

I. INTRODUCCIÓN

Aedes aegypti es el vector más importante del virus de dengue a nivel mundial. Se han realizado estudios acerca de los factores ambientales y los componentes genéticos de *A. aegypti* que podrían controlar la transmisión del virus de dengue. La ingestión de sangre por el mosquito hembra, *A. aegypti*, induce la síntesis de dos tripsinas en el intestino: tripsina temprana y tripsina tardía. La tripsina temprana es una proteasa específica del intestino de la hembra de *A. aegypti* que se sintetiza durante las primeras horas que siguen a la ingestión de sangre. Esta enzima juega un papel esencial en la activación transcripcional de la tripsina tardía. Fernando Noriega, *et al.* secuenciaron el gen de tripsina temprana en 1996. Estos investigadores demostraron que dicho gen contiene un intrón de 64 nucleótidos. En los estudios realizados por William C. Black IV, *et al.* se demostró que la inhibición de las tripsinas en el intestino de *A. aegypti* reduce la tasa de infección y diseminación del virus *Dengue-2*. Se ha propuesto que la tripsina temprana podría ser un factor importante para que los virus de dengue atraviesen las barreras de infección y escapen del intestino hacia las glándulas salivares. De esta manera, esta enzima podría condicionar la competencia vectorial de los virus de dengue en *A. aegypti*. El término competencia vectorial se refiere a la permisividad de un vector artrópodo a la infección, replicación, y transmisión de un virus.

El estudio de la genética de poblaciones y de la dinámica de los vectores es importante para entender el papel del vector en la epidemiología de las enfermedades. Este tipo de estudios también permiten planear mejores estrategias de control vectorial. Por ejemplo, si se piensa en la liberación de vectores refractarios, desarrollados por la ingeniería genética, es necesario conocer previamente la estructura de las poblaciones de vectores. Para esto, se han desarrollado técnicas moleculares que permiten estudiar la genética de poblaciones

Dentro del campo de la sistemática molecular de insectos, se ha descrito que muchos de los marcadores genéticos amplificados son polimórficos. Ha sido demostrado que el gen de la tripsina temprana está localizado en el cromosoma 2 de *A. aegypti* y que presenta dos alelos diferentes correspondientes a una inserción o delección de un segmento de ADN. Por presentar este tipo de polimorfismo, se ha considerado al gen de la tripsina temprana como un buen candidato para marcador genético de las poblaciones de *A. aegypti*.

Este trabajo de tesis, pretende contribuir al conocimiento de la genética de poblaciones de *A. aegypti* y se inscribe en el marco de las investigaciones realizadas en el laboratorio de Biología Molecular de Vectores dirigido por la Lda. Ana María de Mérida (Centro de Estudios en Salud-CDC-CAP, UVG). Para comprender mejor la estructura poblacional y la dinámica de estos vectores, se estudiaron mosquitos capturados en varios países de América Central, México y el Caribe. Los sitios de colecta representan zonas de vida bioclimáticamente distintas que pueden alojar poblaciones de *A. aegypti* genéticamente diferentes.

En un estudio previo (tesis de Licenciatura de María René López B.), los mosquitos individuales fueron caracterizados genéticamente utilizando un marcador mitocondrial correspondiente a un fragmento del gen que codifica a la subunidad cuatro de la NADH deshidrogenada (gen *ND4*). Durante dicho estudio, diferentes haplotipos (una combinación de alelos que no se encuentran en equilibrio de ligamiento) fueron identificados por medio del análisis de polimorfismo de conformación de una sola banda, SSCP, por sus siglas en inglés.

En este estudio, se amplificará a partir de cada individuo, un fragmento de ~300 pb correspondiente al gen nuclear de la tripsina temprana. Se determinará el polimorfismo de los fragmentos obtenidos por medio de geles de poliacrilamida adaptados para la

secuenciación de ácidos nucleicos. Se examinarán los patrones de flujo genético en *A. aegypti* analizando la variación (inserción / deleción) del fragmento. Será determinada la variación genética de las poblaciones provenientes de los sitios de captura. De manera complementaria, se definirá la relación entre variación genética y variación fenotípica de la descendencia F2 de *A. aegypti* provenientes de Guatemala y El Salvador. La información que se obtendrá al finalizar este estudio, ayudará a entender mejor el comportamiento del principal vector de dengue, *A. aegypti*, de manera que se pueda implementar efectivamente la prevención y reducción de los casos de esta enfermedad.

II. ANTECEDENTES

A. Generalidades sobre el dengue

1. Enfermedad de dengue. El dengue ha sido reconocido como un problema importante de la salud pública. Más de 50 millones de personas son infectadas cada año a nivel mundial. La incidencia de las formas severas, a veces letales, de la enfermedad está aumentando (Peyrefitte 2005). En los países occidentales han ocurrido epidemias de dengue periódicamente durante los últimos 200 años. Se ha descrito que en los últimos 25 años, la transmisión de dengue y la frecuencia de epidemias han aumentado significativamente en los países tropicales de América (CDC 2003a).

El dengue es una enfermedad de origen viral transmitida en el ambiente doméstico, de persona a persona, por la picadura de la hembra del mosquito *Aedes aegypti*. Se caracteriza por el comienzo repentino de dolor de cabeza frontal, fiebre alta (por esta razón la enfermedad es también llamada fiebre de dengue), dolor retro-orbital (dolor relacionado con o situado atrás del ojo), mialgias (dolores musculares), artralgias (dolor en las coyunturas), náusea, vómitos y erupciones en la piel. Muchos pacientes tienen alteraciones en el gusto. Los síntomas tienden a confundirse con la influenza, el sarampión o la rubéola. Las

manifestaciones de la enfermedad pueden variar en intensidad, desde pasar desapercibidas hasta presentar los síntomas descritos anteriormente. En los casos leves y moderados, los síntomas se desvanecen al cesar la fiebre. En los casos graves del dengue, a veces fatales como la fiebre del dengue hemorrágico, la condición del paciente empeora de forma repentina. La fiebre hemorrágica del dengue (FHD) se caracteriza por altas fiebres que pueden durar hasta 7 días, aumento de la permeabilidad vascular, sangrado de encías, hematemesis (vómito con sangre), epistaxis (sangrado de nariz) y agrandamiento del hígado. A medida que comienza a bajar la fiebre, el paciente puede mostrar inquietud o letargo y señales de que el sistema circulatorio empieza a fallar. Los pacientes con FHD desarrollan trombocitopenia (recuento bajo de plaquetas), hemoconcentración (aumento de la concentración de la sangre por disminución de su contenido líquido), hipoalbuminemia (concentración plasmática de albúmina disminuye), o derrames pleurales (acumulación de líquido entre las capas de la membrana que recubre el pulmón y la cavidad torácica). La condición de estos pacientes puede evolucionar en síndrome de choque por dengue.

En el caso del síndrome de choque por dengue, el paciente entra en un estado de choque y puede morir antes de las 24 horas, o recuperarse rápidamente si recibe tratamiento inmediato. Los signos de alerta para el síndrome de choque por dengue incluyen dolor abdominal severo, vómito prolongado, cambio drástico en la temperatura (desde fiebre hasta hipotermia), e intranquilidad o letargo. (Calisher 2005, CDC 2005, Medline Plus 2006).

2. Diagnóstico. Para documentar una infección por virus del dengue, existen varias técnicas de diagnóstico entre las cuales están: el aislamiento del virus proveniente de suero para determinar el serotipo; la detección de anticuerpos específicos que pueden ser de la clase IgM o IgG (Effler 2005). Para el aislamiento del virus, se debe obtener una muestra de suero al iniciar los síntomas de dengue. Se recomienda que esto sea realizado durante los

primeros cinco días de la enfermedad. Para el diagnóstico serológico de IgM, se requiere una muestra de suero obtenida al menos seis días después del comienzo del primer síntoma. Estas muestras pueden ser entonces analizadas en el laboratorio clínico por la técnica denominada MAC-ELISA, *IgM Antibody Capture ELISA*, por siglas en inglés (Peyrefitte 2005, CDC 2005). Para la detección de las IgG, se puede hacer una prueba en sueros tomados hasta sesenta días o más, después de que los pacientes presentaran síntomas de dengue (Effler 2005).

3. Tratamiento. Debido a que la fiebre de dengue es causada por un virus para el cual no se conoce cura ni vacuna, sólo es posible el tratamiento de los síntomas. Una vez que el paciente ha sido diagnosticado, la clave para su supervivencia es el tratamiento rápido y adecuado. Si la enfermedad se diagnostica temprano, la tasa de letalidad puede mantenerse en menos del 1 %. La enfermedad de dengue se puede tratar con terapia de reemplazo de líquidos o rehidratación con líquidos intravenosos para corregir los desequilibrios electrolíticos. Una transfusión de sangre fresca o de plaquetas puede ayudar a corregir hemorragias; a veces se requiere oxigenoterapia para equilibrar los niveles de oxígeno en la sangre. A los pacientes a los que se cree con dengue se les debe recetar acetaminofén en lugar de aspirina, para aliviar el dolor y la fiebre. La razón de esto es porque los efectos anticoagulantes de la aspirina pueden agravar la tendencia a sangrar que ocurre con algunas infecciones del dengue (CDC 2003^a, MedlinePlus 2006).

4. El virus *Dengue*. La enfermedad de dengue es causada por el virus *Dengue* perteneciente al género *Flavivirus* de la familia Flaviviridae. Su genoma está constituido por ARN (11 kb) de sentido positivo, segmentado y de una sola hebra. Existen cuatro serotipos del virus denominados DEN-1 al 4, causantes de dengue. La infección por los diferentes serotipos no implica la existencia de una inmunidad cruzada (Peyrefitte 2005). Esto

significa que una persona puede ser infectada hasta cuatro veces por el virus *Dengue*, una vez con cada uno de los serotipos. Se piensa que las infecciones recurrentes con ciertos virus *Dengue* podrían ser causantes de una enfermedad más complicada. (Calisher 2005).

5. Vectores. Los principales vectores del virus *Dengue* son los mosquitos del género *Aedes*, que pertenecen a la familia Culicidae (Black 2002). Según el diccionario Iter Sopena Latino-Español del año 1987, *Aedes* (en latín escrito así: *Ædes*) significa «templo, casa, palacio, mansión, morada o habitación». *Aegypti* (en latín escrito así: *Ægypti*) significa «de egipto», es decir, el caso genitivo de la palabra latina *Aegyptus*. Por tanto, *Aedes aegypti*, también escrito como *Ædes aegypti*, significa «casa o morada de egipto» (cf. Diccionario Iter Sopena Latino-Español 1987). Dentro de esta especie se han descrito dos sub-especies: *Ædes aegypti formosus* y *Ædes aegypti aegypti*. *Ædes aegypti formosus* es una subespecie silvestre de color negro encontrada en Africa sub-sahariana que deposita sus huevos mayoritariamente en hoyos de árboles. *Ædes aegypti aegypti* es una subespecie doméstica de color claro encontrada en regiones tropicales y subtropicales fuera de África, y que deposita sus huevos preferentemente en contenedores artificiales asociados con hábitat humanos (Black 2002).

Además de *Æ. aegypti*, existen otros vectores de dengue como *Ædes albopictus*, considerado como uno de los más importantes vectores en ciertas regiones del mundo. Originalmente, la presencia de *Ædes albopictus* había sido reportada únicamente en los bosques tropicales del sureste asiático, en donde se considera que se originó el virus *Dengue*. El área de repartición de este vector permaneció por varias décadas dentro del límite de ciertas islas del Océano Índico, países de la región oriental de Asia y las islas Hawaianas del Océano Pacífico. Sin embargo, en los años ochenta hubo un cambio drástico en su repartición geográfica. Para el año 1995, una población grande de *Æ. albopictus* había

sido descrita en Estados Unidos y otros países del continente americano. La presencia de este mosquito representa un problema serio para la salud pública ya que juega un rol importante en la transmisión no sólo de *Dengue* sino también de otros arbovirus y que usualmente su susceptibilidad a los virus es mayor que la de *Ae. aegypti* (Ayres 2002).

