

II. ANTECEDENTES

A. Paludismo

1. **Descripción.** El paludismo o malaria es una enfermedad causada por protozoarios intracelulares del género *Plasmodium*, que viven parte de su vida dentro del ser humano y parte dentro del vector, hembras del mosquito *Anopheles*. Sigue siendo uno de los principales problemas para la salud pública a nivel mundial, amenazando la vida de más de una tercera parte de la población (NIAID, 2001).

2. **Epidemiología.** El paludismo se ha reportado desde tiempos antiguos, los escritos de egipcios y griegos hablan de la enfermedad (NIAID, 2001). Pero no fue hasta 1897 cuando el científico Ronald Ross descubrió que la causa del paludismo era el parásito unicelular del género *Plasmodium*. Se cree que la malaria se originó en África, desde donde el *Plasmodium* fue traído al Nuevo Mundo cuando los primeros marineros cruzaron el Pacífico (Bynum, 2002).

a) **Epidemiología a nivel mundial.** El paludismo es la enfermedad parasitaria tropical más importante a nivel mundial. Actualmente, alrededor del 40% de la población mundial, en su mayoría aquellos que viven en los países más pobres, están en riesgo de contraer malaria. Se estima que 90 países o territorios en el mundo son áreas maláricas y de estas, casi la mitad están localizadas en África (Figura 1). El paludismo es endémico en regiones tropicales y sub-tropicales del mundo, y causa más de 300 millones de casos y por lo menos 1 millón de muertes anuales. El 90% de las muertes ocurren en África, en regiones al sur del Sahara, y en su mayoría las víctimas son niños (WHO/OMS, 2002).

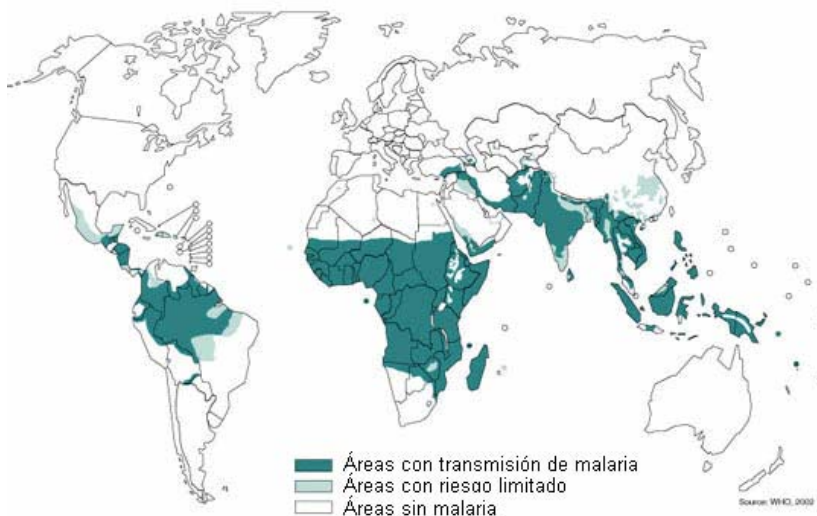


Figura 1. Distribución geográfica de la malaria a nivel mundial (WHO/OMS, 2002)

b) Epidemiología en Guatemala. El paludismo es una enfermedad endémica en Guatemala. En el país la intensidad de transmisión varía de un área a otra. Guatemala está atravesada por cordilleras que dividen el territorio de norte a sur y la transmisión está limitada a los valles por debajo de los 900 m sobre el nivel del mar, con unos pequeños focos a 1,400m (NIAID, 2001). El área malárica abarca 80% del territorio nacional, 20 de los 22 departamentos (Figura 2). Hay alto riesgo en los departamentos de Alta Verapaz, Quiché, Izabal, Petén y San Marcos. Existe un riesgo moderado en los departamentos de Escuintla, Huehuetenango, Quiché, Retalhuleu, Suchitepéquez, Baja Verapaz, El Progreso, Jalapa, Santa Rosa, Sacatepéquez, Chimaltenango y Quetzaltenango. Los departamentos con bajo riesgo son Jutiapa, Chiquimula y Zacapa. En el año 2000, se reportaron 18.5 nuevos casos de malaria parasitológicamente confirmados por cada 1000 habitantes bajo vigilancia (PAHO, 2002).

La baja mortalidad atribuida al paludismo en Guatemala se debe principalmente a que predominan las infecciones por el parásito *P. vivax* (98% de los casos), y a la amplia distribución de medicamentos anti-maláricos. Sin embargo, la morbilidad tiene un gran impacto en el bienestar económico y social de los residentes (NIAID, 2001).

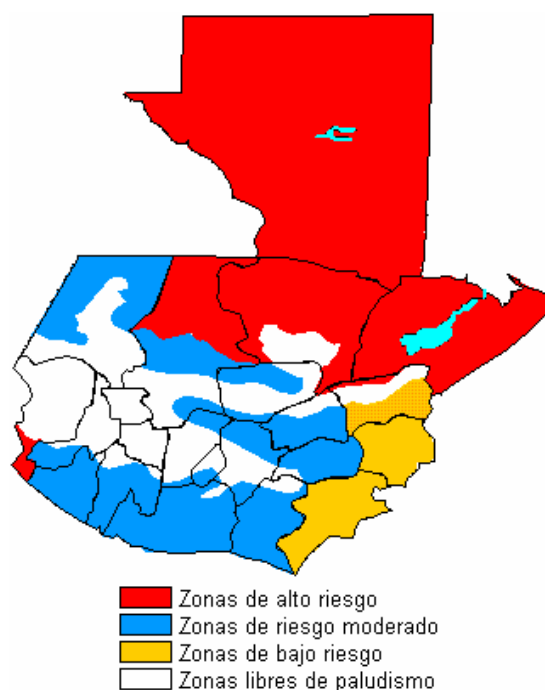


Figura 2. Distribución geográfica del paludismo en Guatemala (PAHO, 2001)

3. Ciclo de transmisión de la enfermedad

a. Parásito. El paludismo es causado por un organismo unicelular del género *Plasmodium*. Existen aproximadamente 156 especies de *Plasmodium* que infectan a varias especies de vertebrados. Se conocen cuatro especies que infectan al humano: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* (CDC, 1992). El ciclo de vida del parásito del paludismo involucra dos hospederos, el zancudo y el humano (Figura 3). Cuando los parásitos se encuentran en la sangre son los responsables de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad (CDC, 2002).

