuador, Paraguay y Perú, cinco países sin dengue durante muchas décadas, o que nunca lo habían registrado, sufrieron brotes explosivos. Además, Costa Rica y Panamá, únicos países tropicales en América Latina que no habían tenido dengue, notificaron en 1993 la transmisión de la enfermedad (OPS 1995).

La transmisión y la persistencia del dengue dependen en gran parte del vector, por lo tanto es necesario estudiar al mosquito con el objeto de conocer y comprender su importancia en la epidemiología de la enfermedad.

La genética de poblaciones permite estudiar variación genética dentro de una población y entre poblaciones de una misma especie de vector para poder comprender mejor la transmisión y control de la enfermedad. De este modo los estudios de genética de poblaciones brindan la oportunidad de desarrollar estrategias de control más efectivas (Black *et-al.* 1996).

Este trabajo consiste en un estudio de genética de poblaciones del mosquito *Aedes aegypti*. Se compararon regiones de América Central, México, Cuba y República Dominicana utilizando como marcador ADN mitocondrial, para determinar si existe flujo genético o si hay aislamiento reproductivo.

II. ANTECEDENTES

A. Dengue

1. Descripción y patología. El dengue es una infección viral, aguda y sistemática, que se transmite de un hospedero a otro por medio de un mosquito **hematófago** del género *Aedes*; propia de los trópicos y subtropicos. A esta enfermedad se le conoce como fiebre dengue, dengüero, fiebre “bouquet”, fiebre quebrantahuesos, fiebre “polka”, fiebre de cinco días y fiebre “dandy”. La palabra dengue es de origen hispanoantillano; se comenzó a emplear para designar los brotes ocurridos en las islas del Caribe entre 1827 y 1828 (USAC 1994).

La complicación del dengue, por mecanismos inmunológicos, da origen al dengue hemorrágico (Muñiz *et al.* 1998). A continuación se describen las diferentes formas en que se presenta esta enfermedad. Ver figura 1.

Figura 1
Manifestaciones del síndrome del dengue
(OPS 1995)

a. Fiebre del dengue clásico. El dengue clásico es una enfermedad que afecta a niños y adultos. Los síntomas varían según la edad y el estado general del paciente. En lactantes y niños puede presentarse un cuadro difícil de distinguir de la gripe, sarampión, hepatitis y otras enfermedades febriles. La fiebre del dengue clásico, es una **enfermedad bifásica** de inicio abrupto, 3-8 días después de haber sido picado por un mosquito infectado; se caracteriza por fiebre alta, dolor de cabeza, dolor detrás de los ojos, dolores musculares y articulares y dolor de huesos. Después de una mejoría por varios días, reaparece la fiebre, se desarrolla una erupción tipo sarampión, **linfadenopatía** generalizada, y, algunas veces se presentan fenómenos hemorrágicos menores. Esta forma de dengue no es mortal y desaparece en dos semanas, aunque algunos pacientes pueden experimentar una convalecencia prolongada, con debilidad y depresión. (Monath 1994).

El dengue en su forma clásica presenta altas tasas de morbilidad pero bajas tasas de mortalidad (USAC 1994).

b. Fiebre del dengue hemorrágico. Es una forma grave del dengue en la que se presentan hemorragias y estado de choque que puede llevar a la muerte (Lechuga *et al.* 1998). Los casos típicos del dengue hemorrágico, DH, se caracterizan por cuatro manifestaciones clínicas fundamentales: fiebre alta, fenómenos hemorrágicos, **hepatomegalia** y a menudo, insuficiencia circulatoria. El cambio fisiológico principal que determina la gravedad de la enfermedad en el DH, y lo distingue del dengue clásico, es la **extravasación de plasma**, puesta de manifiesto por un incremento del **hematocrito** y una **hemoconcentración** ascendente (OPS 1995).

El dengue hemorrágico suele comenzar con un aumento de la temperatura, que viene acompañado por rubor facial y otros síntomas no específicos que se asemejan al dengue clásico, como anorexia, vómitos, cefalea y dolores musculares o de articulaciones. La temperatura es típicamente alta durante 2 a 7 días y luego baja a un nivel normal o sub-normal. La manifestación hemorrágica más común es una **prueba de torniquete** positiva; en la mayoría de los casos se encuentran moretones y hemorragias en los sitios de **venipuntura**. En ocasiones se produce una hemorragia gastrointestinal leve. Es mortal si los pacientes no se recuperan espontáneamente o después de recibir líquidos y electrolitos (OPS 1995).

La gravedad del dengue hemorrágico se clasifica en cuatro grados. El grado I presenta fiebre acompañada de síntomas generales no específicos; la única manifestación hemorrágica es una prueba de torniquete positiva. El grado II está caracterizado por hemorragia, además de las manifestaciones de los pacientes de grado I, generalmente en forma de hemorragia cutánea, de otra localización o ambas. En el grado III se presenta insuficiencia circulatoria, que se manifiesta por pulso acelerado y débil, presión diferencial disminuida o hipotensión con piel fría húmeda y agitación. El grado IV presenta un choque profundo con presión arterial y pulso imperceptibles (OPS 1995).

El dengue en su forma hemorrágica causa mayor mortalidad (USAC 1994).

c. Síndrome de choque del dengue. En casos graves, el estado del paciente con dengue hemorrágico se deteriora en forma súbita luego de una fiebre de pocos días de duración. En el momento en que baja la temperatura o poco más tarde, entre 3 y 7 días después del inicio, aparecen los signos de insuficiencia circulatoria: la piel se torna fría, a menudo se observa **cianosis circunoral** y el pulso se debilita y acelera. Aunque algunos pacientes pueden parecer aletargados, se vuelven inquietos y luego entran rápidamente en una etapa crítica de choque. El dolor abdominal agudo es una molestia frecuente poco antes de sobrevenir el choque (OPS 1995).

El choque se caracteriza por un pulso acelerado y débil con reducción de la presión arterial o hipotensión, con piel fría, húmeda y agitación. Los pacientes en choque están en peligro de muerte si no se administra en seguida el tratamiento de reposición de líquidos apropiado. Pueden pasar a una etapa de choque profundo, haciéndose imperceptibles la presión arterial y el pulso. La duración del choque es corta; el paciente puede morir en 12-24 horas o recuperarse con rapidez. La convalecencia en el DH con o sin choque es corta y sin incidentes. Aún en casos de choque profundo, una vez que éste desaparece, los pacientes que sobreviven se recuperan en 2 a 3 días (OPS 1995).

En general, el choque se ha observado con menor frecuencia entre los adultos que entre los niños, pero cuando se presenta en el adulto, es más serio y generalmente lleva a la muerte (USAC 1994).

La presencia de una infección parasitaria o bacteriana, junto a una infección secundaria del dengue, puede incrementar el riesgo de desarrollo de síntomas severos (USAC 1994).

2. Ciclo de transmisión de la enfermedad. La enfermedad se propaga por la picadura de la hembra de *Aedes aegypti* infectada, que ha adquirido el virus al ingerir la sangre de una persona con dengue (Lechuga *et al.*, 1998). Una vez infectado, el mosquito sigue siendo portador del virus el resto de su vida, transmitiendo la enfermedad a individuos susceptibles, al alimentarse. (WHO, 1999). Existe la posibilidad de que los mosquitos hembras infectados pasen el virus a la siguiente generación de mosquitos por transmisión **transovárica**, pero no hay evidencia que tenga una incidencia importante en la transmisión (WHO 1997).

Los humanos son el hospedero principal del virus, aunque algunos estudios han demostrado que los monos en algunas partes del mundo pueden infectarse y posiblemente servir como fuente de virus en la alimentación de mosquitos. Durante el tiempo en que se presenta la fiebre, es cuando aproximadamente el virus está circulando en la sangre de personas infectadas, y mosquitos que no están infectados pueden adquirir

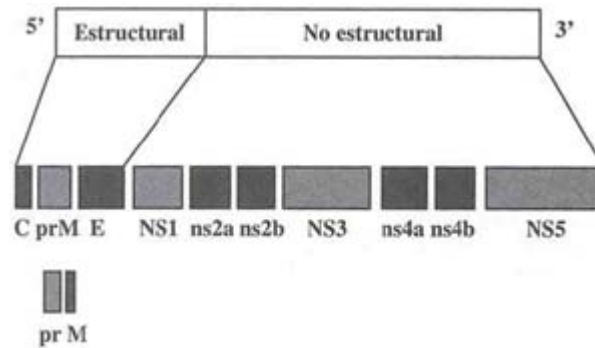
el virus si se alimentan de estas personas. El virus se desarrolla en el mosquito por un período de 8 – 10 días antes de que pueda ser transmitido a otros humanos. El tiempo requerido para esta incubación extrínseca depende en parte de condiciones ambientales, en especial de la temperatura ambiental (WHO 1997).

Los mosquitos transmisores tienen comprobada limitación del rango de vuelo, entre 100 y 500 metros, por lo que la distribución viral la hacen las personas portadoras que visitan las residencias donde hay abundancia de mosquitos caseros que al infectarse afectan a todos los habitantes, inclusive de las casas vecinas; el crecimiento concéntrico del brote se extiende en acción combinada de reservorios humanos y de mosquitos infectados. Esto explica la razón por la que la infestación de *Aedes aegypti* y la infección del dengue sean características de poblaciones urbanas o semi-urbanas (USAC 1994).

a. Virus. El virus que produce el dengue es conocido como virus de Dengue; pertenece al grupo de los arbovirus, género *Flavivirus*, familia Flaviviridae (Gubler 1998). Existen cuatro serotipos del virus del dengue, denominados DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4, que pueden ser reconocidos por métodos serológicos. Un “serotipo” se refiere a las variantes del virus según lo determinado por métodos serológicos (Luft 1996). El virus del dengue posee un genoma compuesto de ARN simple hebra positivo rodeado por una nucleocápside icosaedra y con una cubierta de lípidos con glicoproteínas. Los viriones son esféricos, con un diámetro de 40-50 nm. El genoma de este flavovirus tiene aproximadamente 11,000 bases de largo; está compuesto por tres genes que codifican a proteínas estructurales: el que codifica la proteína de nucleocápside o “core protein”, C, una proteína asociada a la membrana, M, una proteína de envoltura, E, y siete genes de proteínas no estructurales, NS. El orden de las proteínas codificadas es 5' –C- prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (WHO, 1999). Se cree que NS3 y NS5 forman el complejo de ARN polimerasa dependiente de ARN, donde el NS5 tiene una actividad de replicasa y NS3 posee la actividad de helicasa y proteasa. Ver figura 2 (White *et al.* 1994).

Los flavovirus entran a la célula vía endocitosis mediada por receptores. La cubierta se funde con la membrana del endosoma al acidificarse el medio de la vesícula para que la cápside y el genoma sean introducidos al citoplasma (Murray *et al.* 1992). La replicación se lleva a cabo en el citoplasma y es acompañada por la proliferación en el retículo endoplásmico. El ARN genómico sirve directamente como mensajero, por medio de la cual se sintetiza una banda complementaria menor, la cual sirve como patrón para la síntesis de otras moléculas virales. Después de sintetizar nuevas moléculas virales, se liberan por gemación y por lisis celular. La gemación de los virus se produce fundamentalmente a nivel de membranas intracelulares hacia el citoplasma o hacia vesículas. Estos virus pueden liberarse por exocitosis, pero el método más eficaz para ello implica la lisis celular (Murray *et al.* 1992).

Figura 2
Genoma y proteínas del virus del dengue
(Modificado de White *et al.* 1994)



La infección del hombre por un serotipo produce inmunidad para toda la vida contra la reinfección con ese serotipo, pero sólo protección parcial y temporal contra los otros (OPS, 1995). En general, el serotipo del virus DEN-2 se ha asociado con la fiebre hemorrágica después de una infección previa con DEN-1, DEN-3 o DEN-4 (Beaty and Marquardt 1996).

b. Vector. El principal vector del dengue es el mosquito *Aedes aegypti*. Es un mosquito que se originó probablemente en África y después fue transportado a América por el tráfico marítimo. En un tiempo se le llamó “el mosquito de los puertos”, pero su fácil adaptabilidad al medio y la abundancia de formas de transportación propiciaron su gran difusión. El primero en hablar de la transmisión del dengue por *Aedes aegypti* fue Bancroft en 1906 (USAC 1994). Otro mosquito, *Aedes albopictus*, un vector urbano menos importante, ha ayudado a mantener la prevalencia del dengue en las regiones asiáticas (Luft 1996).

1) *Aedes aegypti*. *Aedes aegypti* es el vector más importante del dengue (Luft 1996). La difusión del dengue en el mundo se puede atribuir directamente a la proliferación y adaptación de este mosquito (Luft 1996). Desde el punto de vista taxonómico, este mosquito se clasifica así: *Phylum Arthropoda*, Clase *insecta*, Orden *díptera*, Familia *Culicidae*, Subfamilia *Culicinae*, Género *Aedes*, Subgénero *Estegonia* y Especie *aegypti* (USAC 1994).

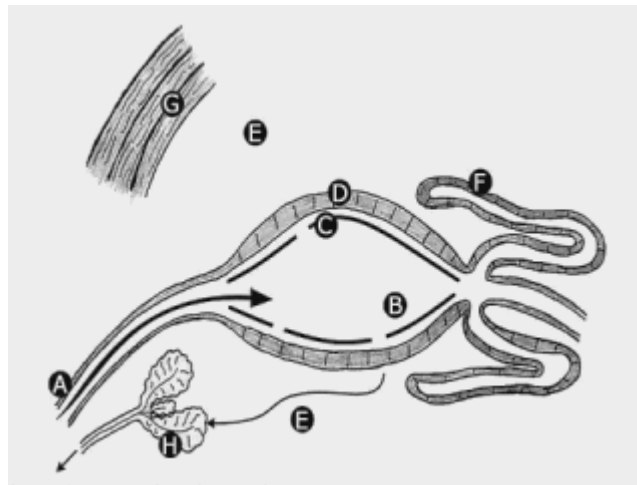
El *Aedes aegypti* se originó probablemente en África, donde existen formas selváticas y domésticas, y después fue transportado a América donde sólo se encuentran las formas domésticas (OPS 1995). *Aedes aegypti* es una especie tropical y subtropical, por lo general limitada a las latitudes comprendidas entre 35° norte y 35° sur, correspondientes a una isoterma de invierno de 10°C. Aunque se ha observado hasta los 45° de latitud norte, estas invasiones ocurren durante la estación cálida y los insectos no sobreviven el invierno (OPS 1995). El *Aedes aegypti* es un mosquito esencialmente doméstico que se reproduce, casi exclusivamente, en el agua contenida en recipientes artificiales depositados cerca o en el interior de las habitaciones humanas. Su éxito se debe a la asociación que mantiene con el hombre quien le brinda alimentación, los recipientes para su desarrollo larvario y su propia sangre para su reproducción (USAC 1994).

Sólo las hembras de los mosquitos son las que succionan sangre porque la necesitan para desarrollar sus huevecillos y perpetuar su especie. El aparato bucal del macho no está capacitado para perforar la piel animal (ver Figura 3) ni tiene necesidad de ella. En la Figura 3, se observa un mosquito adulto, que se reconoce porque es un picador diurno; sobre el dorso negro del tórax lleva un dibujo en forma de lira plateada con dos líneas paralelas medias y dos líneas curvas, más anchas a cada lado. Sus **palpos** son blancos y las patas anilladas. También en los laterales del abdomen hay manchas plateadas sobre las escamas negras (USAC 1994).

Figura 3
Mosquito *Aedes aegypti* adulto
(USAC 1994)

Cuando un mosquito se alimenta de sangre virémica, el virus encuentra varias barreras para la infección. El virus infecta las células epiteliales del intestino medio del mosquito, se **disemina** a través de la lámina basal hacia la circulación y termina por infectar las glándulas salivales. El virus establece una infección persistente y se replica en grandes cantidades en estas células. Posteriormente las glándulas lo secretan a la saliva. (Ver Figura 4)

Figura 4
Diseminación del virus del dengue en el vector *Aedes aegypti*
(Earl, P. 2,003)



Sistema digestivo de la hembra *Aedes aegypti*: A) ingreso de la sangre, B)intestino, C)matriz peritrófica, D) epitelio del intestino, E) virus viaja hacia las glándulas salivales, F)tubulos malfigianos, G) músculo torácico y H)glándulas salivales.