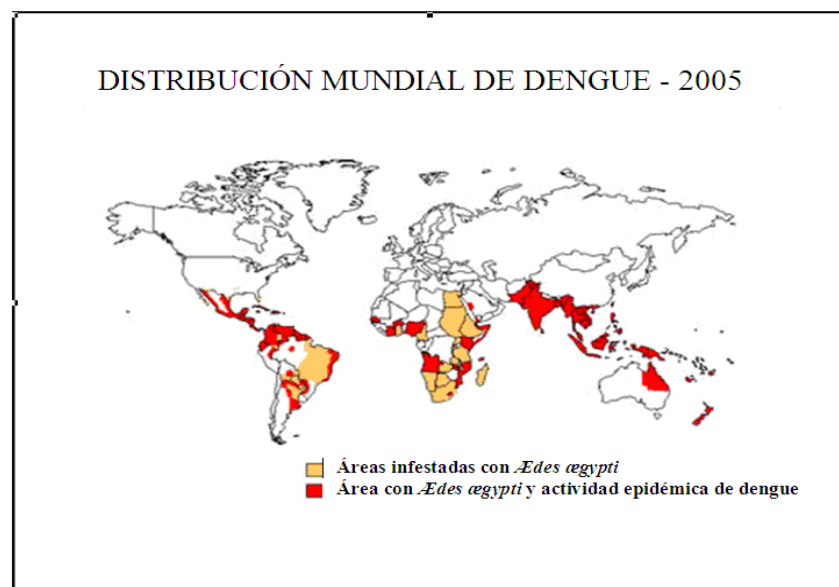
6. Distribución geográfica e incidencia a nivel mundial de dengue. Los virus de Dengue pueden ocasionar síntomas serios para los que padecen de la enfermedad. La fiebre hemorrágica de dengue es la forma más severa de esta enfermedad y por lo tanto, es una preocupación internacional para la salud pública (Calisher 2005). Después de la Segunda Guerra Mundial en Asia, hubo una expansión de la distribución de la enfermedad y un aumento de las infestaciones por *Ae. aegypti* (OPS 2000). El dengue y FHD estaban considerados como un problema de salud pública del continente asiático. Pues antes de 1970, un total de nueve países de esa región habían reportado epidemias de FHD (Calisher 2005). No había evidencia, entonces, que amenazara el continente americano. Esta creencia cambió repentinamente como resultado de la epidemia cubana de 1981, que fue la primera epidemia de FHD grave en dicha región del mundo. Después, en 1990, Venezuela presentó la segunda epidemia grave (OPS 2000).

En 1995, los brotes de FHD reportados habían aumentado cuatro veces. Muchos de los países afectados estaban en el sureste de Asia y en el oeste del Pacífico (Calisher 2005). En ambas regiones, la amplia distribución del vector estuvo seguida de un aumento de la transmisión de múltiples serotipos del virus *Dengue*, resultando en una hiperendemia en muchos países. En la mayoría de esos países se desarrolló posteriormente un ciclo continuo de epidemias de dengue y de FHD, apareciendo en intervalos de tres a cinco años, con epidemias que se tornaban progresivamente más graves. Durante el verano del año 2000,

Costa Rica, El Salvador, Guatemala y Nicaragua experimentaron brotes de dengue que también incluyeron casos de FHD y defunciones (OPS 2000).

Debido a la propagación a nivel mundial de todos los serotipos de *Dengue*, en el año 2001, más de 600,000 casos de dengue fueron reportados en las Américas, de los cuales 15,000 fueron casos de FHD. Esto fue más del doble de la cantidad de casos de FHD en el continente americano que en el año 1995 (Calisher 2005). Se reportan casos de dengue en cada localidad global en que se encuentra *Æ. ægypti*. Cerca de seis millones de casos de dengue han sido reportados en países de América Central y América del Sur, al igual que en el Caribe desde 1976 hasta el año 2002 (Black 2002). Se estima que 500,000 personas con FHD requieren hospitalización cada año, una gran cantidad de éstas son niños. Trágicamente, durante el año 2005, FHD ha sido la causa número uno de hospitalización y muerte de niños en varios países asiáticos. Las tasas de mortalidad pueden exceder el 20 %, pero pueden ser reducidas a menos del 1 % con un reconocimiento rápido de la enfermedad y con tratamiento adecuado (Calisher 2005). (Ver figura 1)

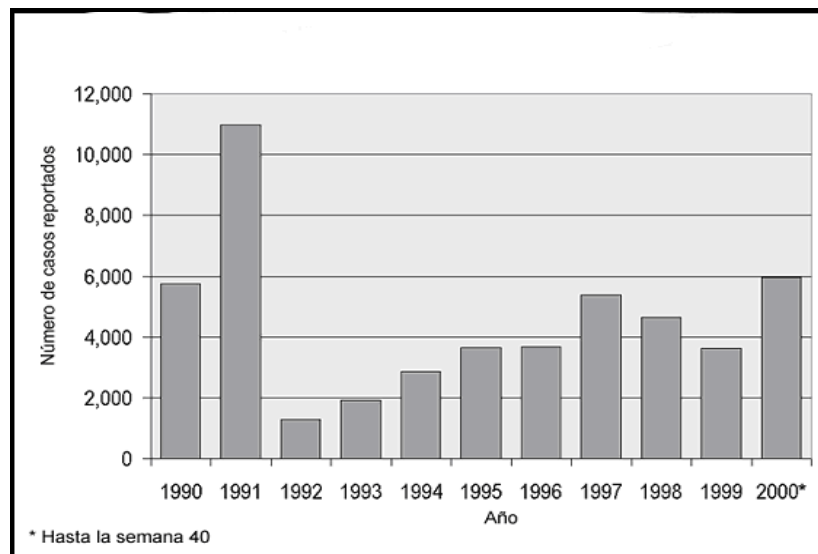
Figura 1. Distribución geográfica de dengue a nivel mundial



(CDC 2005)

7. Distribución geográfica e incidencia en Guatemala. En Guatemala, se trató de erradicar *Æ. aegypti*, entre los años 1948 y 1959, siguiendo las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud. Guatemala fue certificada como libre de *Æ. aegypti* en la XI Reunión del Consejo de Directores de la OMS en 1959. No fue sino hasta 1967 que larvas de *Æ. aegypti* fueron descubiertas en la ciudad de Escuintla. Cinco años después, en 1972, *Æ. aegypti* fue encontrado nuevamente en Escuintla y en Taxisco. Una combinación de elementos como las limitaciones económicas, los factores ecológicos, y la rápida expansión del vector, hizo que esta especie se reinfectara gradualmente. La primera epidemia de dengue ocurrió en 1987 con 2,318 casos, y desde entonces, la enfermedad se ha propagado a todas las áreas infestadas por el vector. El serotipo aislado de los pacientes durante este brote fue DEN-1. En 1991, los casos de dengue y de FHD llegaron al máximo de 10,968. En 1992 se observó que el número de casos disminuyó enormemente con 1,286 casos, pero en los siguientes años el número aumentó gradualmente. Esto puede observarse en la Figura 2 (OPS 2000).

Figura 2. Número de casos de dengue y FHD reportados en Guatemala, 1990-2000



(OPS 2000)

Para el año 2000, en la semana epidemiológica 40, se notificaron 5,963 casos. Este fue un aumento del 85 % del número de casos notificados el año anterior en el mismo período. Durante ese mismo año, se confirmaron 18 casos de FHD con seis defunciones y una tasa de mortalidad de un 33%. Los departamentos más afectados son Zacapa, Santa Rosa, Escuintla y El Progreso (OPS 2000).

Los cuatro serotipos han circulado en Guatemala. Antes de los años noventa, DEN-1 era el único serotipo encontrado aunque en 1988 los serotipos 1, 2 y 4 habían sido aislados. En el Cuadro 1 se puede apreciarse que en siete de los años presentados, se han encontrado varios serotipos circulando en Guatemala simultáneamente (OPS 2000).

Cuadro 1. Serotipos de Dengue circulando en Guatemala, 1990-2000

| Año | DEN-1 | DEN-2 | DEN-3 | DEN-4 |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 1990 | x | - | - | - |
| 1991 | x | X | - | X |
| 1992 | x | X | - | X |
| 1993 | x | - | - | - |
| 1994 | x | X | - | - |
| 1995 | x | X | X | X |
| 1996 | x | X | X | X |
| 1997 | x | X | X | X |
| 1998 | x | X | - | - |
| 1999 | x | X | X | X |
| 2000 | - | X | - | - |

(OPS 2000)

Durante el año 2003, el número de casos de dengue reportados fue de 55,943. De estos, 1,156 casos correspondieron a FHD. En el año 2004, de los 5,940 casos de dengue reportados, solamente 805 fueron confirmados. De estos 805 casos, 31 fueron casos de FHD

y 3 fueron causa de muerte. El año pasado, 2005, de los 6,022 casos de dengue reportados, 688 fueron confirmados, 4 eran FHD, y 1 causó la muerte (MSPAS 2005).

8. Condición de vivienda y manejo de higiene en Guatemala. El uso y manejo del agua en el hogar son factores de riesgo para la prevalencia y la transmisión de enfermedades infecciosas tales como el dengue. Es importante notar la manera en que se maneja el agua en los hogares, ya que debido a su escasez el resultado es la acumulación de la misma en recipientes. También existe el acumulamiento que sucede por las lluvias. El mal manejo de agua en recipientes favorece a la formación de criaderos del vector, aumentando así la transmisión de la enfermedad (INCAP 2003).

Los factores culturales, socio-económicos y la voluntad política resaltan un interés por alcanzar la erradicación del vector. Los cambios de prácticas sanitarias de toda la población y la responsabilidad de las autoridades para la provisión constante de agua a nivel domiciliar, son factores importantes para alcanzar la solución del problema (INCAP, 2003).

9. Prevención y estrategias de control. El único método de prevención de dengue existente hasta ahora es combatir los mosquitos vectores. Este control se lleva a cabo implementando el uso de métodos químicos y de manejo de ambiente. Algunas recomendaciones para el manejo de ambiente son: evitar contenedores abiertos que puedan acumular agua en la cual puedan dejar las hembras sus huevos, desechar y cambiar seguido el agua de los recipientes en uso como por ejemplo pilas y floreros, la aplicación y reaplicación periódicas de insecticidas en los sitios donde haya larvas, y el uso de crustáceos y pescados pequeños que comen mosquitos. Durante los brotes de dengue, una medida de control de emergencia incluye la aplicación de insecticidas para matar los mosquitos adultos usando maquinas portátiles o montadas en camión o en avioneta. El monitoreo regular de la

susceptibilidad de los vectores hacia los insecticidas, es necesario para asegurarse de usar los químicos apropiados y para determinar el impacto del programa (WHO 2002).

La prevención de una epidemia por dengue requiere de una coordinadora comunitaria capacitada para informar sobre dengue y fiebre hemorrágica de dengue a su comunidad, así como ser capaz de reconocer y eliminar los mosquitos por métodos de control. Los turistas en las áreas con dengue, tanto como los habitantes del área, pueden disminuir el riesgo de ser picados siguiendo las siguientes recomendaciones: 1. Permanecer en áreas cerradas y libres de mosquitos, utilizar aire acondicionado para evitar abrir ventanas y puertas, o utilizar ventanas y puertas con cedazo; 2. Aplicar repelentes que contengan 20% a 30% DEET (N, N-dietil-metatoluamide) como ingrediente activo a la piel expuesta; 3. Usar ropa que disminuya la piel expuesta (CDC 2003b).

Otras recomendaciones exitosas dadas por el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP), son las siguientes: 1. Participación de la comunidad a través de líderes locales de forma voluntaria en el programa extendido por el Ministerio de Salud Pública de Guatemala, 2. Control de potenciales criaderos que sean de utilidad, a. Uso de una manta para cubrir el tanque de la pila, el tonel o el tambo, b. Uso de un cepillo para limpiar la pila semanalmente, c. Adición de 1% temephos en bolsas de manta a pozos abiertos en la casa, d. Cubiertas colocadas en los tanques elevados de agua y en los depósitos subterráneos, 3. Control o destrucción de potenciales criaderos no útiles: Eliminación de criaderos potenciales, por ejemplo, en cementerios, talleres mecánicos, venta de llantas, y lugares con chatarra (INCAP 2003).

En el caso de prevención por vacunación, el desarrollo de una vacuna para dengue y fiebre hemorrágica de dengue es difícil porque son cuatro diferente virus los que causan la enfermedad, y porque la protección en contra de uno o dos virus puede aumentar el riesgo

de una enfermedad severa. Actualmente, se está trabajando en el desarrollo de vacunas que puedan proteger contra los cuatro virus. Esto tardará unos años más para que estén disponibles al público (WHO 2002).

B. Vector *Aedes aegypti*

1. Descripción general. El vector primario del dengue es la hembra *Æ. aegypti*, un mosquito que crece en cualquier recipiente que contenga agua estancada, y se ha adaptado a cohabitar con humanos. *Æ. aegypti* tiene una distribución global en áreas tropicales y subtropicales (Bennett 2002). Entre las características de la hembra adulta destacan: cuerpo de color negro, diseños blanco-plateados formados por escamas claras en el dorso del tórax, y un anillado característico en los tarsos, tibia y fémures de las patas. Los *Æ. aegypti* se pueden confundir con *Æ. notoscriptus*, ya que tiene una franja pálida en medio de la probocis o trompa, y también con *Æ. mallochi* que tiene una sola raya en la probocis (Russell 1996). Ver figura 3 de *Æ. aegypti*.