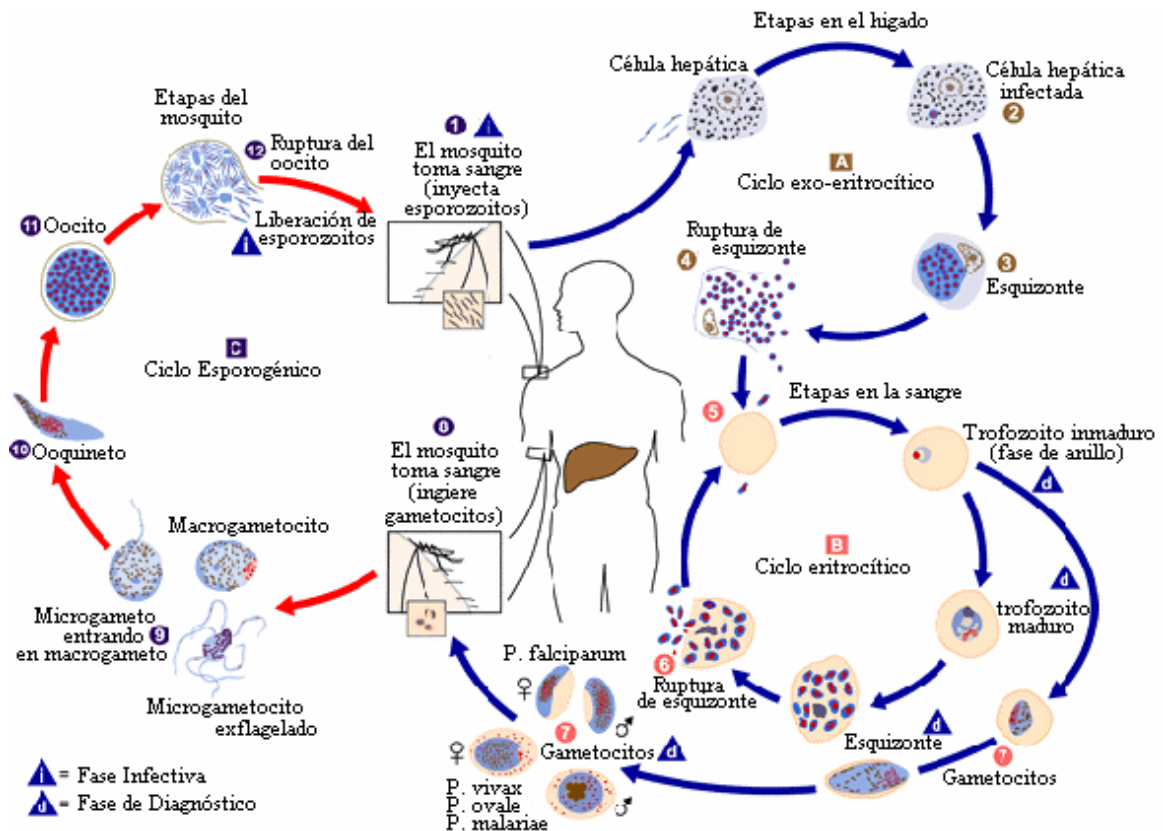


Figura 3. Ciclo de vida del parásito del paludismo (CDC, 2002). Durante una alimentación con sangre, un mosquito *Anopheles* hembra, infectado, inocula esporozoitos en el hospedero humano (1). Los esporozoitos infectan las células del hígado (2) y se desarrollan en esquizontes (3), los cuales se rompen y liberan merozoitos. Adicionalmente, en *P. vivax* y *P. ovale* existe un estado latente, los hipnozoitos, que pueden persistir en el hígado y activarse semanas e incluso años más tarde, en el torrente sanguíneo. Después de esta replicación inicial en el hígado (A), los parásitos se multiplican asexualmente en los eritrocitos. Los merozoitos infectan los glóbulos rojos (5). Los trofozoitos que están en fase de anillo

maduran en esquizontes, que al romperse liberan merozoitos (6). Algunos parásitos se diferencian en fases sexuales en los eritrocitos (gametocitos) (7). Los gametocitos, masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos), son ingeridos por el mosquito *Anopheles* cuando se alimentan de sangre (8). A la multiplicación de los parásitos dentro del mosquito se le conoce como ciclo esporogénico (C). Cuando se encuentran dentro del estómago del mosquito, los microgametos penetran los macrogametos generando cigotos (9). Los cigotos se vuelven móviles y elongados (ooquinetos) e invaden la pared del tracto digestivo del mosquito donde se desarrollan en oocitos (11). Los oocitos crecen, se rompen y liberan esporozoitos (12), que llegan a las glándulas salivares del mosquito. La inoculación de esporozoitos en un nuevo hospedero humano, perpetua el ciclo de vida del paludismo (1).

b. Vector. El mosquito vector del paludismo pertenece a la familia Culicidae y subfamilia Anophelinae, género *Anopheles*. Se conocen en el mundo cerca de 2,500 especies de mosquitos, de los cuales aproximadamente 300 son *Anopheles* y únicamente unas 60 especies son reconocidas como vectores de la malaria (Bonilla y Dardón, 1980). El paludismo es transmitido a los humanos por la hembra de los zancudos, ya que ésta necesita tomar sangre para el desarrollo de sus huevos (Figura 4). Los mosquitos adultos presentan un dimorfismo sexual marcado, ya que las hembras generalmente son más grandes y poseen partes bucales adaptadas para picar; mientras que los machos presentan partes bucales adaptadas para alimentarse de jugos de plantas y néctar en vez de sangre, y por lo tanto no pueden transmitir la enfermedad. Solamente ciertas especies de anofelinos son vectores exitosos del parásito. Algunas especies prefieren chupar sangre de animales y por lo tanto muy raramente o nunca transfieren la enfermedad al humano; algunas especies no viven lo suficiente como para permitir que el parásito se multiplique y se desarrolle dentro del zancudo; y en otras el parásito es incapaz de desarrollarse (NIAID, 2001).

Existen cuatro estadios en el ciclo de vida del zancudo, huevo, larva, pupa y adulto. De estos, los primeros tres (huevos, larva y pupa) se desarrollan en el agua. La hembra adulta grávida toma una alimentación sanguínea aproximadamente cada dos o tres días. Esto es necesario para el desarrollo de los huevos, que normalmente se ponen u ovipositan antes de que la hembra tome otra vez sangre. El tiempo necesario para la digestión de la sangre y desarrollo de los huevos varía con la temperatura y humedad del aire, que en general deben de ser altas. Los huevos (Figura 5) son depositados directamente en el agua en grupos de aproximadamente 100-150. el sitio de ovipostura varía desde pequeños residuos de agua en sitios como cáscaras de coco y huellas de ganado, hasta cuerpos grandes de agua como pozas, canales, zanjonés, rebalse de ríos, etc. (NIAID, 2001).