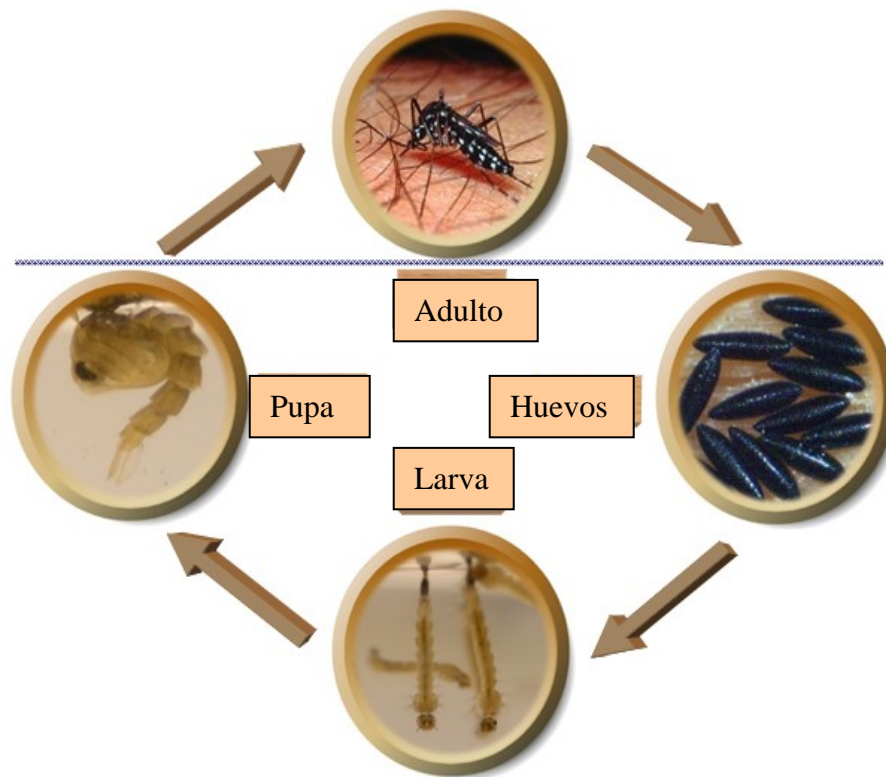
Tras picar al hospedero, la hembra del mosquito introduce su saliva llena de virus hacia la sangre de su víctima. El virus circula en forma libre por el plasma y entra en contacto con las células diana susceptibles, como las células endoteliales de los capilares, los macrófagos, los monocitos y el resto del sistema reticuloendotelial, ver Figura 5 (Murray *et al.* 1992).

Figura 5
Diseminación de la infección por el virus del dengue en el hospedero
(Murray *et al.* 1992).

El mosquito pica de preferencia en las primeras horas de la mañana y al final de la tarde. La hembra se alimenta, sobre todo, de sangre humana o de animales domésticos. Debido a su estrecha relación con el hombre, *Aedes aegypti* es un mosquito urbano. Al parecer invade las áreas rurales en forma de huevos o larvas.

En la figura 6 se puede observar el ciclo de vida de este mosquito (Lechuga *et al.* 1998).

Figura 6
Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*
(Granthan 2004)



Los huevos de *Aedes aegypti* se adhieren individualmente a la superficie interna de los recipientes en la parte húmeda, apenas por encima del nivel del agua. El desarrollo embrionario normal se completa en 48 horas, cuando el ambiente es húmedo y cálido. Una vez que el desarrollo embrionario se completa, los huevos pueden resistir largos periodos de sequedad, a veces durante mas de un año. Cuando se vuelve a mojar, la mayoría de ellos eclosionan rápidamente, aunque algunos pueden no responder hasta que el agua los cubra varias veces. La capacidad de los huevos para resistir la sequedad ha sido uno de los mayores obstáculos en la erradicación de *Aedes aegypti*, ya que pueden ser trasladados grandes distancias en recipientes que ya no contienen líquido (OPS 1995).

Las larvas pasan por cuatro estadios de desarrollo. La duración del desarrollo depende de la temperatura, la disponibilidad del alimento y la densidad larvaria del receptáculo. En condiciones óptimas, el intervalo desde la eclosión hasta la pupación puede ser de tan sólo 5 días; cuando las temperaturas son extremadamente bajas o escasean los alimentos, pueden tomar varias semanas. Cerca de uno o dos días después de su aparición, los mosquitos se aparean y las hembras se alimentan de sangre. La ingestión de sangre proporciona una fuente de proteína para el desarrollo de los huevos (OPS 1995). Por lo general, se desarrolla un lote de huevos después de cada ingestión de sangre. Sin embargo, *Aedes aegypti*, más que otras especies de mosquitos, se alimenta con frecuencia más de una vez entre cada ovipostura. Esta particularidad aumenta las probabilidades de que el mosquito ingiera y transmita el virus. El intervalo entre la ingestión de sangre y la ovipostura puede ser de sólo 3 días, en condiciones óptimas de temperatura y disponibilidad de hospederos; además la hembra puede volver a alimentarse el mismo día de la puesta (Beaty and Marquardt 1996). Para sus huevos, la hembra prefiere el agua relativamente limpia, clara, incolora, al agua turbia, contaminada y de alto contenido orgánico. La hembra suele distribuir cada lote de huevos entre varios recipientes (OPS 1995).

El alcance de vuelo de *Aedes aegypti* es muy limitado (100m) cuando se le compara con la de otras especies de mosquitos. La hembra pasa a menudo toda su vida cerca del sitio donde ha nacido, siempre y cuando disponga de hospederos, lugares de reposo y sitios para la ovipostura. La mayor cobertura de *Aedes aegypti* a grandes distancias ocurre cuando los huevos y larvas son transportados en recipientes. Cuando no están apareándose o procurándose un hospedero, los mosquitos buscan lugares oscuros y tranquilos para reposar (OPS 1995).

Se ha encontrado que poblaciones de *Aedes aegypti* de diferentes regiones geográficas presentan diferencias genéticas significativas. (Tabachnick y Powell 1979). La variación en la competencia vectorial entre poblaciones de *Aedes aegypti* también ha sido demostrada, sugiriendo la existencia de heterogenicidad en las características controladas genéticamente que afectan su habilidad para transmitir la infección. Tanto la eficiencia de la transmisión como el vector dependen del origen geográfico de la población (Tardieux *et al.* 1990)

Figura 7
Mosquito *Aedes aegypti*
(Munstermann, E.1995)



2) *Aedes albopictus*. *Aedes albopictus*, también llamado “mosquito tigre asiático”, ver Figura 8, es un pariente cercano de *Aedes aegypti*, pues pertenece al mismo subgénero *Stegomyia* y tiene muchos de sus hábitos. Este mosquito está ampliamente distribuido por Asia y el pacífico, desde las regiones templadas hasta los trópicos. Aunque ya en 1946 se identificaron y erradicaron varias penetraciones aisladas dentro del territorio continental de los Estados Unidos, no fue sino hasta 1985 cuando se descubrió que esta especie se hallaba bien establecida en Texas; posteriormente se le ha encontrado en muchos otros estados de ese país. Desde 1986, se ha encontrado *Aedes albopictus* en cinco estados brasileños. En 1993, se encontró en Santo Domingo y algunos estados de la frontera norte de México estaban infectados con este mosquito (OPS 1995).

Aedes albopictus es una especie propia de los límites de los bosques, que se ha adaptado a los ambientes rurales, suburbanos y urbanos; deposita sus huevos y se desarrolla en los agujeros de los árboles, en los tocones de bambú y en las axilas de hojas en el campo y en recipientes artificiales en las zonas urbanas. El *Aedes albopictus* es mucho menos doméstico que *Aedes aegypti*; se alimenta y deposita sus huevos al aire libre en el ambiente peridoméstico o lejos de las viviendas humanas. Este mosquito es un hematófago indiscriminado, y a diferencia de *Aedes aegypti*, pica preferentemente a los animales antes que al hombre. Su alcance de vuelo parece ser algo mayor que el de *Aedes aegypti*, pues llega fácilmente a los 500 metros. Al contrario de *Aedes aegypti*, es una especie adaptada al frío, y los huevos pasan al invierno en estado de letargo (OPS 1995).

En las zonas donde *Aedes albopictus* se ha establecido en Estados Unidos, se ha observado una tendencia al descenso o a la desaparición total de la población de *Aedes aegypti*, al parecer debida a la competencia de las larvas por los alimentos o a la de los machos adultos por aparearse con la hembras. En el laboratorio, la hembra *Aedes aegypti* inseminada por *Aedes albopictus* pone huevos infértiles y viceversa. Todavía hay una extensa polémica en torno a la ocurrencia y el mecanismo de este fenómeno de “desplazamiento competitivo entre especies” (OPS 1995).

En el Pacífico se ha demostrado que *Aedes albopictus* es un vector del dengue, aunque segundo en importancia después de *Aedes aegypti*. En el Brasil, aunque *Aedes albopictus* existe en las zonas con dengue endémico, también está presente *Aedes aegypti*. En el laboratorio se ha demostrado que ambas especies transmiten verticalmente (transováricamente) el virus del dengue, aunque *Aedes albopictus* lo hace con más facilidad (OPS 1995).

Figura 8
 Mosquito *Aedes albopictus*
 (Washington post, 1999)



c. Hospedero. Además de ser el hombre el único **reservorio** urbano del virus, también ha sido aislado de los monos que se infectan naturalmente, los cuales juegan un papel muy importante en la transmisión selvática (Muñiz *et al.* 1998)

En los humanos, cada uno de los cuatro serotipos del virus del dengue se han asociado con el dengue y el dengue hemorrágico. Estudios en Cuba y Tailandia han demostrado una alta relación entre la infección con DEN-2 y DH/SCD. Pero en los brotes de México en 1984, de Puerto Rico en 1986 y de El Salvador en 1989 se aisló el serotipo DEN-4 de pacientes con DH. El síndrome de choque del dengue ocurre con mayor frecuencia en dos grupos definidos inmunológicamente: niños que han experimentado una infección previa de dengue, e infantes con una disminución de anticuerpos maternos de dengue. Después de un período de incubación de 3-14 días, la fase aguda de la infección dura aproximadamente de 5-7 días y es seguida por una respuesta inmune. La transmisión del virus del dengue de una persona infectada a un mosquito que se alimenta está determinada por la magnitud y duración de la viremia en el hospedero humano; personas con viremia alta proveen una dosis mayor de virus al mosquito que se está alimentando, lo que normalmente conlleva a que un mayor número de mosquitos que se están alimentando se infecten, aunque también niveles muy bajos de virus en la sangre pueden ser infecciosos para algunos mosquitos (WHO 1997).

B. Epidemiología y control del dengue.

Desde hace más de 200 años se han venido notificando enfermedades como la del dengue en América. Hasta la década de 1960, casi todos los brotes de la enfermedad se han producido a intervalos de uno o mas decenios, aunque posteriormente los espacios se han acortado (OPS, 1995). La amplia distribución que ha logrado obtener el virus del dengue y su alta morbilidad, especialmente en lo que se refiere al dengue hemorrágico, lo han convertido en uno de los mayores problemas de salud pública con que se enfrentan

muchos países tropicales. En el continente americano, en los últimos años se ha observado el aumento constante de la incidencia de dengue como consecuencia del número de serotipos circulando en la población y el poco control ejercido para la erradicación de los vectores (Muñiz *et al* 1998).

1. Distribución geográfica. La distribución del virus del dengue está relacionada con el hábitat del mosquito vector. Se le encuentra en regiones tropicales y subtropicales, principalmente en el sudeste asiático, islas del Pacífico, el Caribe y América Central (USAC 1994).

La epidemiología global del dengue/dengue hemorrágico, D/DH, ha cambiado dramáticamente en los últimos 50 años, primero en Asia durante y después de la Segunda Guerra Mundial, y en los últimos 20 años en otras regiones tropicales del mundo, especialmente en América. Los factores responsables de este cambio involucran cambios demográficos y sociales que han resultado en una expansión de la distribución geográfica de los mosquitos vectores y de los 4 serotipos del virus del dengue, resultando en la co-circulación de múltiples serotipos en una ciudad o país (hiperendemicidad), el factor que más se relaciona con el surgimiento del dengue en su forma severa y fatal en un país. Este cambio se ha dado en la región americana, en donde antes de 1980, en los países solo había uno (hipoendémico) o ningún (no endémico) serotipo del virus. Durante 1980 y 1990, muchos países en América se volvieron hiperendémicos, como se muestra en la tabla 1, a lo que le siguió la aparición del dengue hemorrágico. En 1996, 11 países de la región reportaron la circulación de múltiples serotipos del virus: 2 países reportaron la presencia de 4 serotipos, 3 reportaron la presencia de 3 serotipos y 6 reportaron la presencia de dos serotipos, tabla 1. Es importante resaltar, que no todos los países cuentan con un laboratorio adecuado para la detección del virus (Loroño-Piño *et al.* 1999).

Todos los serotipos han sido aislados de casos autóctonos de la Américas; sin embargo, sólo los serotipos del dengue 1, 2 y 4 han estado circulando durante el período 1978-1991, mientras que el dengue 3 fue aislado la última vez en Colombia y Puerto Rico en 1977. Si bien el dengue 2 estuvo asociado con el brote principal del dengue y DH/SCD en Cuba en 1981, el dengue 1 y el dengue 4 fueron los serotipos circulantes que predominaron en la década de 1980. El dengue 1 también causó brotes importantes en Aruba (isla holandesa de las Antillas dependiente de Venezuela), México y Nicaragua. La introducción del dengue 4 en las Américas en 1981 fue seguida por las epidemias de dengue del Caribe, Centroamérica, México y Sudamérica durante 1981-1983 y posteriormente por las grandes epidemias con casos de DH en México (1984), Puerto Rico y El Salvador. El virus DEN-4 es ahora endémico en la región (OPS 1995).

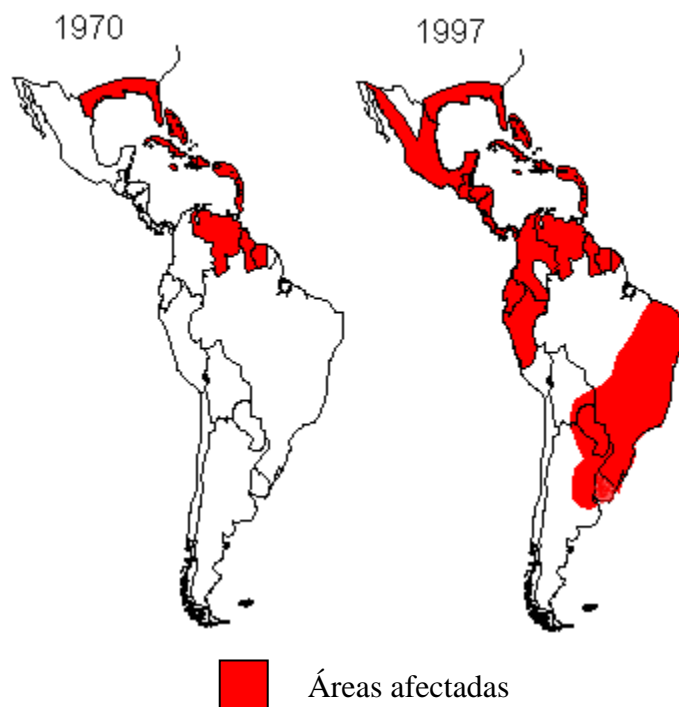
Tabla 1
Reporte de la circulación de múltiples
serotipos del dengue en América
(Loroño-Piño *et al.* 1999).

Los primeros casos de dengue reportados en México fueron en 1982, donde se reportó la circulación de los serotipos 1 y 2. Posteriormente se reportó la presencia de los serotipos 2 y 4, convirtiéndose México en 1996 en un país portador de los cuatro serotipos del virus del dengue. Actualmente se encuentran en circulación los serotipos del virus del dengue 1,2 y 3 (OPS 2000).

Durante epidemias en donde múltiples serotipos del virus del dengue se transmiten, hay pacientes que se infectan con más de un serotipo al mismo tiempo; pero los reportes de estos casos son pocos. El primer caso de una infección con 2 serotipos del virus del dengue, se reportó en Puerto Rico en 1982; DEN-1 y DEN-4 estaban en la población durante ese tiempo, y los dos serotipos del virus se aislaron de un mismo paciente (Loroño-Pino 1999).