Figura 3. *Aedes aegypti*, hembra



(Russell 1996)

2. Hábitat y costumbres alimenticios. Entre los hábitat del mosquito *Æ. aegypti*, están las aguas servidas (agua que ya fue utilizada industrialmente), cisternas, barriles, pozos, pozos negros y sótanos inundados, o cualquier recipiente con agua estancada. Las hembras se alimentan de la sangre humana, muchas veces picando bajo techo o en áreas cerca de casas. Las picaduras por estos mosquitos ocurren predominantemente de día y en áreas con sombra, pero también pueden ocurrir por la noche (Russell 1996).

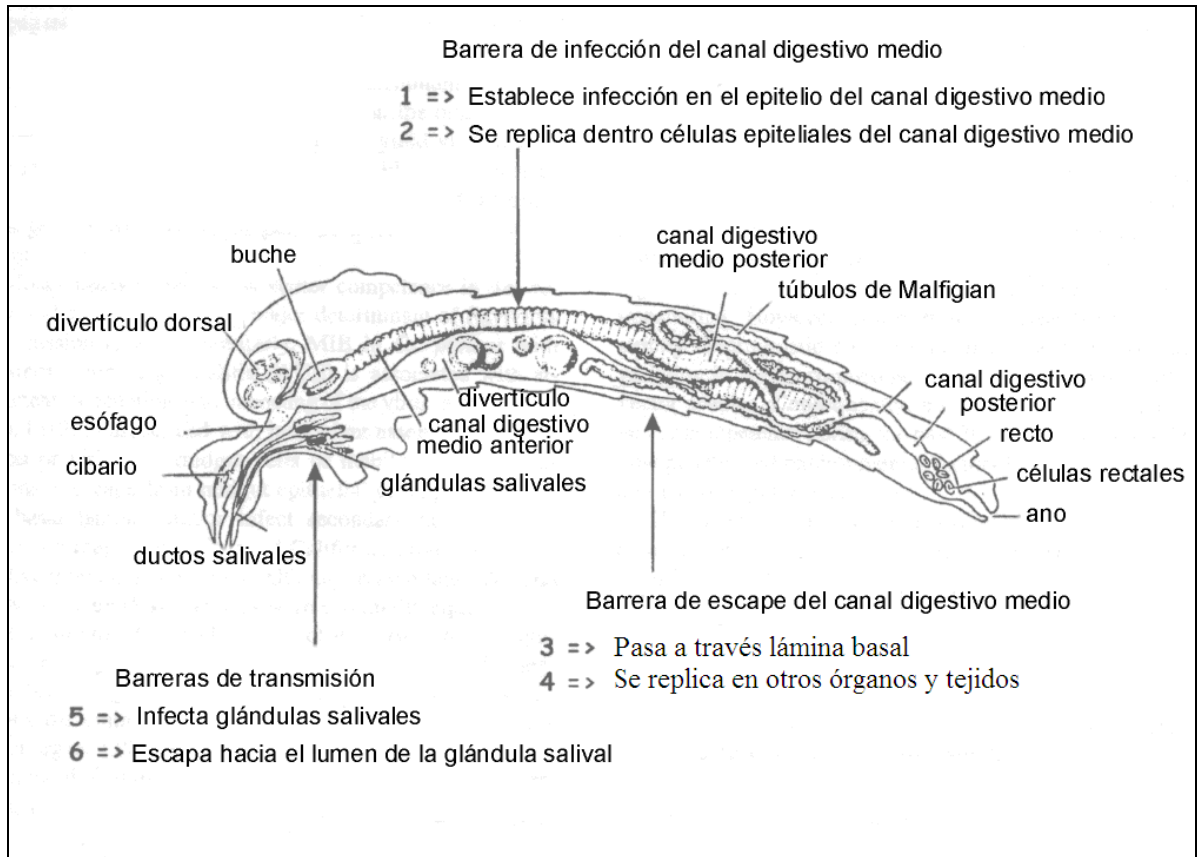
3. Ciclo de replicación viral en el vector. Luego de la ingestión de sangre, el virus debe de infectar primero las células epiteliales del intestino del vector. Se cree que los viriones interactúan con los receptores de las células epiteliales del intestino y penetran las células. Dentro de las células, el genoma viral pasa por sus etapas de replicación hasta llegar a la maduración del virión. Luego, los viriones infecciosos deben diseminarse desde el epitelio del intestino e infectar los órganos secundarios, en donde llegan a las glándulas salivales para su transmisión mediante la próxima picadura (Black 2002).

4. Barreras en el intestino del mosquito. Se ha determinado que existen tres tipos de barreras para la transmisión del virus en el mosquito *Æ. aegypti*. Éstas son: la barrera de infección del intestino (Fig. 4 A), la barrera de escape del intestino (Fig. 4 B) y la barrera de transmisión (Fig. 4 C). La barrera de infección del intestino ocurre si el virus es bloqueado en una etapa temprana. La barrera de escape del intestino es cuando los viriones infecciosos no se diseminan en el hemocele (cavidad o serie de espacios entre órganos de la mayoría de artrópodos en donde circula la hemolinfa). Esta barrera puede ser condicionada por el ensamblaje o maduración ineficiente del virus en las células del intestino de ciertas cepas del vector. La barrera de transmisión ocurre si los viriones, sí se diseminan en el hemocele, pero no maduran hacia un estadio infeccioso antes de llegar a las glándulas salivales. Estudios sobre la ingestión de sangre infectada con *Flavivirus* por *Æ. aegypti* indican que la

barrera de infección del intestino es importante para la transmisión de los *Flavivirus* (Black 2002).

5. Competencia vectorial. Referente a la transmisión de virus, existe un término muy utilizado, la competencia vectorial. Esta se define como la tolerancia intrínseca de un vector a la infección, replicación y transmisión de un virus. La competencia vectorial de los mosquitos está asociada a las barreras anteriormente mencionadas. En vectores que presenten una barrera de infección a nivel del intestino, el virus no puede infectar ni/o replicarse en las células del intestino del mosquito. Esto puede deberse a la falta de células superficiales (que sirven como receptores para el virus) o a que las células del intestino puedan ser intolerantes a la infección por virus. Los vectores que presentan una barrera de escape del intestino pueden permitir la replicación del virus en el intestino, pero en estos el virus no llega a salir del intestino para causar una infección diseminada. Las barreras a infección pueden variar ampliamente entre poblaciones de *A. aegypti* causando que la competencia vectorial para los virus de dengue sean variables también (Bennett 2002).

Figura 4. Barreras que un arbovirus debe atravesar para ser transmitido por un mosquito.



(Black 2002).

6. Síntesis de tripsinas temprana y tardía. Algunos estudios sobre la síntesis de proteasas en el intestino de la hembra de *Ae. aegypti* han demostrado la presencia de actividades de tripsina, quimotripsina y aminopeptidasas después de la ingestión de sangre (Jiang, *et al* 1997). En otros estudios, se ha determinado que la ingestión de sangre por el mosquito hembra, *Ae. aegypti*, induce la síntesis de dos tripsinas específicas del intestino de la hembra: tripsina temprana y tripsina tardía (Noriega 1996a).

La tripsina temprana aparece durante las primeras horas de digestión de sangre. Esta es sint **C. Barrera de transmisión** ; en las primeras cuatro a seis horas después de la ingestión, y se hace responsable de la primera fase de la digestión. La presencia de tripsina temprana es importante para la activación transcripcional del gen de tripsina tardía. La

tripsina tardía es responsable de la última fase de la digestión por tripsina. Esta es producida en grandes cantidades de ocho a veinticuatro horas después de la alimentación (Noriega 1996).

7. Relación de tripsinas con susceptibilidad al virus *Dengue*. Se han realizado estudios con un enfoque en la relación entre las tripsinas y la competencia vectorial. En un estudio, se utilizaron mosquitos *Ae. aegypti* de Puerto Rico y mosquitos de una cepa con alta susceptibilidad al virus. Cada grupo fue subdividido en dos grupos de igual número. Un grupo fue alimentado con sangre infecciosa de dengue, serotipo 2, y el otro grupo con sangre infecciosa de dengue pero con inhibidor de tripsina proveniente de la soya. Al concluir el estudio, se determinó que la inhibición de tripsina en el intestino de *Ae. aegypti* reduce de manera significativa la diseminación de la infección por dengue 2 (Black 2002).

Las poblaciones de *Ae. aegypti* exhiben variabilidad genética en cuanto a su competencia vectorial para los *Flavivirus*, incluyendo al virus *Dengue 2*. Se piensa que la competencia vectorial para los *Flavivirus* en *Ae. aegypti* es controlada por al menos 2 genes ó 2 conjuntos de genes. Uno que podría controlar la barrera de infección del intestino y el otro que controlaría la barrera de escape del intestino. Debido a su importancia en la salud pública, *Ae. aegypti* ha sido sujeto a numerosos estudios sobre competencia vectorial y genética de poblaciones (Bennett 2002).

C. Estudios de diversidad genética de *Aedes aegypti*

Además de estudiar la competencia vectorial y la genética de poblaciones, es necesario conocer los patrones de dispersión del vector con el fin de mejorar la efectividad de las estrategias de control. La forma de dispersión de *Ae. aegypti* ocurre de la siguiente manera: viajes de los mosquitos adultos, transporte de huevos, transporte de larvas o de mosquitos adultos dentro de recipientes a lo largo de rutas comerciales. Los primeros estudios de

genética de poblaciones definen las relaciones genéticas entre *Ae. aegypti* a nivel mundial, mientras que estudios mas recientes se han enfocado en patrones locales de dispersión. (Gorrochotegui 2000)

Dentro las estrategias de control para *Ae. aegypti*, durante brotes urbanos de dengue, se ha observado que los mosquitos viajan entre 50 y 100 metros en sus vidas. Esta observación ha hecho que se utilicen insecticidas para interrumpir su transmisión. Sin embargo, en otros estudios que han usado cepas genéticamente marcadas, se han observado distancias de dispersión hasta de 580 metros en el sur de EE. UU. Estudios como éstos han demostrado que la distancia y tasas de dispersión se correlacionan de manera inversa con el número grande de sitios de oviposición. Las estrategias de control que reducen los sitios de oviposición pueden tener efectos no deseables al incrementar la dispersión de las hembras de *Ae. aegypti* infectadas (Gorrochotegui 2000).

1. Isoenzimas. En estudios sobre la dispersión de *Ae. aegypti* utilizando isoenzimas demostraron que los *Ae. aegypti* se agrupan con respecto a continentes y países específicos. Este patrón sugiere que el flujo genético entre poblaciones disminuye con el aumento de distancias geográficas, un patrón referido como “aislamiento por distancia” en genética de poblaciones. Solamente dos estudios, ambos conducidos en Puerto Rico, han estudiado los patrones locales de flujo genético en *Ae. aegypti* utilizando también isoenzimas. Los resultados de estos estudios que cubren aproximadamente 100 km indican flujo genético continuo. Esto fue confirmado por los resultados de la variación en 57 marcadores de ADN polimórfico amplificado al azar, RAPD por sus siglas en inglés (Gorrochotegui 2000).

2. ADN polimórfico. Para verificar si el elevado flujo genético detectado en Puerto Rico también ocurría en México, Gorrochotegui, *et al.* examinaron patrones locales de flujo genético en *Ae. aegypti* en una escala geográfica mas amplia. El análisis se realizó sobre una

distancia de 735 km entre ciudades a lo largo de la costa noroeste de México. En ese mismo estudio se escogió una población determinada para examinar el flujo genético local entre cuatro colecciones con 45-70 km de distancia entre sí. Entre los marcadores utilizados se incluyeron 60 *loci* de ADN polimórfico amplificado al azar. Se incluyó también un estudio de genoma mitocondrial para el análisis de polimorfismo de conformación de una sola banda, SSCP por sus siglas en inglés. Se analizaron dos mediciones de flujo genético: la razón de migración efectiva y la varianza del tamaño poblacional efectivo. El análisis de marcadores mitocondriales fue incluido debido a que con los marcadores de RAPD se observaron resultados cuantitativos que hacían suponer un número elevado de mutaciones. Los resultados en RAPD son problemáticos para los estudios de genética de poblaciones porque las mutaciones puntuales frecuentes pueden causar un aumento o pérdida de bandas RAPD en diferentes poblaciones. Por lo tanto, durante el análisis por RAPD se puede subestimar las distancias genéticas y sobreestimar las cantidades o porcentajes de flujo genético (Gorrochotegui 2000).