Figura 4. Anofelino tomando sangre (WHO/TDR/LSTM, 2003). Es característica de la hembra defecar una gota de sangre cuando está llena.



Figura 5. Huevos de *Anopheles stephensi*. (WHO/TDR/LSTM, 2003)

Una hembra pone huevos durante toda su vida. La mayoría pone de uno a tres grupos de huevos, y en algunas ocasiones se ha reportado hasta 13 oviposturas.

Bajo las mejores condiciones el promedio de vida de una hembra anofelina es de dos a tres a semanas. Después de dos ó tres días los huevos revientan (eclosionan) y las larvas del zancudo emergen. Las larvas generalmente viven justo debajo de la superficie del agua (ya que necesitan respirar aire para obtener O_2) y toman su alimento en el agua (NIAID, 2001).

Existen cuatro estadios larvales o instars (Figura 6). El tiempo de desarrollo requerido por cada uno de los diferentes estadios depende de varios factores, incluyendo la temperatura del agua: el período de desarrollo es más corto cuando el agua esta tibia que en agua fría. A la temperatura del agua tropical, el

estadio larval dura aproximadamente de 8-10 días. Finalmente, el cuarto instar se convierte en una pupa (NIAID, 2001).

Durante el estadio de pupa (Figura 7) ocurre la mayor metamorfosis, y el organismo acuático cambia a un zancudo adulto capaz de volar. La pupa nada cuando se le molesta, pero no come. Cuando termina la metamorfosis, su piel se rasga y el insecto adulto emerge y vuela. El apareamiento ocurre seguidamente; la hembra, que por lo general se aparea sólo una vez, normalmente toma su primera alimentación sanguínea después de aparearse y se desarrolla el primer grupo de huevos (NIAID, 2001).



Figura 6. Estadíos larvarios de *Anopheles* (NSW Health, 2003). La larva pequeña que emerge del huevo se llama primer instar. Después de uno o dos días esta muda de piel y se convierte en larva del segundo instar; a intervalos subsecuentes de alrededor de dos días, el tercer y cuarto instar aparecen. El cuarto instar se convierte en pupa.



Figura 7. Pupa de zancudo *Anopheles* (WHO/TDR/Wilmore, 2003). Pupas en forma de «coma» permanecen en la superficie del agua. El estadio dura de 2-3 días.

La mayoría de anofelinos pican cuando la temperatura es fresca, durante la noche, algunos al atardecer o amanecer y otros a la media noche. En general, la mayoría de las especies pican durante toda la noche con picos más altos a ciertas horas. La forma principal de alimentación del *Anopheles* es importante. Si el vector se alimenta principalmente de sangre humana, es antropofílico, y si se alimenta principalmente de sangre de animales es zoofílico. Basándose en su hábitat, las especies se pueden clasificar como endofílicas, que permanecen en las habitaciones de los humanos, o exofílicas, que permanecen la mayor parte del tiempo afuera. Una vez alimentados, buscan una superficie cercana para reposar, usualmente en las paredes, debajo de los muebles o en la ropa colgada. Los zancudos que pican afuera reposan en vegetación, en agujeros oscuros en el suelo, o en otros lugares oscuros (Klowden, 1996; NIAID, 2001).

1) **Vectores de malaria en Guatemala.** En Guatemala, se han identificado 18 especies de anofelinos (Clark-Gil and Darsie, 1983). De éstas, 7 especies se han colectado picando a humanos en áreas endémicas para malaria: *A. albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, *A. darlingi*, *A. vestitipennis*, *A. punctimacula*, *A. apicimacula* y *A. neomaculipalpus*. La variedad de anofelinos que pican a los humanos varía de acuerdo a la región del país. Cuatro especies se consideran vectores de malaria en Guatemala: *A. albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, *A. darlingi* y *A. vestitipennis*. *Anopheles albimanus* Wiedeman es prácticamente la única especie que se ha colectado picando a humanos a lo largo de las tierras

bajas de la costa del Pacífico de Guatemala y, consecuentemente, es considerado el responsable de la transmisión de malaria en esta área (Padilla, 1997).

Anopheles albimanus está ampliamente distribuido en el continente americano y es el principal vector de malaria en la costa pacífica de la región centroamericana. No pertenece a ningún complejo de especies, por lo que puede ser identificado morfológicamente. A lo largo de su distribución es la especie antropofágica dominante y, a pesar que es considerado un vector primario, *An. albimanus* es principalmente esofágico, zoofágico y presenta bajas concentraciones de esporozoitos (Ramsey *et al.*, 1986; Collins *et al.*, 2000). Aún no se sabe si su capacidad vectorial está determinada principalmente por su alta densidad, o si solamente una pequeña fracción dentro de una gran población que se observa comúnmente en el campo es la que está involucrada en la transmisión de la malaria. Las poblaciones de *An. albimanus* varían ampliamente en su ecología larval, comportamiento de picadura, preferencia al hospedero, susceptibilidad a infecciones por *Plasmodium*, y la morfología de los huevos, larvas y estados de las pupas (Frederickson, 1993; Collins *et al.*, 1976; Rodríguez *et al.*, 1992; Warren *et al.*, 1975).

En estudios realizados recientemente en el municipio de Ixcán, a través de la técnica de ELISA para detectar antígenos del circunsporozoito de *Plasmodium*, se calculó el índice de inoculación entomológica (EIR por sus siglas en inglés «Entomological Inoculation Rate») para cada una de las especies de *Anopheles* capturadas. Se encontró que *An. albimanus* presentó un EIR para *Plasmodium falciparum* de 0.0164 ; *An. darlingi* presentó el EIR más alto para *Plasmodium vivax* tipo II (0.0327); y *An. vestitipennis* presentó el EIR más alto para *Plasmodium vivax* tipo I (0.1309) y *Plasmodium falciparum* (0.1064) (Padilla *et al.*, no publicado). Estos resultados reflejan que no solo *Anopheles albimanus* tiene una capacidad vectorial importante en esta región, sino también *An. darlingi* y *An. vestitipennis* (comunicación personal Renata de Cabrera, CES).