En un esfuerzo para prevenir la fiebre amarilla, que también es transmitida por *Aedes aegypti*, la Organización Panamericana de la Salud organizó una campaña que erradicó a *Aedes aegypti* de la mayoría de países de Centro y Sur América, en los años 1950 y 1960. Como resultado, durante este período, las epidemias de dengue ocurrían esporádicamente en algunas islas del Caribe, como se muestra en la Figura 9 . El programa de erradicación de *Aedes aegypti* fue descontinuado oficialmente en Estados Unidos en 1970, y el mosquito volvió a reinfestar países donde ya se había erradicado (CDC 1997).

Figura 9
Distribución de *Aedes aegypti* en América;
años 1970 - 1997
(CDC 1997).



En 1970, sólo el virus DEN-2 estaba presente en América, aunque DEN-3 posiblemente tenía una distribución focal en Colombia y Puerto Rico. En 1977, se introdujo DEN-1 y causó grandes epidemias en la región por un período de 16 años. En 1981 se introdujo DEN-4 y causó epidemias similares. También fue en 1981 cuando una nueva cepa de DEN-2, del sureste de Asia, causó la epidemia más grande de DH que ha habido en América, en Cuba. Esta cepa se ha distribuido rápidamente en la región y ha causado brotes de DH en Venezuela, Colombia, Brasil, Guayana Francesa, Surinam y Puerto Rico. En 1997, 18 países de la región americana tenían reportes que confirmaban casos de DH, ver Figura 10, y como consecuencia actualmente el DH es endémico en estos países (CDC 1997).

Desde 1997, el dengue es la enfermedad viral más importante que afecta a humanos, transmitida por mosquito; su distribución a nivel global puede ser comparable con la de la malaria, y se estima que 2.5 billones de personas viven en áreas en riesgo de transmisión epidémica. (CDC 1997).

Antes de 1970 un total de 9 ciudades habían reportado epidemias de dengue hemorrágico, pero en 1995 se reportaron cuatro veces más de casos de DHF. La mayoría de estas ciudades se encuentran en el sur de Asia y el en Oeste del Pacífico. En el 2001, más de 600,000 casos de dengue fueron reportados en América, de los cuales 15,000 fueron de dengue hemorrágico, más del doble de casos de DHF reportados en América en 1995.

La razón de mortalidad por casos de dengue de la mayoría de países (sobre todo en países asiáticos) es aproximadamente 5%; la mayoría de casos fatales se presentan en niños y jóvenes (Calisher, C. 2005).

La incidencia del dengue está incrementando mundialmente, particularmente en las Américas, donde se han reportado tres veces más casos de dengue de 1996 al 2002. En el inicio del siglo XXI, el dengue se han convertido en la enfermedad arboviral más importante para los humanos, con un estimado de 50-100 millones de casos de dengue clásico y varios cientos de miles de casos de DHF que ocurren cada año (Smith *et al.* 2005)

a. Región centroamericana. En todos los países de Asia Suroriental donde el DH epidémico se convirtió en un importante problema de salud pública, la enfermedad apareció inicialmente de manera esporádica durante varios años, culminando finalmente en graves epidemias. En la mayoría de aquellos países se desarrolló posteriormente un ciclo continuo de epidemias de dengue y de DH, apareciendo en intervalos de tres a cinco años, con epidemias que se tornaban progresivamente más graves. Algunos países de Centroamérica están experimentando ciclos continuos de epidemias similares. La situación de dengue en América Central está progresivamente empeorando (OPS 2000).

Figura 10
Países americanos con casos confirmados de DH;
años 1981-1997
(CDC, 1997)



Durante el verano del 2000, Costa Rica, El Salvador, Guatemala y Nicaragua experimentaron brotes de dengue que también incluyeron casos de DH y defunciones. El deterioro de los programas de control, asociado con condiciones climáticas, prolongaron e intensificaron los efectos de la enfermedad (OPS 2000).

1) Guatemala. Entre 1948 y 1959, se hicieron esfuerzos para erradicar el *Ae. aegypti* siguiendo las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud. Guatemala fue certificado como libre de *Ae. aegypti* en la XI Reunión del Consejo de Directores de la OMS en 1959. Para 1967, la larva de *Ae. aegypti* fue descubierta en la ciudad de Escuintla. Cinco años después, en 1972, el *Ae. aegypti* fue encontrado nuevamente en Escuintla y en Taxisco. Con la combinación de las limitaciones económicas, los factores ecológicos, y una rápida expansión, esta especie reinfestó gradualmente otras comunidades hasta que ocurrió la primera epidemia de dengue en Escuintla en agosto de 1978. En 1987, ocurrió un nuevo brote de dengue y desde entonces, la enfermedad se ha propagado a todas las áreas infestadas por el vector. A principios de los años ochenta, se notificaron pocos casos de dengue por año. El primer brote grave ocurrió en 1987 con 2.318

casos. Durante 2000, el serotipo DEN-2 fue el único aislado y los departamentos más afectados fueron Zacapa, Santa Rosa, Escuintla y El Progreso. Antes de los años noventa, DEN-1 era el único serotipo encontrado circulando, excepto en 1988 cuando los serotipos 1, 2 y 4 fueron aislados. Desde el año 2000 se han notificado también casos de dengue hemorrágico (OPS 2000).

La situación del dengue en Guatemala para el año 2,005 es que hasta la semana epidemiológica 15 se notificaron 91 casos de dengue, dentro de los cuales se incluyen dos casos de dengue hemorrágico, siendo los departamentos más afectados el Norte de Petén, seguido de Baja Verapaz, Zacapa, Petén Sur Occidente, Jutiapa y Petén Sur Oriente. Petén es el departamento que presenta la más alta tasa de incidencia en el país. Durante los últimos cinco años (2000-2004) para la semana epidemiológica 15, se tiene una media de 72 casos reportados de Dengue. Esto es superado en la semana epidemiológica 15 del presente año al reportarse 91 casos (21% más casos que el promedio de los últimos 5 años y 44% más casos que el promedio de las últimas cinco semanas del 2005). Esto ubica al país al borde de la zona epidémica.

El número de casos reportados incrementa año con año y los habitantes más afectados son adultos de ambos sexos comprendidos entre los 25 y 39 años de edad (Ministerio de Salud Pública 2005).

2. Factores de riesgo determinantes de la transmisión del dengue. «Riesgo es un concepto empleado para medir la probabilidad de la futura ocurrencia de un resultado negativo, como la infección por dengue o un brote de dengue». Esta probabilidad depende de la presencia de una o más características o factores determinantes del suceso. La dinámica de transmisión del virus del dengue depende de interacciones entre el ambiente, el agente, la población de huéspedes y el vector, los que coexisten en un hábitat específico. La magnitud e intensidad de tales interacciones determinará la transmisión del dengue en una comunidad, región o país. Estos componentes pueden dividirse en macrofactores y microfactores determinantes (OPS 1995).

a. Macrofactores. Entre los factores determinantes de la transmisión del dengue, dentro de lo que son los factores de riesgo ambientales y sociales, ver Tabla 2, está el de las zonas geográficas donde el vector se desarrolla y entra en contacto con la población del hospedero. La altitud es un factor limitativo para el desarrollo de vectores y virus. La temperatura, la humedad y las precipitaciones pluviales son las condiciones que afectan a la supervivencia y reproducción de los vectores; la temperatura también afecta a la replicación del virus en el vector. Estos parámetros geográficos y climatológicos pueden utilizarse para estratificar las zonas donde la transmisión previsible puede ser **endémica, epidémica o esporádica** (OPS 1995).

En América, el dengue es principalmente una enfermedad urbana. Su transmisión está relacionada con densidades de población de moderadas a altas, una urbanización no planificada y densidades habitacionales muy elevadas. Las creencias en relación con el dengue, el estado socioeconómico, la

disponibilidad de los servicios públicos y las condiciones habitacionales pueden influir en el riesgo de transmisión (OPS 1995).

Tabla 2
Macrofactores de riesgo determinantes
de la transmisión del dengue
(OPS 1995)

<p>Ambientales Latitud: 35 °N a 35 °S Altitud: < 2200 m Gama de temperatura ambiente: 15-40 °C Humedad relativa: de moderada a alta</p> <p>Sociales Densidad de la población: de moderada a alta Patrones de asentamiento: urbanización no planificada, y densidad de asentamiento elevada. Viviendas: tejidos de alambre inadecuados o inexistentes, y desagües obstruidos con desechos. Aprovechamiento de agua: agua almacenada en la casa por más de 7 días, ausencia de abastecimiento de agua corriente individual, disponibilidad intermitente y uso de tanques destapados. Recolección de desechos sólidos: envases de almacenaje inadecuados, recolección inadecuada o inexistente, recipientes pequeños en desuso de menos de 50 litros, neumáticos desechados, y automóviles abandonados. Estados socioeconómico Períodos inactivos en la casa durante el día Creencias y conocimientos sobre el dengue</p>

b. Microfactores. Los factores de riesgo que influyen en la transmisión del virus del dengue deben ser separados de los que influyen en la gravedad de la enfermedad. Entre las categorías de factores de riesgo reconocidos para la transmisión figuran los del hospedero, el vector y el agente. Los factores propios del hospedero incluyen el sexo, la edad, el grado de inmunidad y las condiciones de salud específicas. Un factor propio del agente de la enfermedad que influye en la transmisión del dengue es el nivel de viremia. Las personas con viremia alta proporcionan una dosis infecciosa mayor del virus al ser picadas por el mosquito vector. Por ejemplo, una persona con viremia alta puede infectar el 100% de los mosquitos que ingieren su sangre, y aunque la densidad de la población de mosquitos sea baja, algunos de ellos pueden sobrevivir al período extrínseco de incubación y transmitir el virus. Por otro lado, una persona con viremia baja quizá no infecte a ninguno de los mosquitos que ingieren su sangre, aunque la densidad de la población del vector sea alta. Para los factores propios de los vectores; ver Tabla 3 (OPS 1995).

Tabla 3
 Microfactores de riesgo determinantes
 de la transmisión del dengue
 (OPS 1995)

<p>Factores individuales del huésped</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sexo • Edad • Grado de inmunidad • Condiciones de salud específicas • Ocupación <p>Factores del agente de la enfermedad</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nivel de viremia <p>Factores de los vectores</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abundancia y focus de proliferación de los mosquitos • Densidad de hembras adultas • Edad de las hembras • Frecuencia de la alimentación • Preferencia de huéspedes • Disponibilidad de huéspedes • Suceptibilidad innata a la infección

3. Estrategias de control y prevención del dengue. El control y la prevención del dengue y DH se ha vuelto más urgente con la expansión de la distribución geográfica y el aumento de la incidencia en los últimos 20 años. Desafortunadamente, las herramientas disponibles para prevenir la infección por dengue todavía son limitadas. Los programas de prevención efectivos, deben tener varios componentes integrados, incluyendo vigilancia activa de laboratorio, respuesta de emergencia, educación de la comunidad médica para asegurarse del buen manejo de los casos, control del mosquito integrado con la comunidad, y uso efectivo de las vacunas cuando estén disponibles (Gubler 1993).

Los primeros programas de lucha contra *Aedes aegypti* estaban dirigidos a la fiebre amarilla. Se hicieron grandes adelantos a comienzos del siglo en Cuba y Panamá para controlar este vector, principalmente mediante la reducción de fuentes, la aplicación de petróleo y el uso de piretrinas. En 1923, el Brasil inició una campaña de erradicación. La última epidemia urbana de fiebre amarilla en las Américas se notificó en 1942, pero la amenaza permanente de reaparición de esta enfermedad en las zonas urbanas y la mayor incidencia del dengue llevaron a un continuo apoyo de los programas de control de vectores. Con el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT, la erradicación continental de *Aedes aegypti* parecía factible. Antes del comienzo de la campaña de erradicación, todos los países del hemisferio occidental, a excepción de Canadá, estaban infestados por *Aedes aegypti*. Hacia 1962, 18 naciones del continente y varios pequeños países insulares del caribe habían logrado la erradicación. Pero los programas de erradicación fallaron porque no todos los países del continente lograron erradicar *Aedes aegypti*, y los países que todavía estaban infestados se convirtieron en fuentes de reinfestación para los que estaban libres del vector. Con el correr del tiempo, en la mayoría de los países que lograron la erradicación, los programas contra *Aedes aegypti* perdieron importancia

política y la vigilancia contra la reinfestación se redujo gradualmente hasta que resultó inadecuada para detectar reinfestaciones pequeñas. Cuando se descubría una reinfestación, por lo general se reaccionaba demasiado tarde, y los recursos para eliminarla antes que se generalizara y su control fuera imposible, solían ser insuficientes (OPS 2000).

Desde el fracaso definitivo de la campaña panamericana de erradicación de *Aedes aegypti* se han recomendado numerosos cambios, muchos de los cuales han sido puestos en práctica, al menos parcialmente, en los programas de control de vectores. En la XXXI Reunión del Consejo Directivo de la OPS, en 1985, se efectuó un importante cambio de política. Mientras que resoluciones anteriores habían insistido en la política de erradicación de *Aedes aegypti* en todos los países, la resolución XXXVI reconoció, y por primera vez apoyó, el hecho de que algunos países tuvieran programas para el control de *Aedes aegypti*. Este fue un importante paso adelante. La metodología utilizada para una campaña de erradicación es muy diferente de la empleada en los programas de control. La erradicación supone la cobertura completa y concienzuda de las zonas infestadas, con ciclos de tratamiento frecuentes para erradicar el vector en el plazo de unos pocos años. El control es la utilización efectiva, en función de los costos, de recursos limitados para reducir las poblaciones de vectores a niveles en los que ya no sean de gran importancia para la salud pública (OPS 1995).

a. Control del vector. Como el vector principal del virus del dengue es el mosquito *Aedes aegypti*, debe ser también el blanco principal de las actividades de control. Otras especies deben de ser tomadas en cuenta, únicamente si existe evidencia de que juegan un papel importante en la transmisión de la infección (WHO, 1997). Para lograr el control del vector, en vez de aplicar un solo método deben combinarse e integrarse todas las técnicas potenciales de control de vectores de la manera más compatible. En vez de seleccionar un solo vector, en el mismo programa se pueden incluir varias especies relacionadas de vectores. Este enfoque más amplio, conocido como control integral de vectores, no sólo considera varios problemas de salud pública a la vez, sino que también gana mejor aceptación pública para el programa (OPS 1995).

Unos pocos países (Bermuda, Chile, Islas Caimán y Uruguay) no han sido reinfestados en forma permanente por *Aedes aegypti* después de la primera erradicación satisfactoria, y algunos otros (Brasil, Cuba) tienen grandes zonas sin el vector. En estos casos, la vigilancia contra la reinfestación es de capital importancia. Debe prestarse una atención especial a los puertos de mar, aeropuertos, cementerios e instalaciones para reencauchar neumáticos (OPS 1995).

1) Control físico. Los métodos naturales incluyen cambios en el ambiente natural para suprimir la proliferación de formas inmaduras de los mosquitos vectores. Estas medidas pueden ser a corto o largo plazo. Las primeras se basan en el rellenado o drenaje de los criaderos potenciales del vector. Entre otras medidas provisionales figuran la modificación del paisaje tendiente a eliminar la vegetación que proporciona sombra, alimento o acumulaciones de agua que puedan contribuir a la abundancia de estos mosquitos vectores.

Cuando sea posible, se deben cortar o retirar las malezas de los alrededores inmediatos de las casas. Los agujeros de árboles y otros depósitos naturales de agua de lluvia se deben de rellenar con cemento, arena, tierra apisonada, grava u otros minerales apropiados (OPS 1995).

Una de las claves para el control de vectores urbanos, en particular *Aedes*, es la mejora del abastecimiento doméstico de agua. La práctica de almacenar agua en las casas persiste debido a que los servicios de abastecimiento urbano de agua son irregulares. El mensaje es claro: se debe suministrar agua potable en cantidad, calidad y con la regularidad suficiente durante todo el año para reducir el uso de toneles, tanques elevados y vasijas, que constituyen criaderos potenciales del vector. El abastecimiento individual de agua corriente es la mejor alternativa al uso de pozos (OPS 1995).