Como resultado, Gorrochotegui *et al.* sugirieron que en todas las regiones del noroeste de México, las poblaciones de *Ae. aegypti* permanecen genéticamente similares a distancias menores que ~150 km. Se espera entonces que estas poblaciones sean genéticamente similares en los genes que controlan competencia vectorial para dengue y posiblemente en los genes que confieren la resistencia a insecticidas. Sin embargo, a distancias mayores de 250 km., las poblaciones pueden diferir en frecuencia y tipo de alelos en *loci* que están involucrados en la transmisión del dengue. También hubo resultados de una población de *Ae. aegypti* de Nuevo Laredo, México, que indican que poblaciones en hábitat extremos o aislados pueden tener un cambio en la composición genética. (Gorrochotegui 2000).

En otro estudio, se incluyeron poblaciones del noroeste, Yucatán, y la costa pacífica de México en un análisis con marcadores mitocondriales. Los resultados de este estudio indicaron que a lo largo de la costa pacífica, las distancias genéticas tienden a ser muy pequeñas, sugiriendo un flujo genético extenso entre poblaciones del sur del país, como Tapachula, y hasta el norte del país, como Tucson. Esto puede ser debido al comercio humano. En cambio, en el noroeste de México, como Yucatán, las distancias genéticas fueron mayores. En esta región el aislamiento genético por distancia es más pronunciado, probablemente debido al viaje natural del vector (García-Franco 2002). Las diferencias genéticas encontradas en los marcadores RAPD o los marcadores mitocondriales pueden ser las mismas que afectan las distancias genéticas en los *loci* de competencia vectorial. Esto predice que deberían observarse grandes diferencias en los fenotipos de competencia vectorial entre estas poblaciones (García-Franco 2002).

Estudios previos han revelado que los *loci* con características cuantitativas, QTL por sus siglas en inglés, condicionan las diferencias entre competencia vectorial y la barrera de infección del intestino o la barrera de escape del intestino. Aún falta determinar si estos condicionan la transmisión de dengue en poblaciones naturales. Los QTL descubiertos en estudios previos por cruces entre poblaciones cultivadas dentro del laboratorio, pueden no ser relevantes en poblaciones del campo ya que estos pueden tener sus propios QTL actuando en competencia vectorial por dengue. Es evidente, por lo tanto, que la búsqueda de nuevos QTL y estudios de la variación genética en poblaciones silvestres son importantes (Bennet 2002).

Una gran variedad de técnicas están disponibles para la identificación de polimorfismos de un número pequeño de nucleótidos, hasta de un solo nucleótido. Estas técnicas incluyen el análisis de polimorfismo en fragmentos de restricción, RFLP por sus siglas en inglés,

análisis por SSCP, análisis de heteroduplicidad, análisis por hibridización específica de un alelo de oligonucleótido, y por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Black 2001)

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A. Hipótesis

1. El flujo genético entre las poblaciones de *Aedes aegypti* provenientes de América Central, Chiapas, México y el Caribe puede verse reducido debido a las barreras geográficas.

2. En poblaciones de descendencia F2 de *A. aegypti* provenientes de Guatemala y El Salvador hay una relación directa entre su susceptibilidad al virus *Dengue* y su variabilidad genética.

B. Objetivo general

1. Contribuir al conocimiento de la genética de poblaciones de *A. aegypti* estudiando la estructura poblacional y dinámica de *A. aegypti* en países de América Central, Chiapas, México y el Caribe.

2. Ayudar a entender mejor el comportamiento y conocer las características del principal vector de dengue, *A. aegypti*, de manera que se pueda implementar medidas de control mas efectivas.

C. Objetivos específicos

1. Caracterizar genéticamente los mosquitos individuales con un marcador genético de origen nuclear.

2. Amplificar un fragmento del gen nuclear de la tripsina temprana de cada individuo.

3. Identificar los diferentes alelos del polimorfismo dentro del fragmento del gen nuclear de la tripsina temprana por medio de geles desnaturizantes con urea.

4. Examinar los patrones de flujo genético en *A. aegypti* usando el fragmento de ~300 pb del gen tripsina temprana, que presenta una variación inserción / deleción, como marcador genético.

5. Determinar la variación genética de una población proveniente de Centro América, Chiapas, México y el Caribe.
6. Definir la relación entre la variación genética y variación fenotípica de una población con descendencia F2 de *Æ. ægypti* proveniente de Guatemala y El Salvador.
7. Comparar lo encontrado con los resultados del estudio de haplotipos de marcadores mitocondriales (ND4) realizados en la F1.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Colecta de muestras

Los mosquitos *Aedes aegypti* fueron colectados durante los años 2002 y 2003 en diferentes ciudades, en países en los cuales se encontraron casos de dengue. Estos fueron México, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Panamá, Republica Dominicana y Cuba. (Para mayores detalles ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de individuos y sitios de colecta de *Aedes aegypti*

| País | Sitio de colecta | Fecha de colecta | Nº de individuos trabajados | Colectado por: |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| México | Tuxtla | 08/2003 | 51 51 | Dra. Carmen Martínez |
| Guatemala | Cementerio Gral., Esquintla | 28/05/2002 | 231 58 | Dr. Jaime Abraham |
| | Cementerio La Verbena, Gua | 27/05/2002 | 58 | Juárez |
| | La Sabana, Petén | 11/06/2002 | 57 | |
| | Llano de Piedra, Zacapa | 12/06/2002 | 58 | |
| El Salvador | Ilopango | 08/2002-09/2002 | 173 58 | Dr. Eduardo Romero |
| | San Miguel | 08/2002-09/2002 | 57 | |
| | Soyapango | 08/2002-09/2002 | 58 | |
| Nicaragua | Los Novios | 10/2002 | 174 58 | Dra. Emperatriz Lugo Villalta |
| | San Benito | 10/2002 | 58 | |
| | Tipitapa | 10/2002 | 58 | |
| Panamá | Puerto Armuelles | 29/01/2003 | 113 57 | Dr. Lorenzo Cáceres |
| | Río Abajo | 01/2003 | 56 | |
| Cuba | Guanabacoa | 18/03/2003-10/04/2003 | 173 58 | Dr. Israel García Ávila |
| | La Playa, Habana | 15/03/2003-25/03/2003 | 58 | |
| | Santiago | 12/05/2003-14/05/2003 | 57 | |
| República Dominicana | La Gallera | 09/07/2003 | 174 58 | Dr. Guillermo González |
| | Santa Ana | 05/09/2003 | 58 | |
| | Villa María | 11/07/2003 | 58 | |

B. Extracción de ADN

Después de escoger las hembras, con probocis larga, cada mosquito fue tratado individualmente para la extracción de su ADN. Cada individuo fue colocado en un tubo de 1.5mL con 100µL de buffer de extracción (NaCl 0.1M, sucrosa 0.2M, tris-HCl 0.1M, EDTA 0.05M, dodecil sulfato de sodio, SDS, 0.5%, ajustado a pH 9.2). Usando un pistilo limpio y seco por individuo, se maceró completamente el mosquito. Luego de usarse, se sumergió el pistilo en HCl 1N. A cada tubo se le hizo lo siguiente: colocarlo en baño María a 65°C por 30 minutos, agregarle 14 µL de acetato de potasio 8M, dejarlo en hielo por 30 minutos, centrifugarlo por 15 minutos a velocidad máxima, 10,000 rpm, pasar el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1.5ml usando una pipeta y precipitar con 200 µL de etanol absoluto frío a cada tubo, incubar a temperatura ambiente entre 5 y 10 minutos, y centrifugarlo por 30 minutos a velocidad máxima en microcentrífuga fría.

Para la limpieza, a cada tubo se le hizo lo siguiente: decantarle el etanol cuidadosamente, agregarle 10 µL de etanol al 70% frío, golpearlo suave para resuspender el sedimento, centrifugarlo por 5 minutos, decantarlo, agregarle 100 µL de etanol al 100% frío, centrifugarlo por 5 minutos, decantarlo con más cuidado y secarlo al aire o por centrifugación con vacío "SpeedVac" durante 5 minutos.

A éste se le agregó 500 µL de TE para resuspender el precipitado dejándolo reposar toda la noche. De éste se tomaron dos alícuotas de 25µL, se les agregó 25 µL de TE para tener un volumen total de 50 µL. Se guardaron a 4°C para trabajo posterior. Al resto (450 µL) se les agregó 400 µL de etanol absoluto para precipitar el ADN y se guardaron a -20°C.

C. Amplificación de ADN

La mezcla para amplificar el ADN y el programa de PCR fueron hechos según lo establecido por el Dr. Álvaro Molina. La región 5' del gen tripsina temprana fue

amplificada usando el iniciador o cebador positivo 5'-CCCAAAGCCAACCAACCT-3' y el iniciador negativo 5'-CGACCCTCCGCAGAAATG-3'. Se usó el siguiente protocolo: El volumen de la reacción de amplificación de ADN fue de 50µL, conteniendo una cantidad variable de material genético, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), 0.1% Triton-X, 1.5mM MgCl₂, 200µM de cada uno de los 4 dNTPs, 0.8 µM de cada iniciador EarTryp-AMC-1-F y EarTryp-AMC-1-R, y 0.5µL de solución con *Taq* polimerasa (~1 unidad).

Las amplificaciones fueron conducidas en un controlador termal programable modelo PTC-100 (MJ Research, Inc), programado con un paso inicial desnaturalizante a 94°C por 5 min., y luego un paso para agregar la *Taq* polimerasa a 80°C por 20 min., seguido por 30 ciclos de 30 s a 94°C; 30 s a 55°C; 30 s a 72°C; finalizando con 5 min. a 72°C.

D. Electroforesis con gel de agarosa

Se disolvieron 1.92g de agarosa en 160mL de buffer TBE 1X y se agitó continuamente hasta que la solución alcanzara el punto de ebullición. Se dejó enfriar a aproximadamente 60°C, para agregarle 5µL de bromuro de etidio (de manera cuidadosa por ser este cancerígeno), y se vertió en un molde con peine para dejarlo polimerizar aproximadamente 30 minutos. Se llenó la cámara de electroforesis (Hofer modelo HE 99X) con buffer TBE 1X. Sobre un pedazo de papel parafilm se colocaron gotas de 2 µL de buffer de montaje para cada muestra. A éstas se le agregaron 10 µL de producto de PCR y se homogenizaron bien para luego cargar esa mezcla en el pozo del gel. Los pozos extremos, se cargaron con 5 µL del marcador de tamaño 100 pb. Se corrieron las muestras por 1 hora a 80V. Para ver las bandas de ADN en el gel, se irradiaron con luz ultravioleta. Estando irradiado, se pudo fotografiar el gel. Finalmente, se cortó el gel en trozos pequeños que permitieran su conservación en el refrigerador y posterior utilización, lo cual no debe darse más allá de las cinco veces, pues se degradan.

E. Electroforesis con gel desnaturizante

El método por electroforesis con gel desnaturizante usado originalmente para microsatélites, estandarizado por Schoua (2000) y luego modificado por Mills (2001), se utilizó para determinar los alelos inserción y deleción de los PCRs de los fragmentos de 300 pb del gen de la tripsina temprana de cada individuo. Las condiciones de electroforesis con gel desnaturizante fueron adaptadas a geles pequeños de manera que se redujeron los volúmenes iniciales a una cuarta parte que lo usado por Mills (2001).

1. Preparación del gel y del sistema. Se colocaron en un beaker con agitación: 42 g urea, 32 mL agua destilada, 20 mL TBE 5X, y 17 mL de solución de acrilamida (142.5 g poliacrilamida, 7.5 g bis-acrilamida, aforada a 0.5 L con agua destilada; esta solución se almacena a 4°C). Se filtró al vacío, con 2 filtros Whatman #1 por 30 minutos, para desoxigenarla. Las 4 placas de vidrio que van adheridas al gel se lavaron con la solución "Uncle Bill's" (10M NaOH, 0.2M SDS), dejando la solución reposar sobre las placas por 10 minutos. Se restregaron las placas con una esponja plástica, se enjuagaron con agua corriente y luego 2 veces con 250 mL de agua destilada. Con una pizeta y paño para tareas delicadas, se limpiaron las placas con etanol al 70% y se dejaron secar al aire. Las 2 placas de vidrio separadoras, se lavaron con Alconox al 2%, restregándolas con una esponja suave. Se enjuagaron con agua corriente, luego con agua destilada y etanol al 70% de igual manera que las placas anteriores.

A las placas que van adheridas al gel, se les puso 200 μ L (100 μ L a la vez) de la solución con Bind Silano (5 μ L de BS, metacriloxi-propil-trimetoxisilano, en 1mL de una solución de etanol: ácido acético glacial) esparciendo con paños para tareas delicadas. Se dejó reposar por 5 minutos. El exceso de BS fue limpiado 3 veces con etanol al 95% con pizeta y paños para tareas delicadas. Se cambiaron los guantes en éste paso para poder trabajar las placas

de vidrio separadoras, ya que estos estuvieron contaminados ahora con BS. A las placas de vidrio separadoras se les agregó 200 μ L de Sigmacote, 100 μ L a la vez, esparciendo con dos paños para tareas delicadas.