2) **Efectos del clima.** El clima afecta tanto a parásitos como a zancudos. Los zancudos no pueden sobrevivir en humedades bajas. La lluvia aumenta los criaderos y, en muchas áreas tropicales, aumentan los casos de paludismo durante la época lluviosa. Los parásitos de el paludismo se ven afectados por la temperatura, su desarrollo dentro del zancudo se vuelve más lento a medida que la temperatura disminuye (NIAID, 2001).

En general, *Anopheles albimanus* prevalece durante la época lluviosa. La densidad poblacional se ve fuertemente reducida durante la época seca y en algunas áreas parece desaparecer completamente, para reaparecer rápidamente cuando comienza la época lluviosa. Se ha observado alto número de adultos siete y diez días después de las primeras lluvias, en áreas donde previamente parecía no haber adultos. Debido a que éste es el período de tiempo para el desarrollo de una sola generación de huevo a adulto, se han sugerido dos posibles explicaciones:

- Los adultos permanecen en letargo;
- Los huevos de *An. albimanus* son resistentes a la desecación, y si se tienen las condiciones adecuadas de campo, su sobrevivencia durante períodos cortos de desecación no es inusual (Frederickson, 1993).

3) **Genética de insectos.** Los genomas eucariotas son complejos, y tienen secuencias alta y moderadamente repetitivas. El tamaño del genoma nuclear en eucariotas se mide en picogramos (10^{-12} g), donde 1 picogramo (pg) = 0.98×10^6 kb (kilobases) de ADN doble hebra. Los genomas de vectores tienen un tamaño de 0.2-2 pg. El genoma de anofelinos es generalmente más pequeño que el del género *Culex*. Los genomas pequeños están asociados con largos períodos de interspersión, es decir, son genomas que tienen grandes secuencias de ADN únicas sin interrupciones, por lo menos 13 kb, rodeadas por elementos repetitivos normalmente mayor que 5 kb. El genoma de varios vectores es flexible, presentando variación en el tamaño dentro de una misma especie, como resultado de un incremento de secuencias altamente repetitivas. El contenido de ADN de la subfamilia Anophelinae es bajo, con un rango de 0.25 pg en *An. quadrimaculatus* hasta 0.34 pg en *An. freeborni* (Knudson *et al.*, 1996).

El genoma de los mosquitos consiste de tres pares de cromosomas metacéntricos. Se ha encontrado que existe una buena correlación entre el largo cromosomal y el contenido de ADN nuclear. Los anofelinos presentan dimorfismo sexual, por lo que el mecanismo de determinación sexual es comparable con el de los mamíferos. Los anofelinos tienen cromosomas heteromórficos, en donde el cromosoma X es más largo que el Y el cual consiste principalmente de heterocromatina y no está politenizado en las glándulas salivares (Knudson *et al.*, 1996).

Un mapa genético es el orden y distancia en unidades de recombinación de todos los marcadores en los cromosomas. Se ha trabajado mucho en la generación de mapas genéticos con marcadores morfológicos e isoenzimas para los mosquitos *An. albimanus*, *An. quadrimaculatus* y principalmente *An. gambia* (Knudson *et al.*, 1996). Para el genoma de *An. albimanus* ya se han reportado 65 secuencias de nucleótidos y 68 secuencias de proteínas (NCBI, 2003). Completar el genoma de *Anopheles* de 280 Mb permitirá un mejor entendimiento de las adaptaciones evolucionarias del mosquito incluyendo características como la fisiología de alimentarse con sangre, la digestión de la sangre, comportamientos asociados con la selección por sangre humana, y oviposición en agua. La mayor parte de los esfuerzos de este proyecto se enfocan en los tejidos del mosquito con los que interactúan los parásitos de la malaria. La secuenciación del genoma de *Anopheles* también permitirá la identificación de los genes involucrados en los cambios moleculares que llevan a la resistencia, lo cual permitirá la selección y desarrollo de insecticidas alternativos. También proveerá la herramientas que se pueden utilizar en estudios poblacionales para monitorear el surgimiento y esparcimiento de características importantes como resistencia a insecticidas (Hoffman *et al.*, 2002)

c. Hospedero. Los zancudos pueden picar tanto a la gente como a los animales. La preferencia por hospedero difiere entre las especies: algunos zancudos prefieren picar y tomar sangre de humanos, mientras que otros chupan solamente sangre de animales. Las dos determinantes más importantes para un buen vector de malaria son su propensión a alimentarse de humanos y su longevidad media. La incidencia de transmisión también varía de acuerdo a factores estacionales como temperatura, lluvia y humedad, todos teniendo una influencia significativa en la población de zancudos (NIAID, 2001).

La transmisión del paludismo en una localidad dada está determinada por factores biológicos y ambientales; casi toda la gente que vive en áreas endémicas está expuesta a padecer de la enfermedad en repetidas ocasiones a lo largo de su vida. Sin embargo, las personas que han padecido paludismo en la infancia, van desarrollando paulatinamente cierto nivel de inmunidad hacia la enfermedad. Pueden portar la infección sin desarrollar la enfermedad como tal, pero sí actúan como reservorios para la transmisión de la misma por parte de los zancudos. En otras áreas, donde la tasa de infección es baja, la gente no desarrolla inmunidad porque raramente están expuestos a ella, lo que a la vez los hace más vulnerables en caso de una epidemia (NIAID, 2001).

4) Patología. El paludismo generalmente produce una serie de ataques recurrentes, o paroxismos, cada uno de los cuales tiene tres etapas: escalofríos, seguidos de fiebre y sudoraciones. Junto con los escalofríos, el paciente puede tener dolor de cabeza, náusea y vómitos. Dentro de una hora o dos, la temperatura del paciente aumenta, y la piel se siente caliente y seca. Luego, a medida que desciende la temperatura del cuerpo, comienza la sudoración (NIAID, 2001). Dependiendo de la especie de *Plasmodium* que infecte, se pueden presentar otras características clínicas como esplenomegalia, anemia, trombocitopenia, hipoglicemia, disfunción renal o pulmonar y cambios neurológicos. La presentación clínica puede variar substancialmente dependiendo de la especie infectiva, el nivel de parasitemia, y el estado inmune del paciente (CDC, 2002).