Las actividades de control de vectores en las que se emplea el tratamiento de desechos sólidos no solo protegen la salud pública, sino que conservan los recursos naturales. El almacenamiento, recolección y eliminación adecuados de los desechos sólidos protege la salud pública, mientras que la reducción en la generación de desechos, la reutilización y el reciclaje conservan los recursos naturales. Ambos enfoques requieren la educación y participación de la comunidad. El tratamiento de desechos sólidos para el control satisfactorio de vectores consta de tres aspectos: la reducción, reciclaje y reutilización de desechos, la recolección y la eliminación apropiada (WHO 1997).

Los neumáticos descartados son desechos sólidos de importancia crítica para el control urbano de *Aedes*. Nunca faltan neumáticos desechados en las zonas urbanas: solamente en Estados Unidos, 200 millones de neumáticos usados entran en la corriente de desechos cada año. Las pilas de neumáticos desechados son un grave peligro para la salud (vectores) y para la seguridad (incendios) en las ciudades. Además, se cree que los neumáticos usados importados son responsables de la introducción de *Aedes albopictus* en los Estados Unidos (OPS 1995).

Los neumáticos se pueden tratar con insecticidas, sal o jabón para el control químico de mosquitos inmaduros. Continuamente están surgiendo nuevas tecnologías para la reutilización y eliminación de neumáticos, pero la mayoría de ellas han resultado limitadas en cuanto a su aplicación o efectividad en función de costo. Los neumáticos pueden reciclarse para hacer suelas para sandalias, esterillas para suelos, arandelas y juntas industriales, baldes y tachos de basura y revestimiento de alfombras. La goma de los neumáticos usados se puede combinar con goma virgen o virutas plásticas para hacer productos plásticos moldeados por inyección, como tejas de goma para tejados, correas de ventilador de automóviles, señales de cruces de ferrocarril y para cubrir el piso de los camiones a fin de proteger la carga. La goma triturada se mezcla con asfalto (goma de asfalto) para pavimentar carreteras, sellar grietas de caminos y techos y revestir tanques y lagunas artificiales. La eliminación de neumáticos puede hacerse simplemente quemándolos apilados en un patio o un terreno baldío, o incinerándolos adecuadamente en plantas de transformación de desechos. La pirólisis de los neumáticos (exposición a calor alto en ausencia de oxígeno), una tecnología

experimental, genera aceite que se puede vender para mezclarlo con materiales como aceites combustibles, carbón de leña y materiales plásticos (OPS 1995).

Las cercas y los postes hechos de árboles huecos como el bambú deben ser cortados hasta el nódulo, mientras que los bloques de cemento o las botellas rotas se deben llenar con cemento, arena compactada o trozos de vidrio para eliminar los focos potenciales de *Aedes*. Los neumáticos y otros tipos de focos potenciales almacenados en el exterior se deben cubrir adecuadamente con lonas o se deben acomodar con cobertizos. Cuando sea posible, las casas se deben diseñar de manera que se reduzca al mínimo la oportunidad de que los mosquitos entren en ellas. Esta medida ayudaría a disminuir el contacto vector-hombre y por ende el riesgo de contraer el dengue (Gubler 1989).

Las medidas de protección personal se han usado ampliamente en los esfuerzos para proteger a los habitantes de las zonas rurales contra la malaria. Parece que los mosquiteros o cortinas impregnados con piretroide ofrecen buena protección contra los vectores nocturnos de esta infección. Sin embargo, en el caso de vectores más diurnos, como *Aedes*, esas medidas pueden tener poca importancia. Estas barreras se pueden usar para proteger grupos especiales de personas, como los que están postrados en camas, los lactantes o los trabajadores nocturnos. Los turistas u otros visitantes temporarios de una zona endémica pueden protegerse usando repelentes (Gubler 1989).

2) Control químico. Desde comienzos del siglo se han venido utilizando productos químicos para el control de *Aedes aegypti*. Cuando comenzó a surgir la resistencia a DDT en la década de 1960, ya se habían desarrollado insecticidas organofosforados, y algunos de ellos, como el fenitión, el malatión, el fenitrotión y el temefós empezaron a usarse sucesivamente para el control de *Aedes aegypti*. En la actualidad se tiende a limitar el uso de los productos químicos para el tratamiento de los recipientes que no puedan ser limpiados o tratados de otro modo y para situaciones de emergencia. Los métodos de aplicación de insecticidas para el control de *Aedes aegypti* son: el tratamiento perifocal, el tratamiento focal y la aplicación espacial. En la Tabla 4 se listan insecticidas seleccionados para usar en forma de nieblas frías contra *Aedes aegypti*. Todos los plaguicidas son tóxicos hasta cierto punto, motivo por el cual se deben adoptar varias medidas de seguridad importantes, entre ellas: tomar precauciones al manipular los plaguicidas, en particular las personas que los aplican, y al realizar las aplicaciones en las casas ocupadas y alrededor de ellas (WHO 1997).

En la actualidad, el metopreno promete ser el larvicida químico más aceptable desde el punto de vista ambiental que se puede utilizar contra los mosquitos. La ausencia aparente de toxicidad para los mamíferos de esta hormona juvenil sintética permite el uso en el agua potable (OPS 1995).

Tabla 4
 Insecticidas seleccionados para usar en forma de niebla fría,
 contra *Aedes aegypti*
 (Modificado de WHO 1997).

Insecticida	Dosis (gramos de ingrediente activo per ha)
Organofosforados	
Malatión	112-693
Fenitrotión	250-300
Naled	56-280
Pirimifos-metil	230-330
Piretroides	
Deltametrín	0.5-1.0
Resmetrín	2-4
Bioresmetrín	5
Permetrín	5
Cipermetrín	1-3
Lamda-cialotrín	1

3) Control biológico. El control del dengue basado en la introducción de organismos vivos que eliminen o parasiten a *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*, o que compitan con ellos, u otras medidas para reducir su proliferación, sigue siendo experimental o está restringido a operaciones de campo de pequeña escala que complementan otras medidas. Los peces larvívoros y el insecticida biológico *Bacillus thuringiensis* H-14 (BTI) son las dos clases de organismos usados con más frecuencia, mientras que algunos copépodos depredadores parecen ser prometedores. Las ventajas de las medidas de control biológico incluyen: la no contaminación del ambiente con productos químicos, la especificidad de la actividad contra el organismo diana (el efecto de BTI, por ejemplo, está limitado a mosquitos y dípteros afines) y la autodispersión de algunos de estos agentes en sitios inaccesibles que no habían sido tratados fácilmente por otros medios. Las desventajas de estas medidas comprenden: el gasto de desarrollar los organismos, la dificultad de su aplicación y cría y la limitación de su utilidad en medios acuáticos donde la temperatura, el pH y la contaminación orgánica constituyen un ambiente hostil a su adaptación. Un inconveniente de los agentes biológicos utilizados contra los mosquitos es que solo pueden emplearse contra las formas inmaduras de estos insectos (WHO 1997).

Ciertos copépodos ubicuos (pulgas de agua) devoran las larvas recién eclosionadas. No obstante, si estos mosquitos se desarrollan hasta el tercer estadio, son demasiado grandes para que puedan ser atacados

con éxito por estos depredadores diminutos. El efecto principal del esfuerzo de aplicación de ciclopoides es tardío, pues ocurre solo después de una lluvia, cuando eclosionan un lote de huevos. Una desventaja, es que solo matan las larvas recién emergidas, por lo que es preciso incluir BTI (OPS 1995).

El BTI (*Bacillus thuringiensis esraelensis* H-14), descubierto en la década de 1970, es un larvicida de mosquitos comprobado que no afecta al medio ambiente y que, además, parece totalmente inofensivo para el hombre. Este producto de fermentación de *Bacillus thuringiensis esraelensis* H-14 es el material más aceptable contra los mosquitos con que se cuenta en la actualidad. El cuerpo paraesporal presente dentro de este agente contiene una toxina que se degrada exclusivamente en un ambiente alcalino y solo los dípteros del suborden Nematocera tienen sistema digestivo alcalino. La ventaja de este material es que su aplicación destruye las larvas de los mosquitos, pero no daña a los depredadores entomófagos que pueden estar presentes. La toxina es fotolábil, y por lo tanto es destruida por la luz solar. Este efecto obliga a realizar aplicaciones frecuentes (WHO 1997).

4) Control genético. Se ha hecho mucho trabajo para evaluar el uso de métodos genéticos para el control de las poblaciones del vector. En la actualidad, la importancia de este trabajo es el desarrollo de una cepa transgénica competitiva y el aislamiento de elementos apropiados transposables. Entre los estudios que se han hecho está la esterilización de mosquitos. Todavía hay muchos mecanismos potenciales en estudio (Beaty y Marquardt 1996).

5) Métodos de control en Guatemala. Actualmente el programa de control de *Aedes aegypti* incluye el uso de un insecticida y un larvicida, caotrin y abate respectivamente. Estos insecticidas se aplican en condiciones extremas, cuando la infesta de mosquitos es muy alta. Pero el principal enfoque de este programa son actividades de prevención, utilizando los medios de comunicación (radio, prensa y televisión) para informar a la población los cuidados que debe tener para evitar los criaderos de mosquitos, poniendo énfasis en la limpieza de recipientes para almacenar agua y en el desecho correcto de utensilios inútiles. (Montenegro 2004).

C. Genética de poblaciones

Es el estudio de la variación genética en una población natural y los factores que influyen dicha variación. La genética de poblaciones es un área de estudio de gran importancia en cuanto a vectores artrópodos de enfermedades, ya que provee información crítica para conocer la capacidad vectorial y el rol de éstos en la epidemiología de la enfermedad (Black y Tabachnick 1996).

Los estudios de genética de poblaciones permiten investigar el flujo genético y la velocidad de dispersión de genes entre una población, para poder desarrollar estrategias de control efectivas. Este flujo de genes puede ser medido con respecto a varios factores: localización del alimento, hospedero principal,

densidad poblacional y competencia vectorial (i.e susceptibilidad del vector a la infección del patógeno, habilidad de transmisión). Se ha sugerido que una forma para controlar las poblaciones vectoriales puede ser por medio de la introducción de individuos manipulados genéticamente con capacidad vectorial reducida. Pero esta visión sólo puede ser alcanzada si se tiene el conocimiento necesario sobre el control genético de características vectoriales específicas, los efectos ambientales y la genética de estas poblaciones (Black y Tabachnick 1995).

Las técnicas utilizadas para la identificación de variaciones genéticas en poblaciones naturales han evolucionado, y gracias a esto actualmente los estudios ya no son empíricos. Las primeras técnicas utilizadas fueron la identificación de mutantes morfológicos, variaciones cromosómicas estructurales y el uso de isozimas, siendo esta última la que ha proporcionado mayor información acerca de la genética de poblaciones (Black y Tabachnick 1996).

1. Poblaciones naturales. El término población se refiere a un grupo de organismos de la misma especie que viven dentro de un área geográfica restringida donde ocurre apareamiento al azar. La mayoría de poblaciones se subdividen por características geográficas u otras características, en unidades pequeñas llamadas subpoblaciones (Hartl y Jones 2002).

Las poblaciones son dinámicas, pueden crecer y expandirse o disminuir y contraerse por cambios en el índice de nacimientos o muertes, por migraciones o por apareamientos con otras poblaciones. Los cambios en una población tienen importantes consecuencias y con el tiempo pueden producir cambios en la estructura genética de la población (Cummings y Klug 2000).

Las unidades fundamentales de estudio en la genética de poblaciones son las poblaciones locales, es decir, unidades dentro de una población en las cuales ocurre cruzamiento entre parientes. Dentro de estas unidades o poblaciones se producen cambios en la frecuencia de alelos, que son importantes para la evolución adaptativa de una característica (Hartl y Jones 2002).

2. Variación genética

a. Equilibrio Hardy-Weinberg. El equilibrio de Hardy-Weinberg establece que en una población grande con apareamiento al azar y en ausencia de selección, migración y mutación, los genes y las frecuencias genotípicas permanecen constantes de generación en generación (Black y Tabachnick 1996).

b. Factores que influyen la variación genética. Los factores responsables de los cambios en los genes y en las frecuencias genotípicas en cualquier población son:

1) Apareamiento. Cuando no hay apareamiento al azar entre genotipos, se producen cambios en la frecuencia genotípica y como consecuencia, la reducción en la frecuencia de heterocigotos en cada generación. La frecuencia con la que aumentan los homocigotos dentro de una población es función del grado de relación entre los individuos que se aparean; es decir, que la frecuencia incrementa rápidamente cuando existe apareamiento entre padre e hijos o entre los mismos hijos (Black y Tabachnick 1996).

2) Tamaño de la población. El tamaño de la población afecta el equilibrio Hardy-Weinberg, ya que una población muy pequeña esta sujeta a cambios en los genes y en la frecuencia genotípica. En teoría, el tamaño de una población debe ser grande y constante, pero en la realidad el tamaño de una población varia según la época del año, la estación y por métodos de control deficientes, produciendose cambios de frecuencia al azar (deriva genética). La **deriva genética** afecta la heterocigocidad observada en una población, de manera que puede llegar a reducirse de tal forma que un solo alelo podría llegar a fijarse en una población (Black y Tabachnick 1996)

3) Migración. La migración de individuos hacia otra población introduce nuevos genes produciendo cambios en la frecuencia genotípica. Cuando dos poblaciones difieren en la frecuencia de genes e intercambian emigrantes, la frecuencia genética en cada población cambia dependiendo del número de emigrantes. Si este intercambio de emigrantes es constante, la migración provocará eventualmente que ambas poblaciones tengan frecuencias genéticas similares. Al intercambio de genes entre poblaciones se le llama flujo genético, el cual puede llegar a producir poblaciones genéticamente similares (Black y Tabachnick 1996).

4) Mutación. La tasa de mutación afecta la frecuencia genética (ya que es una fuente de material genético nuevo) y está estimada en el orden de 10^{-6} por locus por generación (Black y Tabachnick 1996).

5) Selección. La selección natural es el proceso por el cual los genotipos con mejor adaptación se reproducen y proliferan. A medida que estos alelos favorables aumentan su frecuencia dentro de la población, más de los genotipos mejor adaptados se van formando. Como resultado, los tipos y frecuencias de los alelos de la población gradualmente cambian hasta promover mejor adaptación al ambiente (Hartl y Jones 2002).

c. Métodos moleculares utilizados para el estudio de variaciones genéticas. Actualmente, los métodos utilizados para el análisis de las variaciones genéticas en poblaciones naturales de vectores están basadas en el uso de marcadores moleculares de ADN, los cuales permiten detectar diferencias genéticas o **polimorfismos**. Algunos de estos métodos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5
Métodos utilizados para determinar variaciones genéticas
en una población natural
(Modificado de Black y Tabachnick 1996)

Métodos moleculares	Abreviaturas por sus siglas en inglés
Fragmentos de restricción de largo polimórfico	RFLP (Restriction fragment length polymorphism)
ADN polimórfico amplificado al azar	RAPD (Random amplified polymorphic DNA)
Secuencia simple de largo polimórfico	SSLP (Simple sequence length polymorphism)
Polimorfismo en la conformación de banda simple	SSCP (Single strand conformational polymorphism)
Polimorfismo de un solo nucleótido	SNP's (Single nucleotide polymorphism)

1) Polimorfismo en la conformación de banda simple. Es una técnica importante en la genética de poblaciones y se basa en la movilidad electroforética de las diferentes conformaciones que adopta una molécula de DNA simple hebra. La localización y el número de pares de bases en una banda de DNA determinan las estructuras secundarias y terciarias de una conformación (Black y Duteau, 1997). Las mutaciones puntuales también son responsables de las diferentes conformaciones que adoptan las hebras de ADN ya que alteran las interacciones intra-banda (Cummings y Klug 2000).

Las moléculas de ADN de doble hebra se desnaturalizan con calor y luego se colocan en hielo. La temperatura fría promueve la formación de complejos intra-banda e inhiben la renaturalización de la doble hebra. Las muestras se colocan en geles de poliacrilamida y se realiza una electroforesis donde la movilidad de cada muestra dependerá de su conformación (Black y Duteau 1997).

El método de polimorfismo en la conformación de banda simple es rápido, sencillo, y no se requiere secuenciar el ADN para detectar cambios de una sola base (Cummings y Klug 2000).

d. Variaciones en el ADN mitocondrial. El ADN mitocondrial posee varias características que lo hacen útil para el estudio de relaciones genéticas entre organismos. El ADN mitocondrial es heredado únicamente

de la madre, y a diferencia de los marcadores nucleares, no hay recombinación entre genomas de diferentes clones maternos (Black y Tabachnick 1996).