Para ensamblar el sistema, se colocaron las placas de vidrio que van adheridos al gel con los espaciadores (0.4mm) en los extremos, y cada una de las placas separadoras en el centro formando un “sándwich”. Hubo que tener cuidado de colocar los lados tratados, tanto con BS como con Sigmacote, adecuadamente. Los espaciadores y las placas deben quedar bien alineadas antes de asegurar las abrazaderas. Se le agregó a la solución de acrilamida, 53.5 μ L de TEMED y 53.5 μ L de APS (62.5 mg APS, persulfato de amonio, y 250 μ L agua destilada), y se agitó un momento. Esta mezcla se cargó con pipeta volumétrica y se llenó de manera constante usando un pipeteador eléctrico. Se colocó el peine hacia abajo y se dejó polimerizar por una hora.

2. Preparación de corrida. Se calentó un bloque a aproximadamente 95°C y se encendió el calentador de la cámara que contenía 4L de TBE 1X a 55°C. Se calentó 1L buffer TBE 0.5X a 60°C. Al polimerizar el gel se quitó el peine de un sólo, se lavaron los pozos con buffer TBE 1X, y se removieron las burbujas con una pipeta. Antes de cargar el gel, los productos de PCR debieron calentarse por cinco minutos a 95°C. Los pozos extremos se cargaron con 6 μ L de buffer de montaje (10mM NaOH, 95% de formamida, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de xilen cianol), los siguientes extremos con 6 μ L de una mezcla de 2 μ L de marcador de tamaño 100pb y 8 μ L de buffer de montaje, los pozos al centro con 6 μ L de una mezcla de 2 μ L de marcador de tamaño 1 Kb y 8 μ L de buffer de montaje. Los demás pozos con 6 μ L de una mezcla de 6 μ L de producto PCR con 4 μ L de buffer de montaje.

3. Corrida del gel. Una vez el sistema alcanzara 60°C se montó el “sándwich” con la parte superior que lleva aproximadamente 700mL de buffer TBE 0.5X ya caliente. Este sistema parcial iba dentro del tanque con buffer TBE 1X. El sistema que se usó es de Heofer modelo RCB 300. Se corrió el gel a 30 mA por 3 horas. Al término de la corrida, se desmontó el sistema y se colocaron las placas con geles en 250 mL de ácido acético al 10% por 30 minutos como mínimo.

4. Tinción con nitrato de plata. Se sacaron las placas con geles del ácido acético y esta solución ácida se guardó para uso posterior. Se lavó seis veces con agua, con agitación suave, por dos minutos cada vez. Las soluciones de trabajo debieron ser preparadas pocos minutos antes de usarlas y las agitaciones de incubación fueron suaves. Se dejaron en 250mL de solución de coloración (1.5g AgNO₃, 4mL de formaldehído al 37%, aforada a 1L con agua destilada) por treinta minutos. Se lavó una vez con agua destilada por 18 segundos y se dejaron en solución reveladora fría (30g Na₂CO₃, 4mL formaldehído 37%, aforada a 1L con agua destilada, más 200µL de una solución con 0.01g de tiosulfato de sodio en 1 mL de agua destilada). Se mantuvo en agitación hasta aparecer las bandas teñidas, aproximadamente 3 minutos. La reacción fue detenida con 250mL de ácido acético 10% utilizada y recuperada anteriormente. Se dejó en agitación hasta que la reacción entre el ácido acético y el carbonato de sodio cesara. Esta solución se desechó y se lavaron las placas con gel con agua corriente en abundancia. Se lavó con agua desionizada por 2 minutos. Se colocaron verticalmente los vidrios con gel en recipientes de secado. Después de 24 horas, los geles ya no estarán húmedos ni pegajosos y se podrán leer, marcar con marcador, fotocopiar y/o escanear.

5. Lectura del gel. Los geles se pusieron sobre una fuente de luz blanca para visualizar bien la placa y las bandas que aparezcan. Se rotuló la parte superior de los geles, colocando

la fecha, nombre de la población, y la muestra que pertenece a cada pozo. Con la guía de los marcadores de tamaño, se ubicó las bandas cercanas a 300 pb. Al determinar que las bandas de cada muestra son de ~300 pb, se marcó heterocigoto, cuando se manifestaron dos bandas ligeramente distanciadas (13 pb), y homocigoto delección cuando se trató de una banda inferior u homocigoto inserción, tratándose de una banda superior. Esto se confirmó en cada gel, utilizando siempre un control positivo para heterocigoto delección/inserción.

6. Descarte del gel. Cuando ya se hubo tenido una impresión del gel, se pudo descartar. Se colocaron los vidrios en agua común por un día para suavizar el gel. Luego se desprendió completamente el gel del vidrio utilizando una paleta plástica. El gel se recogió en una servilleta de papel y se tiró en un basurero.

7. Purificación de ADN. Para purificar el ADN se utilizó el kit de Promega *Wizard PCR DNA Purification System*. Se usaron tres tubos de 1.5mL por muestra y émbolos de jeringas de 3mL. Todo debidamente rotulado. Se añadió 100µL de buffer directo de purificación en un tubo de 1.5mL. Se agregó todo el producto de PCR al tubo anterior y agitándolo con vortex brevemente. Se agregó 1mL de resina purificadora debidamente mezclada, agitando el tubo con vortex brevemente. Después de pipetear la resina/ADN a la jeringa, se empujó con el émbolo cuidadosamente para eluir el buffer. Se quitó el émbolo después de quitar la minicolumna. Luego de eluir 2mL de isopropanol al 80%, para lavar la columna, se centrifugó la minicolumna por 2 minutos a 10,000 x g para secar la resina. Al transferir la minicolumna a otro tubo de 1.5mL, se le agregó 50µL de buffer TE y se centrifugó por 20 segundos a 10,000 x g para eluir el ADN al tubo. Este se dejó secar con la centrífuga al vacío para poder enviar la muestra. De otra manera, se podría haber guardado a 4°C o -20°C en buffer TE.

8. Análisis de datos. Inicialmente se realizó un análisis estadístico usando un programa desarrollado para el estudio de la genética de poblaciones llamado Arlequín 2.0. La primera fase de análisis permitió determinar que las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Según Hartl (2002), el concepto de equilibrio en el modelo de Hardy-Weinberg se basa en las siguientes hipótesis: 1. La población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar, panmixia); 2. La población es suficientemente grande (para minimizar las diferencias existentes entre los individuos); 3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos). 4. Las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

En el siguiente paso, se realizó el análisis de varianza molecular, AMOVA por sus siglas en inglés. Esto se llevó a cabo con el programa Arlequín 2.0. El análisis se repitió varias veces con diferentes agrupamientos en regiones. En cada análisis se tomó en cuenta la variabilidad molecular observada “entre regiones”, “entre sitios de colecta dentro de regiones” y “dentro de sitios de colecta”.

Luego, se calcularon los índices de fijación de Wright. Los índices de fijación de Wright son tres: F_{ST} (corresponde a la heterocigocidad de una subpoblación comparada con la heterocigocidad de una población total), F_{IS} (heterocigocidad individual dentro de una subpoblación), F_{IT} (heterocigocidad individual dentro de una población total).

Finalmente, se realizó el análisis de Mantel que busca determinar si existe una correlación entre la distancia geográfica en kilómetros y la distancia genética entre las poblaciones. En otras palabras, calcula la relación lineal entre la distancia genética según $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ en función de la distancia geográfica en kilómetros, y prueba la linealidad con el valor R^2 y el valor de la probabilidad de Mantel.

F. Pruebas de susceptibilidad al virus *Dengue*

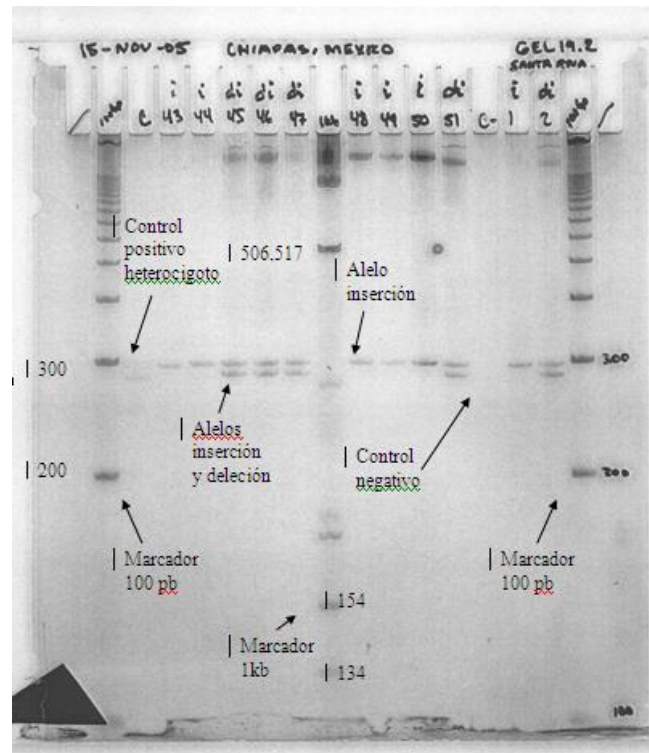
Los mosquitos fueron incubados en un laboratorio y los adultos de 3 a 7 días fueron alimentados con sangre conteniendo 10^{7-8} TCDI₅₀ por mL de virus de dengue-2 proveniente de una cepa no. 1409 de Jamaica. La sangre fue presentada a los mosquitos en un alimentador de sangre artificial con temperatura regulada. Los mosquitos alimentados con sangre fueron separados y mantenidos con agua y azúcar por 14 días como un periodo de incubación extrínseco. En el día 14 las cabezas de los mosquitos fueron separadas y preparadas para detección del virus de dengue por inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal de ratón contra dengue-2. Al mismo tiempo, todos los mosquitos de la generación F2 de la larva colectada en el campo fueron dados la misma alimentación de sangre y analizados utilizados en este estudio de la misma manera que las demás poblaciones estudiadas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Estandarización de la metodología

Con el fin de determinar los alelos de “inserción” y “delección” correspondientes al gen de la tripsina temprana se adaptó el método de electroforesis en gel desnaturizante como se describe en la parte de metodología. En la figura 5 se presenta un ejemplo de un gel obtenido por este método después de la tinción con nitrato de plata. Tiene señalado un control negativo, control positivo heterocigoto, los marcadores usados, y las bandas leídas para los alelos “inserción” y “delección”. Los alelos difieren entre sí por aproximadamente 13 pb. Esta metodología permitió separar estas bandas de forma notoria. Para determinar si el método utilizado es reproducible y preciso, se secuenciaron cinco muestras de cada alelo. El análisis de las secuencias de los alelos encontrados demostró que el método es sensible para diferenciar las 13 pb.