Los síntomas aparecen alrededor de los 10 a 16 días después de la picadura del zancudo infectado y coinciden con la ruptura de los glóbulos rojos infectados. Cuando el nivel de parasitemia es alto, y muchos glóbulos rojos se rompen al mismo tiempo por el crecimiento del parásito, los ataques de paludismo pueden recurrir a períodos regulares de tiempo: cada dos días para el paludismo por *P. vivax* y *P. ovale* y cada tres días para *P. malarie*. En el paludismo por *P. vivax*, el paciente puede sentirse completamente bien entre ataques. Aun sin tratamiento, los paroxismos ceden en unas pocas semanas. Sin embargo, una persona con paludismo por *P. falciparum* puede sentirse muy mal incluso entre ataques y, si no recibe tratamiento, está en peligro de muerte. Una de las razones por las que el paludismo por *P. falciparum* es tan virulento es que el parásito tiene la capacidad de infectar glóbulos rojos en todas las etapas de desarrollo, por lo que el número de parásitos en la sangre puede llegar a alcanzar niveles extremadamente altos. Una infección

severa por *Plasmodium falciparum* puede provocar también el desarrollo de malaria cerebral, la cual es causada por el bloqueo de los capilares cerebrales con eritrocitos infectados, que se adhieren al endotelio. En contraste, los parásitos de *P. vivax* infectan solo glóbulos rojos jóvenes, lo cual implica que el número de parásitos en la sangre no alcanza los niveles tan altos que se observan en infecciones por *P. falciparum* (Biggs and Brown, 2001; NIAID, 2001).

Los síntomas de un paludismo no complicado pueden ser no específicos y el diagnóstico se puede perder si los agentes en salud no están alertas a la posibilidad de esta enfermedad. Ya que los casos de paludismo no tratados pueden progresar a formas severas que pueden convertirse rápidamente en fatales (menor que 24 horas), siempre se debe tomar en consideración el paludismo en pacientes que tienen historia de exposición ya sea por viaje o por residencia en áreas endémicas (CDC, 1992).

5) **Tratamiento.** La profilaxis recomendada para cada país se decide en base a los siguientes factores: el riesgo de contraer malaria; la especie del parásito prevalente en el área; el nivel de resistencia al medicamento reportado por el país y el posible riesgo de efectos secundarios que resulten de el uso de varios medicamentos profilácticos (WHO, 2002). Originalmente, el tratamiento por excelencia había sido la cloroquina. Sin embargo, en la mayoría de regiones endémicas para *Plasmodium falciparum* la resistencia a este medicamento por parte del parásito ha alcanzado niveles tan altos que ya no permiten utilizarla como tratamiento de primera línea. Si el número de parásitos en la sangre no decae significativamente en las primeras 24 a 48 horas de tratamiento, puede ser un indicio que los parásitos son resistentes al medicamento. De hecho, si una persona desarrolla fiebre dentro de un período de semanas a meses después de un tratamiento aparentemente exitoso, la medicina puede no haber terminado con todos los parásitos y el paciente debe ser tratado de nuevo (NIAID, 2001).

Los pacientes que adquieren el paludismo por *P. falciparum* en un área donde se sabe que hay resistencia a cloroquina, pueden ser tratados con una combinación de drogas antimaláricas como el sulfato de quinina, pirimetamina y sulfadoxina. Los pacientes con paludismo por *P. falciparum* también son tratados con aspirina para bajar la fiebre y aliviar el dolor de cabeza. Los medicamentos antimaláricos se pueden clasificar por su acción en las diferentes fases del ciclo de vida del *Plasmodium* (Cuadro 1). El médico puede tratar a los pacientes con complicaciones severas con quinina intravenosa (directamente en la vena) u oral. La cloroquina elimina los parásitos de paludismo susceptibles de los glóbulos rojos pero no mata las formas de *P. vivax* o *P. ovale* en el hígado. Por esto, los médicos tratan a los pacientes con *P. vivax* o *P. ovale* durante dos semanas con un tratamiento combinado de cloroquinaprimaquina, para eliminar también los parásitos del hígado (NIAID, 2001; VNH, 2000).

Clase de medicamento	Medicamento
Esquizonticida sanguíneo	Cloroquina, Quinina, Quinidina, Mefloquina, Halofantrina, Sulfonamidas, Tetraciclinas, Atavaquone, compuestos de Artemisinín.
Esquizonticida en tejidos	Primaquina, Proguanil, Piremetamina.
Gametocida	Primaquina
Hipnozoitocida	Primaquina

Cuadro 1. Medicamentos antimaláricos clasificados por su acción en el ciclo de vida de *Plasmodium* (VNH, 2000)

6) **Medidas de control.** La quimioterapia desempeña un papel fundamental en las campañas de control y erradicación de la malaria para prevenir la mortalidad y disminuir la morbilidad. Sin embargo, esta medida por sí sola únicamente puede conducir a la erradicación de la enfermedad únicamente en ocasiones especiales. Para lograr este objetivo es esencial un control efectivo de los vectores que transmiten la enfermedad. Existen varios métodos que pueden utilizarse para el control de los vectores de la malaria, que pueden estar enfocados a atacar tanto el estado de larva como el adulto del mosquito *Anopheles*.

a. **Insecticidas.** El rociamiento de viviendas con insecticidas de acción residual tiene la ventaja de disminuir el lapso de vida del vector y, algunas veces, el contacto hombre vector. Los insecticidas tienen y continuarán teniendo un papel importante en el control del mosquito vector de malaria. Sin embargo, el uso indiscriminado de un número limitado de insecticidas para controlar plagas agrícolas, como vectores de enfermedades humanas, ha llevado al desarrollo de resistencia a los insecticidas. Para el año 1992 se reportaron más de 55 diferentes especies de anofelinos con resistencia a uno o más de los insecticidas comúnmente usados. Para controlar la efectividad de los insecticidas disponibles actualmente, es importante detectar la resistencia al insecticida en una etapa temprana (Collins *et al.*, 2000).