Estudios de variaciones intraespecíficas en el ADN mitocondrial muestran que uno o mas clones maternos pueden caracterizar a una población. La presencia de estos clones fuera de los límites de la población proporcionan información sobre la dispersión y el flujo genético. Debido a la elevada sensibilidad de este marcador y por ser transmitido únicamente por la madre, se pueden elaborar estudios de filogenia y evolución (Black y Tabachnick 1996).

e. Medición de la variación genética

1) Estadística F de Wright. Una población subdividida presenta un característico exceso de homocigotos. Este efecto se mide por medio de la disminución en la proporción de heterocigotos. Una población subdividida presenta tres niveles de complejidad: organismos individuales (I), subpoblaciones (S) y población total (T), y en estos terminos se definen las siguientes variables:

H_I = Heterocigocidad de un individuo en una población. Es el promedio de la heterocigocidad observada (H_{obs}) entre subpoblaciones.

H_S = Heterocigocidad esperada de un individuo en una subpoblación con cruzamiento al azar. Es el promedio de la heterocigocidad experimental (H_{exp}) entre subpoblaciones.

H_T = Heterocigocidad esperada en una población total con cruzamiento al azar (Black y Tabachnick 1996).

La proporción de individuos que migran en relación con la población total se denomina tasa de migración y se denoma "m". La tasa de migración determina la velocidad de migración con la cual las poblaciones llegarán a tener una composición genética similar, y es un parámetro importante porque permite estimar el potencial de expansión de un vector patógeno de una población a otra (Black y Tabachnick 1996).

Se puede estimar las desviaciones con respecto a la reproducción al azar dentro y entre las diferentes subpoblaciones utilizando tres estadísticas F introducidas por Wright, que permiten describir la estructura reproductiva de las poblaciones naturales. Las tres estadísticas F son F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} , donde I = individuos, S = subpoblación y T = población total (Black y Tabachnick 1996).

El apareamiento no al azar dentro de una subpoblación es descrita por F_{IS} y se calcula con la siguiente fórmula:

$$F_{IS} = (H_S - H_I)H_S$$

Este dato es el promedio de la correlación entre gametos presentes en la misma subpoblación. Se dice que dos gametos están correlacionados cuando los dos alelos se derivan de un mismo alelo con un

ancestro común. En una población en la que los individuos se reproducen de manera selectiva con individuos muy cercanos genéticamente, la correlación entre los gametos que se unen es muy grande y la estadística F_{IS} toma un valor positivo. Si la heterocigocidad observada y esperada son iguales, entonces $F_{IS} = 0$ y la población está en equilibrio Hardy-Weinberg ya que no hay correlación entre los gametos. La **endogamia** produce un exceso de homocigotos y F_{IS} adquiere un valor mayor a cero, indicando que la subpoblación no está en equilibrio Hardy-Weinberg y que existe correlación entre los gametos. Cuando existe un exceso de heterocigotos F_{IS} es menor a cero (Black y Tabachnick 1996).

El apareamiento no al azar entre subpoblaciones es descrito por F_{ST} , el cual es una correlación entre gametos tomados al azar dentro de una subpoblación, en relación con los gametos en la población total. Esta estadística se calcula a partir del número de heterocigotos esperados en la población total (H_T), y el promedio de heterocigotos esperados en las diferentes subpoblaciones (H_S). F_{ST} se calcula por medio de la siguiente ecuación:

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

Cuando existe flujo genético limitado entre dos subpoblaciones, los gametos tomados al azar dentro de una subpoblación tendrán con mayor frecuencia alelos que se derivan de un ancestro común, en relación a los gametos en la población total. En este caso, la estadística F_{ST} será positiva. La deriva genética y la selección local de algunos alelos, son factores que provocan que los gametos dentro de una subpoblación estén correlacionados (Black y Tabachnick 1996).

El valor de F_{ST} también se conoce como índice de fijación y se utiliza para medir diferencias entre subpoblaciones. En una población ideal, sin mutación, migración o selección, el valor de F_{ST} puede interpretarse fácilmente en términos de deriva genética, pero la interpretación no es tan sencilla en poblaciones naturales, porque los valores observados de F_{ST} están influenciados no sólo por deriva genética, sino también por mutación y especialmente por migración y selección natural. Sin embargo, las dificultades en la interpretación no invalidan la utilidad del parámetro F_{ST} como índice de diferenciación genética (Shoua 2000)

A pesar que el valor de F_{ST} tiene un mínimo teórico de cero (que indica que no hay divergencia genética) y un máximo teórico de uno (que indica la fijación de alelos en las subpoblaciones), el máximo observado es usualmente mucho menor que uno. Wright sugirió los siguientes alineamientos cualitativos para la interpretación de F_{ST} :

- El rango de 0 a 0.05 puede considerarse como indicador de una diferenciación genética muy pequeña.
- El rango de 0.05 a 0.15 indica diferenciación genética moderada.
- El rango de 0.15 a 0.25 indica diferenciación genética elevada.
- Los valores de F_{ST} mayores de 0.25 indican una diferenciación genética enorme.

La estadística F_{IT} indica la desviación con respecto a la reproducción al azar en la población total, y se calcula con la siguiente fórmula:

$$F_{IT} = (H_T - H_I)/H_T$$

Este parámetro representa la correlación entre los gametos que se unen para producir nuevos individuos, en relación con los gametos en la población total. La estadística F_{IT} es un indicador del grado de cruces entre individuos muy cercanos (Black y Tabachnick 1996).

La estadística F de Wright utilizada para calcular la velocidad de migración es la F_{ST} . La tasa de migración efectiva se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = 1/(1 + 4Nm) \text{ ó } Nm = (1 - F_{ST})/4F_{ST}$$

donde Nm es el número total de individuos que migran de una población a otra, sin importar el tamaño de la población (Black y Tabachnick 1996).

Al incrementar el número de individuos que migran, se obtienen valores bajos de F_{ST} ya que las poblaciones se vuelven genéticamente similares. Se ha determinado que se necesita muy poca migración para mantener la homogeneidad entre las diferentes subpoblaciones. Cuando la velocidad de migración efectiva Nm se aproxima a 10, la estadística F_{ST} se reduce rápidamente a cero, indicando que las subpoblaciones son homogéneas (Black y Tabachnick 1996).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

A. Objetivos

1.General

Estudiar la genética de poblaciones del mosquito *Aedes aegypti* en diferentes regiones de América Central, México, Cuba y República Dominicana.

2.Específicos

- Determinar la variación y comparar la estructura genética que existe entre las poblaciones de los distintos países analizados.
- Estimar la variación genética existente entre las poblaciones de un mismo país, es decir, entre las poblaciones de México (Chiapas y Veracruz), Guatemala (Petén, Zacapa, Escuintla, Guatemala), El Salvador (San Miguel, Ilopango y Soyapango), Nicaragua (Los Novios, San Benito, Tipitapa), Panamá (Puerto Armuelles y Río Abajo), Cuba (Santiago de Cuba, Guanabacoa y la Playa C), y República Dominicana (Villa María, Santa Ana y La Gallera).
- Establecer si existe flujo genético entre las diferentes poblaciones estudiadas.

B.Hipótesis

Las poblaciones de *Aedes aegypti* de las diferentes regiones de México, América Central, Cuba y República Dominicana presentan variaciones genéticas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Colecta de mosquitos

Se trabajó con mosquitos *Aedes aegypti* colectados durante los años 2002 y 2003 en diferentes ciudades endémicas de dengue de México (Chiapas) y América Central (ver Figura 11).

Los países de Centro América con los cuales se trabajó fueron Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Panamá. Además, se incluyeron en este estudio muestras provenientes de República Dominicana y Cuba.

En la tabla 6 se presenta las regiones de colección de los mosquitos y el número de individuos por población.

B. Extracción de ADN

El ADN se extrajo de mosquitos, los cuales fueron colocados individualmente en tubos de 1.5mL con 100µL de buffer de extracción (NaCl 0.1M, Sucrosa 0.2M, Tris-HCl 0.1M, EDTA 0.05M y dodecil sulfato de sodio [SDS] 0.5%, mezcla ajustada a pH 9.2). Los mosquitos fueron completamente macerados con un pistilo. El contenido de cada tubo fue centrifugado levemente e incubado a 65°C por 30min. Luego se agregó a cada tubo 14µL de acetato de potasio 8M, se colocaron en hielo por 30min y se cetrifugaron a velocidad máxima, por 15min, a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante a un segundo tubo de 1.5mL, se agregaron 200µL de etanol frio al 100% y se incubó a temperatura ambiente por 5min. Los tubos fueron centrifugados a 10,000rpm a 4°C por 20 minutos y el precipitado fue lavado con etanol al 70% seguido de un segundo lavado con etanol al 100%. El precipitado fue secado en “SpeeVac” por 8 min y resuspendido en 500µL de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 0.5M, pH 8.0). De esta dilución se tomaron dos alícuotas de trabajo de 50µL cada una. El resto fue almacenado a -20°C con 400µL de etanol al 100% para su posterior uso.

C. Amplificación de DNA

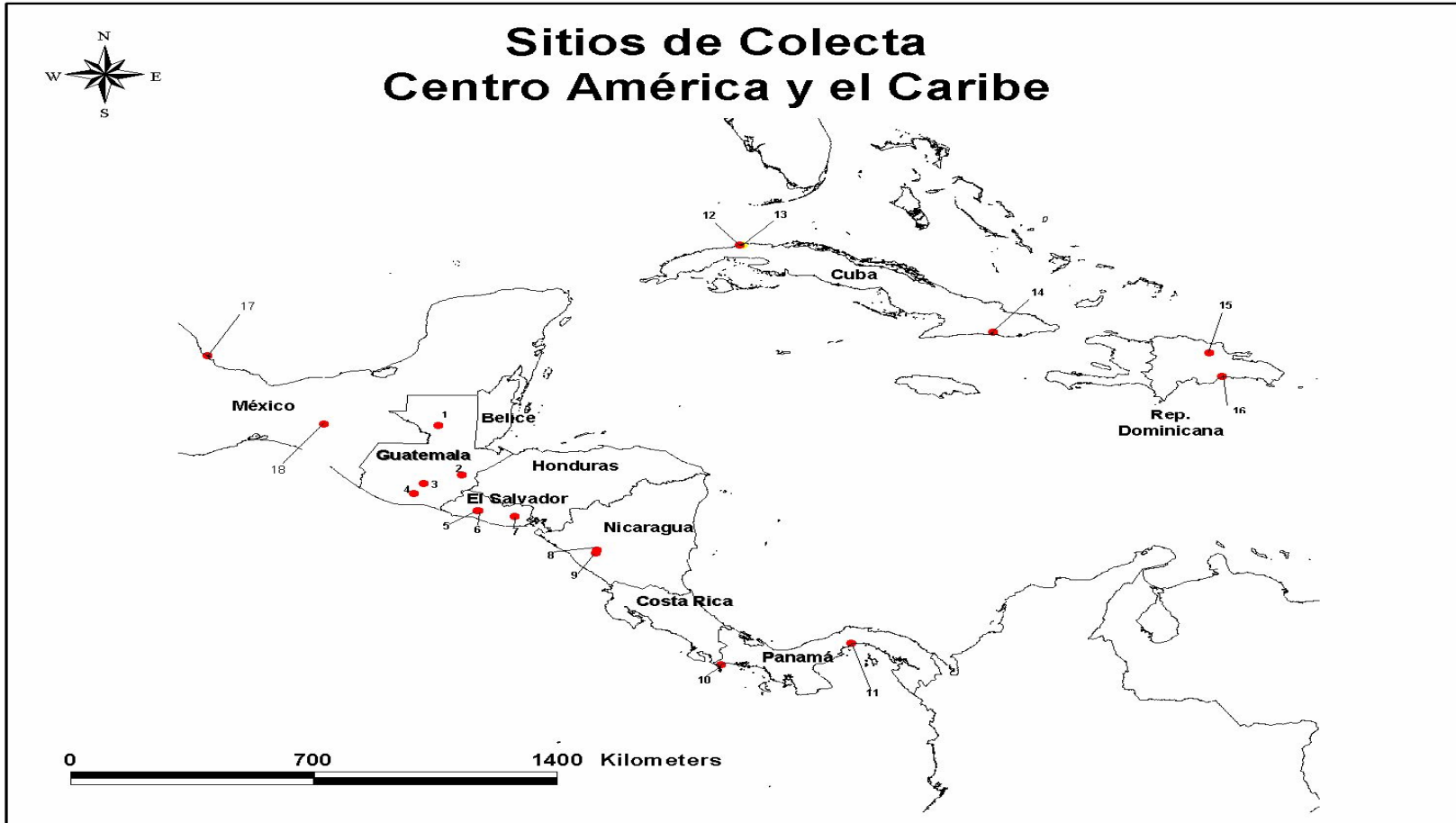
La amplificación de DNA se realizó mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El volumen final de la reacción fue de 50µL, utilizando Buffer 1X, MgCl₂ 3mM, dNTP 20mM, iniciador ND4 500pmol/µL y 1µL de muestra de DNA. Los iniciadores utilizados para amplificar el gen mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 4 fueron ND4+(5' –GTD YAT TTA TGA TTR CCT AA- 3') y ND4- (5' –CCT CGD CTT CCW ADW CGT TC- 3'), donde Y = pirimidina, D = A, G o T y W = A or T.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research) y consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 5min, luego 20min a 80°C donde se adicionó 1 unidad de *Taq* polimerasa.

Tabla 6
Regiones de colección de *Aedes aegypti* y número de individuos trabajados

País y sitio de colección	Fecha de colecta	Número de individuos trabajados	Colectas realizadas por:
Guatemala		232	Dr. Jaime Abraham Juárez
(1) La Sabana, La libertad	11/06/2002	58	
Petén	12/06/2002	58	
(2) Llano de Piedra, Zacapa	28/05/2002	58	
(4) Escuintla	27/05/2002	58	
(3) La Verbena			
El Salvador		174	Dr. Eduardo Romero
(5) Soyapango	Ago/Sept/2002	58	
(6) Ilopango	Ago/Sept/2002	58	
(7) San Miguel	Ago/Sept/2002	58	
Nicaragua		174	Dra. Emperatriz Lugo Villalta
(8) Los Novios	Oct/2002	58	
(8) San Benito	Oct/2002	58	
(9) Tipitapa	Oct/2002	58	
Panamá		116	Dr. Lorenzo Cáceres
(10) Puerto Armuelles	29/01/2003	58	
(11) Río Abajo	Enero/2003	58	
Cuba		174	Dr. Israel García Avila
(12) Playa, Ciudad Habana	15/03/2003	58	
	25/03/2003	58	
(13) Guanabacoa	18/03/2003	58	
(14) Santiago de Cuba	10/04/2003		
	12/05/2003		
	14/05/2003		
República Dominicana		174	Dr. Guillermo González
(15) La Gallera, Dajabón	9/07/2003	58	
(16) Santa Ana	5/09/2003	58	
(16) Villa María	11/07/2003	58	
México		109	Dra. Carmen Martínez
(17) Veracruz	18/03/2003	58	
(18) Tuxtla, Chiapas	Ago/2003	51	

Figura # 11
(Mérida, 2004)



El programa consistió en 1min a 92°C, 1min a 48°C, 2 min a 72°C y 10 ciclos de 1 min a 92°C, seguido de 35segundos a 52°C, 2 min a 72°C y 32 ciclos de 1min a 92°C. La reacción de extensión final ocurrió durante 7min a 72°C y las muestras fueron conservadas a 4°C. Se utilizaron controles negativos (que incluye todos los reactivos y agua como sustituto del ADN) para verificar la ausencia de posibles contaminantes.

D. Electroforesis en gel de agarosa

Se disolvieron 1.92g de agarosa en 160mL de buffer TBE 1X y se agitó constantemente mientras la solución alcanzaba la ebullición. Se dejó enfriar la solución a aprox 50°C, se le agregó 5µL de bromuro de etidio, se vertió en el molde con el peine y se dejó polimerizar por 20 minutos. La cámara de electroforesis fue llenada con 1200mL de buffer TBE 1X, se colocó el gel polimerizado y en cada pozo se cargaron 10µL de producto de PCR mezclado con 2µL de buffer de montaje. En los pozos de los extremos se colocaron 5µL de marcador de tamaño 1Kb (Invitrogen). Se dejaron correr las muestras por una hora a 90V. Las bandas de ADN fueron visualizadas con luz ultravioleta utilizando una cámara fotográfica (Polaroid) de luz UV.