Figura 5. Electroforesis en gel desnaturizante para Chiapas, México. Muestras 43 al 51



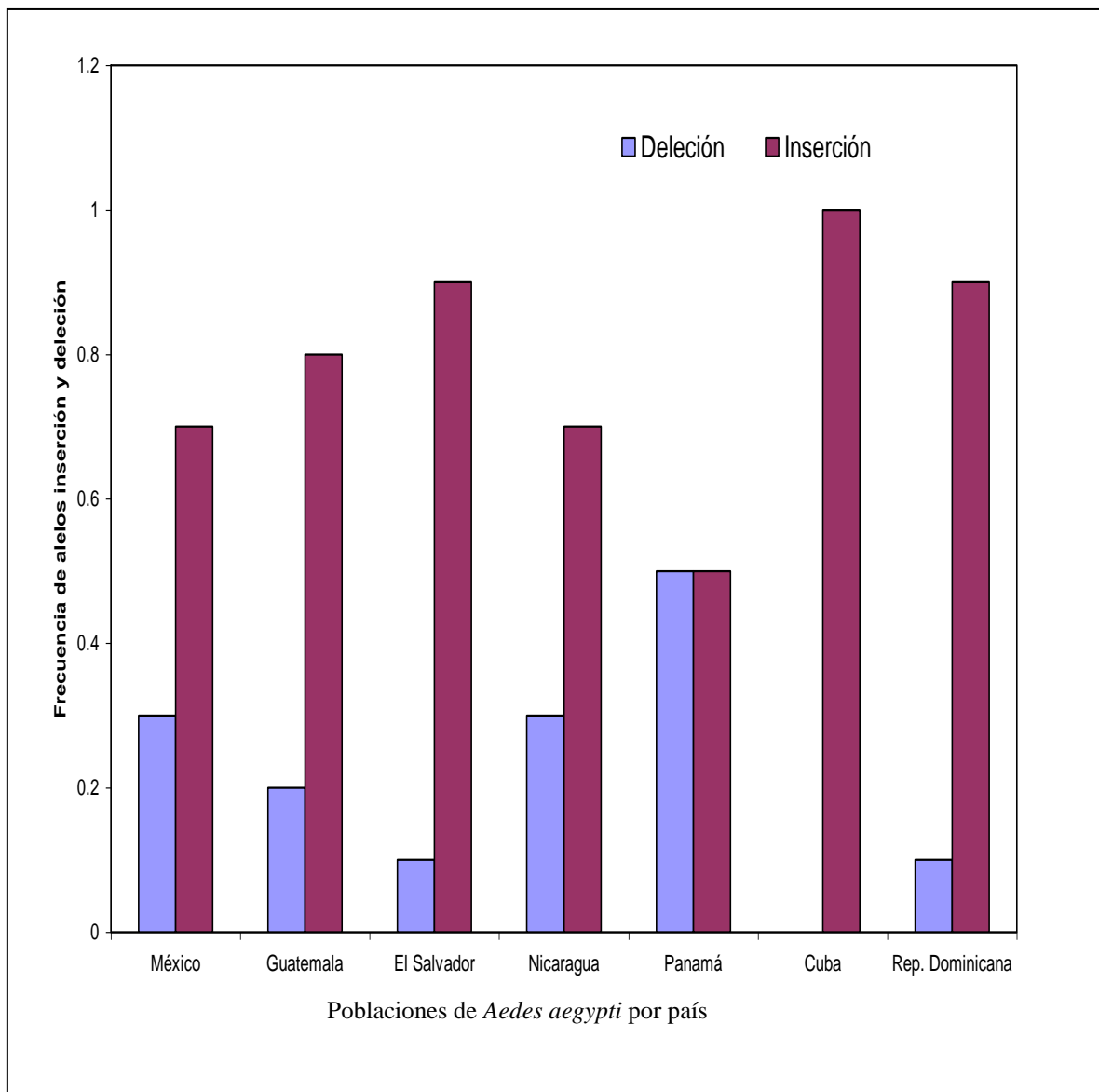
B. Frecuencias alélicas de los individuos estudiados

El número de individuos que se amplificaron con PCR y para los cuales fue posible determinar el genotipo fue de 1,294. Los datos de frecuencias se presentan en el cuadro 3, por población, por país y para el total de individuos analizados. Además se presentan gráficas que ilustran las frecuencias de los alelos en cada país y cada sitio. Ver gráficas 1 y 2. Nótese que (en las frecuencias para el total de individuos) el alelo más frecuente fue el de “inserción”, con 0.8 de frecuencia. En la gráfica 1, se puede ver que el alelo “inserción” fue más frecuente en todos los países excepto en Panamá, donde el alelo “deleción” fue igualmente abundante que el alelo “inserción”. Es importante mencionar también, que en las colecciones de Cuba el alelo “inserción” fue casi absoluto. En la gráfica 2, se nota que en Cuba, se detectaron alelos de “deleción” únicamente en Guanabacoa y La Playa-Habana, correspondientes a la parte noroeste del país. En Panamá, el alelo “deleción” es notablemente más frecuente en Río Abajo, que corresponde a la parte este del país.

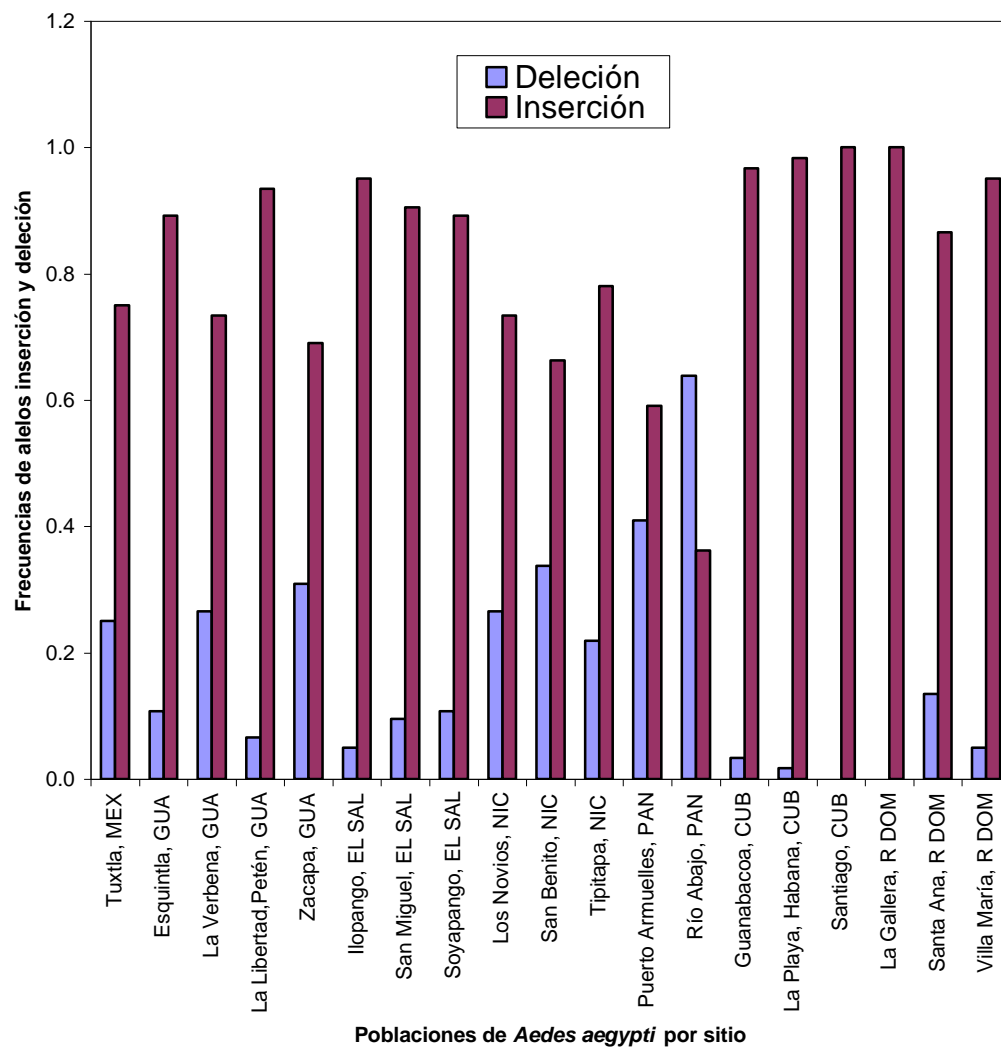
Cuadro 3. Número de muestras para cada alelo y la frecuencia de alelos

| País | Sitio de colección | Nº de muestras | | | Frecuencias | |
|-----------------------------|--------------------|----------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | | delección | inserción | Total | delección | Inserción |
| México | | 17 | 34 | 51 | 0.3 | 0.7 |
| | Tuxtla | 17 | 51 | 68 | 0.3 | 0.8 |
| Guatemala | | 58 | 231 | 289 | 0.2 | 0.8 |
| | Escuintla | 7 | 58 | 65 | 0.1 | 0.9 |
| | La Verbena | 21 | 58 | 79 | 0.3 | 0.7 |
| | La Libertad, Petén | 4 | 57 | 61 | 0.1 | 0.9 |
| | Zacapa | 26 | 58 | 84 | 0.3 | 0.7 |
| El Salvador | | 16 | 173 | 189 | 0.1 | 0.9 |
| | Ilopango | 3 | 58 | 61 | 0.0 | 1.0 |
| | San Miguel | 6 | 57 | 63 | 0.1 | 0.9 |
| | Soyapango | 7 | 58 | 65 | 0.1 | 0.9 |
| Nicaragua | | 64 | 168 | 232 | 0.3 | 0.7 |
| | Los Novios | 21 | 58 | 79 | 0.3 | 0.7 |
| | San Benito | 27 | 53 | 80 | 0.3 | 0.7 |
| | Tipitapa | 16 | 57 | 73 | 0.2 | 0.8 |
| Panamá | | 89 | 82 | 171 | 0.5 | 0.5 |
| | Puerto Armuelles | 36 | 52 | 88 | 0.4 | 0.6 |
| | Río Abajo | 53 | 30 | 83 | 0.6 | 0.4 |
| Cuba | | 3 | 173 | 176 | 0.0 | 1.0 |
| | Guanabacoa | 2 | 58 | 60 | 0.0 | 1.0 |
| | La Playa, Habana | 1 | 58 | 59 | 0.0 | 1.0 |
| | Santiago de Cuba | 0 | 57 | 57 | 0.0 | 1.0 |
| República Dominicana | | 12 | 174 | 186 | 0.1 | 0.9 |
| | La Gallera | 0 | 58 | 58 | 0.0 | 1.0 |
| | Santa Ana | 9 | 58 | 67 | 0.1 | 0.9 |
| | Villa María | 3 | 58 | 61 | 0.0 | 1.0 |
| Total | | 259 | 1035 | 1294 | 0.2 | 0.8 |

Gráfica 1. Frecuencias de los alelos inserción y delección de tripsina temprana en las poblaciones de *A. aegypti* agrupados por país



Gráfica 2. Frecuencias de los alelos inserción y delección de tripsina temprana en las poblaciones de *A. aegypti* agrupadas por sitio *



* MEX = México, GUA = Guatemala, EL SAL = El Salvador, NIC = Nicaragua, PAN = Panamá, CUB = Cuba, R DOM = República Dominicana

C. Análisis estadístico

La mayoría de las poblaciones de los sitios de colecta, con la excepción de dos de Panamá, fue encontrada en equilibrio de Hardy-Weinberg. Para estar en equilibrio de Hardy-Weinberg, el valor de P en la prueba de Chi cuadrado debe ser mayor que 0.05. En el caso de las poblaciones que sí estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg el valor de P fue de 0.14176. Este análisis se hace debido a que las poblaciones estudiadas representan sólo una pequeña parte de la población real de *Aedes*. Por lo tanto, debe asegurarse que no haya errores de muestreo que lleven a una conclusión errónea. El siguiente análisis realizado, AMOVA (ver sección de metodología), permitió agrupar las poblaciones estudiadas como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Distribución de los grupos analizados por AMOVA para las poblaciones de

Aedes de México a Nicaragua

| Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 4 |
|-----------------------------------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| <u>Sitio de colecta en México</u> | <u>Sitios de colecta en Guatemala</u> | <u>Sitios de colecta en El Salvador</u> | <u>Sitios de colecta en Nicaragua</u> |
| 1. Tuxtla | 1. Cementerio Gral., Escuintla | 1. Ilopango | 1. Los Novios |
| | 2. Cementerio La Verbena, Gua | 2. San Miguel | 2. San Benito |
| | 3. La Sabana, Petén | 3. Soyapango | 3. Tipitapa |
| | 4. Llano de Piedra, Zacapa | | |

En el cuadro 5 se presentan los resultados del análisis de varianza, AMOVA. Los resultados de este análisis muestran que existe un porcentaje de variación muy elevado (93.76%) dentro de cada sitio de colecta de México a Nicaragua. Si se compara la variación a nivel de las poblaciones que provienen de los diferentes sitios de colecta dentro de estos países, se observa un porcentaje de variación mucho más pequeño (3.60%). Al comparar la

variación de las poblaciones provenientes de cada país, entre los cuatro países, el porcentaje es aun menor (2.65%).

Cuadro 5. Análisis de varianza molecular entre alelos inserción y delección del gen de tripsina temprana en las poblaciones de *A. aegypti* de México a Nicaragua

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Componentes de varianza | Porcentaje de variación |
|---|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| Entre países de México a Nicaragua | 3 | 4.330 | 0.00299 Va | 2.65 |
| Entre sitios de colecta de México a Nicaragua | 7 | 4.027 | 0.00406 Vb | 3.60 |
| Dentro de sitios de colecta | 1247 | 132.038 | 0.10588 Vc | 93.76 |
| Total | 1257 | 140.395 | 0.11293 | |

Estos resultados nos permiten pensar que podría existir un importante flujo genético entre las poblaciones de *A. aegypti* de México hasta Nicaragua. Dado que el porcentaje de variación entre estos países es relativamente bajo (2.65%), se puede pensar que no existe una barrera genética entre las poblaciones de *A. aegypti* del oeste de América Central.