La mayor parte del control químico de los mosquitos vectores de malaria tiene como objetivo el mosquito adulto. Los insecticidas más utilizados para el rociamiento interno de viviendas son el diclorodifeniltricloroetano (DDT), piretroides sintéticos y, en menor escala, malatión. El rociamiento de viviendas con DDT, que tiene un efecto residual de seis meses, tuvo un gran éxito durante los años de 1950 y 1960, en reducir la incidencia de malaria en grandes áreas de Asia tropical, Latino América y en algunos países de África. Hasta la fecha, el control con este insecticida es efectivo en algunas regiones. Si embargo, la resistencia a DDT y la presión ejercida por ambientalistas amenazó el uso del mismo. Malatión es una alternativa de baja calidad. Tiene un olor desagradable, menor actividad residual, mayor costo y necesita

aplicarse el doble que DDT. Al disminuir el uso de DDT aumentará el uso de insecticidas piretroides (Collins *et al.*, 2000).

b. Larvicidas. Los larvicidas constituyen uno de los métodos más antiguos para el control de los vectores de la malaria; se basa en la utilización de peces, aceites, insecticidas inorgánicos e incluso manejo del medio ambiente. Desde el punto de vista epidemiológico, los larvicidas y la reducción de los criaderos son solamente métodos moderadamente eficaces de control ya que solo influyen en el número del vector. Los métodos larvicidas constituyen un modo de aumentar la eficacia de los insecticidas que no son efectivos cuando se rocían las viviendas y contribuyen también a eliminar los vectores de resistencia múltiple (OPS, 1991).

c. Mosquiteros impregnados. El uso de insecticidas es un método efectivo para el control del vector, pero su alto costo es un impedimento para algunos países en desarrollo. Debido a lo anterior, se ha promovido el uso de mosquiteros impregnados, que tiene un menor costo, porque se cuenta con la colaboración de la población. En la actualidad, los piretroides sintéticos son la única clase de insecticidas útiles para la impregnación de los mosquiteros, porque tienen baja toxicidad para los mamíferos y son de rápida acción. El sitio de acción de los insecticidas piretroides y DDT es el canal de sodio en el sistema nervioso de los insectos (Collins *et al.*, 2000).

En un estudio realizado en el departamento de Izabal, norte de Guatemala, se encontró que el uso de mosquiteros impregnados redujo la incidencia de malaria. Se sugirió que la impregnación no fue la que más contribuyó a esta reducción, sino la barrera física contra el vector. A pesar de esto, existen razones para impregnar los mosquiteros: primero, la resistencia de anofelinos a los piretroides en Guatemala es baja; segundo, las personas que utilizaron mosquiteros impregnados tuvieron menos episodios de malaria clínica que los controles; tercero, algunos autores han reportado que la impregnación puede mantener la barrera protectora aún cuando los mosquiteros se rompen (Richards *et al.*, 1993).

d. Tecnología transgénica. Esta tecnología consiste en la introducción de genes refractarios a la infección por el parásito, en poblaciones naturales del mosquito vector de la malaria. El éxito de un programa de modificación genética requiere de la identificación de genes apropiados para su introducción en poblaciones naturales, y un claro entendimiento de la estructura genética de la población. Lo anterior con el fin de poder determinar qué tan lejos y qué tan rápido se van a propagar estos genes, y la escala temporal y espacial en la que se debe hacer la introducción. El estudio de genética de poblaciones de los mosquitos provee la información necesaria a cerca del intercambio genético entre poblaciones (Kamau *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2000).

B. Técnicas moleculares para el estudio de genética de poblaciones

1. Principios de genética. Antes de analizar las técnicas de biología molecular que existen y su uso en estudios de genética poblacional, se presenta una breve revisión de los principios básicos de genética.

a. Estructura básica del ADN. Una gran parte de estudios están enfocados a organismos diploides (dos grupos de cromosomas, uno paterno y otro materno) o poliploides (múltiples grupos de cromosomas). Sin embargo, algunas de las herramientas para analizar poblaciones están orientadas al estudio de células haploides (ADN mitocondrial, óvulos no fertilizados, espermatozoides, granos de polen, machos haploides de Hymenoptera). El ADN está formado por cuatro diferentes nucleótidos: A, G, C y T. Los nucleótidos difieren en su base nitrogenada. A y G son purinas, mientras que C y T (y U para el ARN) son pirimidinas. La estructura de un nucleótido está formada por: una base nitrogenada de purina o pirimidina más un azúcar ribosa o deoxyribosa más grupo fosfato. Un cromosoma consiste de dos hebras complementarias de ADN, que se conocen como las hebras sentido o *forward* y antisentido o *reverse*. Las hebras están arregladas en una configuración de doble hélice, en donde cada par de bases (A, G, C o T) tiene una orientación a lo largo de la hebra, ya sea 5' en un extremo o 3' en el otro extremo. Cuando el código genético se traduce en proteínas, se lee en dirección 3' a 5'. Durante la mitosis y meiosis la replicación convierte un hebra simple de ADN en doble hebra por el proceso de complementariedad, en donde cada par de base se aparea con su complementario (A con G y C con T) para generar una doble hebra a partir de una hebra simple (McDonald, 2002).

b. Regiones codificadoras y no codificadoras. Los genes en los cromosomas consisten de: porciones que se transcriben y traducen en proteínas (exones), porciones que se transcriben pero no se traducen en proteínas (intrones), y porciones largas que no están asociadas con ninguna clase de gen (por ejemplo, secuencias satélites de ADN que usualmente se encuentran cerca de los centrómeros de los cromosomas) (McDonald, 2002).

c. Herencia mendeliana. Los organismos diploides tienen dos copias de cada tipo de cromosoma. El número de cromosomas complementarios o cariotipo varía en los organismos diploides desde 4, como en la mosca de la fruta *Drosophila*, hasta 80 como en la mosca *Nymphae*. Los humanos tienen 23 diferentes tipos, cada padre contribuye con uno de su pareja de cromosomas para obtener un complemento en su descendencia. Debido al proceso de distribución independiente, la descendencia recibe diferentes combinaciones de una pareja de cromosomas (excepto para gemelos idénticos y clones). Dado que existen 23 cromosomas y por la distribución independiente, cada humano puede producir 2^{23} posibles combinaciones de cromosomas en sus gametos, es decir, existen más de 8

millones de posibilidades. Los diferentes cromosomas pueden tener diferentes secuencias de ADN en el mismo lugar o Locus en un cromosoma particular. Locus se refiere a la posición de un gen a lo largo del cromosoma. Las formas alternativas de un gen se conocen como alelos. Los alelos se refieren, tanto a porciones que se expresan (o codifican) o a cualquier porción de ADN en donde se pueda encontrar variación en la secuencia de nucleótidos (Hartl and Clark, 1997; McDonald, 2002).