E. Electroforesis en gel de poliacrilamida

1. Preparación del sistema. Se cubrió la placa de vidrio con solución limpiadora "Uncle Bills" (NaOH 10M, SDS 0.2M), se dejó reposar 10 min y se restregó fuertemente con una esponja. Luego se enjuagó con abundante agua corriente y con 8 litros de agua destilada. Se secó la placa y se roció con etanol 70% limpiandola con un kimwipe grande. Se repitió el procedimiento con etanol 95% y se dejó secar por 5 minutos. Sobre la placa se distribuyó uniformemente una solución de Bind Silano (10µl de Bind Silano mezclados a 2mL de etanol 95% con ácido acético 0.5%). Se dejó secar por 5min y se lavó tres veces con etanol 95%.

La placa de vidrio adherida a la cámara superior se restregó conalconox 2% con una esponja suave y se desaguó con abundante agua corriente y agua destilada. Se dejó secar y se limpió con etanol 70% y etanol 95%. Se roció la placa con 2mL de Sigmacote (1mL a la vez), se distribuyó uniformemente sobre la superficie y se dejó secar por 5 minutos. Para ensamblar las dos placas de vidrio ya tratadas se colocaron espaciadores de por medio (0.4mm), se alinearon y se ajustaron con las pinzas.

2. Preparación del gel. Se mezclaron 52 mL de agua destilada, 2.5mL de glicerol, 20mL de TBE 1X y 25.5mL de una solución de acrilamida / bis al 30%. Se degasificó la solución por 30 minutos filtrandola al vacío a través de dos filtros Whatman #1. Se preparó una solución de persulfato de amonio (APS), agregando

250µL de agua destilada a 62.5mg de APS. A la solución de acrilamida se le agregó 95µL de APS y 95µL de TEMED, se agitó y se inyectó en las placas evitando la formación de burbujas. Rápidamente se colocó el lado del revés de un peine de 0.4mm para hacer un solo pozo en la parte superior del gel. Se dejó polimerizar el gel por dos horas.

3. Montaje del gel. Se preparó 2L de TBE 1X, colocando 500mL en la base del sistema y 1,100mL en la cámara superior del gel. Se sacó el peine, y se colocó nuevamente empujándolo con los dientes hacia abajo hasta apenas pinchar el gel. Se ajustó el peine con clips metálicos. El producto de PCR (6µL de 50µL) fue mezclado con 4µL de buffer de montaje (NaOH 1M, formamida 95%, azul de bromofenol 0.05% y xileno cianol 0.05%) y se calentó a 95°C por 5 minutos en el termociclador. Inmediatamente fue colocado en hielo por 5 minutos y 6µL de la muestra se colocaron directamente en el gel. En los extremos y parte media del gel se colocaron 2µL de marcador de tamaño 1Kb. Se removieron los clips metálicos, se conectaron los electrodos y se dejó correr el gel a amperaje constante (15mA) y a temperatura ambiente por 20 horas (toda la noche).

4. Tinción del gel. Los fragmentos de DNA migrados en el gel fueron visualizados por medio de una tinción con nitrato de plata. Al finalizar la corrida del gel, éste se colocó en 2L de ácido acético 10% con agitación suave por 30 minutos. Se hicieron 3 lavados con 2L de agua destilada cada uno y con agitación moderada por 2 min. Posteriormente se preparó una solución de nitrato de plata 0.1% (2L) con 3mL de formaldehído 37%, donde se colocó el gel por 30 minutos con agitación constante. Se descartó la solución de plata y se lavó por 10 seg con 2L de agua destilada. Inmediatamente se sumergió el gel en una solución reveladora fría (Na₂CO₃ 3% en 2L de agua destilada + 3mL de formaldehído 37% y 40µL de tiosulfato de sodio, elaborado con 90mg en 200µL de agua destilada) con agitación fuerte hasta la aparición de bandas color gris intenso. Esta reacción de revelado se neutralizó con una solución de ácido acético 10%. Se agitó suavemente el gel hasta que la reacción entre el ácido acético y el carbonato de sodio cesara. Esta solución se desechó y se lavó el gel con 2L de agua destilada con agitación constante por 20 minutos.

5. Lectura del gel. Se dejó secar completamente el gel y se rotuló en la parte superior, colocando fecha de corrida del gel, nombre de la población y a que muestra pertenecía cada pozo. Al marcador de tamaño se le asignó el valor de pares de bases de cada banda. Posteriormente se puso el gel sobre una fuente continua de luz blanca para visualizar bien las bandas de DNA. Se analizó el número y la posición de bandas de cada muestra y se determinaron los haplotipos de cada población. Para determinar con precisión los diferentes haplotipos, se realizaron pruebas preliminares, donde se determinaron exactamente seis haplotipos diferentes, los cuales fueron usados como controles de referencia en cada gel preparado, para hacer el análisis de bandas.

F. Purificación del ADN

Para la purificación del ADN se utilizó el kit de Promega “Wizard PCR Preps DNA purification System, Cat No. A7170”.

Se utilizaron tubos ependorf (3 por cada muestra) de 1.5ml, jeringas, embolos y minicolumnas, los cuales fueron debidamente rotulados. Se colocaron 100µl de “Direct Purification Buffer” en tubos de 1.5ml. Se agregaron 40µl de producto de PCR, 1ml de resina y se agitaron tres veces a lo largo de un minuto. Se unieron las jeringas a las minicolumnas y se les agregó la mezcla de buffer, PCR y resina. Se introdujo cuidadosamente el émbolo y se oprimió para eluir el buffer. Posteriormente se lavaron las minicolumnas con 2ml de isopropanol 80% frío. Se removieron las minicolumnas y se colocaron en un tubo no marcado. Se centrifugaron las minicolumnas por 2min a 14,000xg para secar la resina. Se transfirieron las minicolumnas a un tubo nuevo debidamente rotulado, se les agregó 50µl de ddH₂O y se dejaron incubando por un minuto. Se volvieron a centrifugar por 20seg a 14,000xg, para eluir el ADN. Se removieron las minicolumnas y los tubos con el ADN purificado fueron almacenados a 4°C, para luego ser enviados a secuenciar. Se purificaron 36 muestras en total.

G. Análisis de datos

Los haplotipos encontrados y el número de muestra de cada población se ingresaron en una hoja de Microsoft Excel donde se determinaron las frecuencias.

La variación en la frecuencia de los haplotipos fue examinada con el programa Arlequin 2.0, donde se analizó la varianza molecular (AMOVA). El programa Arlequin 2.0 también se utilizó para determinar F_{ST} entre todas las poblaciones y entre pares de poblaciones. Finalmente, las secuencias de ND4 fueron manualmente alineadas de acuerdo a sus codones y se determinó la relación filogenética entre los haplotipos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Frecuencias de los haplotipos de ADN mitocondrial

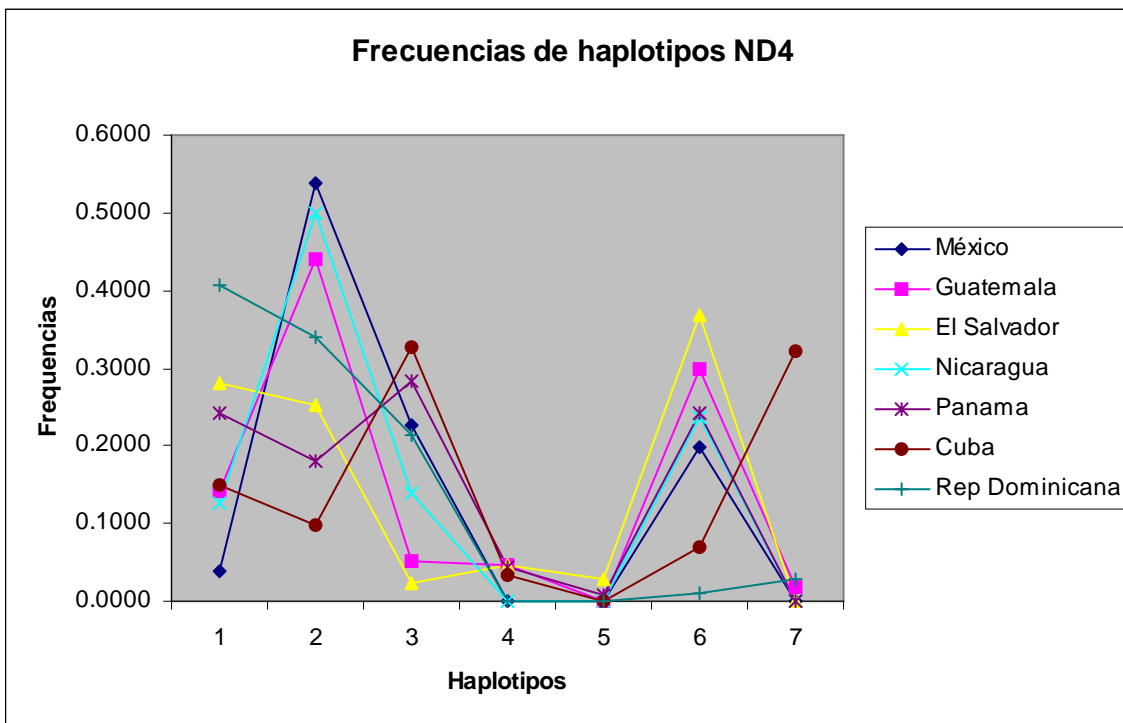
Se analizó ADN mitocondrial de 1,153 mosquitos *Aedes aegypti* por medio de geles de SSCP y se encontraron 7 haplotipos diferentes.

Para determinar el número exacto de haplotipos, se secuenciaron 3 muestras de cada haplotipo encontrado y se compararon con las secuencias encontradas en un estudio realizado en México (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000).

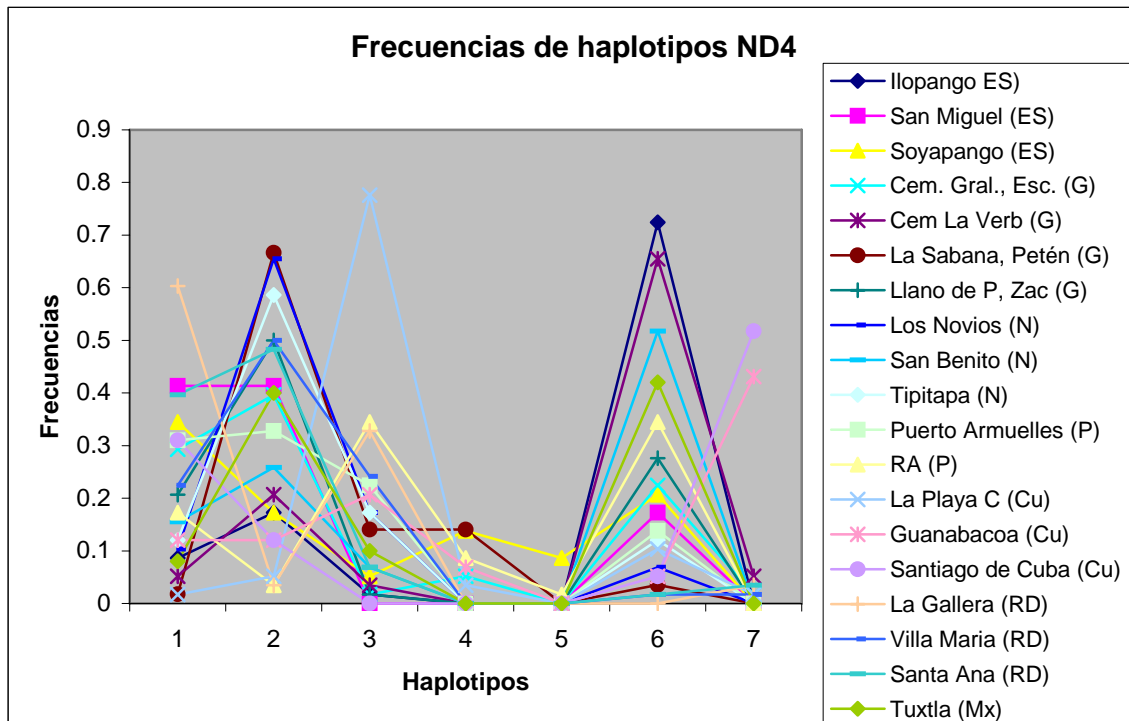
El análisis de las secuencias de los haplotipos encontrados demostró que la técnica de SSCP es específica y reproducible. Además, también se confirmó que esta técnica es muy sensible inclusive para sustituciones de una sola base, ya que se encontró que los haplotipos 5 y 6 difieren por una sola base nitrogenada, C-T, donde ocurre una transición en la posición 73. Los haplotipos 1 y 2 difieren por dos bases nitrogenadas, una transición en la posición 217 (A-G) y una transversión (T-G) en la posición 271.

Se analizó la frecuencia de haplotipos por país (Gráficas 1 y 2), y se determinó que fue similar en la mayoría de ciudades de Centroamérica y México mientras que Cuba y República Dominicana sí presentaron ciertas diferencias.

Gráfica # 1. Frecuencias de los haplotipos de la subunidad 4 de NADH deshidrogenasa (ND4) de *Aedes aegypti* agrupados por país.



Gráfica # 2. Comparación de las frecuencias de haplotipos ND4 agrupados por ciudad.

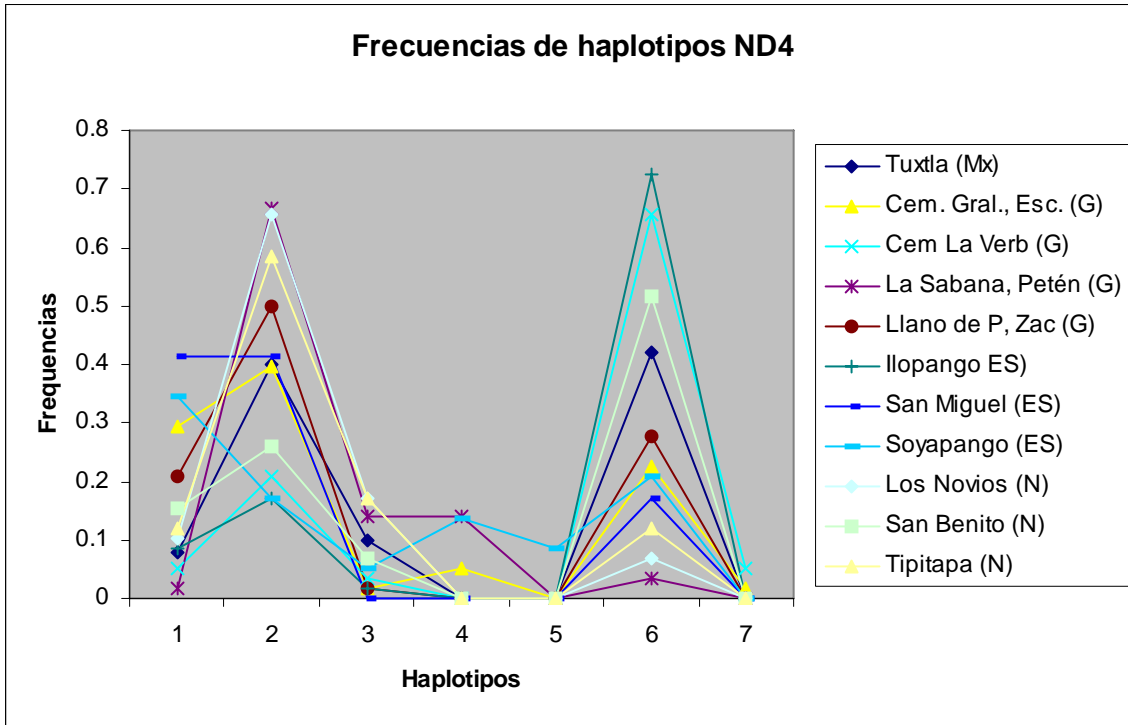


En la gráfica # 3 se encuentran las frecuencias de los haplotipos de Chiapas, y las ciudades de Guatemala, El Salvador, y Nicaragua, donde se puede observar muy poca variación entre las poblaciones entre los países centroamericanos y la ciudad de Chiapas.