Luego, se realizó un análisis de varianza molecular entre las poblaciones del oeste de América Central y Panamá. Los dos grupos formados se ven en el cuadro 6. En el cuadro 7 se presentan los resultados del análisis de varianza, AMOVA, para estos dos grupos. Los resultados de este análisis muestran que existe un porcentaje de variación relativamente elevado (58.22%) dentro de cada sitio de colecta del oeste de América Central y Panamá. La variación disminuye (5.16%) al comparar las poblaciones provenientes de los sitios de colecta en estas dos regiones. Sin embargo, esta variación es superior a la que se observaba al tomar únicamente los países del oeste de América Central (comparar cuadros 7 y 5). Los resultados presentados en el cuadro 7 demuestran que al agrupar las poblaciones de *A.*

aegypti del oeste de América Central y compararlas con las poblaciones de Panamá, aumenta sensiblemente el porcentaje de variación (36.62%).

Cuadro 6. Distribución de los grupos analizados por AMOVA para poblaciones del oeste de América Central y Panamá

| Grupo 1 | Grupo 2 |
|---|---|
| <u>Sitios de colecta en el oeste de América Central</u> 1. Tuxtla 2. Cementerio Gral., Escuintla 3. Cementerio La Verbena, Gua 4. La Sabana, Petén 5. Llano de Piedra, Zacapa 6. Ilopango 7. San Miguel 8. Soyapango 9. Los Novios 10. San Benito 11. Tipitapa | <u>Sitios de colecta en Panamá</u> 1. Puerto Armuelles 2. Río Abajo |

Cuadro 7. Análisis de varianza molecular entre alelos inserción y delección del gen de tripsina temprana en las poblaciones de *A. aegypti* del oeste de América Central y Panamá

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Componentes de varianza | Porcentaje de variación |
|---|--------------------|-------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Entre países del oeste de América Central y Panamá | 1 | 31.114 | 0.07765 Va | 36.62 |
| Entre sitios de colecta del oeste de América Central y Panamá | 11 | 15.109 | 0.01094 Vb | 5.16 |
| Dentro de sitios de colecta | 1471 | 181.569 | 0.12343 Vc | 58.22 |
| Total | 1483 | 227.792 | 0.21202 | |

Los resultados obtenidos a raíz de este análisis nos llevan a pensar que posiblemente hay poco flujo genético entre las poblaciones de *A. aegypti* del oeste de América Central y Panamá, por lo tanto pueda que exista una barrera genética entre estas dos regiones. La siguiente etapa de análisis consistió en comparar por medio del AMOVA las poblaciones de América Central (incluyendo Panamá) y el Caribe. Para este análisis se formaron los dos grupos señalados en el cuadro 8.

Cuadro 8. Distribución de los grupos analizados por AMOVA para poblaciones de América Central y el Caribe

| Grupo 1 | Grupo 2 |
|---|---|
| <u>Sitios de colecta en América Central</u> | <u>Sitios de colecta en Cuba y República Dominicana</u> |
| 1. Tuxtla | 1. Guanabacoa |
| 2. Cementerio Gral., Escuintla | 2. La Playa, Habana |
| 3. Cementerio La Verbena, Gua | 3. Santiago, Cuba |
| 4. La Sabana, Petén | 4. La Gallera |
| 5. Llano de Piedra, Zacapa | 5. Santa Ana |
| 6. Ilopango | 6. Villa María |
| 7. San Miguel | |
| 8. Soyapango | |
| 9. Los Novios | |
| 10. San Benito | |
| 11. Tipitapa | |
| 12. Puerto Armuelles | |
| 13. Río Abajo | |

En el cuadro 9 se presentan los resultados del análisis de varianza, AMOVA, para estos dos últimos grupos. Se muestra que existe un porcentaje de variación mucho mayor entre los individuos dentro de todos los sitios de colecta (72.53%), que entre los dos grupos analizados (8.92%) y entre los sitios de colecta dentro de los países (18.55%).

Cuadro 9. Análisis de varianza molecular entre alelos inserción y delección del gen de tripsina temprana en las poblaciones de *A. aegypti* de América Central y el Caribe

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Componentes de varianza | Porcentaje de variación |
|--|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| Entre países de América Central vs. Caribe | 1 | 13.305 | 0.01115 Va | 8.92 |
| Entre sitios de colecta de América Central y el Caribe | 17 | 46.717 | 0.02319 Vb | 18.55 |
| Dentro de sitios de colecta | 2159 | 195.750 | 0.09067 Vc | 72.53 |
| Total | 2177 | 255.772 | 0.12500 | |

En esta última comparación, se conserva la tendencia a tener una importante variación de los individuos dentro de los sitios de colecta (72.53%). También se puede notar que existe variación entre las poblaciones de los diferentes sitios de colecta de las dos regiones (18.55%). Finalmente, al comparar en su conjunto las poblaciones de América Central (Panamá incluida) y el Caribe, se puede notar que existe una mayor variación (8.92%) en este caso que entre los países del oeste de América Central, de México a Nicaragua (comparar cuadro 9 y cuadro 5). Este análisis nos lleva a pensar que posiblemente hay poco flujo genético entre las poblaciones de *A. aegypti* de América Central (de México a Panamá) comparadas con las del Caribe. Estos resultados sugieren que podría existir una barrera genética entre estas dos regiones.

En el cuadro 10, se presentan los índices de fijación de Wright. El índice de fijación por grupos (F_{CT}) corresponde a la diferencia genética entre los grupos establecidos. Si este valor cae dentro del rango de 0.00 a 0.05, entonces indica poca diferencia genética. Si este valor cae dentro del rango de 0.05 a 0.15, entonces indica una diferencia genética moderada. En cambio, si este valor cae dentro del rango de 0.15 a 0.25, entonces indica una diferencia genética elevada. Un valor mayor que 0.25 indica una diferencia genética enorme.

Cuadro 10. Índices de fijación de Wright para los tres análisis de varianza molecular

| Agrupación | Valor de F_{CT} |
|--|-------------------------------------|
| Entre los países desde México hasta Nicaragua | 0.02645 |
| Entre los países del oeste de América Central (desde Méx. a Nic.) versus Panamá | 0.36621 |
| Entre los países de América Central (desde Méx. a Pan) versus el Caribe | 0.08917 |

Para las poblaciones de México hasta Nicaragua se obtuvo un índice de fijación de 0.02645. Este valor está fuera del rango mencionado y sugiere que hay poca diferencia genética entre los grupos establecidos. Esto apoya los resultados de los porcentajes de variación del análisis de frecuencias de alelos.

Para los grupos del oeste de América Central y Panamá se obtuvo un índice de fijación de 0.36621. Este valor indica que hay diferencia genética enorme entre esas dos regiones. Con base a estos resultados se podría pensar entonces que existe una barrera genética entre el Oeste de América Central (México-Nicaragua) y Panamá.

Al agrupar todos los países de México a Panamá como “América Central” y comparar con el Caribe se obtuvo un índice de fijación de 0.08917, indicando que existe una diferencia genética moderada. Este dato confirma el análisis de frecuencias de alelos y sugiere que podría existir una barrera genética entre América Central y el Caribe. Con base a estos resultados se puede pensar que el mar Caribe podría ser una barrera genética para el flujo de genes entre ambas regiones.

Para determinar si la diferencia genética entre las poblaciones se correlaciona con la distancia geográfica, se realizó el análisis de Mantel (ver en la sección de metodología). En nuestro caso, ninguna correlación fue encontrada entre las distancias genéticas y las

distancias geográficas ($R^2=0.02$, probabilidad de Mantel = 0.05) entre las poblaciones de México a Nicaragua. Esto sugiere que el flujo genético no cambia (ni disminuye, ni aumenta) conforme se aumenta la distancia geográfica entre las poblaciones. Como el análisis de varianza molecular ya había indicado que existe una diferencia significativa entre el oeste de América Central y Panamá, no se realizó el análisis de Mantel con esos grupos. Al mostrar que no hay aislamiento por distancia en el oeste de América Central, se hace más notorio que la diferencia con Panamá no es debida a la distancia sino a alguna posible barrera. Lo más probable es que la barrera sea una barrera geográfica, como por ejemplo, la Cordillera de Talamanca y/o la Serranía de Tabasará en Costa Rica.

Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos en un estudio previo en donde se utilizó un marcador mitocondrial correspondiente a un fragmento del gen que codifica a la subunidad cuatro de la NADH deshidrogenada (gen *ND4*) (ver tesis de licenciatura en Bioquímica, M. R. López 2005). Las dos clases de marcadores genéticos utilizados en estos estudios (*ND4*, tripsina temprana), sugieren que existe un flujo genético entre las poblaciones de *A. aegypti* de América Central. En cambio, entre América Central y el Caribe el flujo genético aunque existente, es más limitado. En conjunto, los dos estudios sustentan la hipótesis que el mar Caribe podría servir como una barrera geográfica que limita el flujo genético.

Los resultados obtenidos para los países de América Central estudiados también concuerdan con los obtenidos en un estudio realizado en México donde se utilizó como marcador molecular ADN mitocondrial (gen *ND4*) (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2000).

Una diferencia importante encontrada en este estudio (utilizando un marcador nuclear) y el estudio de López (que utilizaba un marcador mitocondrial) es la variabilidad observada entre las poblaciones del oeste de América Central y Panamá. En efecto, con el marcador

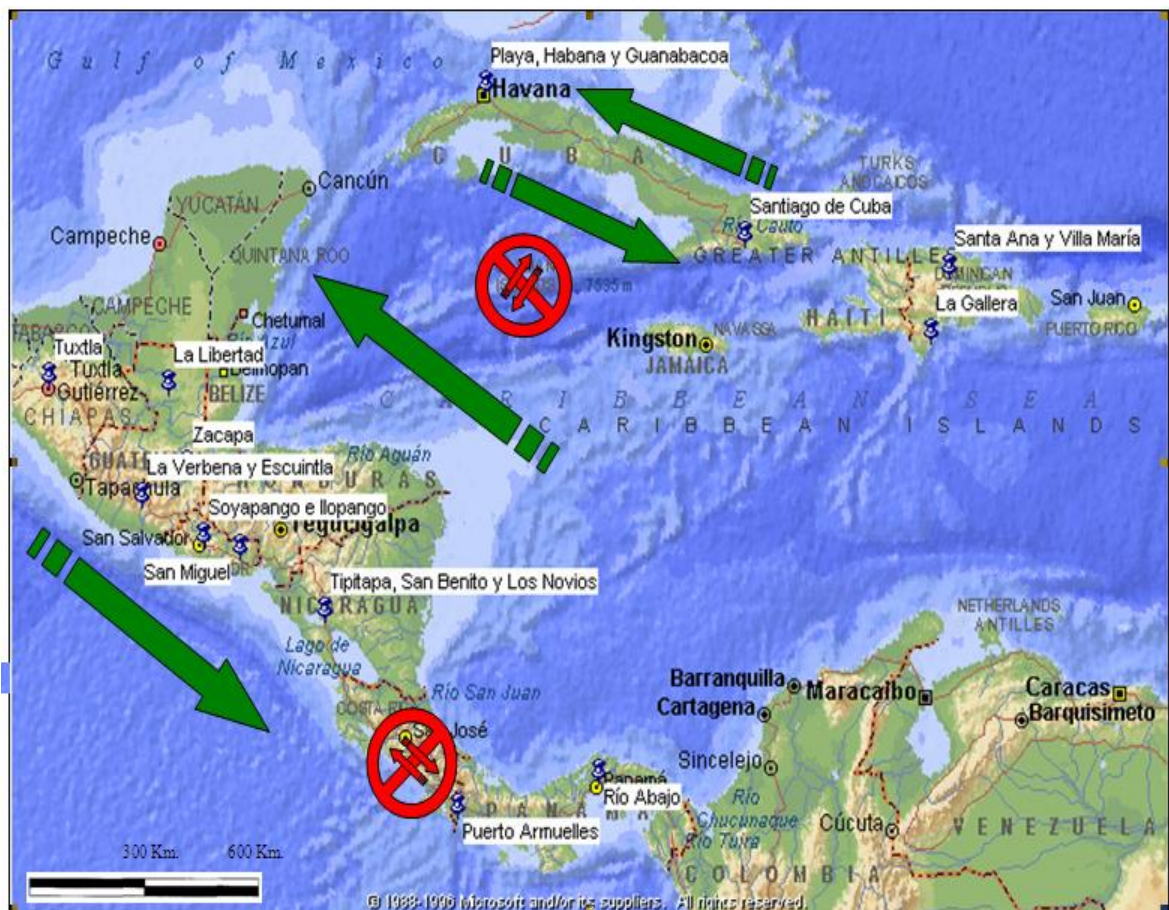
ND4 no se observó diferencia entre el oeste de América Central y Panamá. Se podría sugerir que exista una barrera geográfica entre estas dos regiones que podría ser detectada únicamente con el marcador nuclear y no con un marcador mitocondrial. Adicionalmente, las diferencias observadas con el marcador nuclear concuerdan con los resultados obtenidos en dos estudios realizados con el vector de malaria, *Anopheles albimanus*. Estos dos estudios utilizaron ADN mitocondrial y secuencias microsatélites como marcadores moleculares (Molina-Cruz, *et al.* 2004 y Mills 2001). Los autores de estos estudios, al igual que en este estudio, habían propuesto que existe la posibilidad de que la Cordillera de Talamanca y la Serranía de Tabasará en Costa Rica puedan servir como barrera geográfica al flujo genético entre el oeste de América Central y Panamá. Otros factores que podrían contribuir son por ejemplo las vías de transporte y comunicación entre los países del oeste de América Central ya que existe entre estos mismos un triangulo comercial activo, que no está tan marcado con Panamá.