Un organismo diploide contiene en cada Locus dos alelos, de los cuales uno proviene del cromosoma materno y el otro del paterno. Si los dos alelos en un Locus tienen la misma secuencia de nucleótidos, son idénticos químicamente, se dice que el organismo es homocigoto en el locus bajo consideración. Si los dos alelos tienen diferente composición química, se dice que el organismo es heterocigoto en ese locus. La posibilidad de obtener dos diferentes alelos de cromosomas homólogos produce la combinación AA, en donde el padre y la madre contribuyeron con un alelo denominado «A». La combinación Aa se obtiene cuando la madre o el padre contribuyeron con un alelo «A» y el otro padre contribuyó con «a»; o se puede obtener aa, en donde ambos padres contribuyeron con «a». Los alelos recesivos se expresan solo cuando están presentes como homocigotos (aa = blanco, AA y Aa = rojo). Los alelos codominantes muestran un fenotipo intermedio en heterocigotos (aa = blanco, Aa = rosado, AA = rojo), es decir, el producto de ambos alelos se puede detectar en heterocigotos Aa. La codominancia es importante en las regiones no codificadoras de microsatélites, porque las variantes difieren por el tamaño. Un homocigoto va a mostrar una sola banda, mientras que un heterocigoto muestra dos diferentes bandas (Hartl and Clark, 1997; McDonald, 2002).

Al contrario del patrón de herencia mendeliana, descrito anteriormente, el ADNmt se hereda de forma maternal, lo cual es importante considerar cuando se hacen inferencias. Por ejemplo, el número efectivo del tamaño de la población es menor cuando se utiliza ADNmt (McDonald, 2002).

d. Mutaciones. El tipo más común de mutaciones es el de las puntuales, en las cuales durante la replicación se coloca un nucleótido diferente en la cadena (por ejemplo A, G o T en lugar del C original). Se pueden dividir en dos tipos: transición y transversión. Las transiciones involucran un cambio de una purina por una purina o una pirimidina por una pirimidina, mientras que la transversión es menos frecuente e involucra un cambio de purina por pirimidina o viceversa. Las mutaciones puntuales ocurren a una baja velocidad (aproximadamente 10^{-6} ó una vez cada millón de replicaciones). Por lo anterior la transición y transversión, mencionadas anteriormente, son muy importantes. Los microsatélites, mutan por un proceso, conocido como deslizamiento durante la replicación, en donde se agrega o elimina un par de bases, en lugar del mecanismo de mutación puntual. Lo más común es que se agregue o retire una unidad repetitiva, lo que significa que el proceso de mutación es *stepwise* o por etapas, lo que en teoría provee información filogenética (Lewin, 2000; McDonald, 2002).

2. Métodos utilizados para el estudio de genética de poblaciones.

a. Generalidades. La genética de poblaciones es el estudio de polimorfismos genéticos, es decir, variaciones de ADN y su divergencia (McDonald, 2002). Los estudios de genética de poblaciones en mosquitos dan información acerca del nivel de intercambio genético entre poblaciones. Están enfocados a establecer las poblaciones efectivas mínimas (el *deme*) a partir de las cuales no va ocurrir flujo genético. Esta información es útil para inferir patrones de dispersión de los vectores, que en un momento dado pueden ser de relevancia para el control vectorial. Si los niveles de flujo genético observado entre poblaciones de diferentes áreas geográficas son significativamente más altos que los que se pueden atribuir solamente al azar, implica que los genes de interés, si están presentes en una población, al transcurrir el tiempo, van a moverse a otras poblaciones. Si en el mosquito, por ejemplo, los genes son aquellos responsables de la resistencia a insecticidas o competencia vectorial, es posible predecir cuán lejos y cuán rápido esta resistencia o competencia se va a dispersar (Collins *et al.*, 2000).

Por otro lado, la estructura poblacional es la distribución y abundancia de genotipos dentro y entre poblaciones. En genética poblacional la palabra población se refiere a un grupo de organismos de la misma especie que viven dentro de un área geográfica lo suficientemente restringida, en donde cualquier miembro puede aparearse con otro miembro. La estructura genética se describe como la distribución de la variación genética como resultado de migración, selección, mutación, desplazamiento genético y factores relacionados. Los datos genéticos constituyen algunas veces los mejores y únicos datos para analizar un aspecto particular de la demografía, como la migración entre poblaciones múltiples. La variación genética se puede analizar utilizando diferentes técnicas moleculares (Hartl and Clark, 1997; Roderick, 1996). A continuación se presenta una descripción de las diferentes técnicas moleculares y sus limitaciones en el estudio de genética de poblaciones según Roderick, 1996.

b. Variación genética nuclear para medir la estructura poblacional. Los marcadores utilizados ofrecen un número ilimitado de loci para el análisis de estructura poblacional. A continuación se describen los más utilizados y su potencial de uso.

1) Aloenzimas. Las aloenzimas, son variantes de una enzima que cataliza la misma reacción pero son codificadas por alelos diferentes (Lackie and Dow, 1999). Por la diferencia en su secuencia de aminoácidos se pueden separar y distinguir realizando electroforesis de proteínas, a través de una gel, la cual se revela con una solución que contiene substrato y un colorante que precipita donde se llevó a cabo la reacción catalizada por la enzima. Si la enzima presente en la muestra tiene un reemplazo de amino ácidos que cambia la carga iónica total de la molécula, entonces la enzima tiene una movilidad electroforética alterada y se va a desplazar a diferente velocidad. La movilidad electroforética cambia,

porque enzimas que tienen el mismo tamaño y forma se mueven a una velocidad determinada en gran parte por la razón entre el número de aminoácidos cargados positivamente (principalmente lisina, arginina e histidina) y el número de aminoácidos cargados negativamente (principalmente ácido aspártico y glutámico). Por lo anterior, la electroforesis se utiliza para detectar mutaciones que codifican una enzima, por diferencias en la movilidad electroforética (Hartl and Clark, 1997; Jarne and Lagoda, 1998).

Es el método más accesible, pero tiene limitaciones importantes:

- Con algunas excepciones los insectos deben estar vivos o congelados antes de su uso;
- Las aloenzimas de algunos insectos (especialmente parásitos de la familia Hymenoptera) muestran poca variabilidad;
- Las bandas que migran juntas se asumen como homólogas;
- Puede haber bandas que no siguen una herencia mendeliana;
- Es difícil extrapolar los resultados de una electroforesis enzimática al genoma entero, porque las enzimas pueden no ser representativas;
- En cualquier Locus la electroforesis de aloenzimas revela sólo un subgrupo de la variación genética actual; Son imposibles de definir patrones de ancestros y descendencia entre diferentes alelos. Por las últimas dos razones, el análisis de aloenzimas no puede revelar relaciones históricas entre alelos. Esta técnica es útil cuando solo se requiere una respuesta referente a la frecuencia de alelos, es barata, rápida y puede dar una idea de loci múltiples (Hartl and Clark, 1997; Roderick, 1996).