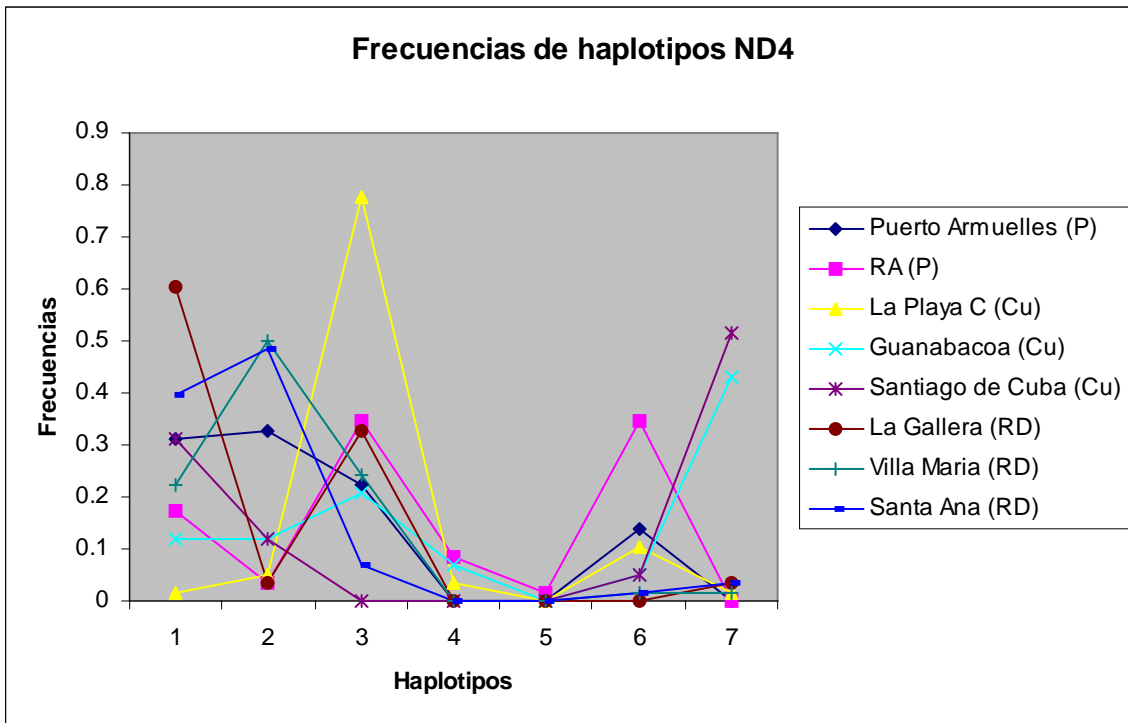
Se compararon las frecuencias de los haplotipos de las poblaciones de Panamá, Cuba y República Dominicana, donde se observa algunas diferencias entre estas poblaciones. También se pueden apreciar ciertas diferencias no sólo entre los países de Cuba y República Dominicana sino entre las mismas ciudades de cada país. (Gráfica 4).

El análisis de frecuencias muestra que las poblaciones de Centroamérica y Chiapas son genéticamente similares. Estos resultados sugieren que la separación geográfica entre las poblaciones no está sirviendo de barrera genética, permitiendo el flujo de genes. Sin embargo, las diferencias genéticas que se encontraron entre las poblaciones de Panamá y las islas de Caribe sugieren que la separación geográfica sí funciona como una barrera genética.

Gráfica # 3. Comparación de las frecuencias de haplotipos ND4 entre las ciudades de Guatemala, El Salvador, Nicaragua y México.



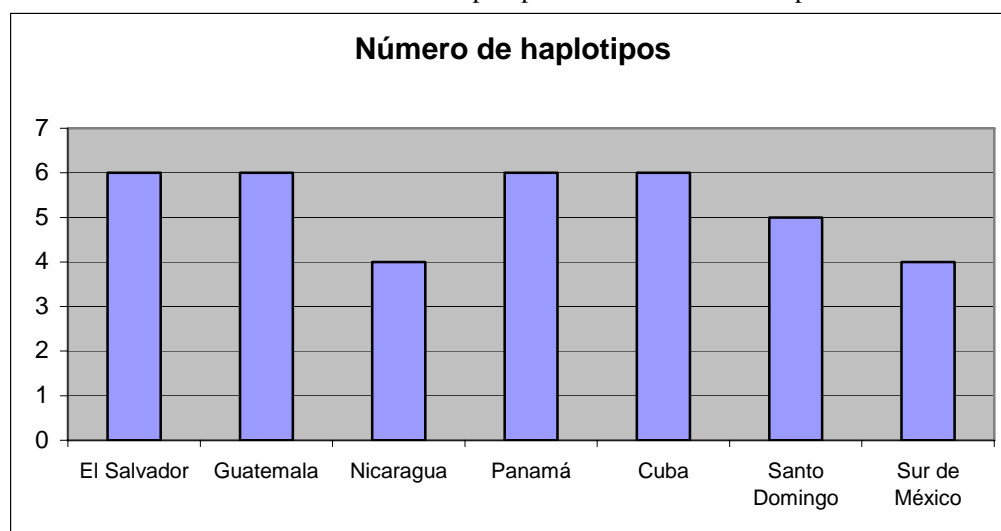
Gráfica # 4. Frecuencias de haplotipos ND4 entre las ciudades de Cuba y República Dominicana.



También, se determinó el número de haplotipos en cada país estudiado (Gráfica 5). El Salvador, Guatemala, Panamá y Cuba tienen 6 haplotipos circulando, mientras que República Dominicana tiene 5 haplotipos y Nicaragua y el Sur de México sólo presentan 4 haplotipos en circulación.

En los haplotipos encontrados en cada país se pudo observar que los haplotipos 2 y 6 fueron los más frecuentes en México y América Central; los haplotipos 3 y 7 fueron los más frecuentes en Cuba y el haplotipo 1 fue el más frecuente en República Dominicana. (Gráficas 1 y 2). No se encontró ningún haplotipo que fuera único para alguna región.

Gráfica # 5. Número de haplotipos encontrados en cada país.



B. Análisis estadístico AMOVA

La variación en la frecuencia de haplotipos dentro y entre las poblaciones estudiadas fue determinada usando análisis de varianza molecular (AMOVA), con el programa Arlequin 2.0. Para hacer este análisis se dividieron las poblaciones en varios grupos. Inicialmente se compararon las poblaciones de Chiapas y Centroamérica, luego se compararon las poblaciones de Cuba y República Dominicana y finalmente se compararon las poblaciones centroamericanas *versus* las poblaciones del caribe.

Para hacer el análisis de varianza molecular entre México y Centroamérica se hicieron cinco grupos, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla # 7

Distribución de los grupos analizados por AMOVA para poblaciones de México y Centroamérica

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
1. Tuxtla	1. Cementerio General Escuintla 2. Cementerio La Verbena 3. La Sabana Petén 4. Llano de Piedra, Zacapa	1. San Miguel 2. Ilopango 3. Soyapango	1. Los Novios 2. San Benito 3. Tipitapa	1. Puerto Armuelles 2. Río Abajo

En la tabla # 8 se presentan los resultados para el análisis de varianza AMOVA entre México y Centroamérica. Estos resultados muestran que existe un porcentaje de variación mucho mayor entre los individuos dentro de una población (84.07%), que entre las poblaciones de un mismo grupo (15.99) y entre los cinco grupos analizados (0.06%).

Tabla #8.

Análisis de varianza AMOVA para las poblaciones de México y Centroamérica

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	4	14.570	-0.00021 Va	-0.06
Entre poblaciones dentro de grupos	9	33.257	0.05886 Vb	15.99
Dentro de poblaciones	790	244.456	0.30944 Vc	84.07
Total	803	292.282	0.36808	

El programa Arlequín 2.0 también se utilizó para determinar el índice de fijación de Wright. El valor del índice de fijación total (Fst) para las poblaciones de México y Centroamérica fue de 0.15933 (tabla 9), que indica una diferencia genética moderada. El índice de fijación total corresponde a la heterocigocidad de una subpoblación comparada contra la heterocigocidad total.

Tabla # 9

Indice de fijación Wright para las poblaciones de México y Centroamérica

Fsc (F_{IS})	0.15982
Fst	0.15933
Fct (F_{IT})	-0.00058

Para el análisis de varianza molecular entre las poblaciones de Cuba y República Dominicana se formaron dos grupos, como se presenta en la siguiente tabla:

Tabla # 10

Distribución de los grupos analizados por AMOVA para poblaciones de Cuba y República Dominicana

Grupo 1	Grupo 2
1. La Playa	1. La Gallera
2. Guanabacoa	2. Villa María
3. Santiago de Cuba	3. Santa Ana

El análisis AMOVA para Cuba y República Dominicana (Tabla 11) mostró que existe un porcentaje de variación elevado entre los individuos dentro de una población (71.99%), sin embargo el porcentaje de variación entre las poblaciones de un mismo grupo también es significativo (21.87%).

Tabla # 11

Análisis de varianza AMOVA para las poblaciones de Cuba y República Dominicana

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	9.951	0.02537 Va	6.14
Entre poblaciones dentro de grupos	4	22.149	0.09034 Vb	21.87
Dentro de poblaciones	342	101.707	0.29739 Vc	71.99
Total	347	133.807	0.41310	

En la tabla # 12 se presenta el índice de fijación de Wright para las poblaciones de Cuba y República Dominicana. Este índice de fijación muestra que existe una diferencia genética alta (0.28010).

Tabla # 12

Indices de fijación de Wright para las poblaciones de Cuba y República Dominicana

Fsc (F_{IS})	0.23301
Fst	0.28010
Fct (F_{IT})	0.06141

Finalmente, se hizo el análisis de AMOVA entre las poblaciones de Centroamérica, Chiapas y El Caribe, donde se formaron dos grupos para hacer el análisis (Tabla 13)

Tabla # 13

Distribución de los grupos analizados por AMOVA para poblaciones de Centroamérica, Chiapas y El Caribe

Grupo 1	Grupo 2
1. Tuxtla	1. La Playa
2. Cementerio General Escuintla	2. Guanabacoa
3. Cementerio La Verbena	3. Santiago de Cuba
4. La Sabana, Petén	4. La Gallera
5. Llano de Piedra, Zacapa	5. Villa María
6. San Miguel	6. Santa Ana
7. Ilopango	
8. Soyapango	
9. Los Novios	
10. San Benito	
11. Tipitapa	
12. Puerto Armuelles	
13. Río Abajo	

En la tabla 14 se muestran los resultados de AMOVA entre Chiapas, Centroamérica y El Caribe. Estos resultados indican que los individuos dentro de una población presentan mayor variación (75.40%) comparado con la variación entre las poblaciones de un mismo grupo (17.70%) y entre los dos grupos (6.90%).

Tabla # 14

Análisis de varianza AMOVA entre las poblaciones de México, Centroamérica y el Caribe.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	18.051	0.02798 Va	6.90
Entre poblaciones dentro de grupos	18	79.927	0.07180 Vb	17.70
Dentro de poblaciones	1132	346.163	0.30580 Vc	75.40
Total	1151	444.141	0.40558	

El índice de fijación total para estas poblaciones fue de 0.24602 (tabla 15), lo que indica una diferencia genética moderada entre las poblaciones.

Tabla # 15

Indices de fijación de Wright para las poblaciones de México, Centroamérica y el Caribe

Fsc (F_{IS})	0.19015
Fst	0.24602
Fct (F_{IT})	0.06899

El análisis de varianza AMOVA confirmó los resultados obtenidos con las frecuencias de los haplotipos ya que se determinó que las poblaciones de Centroamérica y Chiapas son genéticamente similares, mientras que las poblaciones de Cuba y República Dominicana sí presentan una diferencia genética moderada. Esta diferencia genética sugiere que el mar caribe podría estar sirviendo de una verdadera barrera genética para el flujo de genes (Figura 11).

Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio realizado en México, donde también se encontraron 7 haplotipos utilizando como marcador molecular ADN mitocondrial (ND4), y además se detectó que no hay aislamiento por distancia entre las poblaciones de la costa nororiente de México (Gorochotegui-Escalante *et al.*, 2000).

Las similitudes genéticas entre las poblaciones estudiadas puede deberse al gran incremento de rutas comerciales donde pueden transportarse huevos o larvas de *Aedes aegypti*; la deriva genética y los ambientes áridos también contribuyen a reducir el aislamiento genético entre poblaciones.

Además, las similitudes genéticas entre las poblaciones de *Aedes* pueden deberse al efecto de “cuello de botella” (bottleneck effect). Este fenómeno se debe a la presencia de ambientes áridos y a constantes fumigaciones. Estos efectos de botella se ven frecuentemente en algunos países latinoamericanos, ya que además de poseer algunas regiones áridas, se hacen aplicaciones constantes de insecticidas donde se reportan altas infestaciones de mosquitos, reduciendo así temporalmente las poblaciones de *Aedes*, hasta que se reporte una nueva proliferación de mosquitos.

Este ciclo de fumigaciones es el que se mantiene debido principalmente al deterioro de los programas de control de *Aedes aegypti*.

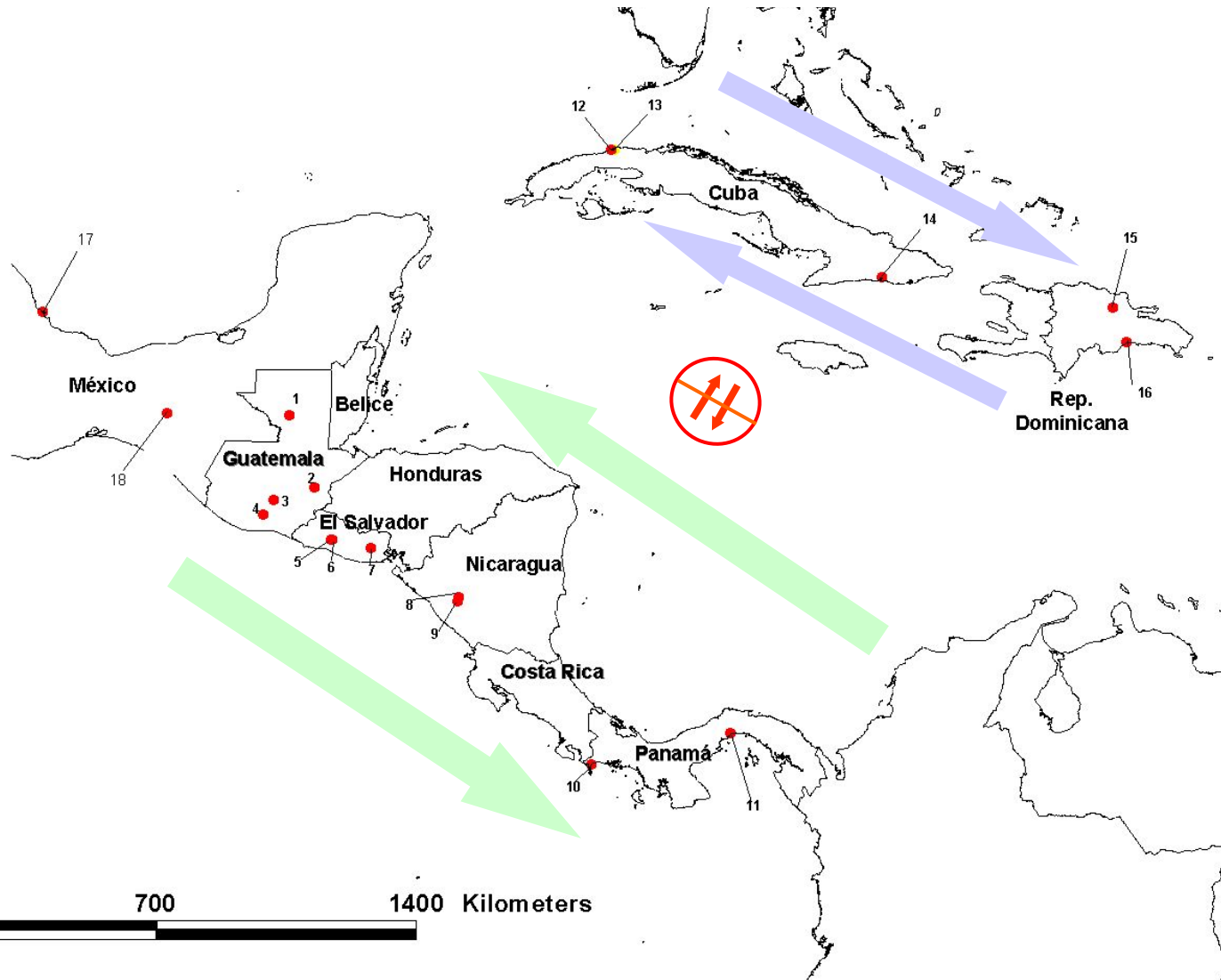
También, otro factor que contribuye a producir poblaciones genéticamente similares es el incremento de migraciones humanas, ya que el aumento de estas migraciones determinan el tráfico de microorganismos entre regiones, países y continentes.