Para confirmar los resultados se sugiere, realizar los mismos análisis con poblaciones de *A. aegypti* provenientes de Costa Rica, que desafortunadamente no pudieron ser incluidos en este trabajo. En la figura 6 se muestran, con flechas verdes, los sitios donde podría haber flujo genético y en rojo las posibles barreras geográficas.

La susceptibilidad de las poblaciones de *A. aegypti* al virus de dengue 2, fue analizada con poblaciones de *A. aegypti* de Guatemala y El Salvador en complemento a este estudio, por el Dr. Álvaro Molina quien realizó esta parte del trabajo en su laboratorio. Como se presenta en el cuadro 11, la susceptibilidad al virus de dengue 2 varió considerablemente (39-93%) entre las poblaciones probadas. Esto sugiere que aunque los marcadores genéticos nucleares y los de origen mitocondrial no detecten una variación genética significativa entre las poblaciones del área del oeste de América Central, pueda que haya una variación en los

genes que determinen la susceptibilidad del vector al virus de dengue. La susceptibilidad de las poblaciones de *A. aegypti* al virus de dengue 2, fue analizada con poblaciones de *A. aegypti* de Guatemala y El Salvador en complemento a este estudio, por el Dr. Álvaro Molina quien realizó esta parte del trabajo en su laboratorio. Como se presenta en el cuadro 11, la susceptibilidad al virus de dengue 2 varió considerablemente (39-93%) entre las poblaciones probadas. Esto sugiere que aunque los marcadores genéticos nucleares y los de origen mitocondrial no detecten una variación genética significativa entre las poblaciones del área del oeste de América Central, pueda que haya una variación en los genes que determinen la susceptibilidad del vector al virus de dengue.

Figura 6. Flujo genético entre las poblaciones de *A. aegypti*



Cuadro 11. Susceptibilidad a una infección por el virus *Dengue-2* de las poblaciones de *A. aegypti* provenientes de Guatemala y El Salvador

| Población | Nº de Individuos | Infectados con Dengue-2 | % Infectados |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Cementerio Guatemala (Gua) | 19 | 11 | 58 |
| Petén (Gua) | 36 | 25 | 69 |
| Cementerio La Verbena (Gua) | 34 | 23 | 68 |
| Zacapa (Gua) | 46 | 43 | 93 |
| Libertad (El Sal) | 40 | 31 | 78 |
| Sta. Ana (El Sal) | 29 | 18 | 62 |
| San Salvador (El Sal) | 28 | 11 | 39 |

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. Conclusiones

1. Se determinó la presencia del alelo “inserción” y “delección” en un fragmento de ~300 pb correspondientes al gen nuclear de la tripsina temprana en *Aedes aegypti*.
2. El alelo “inserción” fue más frecuente en todos los países excepto en Panamá, donde el alelo “delección” fue igualmente abundante que el alelo “inserción”.
3. En las colecciones de Cuba el alelo “inserción” fue casi absoluto.
4. La mayoría de las poblaciones, con la excepción de las dos de Panamá, fueron encontradas en equilibrio de Hardy-Weinberg.
5. Existe un importante flujo genético entre las poblaciones de *A. aegypti* de México hasta Nicaragua.
6. Entre América Central y el Caribe existe una diferencia genética moderada, sugiriendo que el mar Caribe podría servir como una barrera geográfica que limita el flujo genético.
7. Entre los países del oeste de América Central y Panamá existe una diferencia genética enorme, indicando que posiblemente exista una barrera geográfica, como la Cordillera de Talamanca y la Serranía de Tabasará en Costa Rica.
8. Los resultados de la región de América Central concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado en México (Gorochotegui-Escalante *et al.* 2000) y el estudio realizado previamente en nuestro laboratorio utilizando un marcador mitocondrial (López 2005).

9. Se podría sugerir que existe una barrera geográfica entre las poblaciones del oeste de América Central que puede ser detectada únicamente con el marcador nuclear y no con un marcador mitocondrial.

10. Las diferencias observadas con el marcador nuclear concuerdan con los resultados obtenidos en dos estudios realizados con el vector de malaria (Molina-Cruz, *et al.* 2004 y Mills 2001).

B. Recomendaciones

1. Se recomienda confirmar los resultados con poblaciones de *A. aegypti* de Costa Rica.

VII. LITERATURA CITADA

- Ayres, C.F.J., T.P.A. Romao, M.A.V. Melo-Santos, y A.F. Furtado. Genetic Diversity in Brazilian Populations of *Aedes albopictus*. *Memorial Institute Oswaldo Cruz*, (2002) **97**(6), pp. 871-875.
- Bennett, Kristine E., K. Olson, M.D.L. Muñoz, I. Fernandez-Salas, J.A. Farfan-Ale, S. Higgs, W.C. Black IV, y B.J. Beaty. Variation in Vector Competence for Dengue 2 Virus Among 24 Collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, (2002) **67**(1), pp. 85-92.
- Black IV, William C., C. F. Baer, M. F. Antolin, y N. M. DuTeau. Population Genomics: Genome – Wide Sampling of Insect Populations. *Annu. Rev. Entomol.* (2001) **46**, pp. 441 – 469.
- Black IV, William C., K. Bennet, N. Gorrochótegui-Escalante, C. V. Barillas-Mury, I. Fernández-Alé, K. E. Olson y B.J. Beaty. Review Article: Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research* (2002) **33**, pp. 379-388.
- Bosio C.F., Fulton R.E., Salasek M.L., Beaty B.J., Black W.C.IV. “Quantitative trait *loci* that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*.” *Genetics* 2000; 156:687-698.
- Calisher, Charles H. Persistent Emergence of Dengue. *Emerging Infections Disease*. (2005) **11** (5), 738-739.
- Center of Disease Control and Prevention (CDC). Dengue Fever Fact Sheet. CDC Division of Vector – Borne Infectious Diseases. 2005.

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-distribution-2005.htm>

Center of Disease Control and Prevention (CDC). El Dengue y el Dengue

Hemorrágico: Información para los Médicos. CDC Division of Vector – Borne

Infectious Diseases. 2003. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>

Center of Disease Control and Prevention (CDC). Dengue and Dengue Hemorrhagic

Fever: Questions and Answers. CDC Division of Vector – Borne Infectious

Diseases. 2003b. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/den.htm>

Diccionario Iter Sopena Latino-Español. Editorial Ramón Sopena S.A. Barcelona,

1987. pp. 507.

Effler, Paul V., L. Pang, P. Kitsutani, et al. Dengue Fever, Hawaii, 2001-2002.

Emerging Infections Disease. (2005) **11** (5), 742-749.

García-Franco, Francisco, M. Muñoz, S. Lozano-Fuentes, I. Fernández-Salas, J. García-

Rejon, B. J. Beaty, y W. C. Black IV. Large Genetic Distances among *Aedes*

aegypti Populations along the South Pacific Coast of Mexico. *Am. J. Trop.*

Med. Hyg.(2002) **6**(5), pp. 594-598.

Gorrochotegui-Escalante, N., M. De Lourdes Munoz, I. Fernandez-Salas, B.J.Beaty y

William C. Black IV. Genetic Isolation by Distance among *Aedes aegypti*

Populations along the Northeastern Coast of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*

(2000) **62**(2), pp. 200-209.

INCAP, Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Desarrollo y Validación

de una Estrategia Comunitaria para la Reducción del Riesgo de Dengue y

- Diarrea en Ecosistemas Urbanos de la Frontera de Guatemala con el Sur de México. Guatemala, 2003.
- Jiang, Q., M. Hall, F.G. Noriega, y M.A. Wells. cDNA Cloning and Pattern of Expression of an Adult, Female-Specific Chymotrypsin from *Aedes aegypti* Midgut. *Insect Biochemical Molecular Biology* (1997) **27**(4), 283-289.
- Hartl, D y E. Jones. Essential Genetics: A Genomics Perspective. 3^a ed. Jones and Bartlett Publishers. 2002. pp. 613.
- López, M. Estudio de la Variabilidad Genética entre Poblaciones del Mosquito *Aedes aegypti* en México, América Central y el Caribe. Tesis, Universidad Del Valle de Guatemala, Guatemala. 2005.
- Medline Plus: Información de Salud para Usted. Biblioteca Nacional de Medicina de E.E.U.U. y los Institutos Nacionales de la Salud. 2006. <http://www.nlm.nih.gov/> y <http://medlineplus.gov/spanish/>.
- Mills, K. Estudio de la variabilidad genética de poblaciones de *Anopheles albimanus* de América Latina, mediante el uso de secuencias microsatélites como marcadores moleculares. Tesis, Universidad Del Valle de Guatemala. Guatemala, 2001.
- MSPAS. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. *La Semana Epidemiológica en Guatemala*. Semana No. 47, 2005. <http://www.mspas.gob.gt/cms2/docs/epi/SEM%20No%2047-2005.pdf>
- Noriega, F.G., J.E. Pennington, C. Barillas-Mury, X.Y. Wang y M.A. Wells. *Aedes*

aegypti midgut early trypsin is post-transcriptionally regulated by blood feeding.

Blackwell Science Ltd, *Insect Molecular Biology* (1996a) **5**(1), 25-29.

OPS. El Dengue en Centroamérica: Las epidemias de 2000. *Boletín Epidemiológico*,

Vol. 21 No. 4, 2000.

Peyrefitte, Christophe N., B. A. M. Pastorino, M. Bessaud, et al. Dengue Type 3 Virus,

Saint Martin, 2003-2004. *Emerging Infectious Diseases*. (2005) **11**(5), 757-761.

Russell, R.C. A colour photo atlas of mosquitos of Southeastern Australia. *Medical*

Entomology, Westmead Hospital. (1996).

<http://medent.usyd.edu.au/photos/aedes%20aegypti.htm>

Schoua, C. Estudio genético de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus*

mediante secuencias microsatélites. Tesis, Universidad Del Valle de Guatemala.

Guatemala, 2000.

World Health Organization. Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Fact Sheet

No.117. (2002). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/print.html>

VIII. GLOSARIO

Alelo: cualquiera de las formas alternativas de un gen dado. (Hartl 2002)

Cebador: un segmento corto de ADN de una sola banda o de ARN que funciona como un punto de partida en la polimerización; también llamado primer o iniciador. (Hartl 2002)

Competencia vectorial por un virus: una función de barreras biológicas en la cual un virus ingerido debe atravesar para ser replicado y finalmente transmitido. (Black 2001)

Delección: pérdida de un segmento del material genético de un cromosoma; también llamado deficiencia. (Hartl 2002)

Fenotipo: Las propiedades observables de una célula o un organismo, que resulta de una interacción del genotipo y el medio ambiente. (Hartl 2002)

Gen: la región de ADN que codifica para ARN, sin importar si el ARN es luego modificado y traducido en enzimas y proteínas o que tenga otras funciones dentro de la célula. (Black 2001)

Gen candidato: un gen propuesto de estar involucrado en una determinación genética de una característica por el rol de producto del gen en la célula u organismo. (Hartl 2002)

Generación F2: la segunda generación de descendencia de un apareamiento dado, producido por entrecruzamiento con organismos de primera generación. (Hartl 2002)

Genética de poblaciones: aplicación de las leyes de Mendel y otros principios de la genética a poblaciones enteras de organismos. (Hartl 2002)

Heterocigoto: contiene alelos no similares de uno o más genes. (Hartl 2002)

Homocigoto: contiene el mismo alelo de un gen en cromosomas homólogos. (Hartl 2002)

Locus: el sitio de una secuencia de ADN particular en un genoma, sin importar si codifica para ARN o no. (Black 2001)

Loci con características cuantitativas: un locus segregando para alelos que tienen diferentes efectos medibles en la expresión de una característica cuantitativa. (Hartl 2002)

Razón de migración efectiva: el número de individuos reproductivos migratorios entre poblaciones. (Gorrochotegui 2000).

Varianza del tamaño poblacional efectivo: el cambio en la varianza de frecuencias de alelos entre poblaciones y se define como la media armónica de una población de adultos reproductivos sobre una unidad de área. (Gorrochotegui 2000).