Debido a que las poblaciones de Centroamérica y Chiapas son genéticamente uniformes, se sugiere que en ausencia de selección local, los genes responsables de la susceptibilidad al virus del dengue y/o de la resistencia a insecticidas, podrían mantenerse uniformes en frecuencia.



Figura # 12

Flujo genético entre las poblaciones de *Aedes aegypti*



Además, la liberación de los mosquitos transgénicos hacia las poblaciones podrían dispersarse rápidamente dentro de éstas.

El comprender los patrones de dispersión del mosquito *Aedes aegypti* es importante para el desarrollo de estrategias de control efectivas y para la predicción de epimias de dengue.

C.Análisis filogenético

Los patrones de variación en las frecuencias de haplotipos de ADN mitocondrial que fueron usadas para estimar el flujo genético, también permiten determinar la relación filogenética entre y dentro de las poblaciones de *Aedes aegypti* debido a que el ADN mitocondrial es maternalmente heredado y no se recombina, por lo que cuando se colectan las secuencias de datos estas propiedades del ADNm permiten hacer una análisis filogenético del linaje materno.

Para llevar a cabo el análisis filogenético, las secuencias de los haplotipos de ND4 de *Aedes aegypti* fueron manualmente alineadas con las regiones homólogas de *An.gambiae* y *An. Quadrimaculatus*.

El análisis filogenético mostró tres haplotipos ancestrales (1,2 y 4). También, se determinó que los haplotipos 6 y 7 parecen ser los más recientes. La existencia de estos linajes maternos en *Aedes aegypti* probablemente refleja la existencia de distintos linajes maternos dentro de la especie.

Figura # 13. Relación filogenética entre los haplotipos ND4

VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de siete diferentes haplotipos ND4 de *Aedes aegypti* en las poblaciones estudiadas.
2. No se encontró ningún haplotipo que fuera único para alguna región estudiada.
3. Las poblaciones de *Aedes aegypti* de las diferentes regiones de América Central y Chiapas no presentan variaciones genéticas significativas, mientras que las poblaciones de Cuba y República Dominicana presentan variaciones genéticas moderadas.
4. Existe flujo genético entre las poblaciones de Centroamérica y Chiapas.
5. Se identificó, con el análisis filogenético, la presencia de 3 haplotipos ancestrales (1, 2 y 4).
6. Los resultados de este estudio son consistentes con los resultados obtenidos por Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000 en un estudio de genética de poblaciones de *Aedes aegypti* en la costa nororiente de México.

VII. RECOMENDACIONES

1. Determinar y comparar la competencia vectorial y la resistencias a insecticidas de *Aedes aegypti* en las poblaciones estudiadas.
2. Se recomienda comparar las poblaciones estudiadas con poblaciones de *Aedes aegypti* de Costa Rica para determinar si existe flujo genético en este país, ya que en un estudio realizado previamente (Molina *et al.*, 2004) en donde se analizó la genética de poblaciones de *An. Albimanus*, utilizando ADN mitocondrial como marcador molecular, se encontró que las poblaciones de Costa Rica difieren del resto de poblaciones de Centroamérica.

VIII. FUENTES CITADAS

- Anagnostakos, N., Tortora, G. 1991. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 6a.ed. Harla. México. 1206pp.
- Beaty, J., Marquardt, W. 1996. *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado. USA. 632pp.
- Black, W., Duteau, N. 1997. *RAPD-PCR and SSCP analysis for Insect Population Genetics Studies* In Molecular Biology of Insect Disease Vectors & Methods Manual. By (J. Crampton, C. Beard, C. Louis). USA. Chapman & Hall. 1997. 45-48pp
- Black, W., Tabachnick, W. 1996. *Population Genetics in Vector Biology*. In The biology of disease vectors. By (J. Beaty, W. Marquardt). University Press of Colorado. USA. 632pp.
- Brown, T. 2001. *Gene Cloning and DNA analysis. An introduction*. 4a.ed. Blackwell Science. USA. 363pp.
- Calisher, C. 2005. *Persistent Emergence of Dengue*. Emerging Infectious Diseases. 11(5): 738-739 pp.
- CDC. «Information on dengue fever & dengue hemorrhagic fever». 1997.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue.htm>. [Consulta: 26 junio 2004]
- Cummings, M., Klug, W. 2000. *Concepts of Genetics*. 6a.ed. Prentice Hall. USA. 816pp.
- Dorland. 1988. *Diccionario enciclopédico ilustrado de medicina*. 2a.ed. Interamericana. México, D.F. 567pp.
- García-Franco, F., Muñoz, M.L., Lozano-Fuentes, S., Fernández-Salas, I., García-Rejón, J., Beaty, J., Black, W. 2002 *Large genetic distances among Aedes aegypti populations along the South Pacific coast of Mexico*. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 6(5): 594-598 pp.
- Gorochotegui-Escalante, N., Muñoz, M., Fernández-Salas, I., Beaty, J., Black, W. 2000. *Genetic isolation by distance among Aedes aegypti populations along the northeastern coast of Mexico*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 62(2): 200-209 pp.
- Gorochotegui-Escalante, N., Gomez-Machorro, C., Lozano-Fuentes, S., Fernández-Salas, I., Muñoz, M., Farfan-Ale, J., García-Rejón, J., Beaty, J., Black, W. 2002 *Breeding structure of Aedes aegypti in Mexico varies by region*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 66(2): 213-222pp.
- Grantham, R. *Mosquitoes*. 2006. <http://www.ento.okstate.edu/mosquito/lifecycle.html>.
- Gubler, D. 1989. *Aedes aegypti and Aedes aegypti-borne disease control in the 1990s: top down or Bottom up*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 40(2): 571-578pp.
- Gubler, D., Trent, D. 1993. *Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public Health problem in the Americas*. Infect Agents Disease. 2(6): 383-393 pp.
- Gubler, D. 1998. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. Clinical Microbiology Reviews. 11(3); 480-496 pp.
- Hartl, D., Jones, E. 2002. *Essential Genetics: a genomics perspective*. 3a.ed. Jones and Bartlett Publishers. USA. 613pp.
- Lechuga, D., Flores, R., Solís, E. 1998. *Manual de prevención y control del dengue*. Publicación INCAP MDE/103. Guatemala. 22pp

- Loroño-Pino, M., Cropp, C., Farfán, J., Vorndam, A., Rodríguez-Angulo, E., Rosado-Paredes, E. Flores-Flores, L., Beaty, B., Gubler, D. 1999. *Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 61(5): 725-730 pp.
- Luft, P. «Mosquitoes and dengue». 1996. <http://www.biohaven.com/dengue.htm>.
- Mérida, A.M., Palmieri, M., Yurrita, M., Molina, A., Molina, E., Black, W. 1999. *Mitochondrial DNA variation among Anopheles albimanus populations*. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 61(2). 230-239 pp.
- Ministerio de Salud Pública. 2004. *Situación de los Principales Eventos de Vigilancia Epidemiológica*. La Semana Epidemiológica en Guatemala. 360(48): 1-9 pp.
- Molina-Cruz, A., Mérida, A.M., Mills, K., Rodríguez, F., Schoua, C., Yurrita, M., Molina, E., Palmieri, M., Black, W. 2004. *Gene flow among Anopheles albimanus populations in Central America, South America, and the Caribbean assessed by microsatellites and mitochondrial DNA*. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 71(3): 350-359 pp.
- Monath, T. 1994. *Dengue: The risk to developed and developing countries*. Public Health/ International aspects. 91: 2395-2400 pp.
- Montengro, J.L. 2004. Ministerio de Salud Pública: Programa de Vectores. Comunicación personal.
- Muñiz, C., Molina, E., Villagrán, C., Torres, O. 1998. *Obtención de antígeno de dengue*. Revista del Colegio de Médicos de Guatemala. 8(3): 5-7 pp.
- Murray, P., Dew, W., Kobayashi, G., Thompson, J. 1992. *Microbiología Médica*. Mosby. España. 430pp.
- Organización Panamericana de la Salud. 1995. *Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control*. Publicación científica 548: 1-39 pp.
- Organización Panamericana de la salud. 2000. *As dengue epidemics continue, PAHO urges preventive efforts*. <http://www.paho.org/English/DPI/press.001019.htm>.
- Organización Panamericana de la salud. 2000. *Dengue in the Americas: The Epidemics of 2000*. Epidemiological Bulletin 21(4): 1-8 pp.
- Schoua, C. 2000. *Estudio genético de poblaciones del mosquito Anopheles albimanus mediante secuencias microsatélites*. Trabajo de graduación para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 106 pp.
- Smith, C., Tom, T., Sasaki, J., Ayers, T., Effler, P. 2005. *Dengue Risk among Visitors to Hawaii during an Outbreak*. Emerging Infectious Diseases. 11(5): 750-756 pp.
- Tabachnick, W., Black, W. 1995. *Making a case for Molecular Population Genetic Studies of Arthropod Vectors*. Parasitology Today. 11(1): 27-30 pp.
- Tabachnick, W., Wallis, G., Aitken, T., Miller, B., Amato, G., Lorenz, L., Powell, J., Beaty, B. 1979 *A world wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito Aedes aegypti*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 34(6): 215-229 pp.

- Tardieux, I., Poupel, O., Lapchin, L., and Rodhain, F. 1990. *Variation among strains of Aedes aegypti in susceptibility to oral infection with dengue virus type 2*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 43: 308-313 pp.
- Universidad de San Carlos de Guatemala. 1994. *Caracterización epidemiológica del dengue en áreas endémicas de Guatemala*. Centro de investigaciones de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala. 1-22 pp.
- Villee, C., et al. 1996. *Biología*. 4ª.ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 1305 pp.
- White, D., Fenner, F. 1994. *Medical Virology*. 4a.ed. Academic Press. USA. 603 pp.
- World Health Organization. 1997. *Dengue Hemorrhagic Fever: Diagnosis, treatment, prevention and control*. 2a.ed. WHO Library. Geneva. 1-84 pp.

APÉNDICES

APÉNDICE A

Glosario

Choque: estado fisiológico anormal que constituye la primera fase de la reacción del organismo frente a una lesión traumática. Los signos clínicos más frecuentes son reducción del gasto cardíaco, insuficiencia circulatoria, taquicardia, hipotensión, inquietud, palidez y disminución de la diuresis (Mosby, 1995).

Cianosis circunoral: coloración azulada de la piel alrededor de la boca debida al exceso de hemoglobina no oxigenada en la sangre o a un defecto estructural de la molécula de hemoglobina (Mosby, 1995).

Cuello de botella (efecto de): Reducción del pool genético de una población acompañado de cambios en la frecuencia genética, producido cuando algunos miembros de la población sobreviven a la eliminación de la especie. (Encyclopedia of Science, 2004).

Deriva genética: Cambio aleatorio en la frecuencia alélica en una pequeña población reproductiva (Villem *et al.*, 1996)

Disemina: esparcido o extendido por una zona muy amplia (Dorland, 1988).

Endémica: Una enfermedad de morbilidad baja que se presenta constantemente en una comunidad (Dorland, 1988).

Endogamia: Apareamiento de individuos genéticamente similares. La homocigosidad aumenta con cada generación endogámica sucesiva (Villem *et al.*, 1996).

Enfermedad bifásica: padecimiento que tiene dos fases, partes, aspectos o estadios (Mosby, 1995).

Epidemiología: rama de la medicina que se relaciona con la frecuencia y distribución de las enfermedades en las poblaciones humanas (Anagnostakos *et al.*, 1993).

Extravasación: paso o escape hacia los tejidos de un líquido, generalmente sangre, suero o linfa (Mosby, 1995).

Haplotipo: Es una combinación particular de alelos en una región definida de algún cromosoma, es un genotipo en miniatura (Lewin, 2000).

Hematocrito: medida del volumen de la fracción de hematíes de la sangre expresado como porcentaje de volumen sanguíneo total. Los márgenes normales del hematocrito son del 43 al 49% en el hombre, y del 37 al 43% en la mujer (Mosby, 1995).

Hemoconcentración: disminución del contenido líquido de la sangre, con aumento resultante en la concentración (Dorland, 1988).

Hepatomegalia: aumento del tamaño del hígado que suele deberse a una enfermedad del mismo (Mosby, 1995).

Iniciador: Es un pequeño fragmento de ARN o ADN simple hebra que forma pares de bases con una hebra patrón y actúa como punto de inicio para la síntesis de la hebra complementaria dirigida por la ADN polimerasa. **Primer** en inglés (Brown, 2001).

Linfoadenopatía: trastorno inflamatorio de los ganglios linfáticos. Los ganglios pueden encontrarse aumentados de tamaño, duros, con superficie lisa o irregular y calientes; la piel que los recubre está a veces enrojecida (Mosby, 1995).

Palpos: órganos táctiles de los crustáceos o insectos (Villemet *et al.*, 1996).

Patogénesis: el surgimiento o desarrollo de una enfermedad o un estado mórbido (Anagnostakos *et al.*, 1993).

Polimorfismo: Diferencias en la secuencia de ADN entre individuos. Variaciones genéticas en una población mayores al 1%, que se consideran útiles para mapeo genético (Cummings, 2000).

Síndrome: complejo de signos y síntomas resultantes de una causa común o que aparecen en combinación como expresión del cuadro clínico de una enfermedad o de una alteración hereditaria (Mosby, 1995).

Reservorio: Organismo en el que se reproducen virus, bacterias o parásitos y que generalmente no es afectado por éstos (Dorland, 1988).

Respuesta anamnésica: formación acelerada o más intensa de anticuerpos con una exposición a un antígeno subsecuente a la inicial (Anagnostakos *et al.*, 1993).

Torniquete: aparato utilizado en el control de la hemorragia. Consiste en una banda ancha constrictora aplicada en el extremo proximal de la zona de hemorragia. Su uso es una medida drástica y sólo debe recurrirse al mismo en el caso de hemorragias que comprometan la vida o cuando otras medidas hayan demostrado ser ineficientes (Mosby, 1995).

Transovárica: Se refiere a la transmisión de agentes patógenos desde el organismo materno por invasión del ovario e infección de los óvulos, a individuos de la siguiente generación, como puede suceder en infecciones de los artrópodos (Dorland, 1988)

Venipuntura: técnica que consiste en puncionar transcutáneamente una vena con una aguja de acero unida a una jeringa o un catéter, o con un estilete rígido y agudo. El objeto del procedimiento es extraer una muestra de sangre, realizar una flebotomía, administrar una medicación o una infusión intravenosa o inyectar una sustancia radioopaca (Mosby, 1995).

APÉNDICE B

Secuencias de haplotipos encontrados

APÉNDICE C

Ejemplos de Gel SSCP después de tinción con nitrato de plata
(Acrilamida 7.5%-Glicerol 2.5%)

APÉNDICE D

Tablas del número de casos reportados de dengue y
Dengue hemorrágico en América y el Caribe, por ciudad.

(PAHO, 2003)

Tablas del número de casos reportados de dengue y
Dengue hemorrágico en las Américas, por ciudad.
(PAHO, 2003)

Tablas del número de casos reportados de dengue y
Dengue hemorrágico en las Américas, por ciudad.
(PAHO, 2003)

Tablas del número de casos reportados de dengue y
Dengue hemorrágico en las Américas, por ciudad.
(PAHO, 2004)

Tablas del número de casos reportados de dengue y
Dengue hemorrágico en las Américas, por ciudad.
(PAHO, 2004)

Tablas del número de casos reportados de dengue y
Dengue hemorrágico en las Américas, por ciudad.
(PAHO, 2004)