2) Amplificación de ADN y PCR. La mayoría de las técnicas para analizar variación nuclear se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés «polymerase chain reaction») para amplificar suficiente cantidad de ADN de interés. Existen cinco técnicas para analizar la variación de ADN nuclear que son ampliamente utilizadas para analizar la estructura poblacional: microsatélites, la técnica de RAPDs (por sus siglas en inglés «randomly amplified polymorphic DNA»), RFLPs (por sus siglas en inglés «restriction fragment-length polymorphisms»), intrones e ITS (por sus siglas en inglés «internal transcribed spacer regions») (Roderick, 1996). A continuación se explicarán cada una de estas técnicas, y en la siguiente sección se hará énfasis en los microsatélites, ya que será la técnica utilizada en este trabajo de investigación.

Para el análisis de las bandas de RAPD se utiliza un oligonucleótido arbitrario, de aproximadamente 10 bases, en la reacción de PCR en la cual éste se hibridiza lo suficientemente bien para servir como iniciador *forward* y *reverse* para amplificar 3-10 sitios de ADN nuclear simultáneamente. Los productos obtenidos se corren en geles de agarosa, se tiñen y distinguen por su tamaño. Se considera que una banda representa un locus, y puede estar presente o ausente (Jarne and Lagoda, 1998; Queller *et al.*, 1993). El análisis se basa en la frecuencia de alelos dentro de poblaciones. La interpretación de los datos de RAPD es limitada por una

pobre repetibilidad, una ausencia de codominancia y finalmente la posibilidad de elementos no heredables o no homólogos, lo cual también se presenta en los métodos de aloenzimas y RFLP. Con RAPD, la amplificación de ADN constituye el dato final. Como resultado, la variación experimental puede ser alta, especialmente cuando se utiliza una baja temperatura de hibridación. Esta técnica no es adecuada en un estudio donde la repetibilidad es crucial. Los patrones de RAPD muestran dominancia, por lo que individuos homocigotos y heterocigotos van a producir solo una banda, por lo que la frecuencia de heterocigotos es difícil de determinar. La técnica de RAPD se utiliza generalmente porque provee información de forma rápida y fácil. A pesar de sus limitaciones, tiene potencial en mapeo genético de loci, relaciones familiares y en identificar sitios variables para futuros análisis (Roderick, 1996).

La técnica de RFLP, también conocida como *DNA fingerprinting*, consiste en amplificar regiones de ADN nuclear por PCR, y luego digerir los productos con enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas de cuatro a seis bases y cortan el ADN, generando fragmentos más pequeños. Se pueden utilizar diferentes métodos de detección como geles de agarosa o poliacrilamida, tinción con bromuro de etidio o marcaje con sondas. Los alelos que difieren por la presencia o ausencia de sitios de restricción, producen diferentes tamaños de fragmentos. Esta técnica permite establecer relaciones familiares al comparar los patrones de polimorfismo. Las limitaciones de esta técnica son similares a las del método de RAPD, entre las cuales se pueden mencionar que los alelos no se pueden asignar a un locus, es un marcador dominante, pero los resultados tienen mayor repetibilidad que los obtenidos con RAPD (Lackie and Dow, 1999; Queller *et al.*, 1993; Roderick, 1996).

La técnica de intrones nucleares se basa en el hecho que los intrones no están sujetos a la misma fuerza selectiva que los exones, que son las regiones codificadoras, por lo que las bases dentro de los intrones evolucionan igual de rápido que los sitios silenciosos de ADN nuclear (bases en las cuales un cambio no afecta la secuencia de amino ácidos). Estudios preliminares han mostrado que los intrones son útiles para reconstruir filogenias de alelos entre especies de insectos, así como de especies estrechamente relacionadas. Pero las secuencias de intrones son probablemente demasiado variables para ser utilizadas para reconstruir relaciones entre especies de insectos que no están muy relacionadas o entre géneros. Las limitaciones de este método son:

- No todos los taxa tienen intrones en la misma localización;
- Algunos intrones no son lo suficientemente variables entre especies, y
- Se requiere de clonación y secuenciación, por lo menos al inicio del estudio (Roderick, 1996).

Las regiones ITS entre genes de ARN ribosomal pueden variar entre individuos en la misma población y por eso pueden ser utilizadas en el análisis de la estructura geográfica. Estos genes ribosomales están organizados en grupos de unidades repetitivas. Las regiones ITS se amplifican por medio de PCR

utilizando iniciadores universales. La principal limitación de las regiones ITS en un estudio de poblaciones es que puede existir mucha variación entre individuos, haciendo la identificación de ADN homólogo difícil o imposible. En estudios poblacionales las regiones ITS se deben asignar a cada especie (Roderick, 1996).

c. Variación genética mitocondrial para medir la estructura poblacional. El ADN mitocondrial se ha utilizado ampliamente en estudios poblacionales de varias especies de insectos porque evoluciona rápidamente y, a diferencia del ADN nuclear, no lleva a cabo recombinación. Muchas regiones son suficientemente conservadas, de manera que los iniciadores se pueden usar en diferentes taxa de insectos. La variación de ADN mitocondrial se evalúa en términos de secuencia o RFLP de una forma similar a la descrita para Loci nuclear. Las secuencias de ADNmt tienen más información que los fragmentos de restricción, por lo que son más útiles para inferir la historia de haplotipos o poblaciones (Roderick, 1996).

El genoma mitocondrial tiene varias características importantes que afectan el análisis y la interpretación de datos. Primero, el genoma se hereda por una sola entidad, y por la ausencia de recombinación, sus genes representan un solo locus genético. Por lo tanto, los genes de ADNmt no se pueden interpretar como loci independientes. Segundo, el tamaño de población efectiva de ADNmt es más pequeño que el de ADN nuclear por su naturaleza haploide y herencia maternal (Roderick, 1996).

3. Microsatélites

a. Descripción. Los microsatélites son repeticiones de secuencias cortas de ADN de 2-6 pares de bases, que se repiten al azar a lo largo de todo el genoma. Se encuentran en una amplia variedad de eucariotas y en el genoma del cloroplasto en plantas. Se pueden clasificar en tres familias: repeticiones puras, compuestas e interrumpidas, como se muestra en el siguiente ejemplo:

Puros	CACACACACACACACACA
Compuestos	CACACACACAGAGAGAGAGA
Interrumpidos	CACATTCACACATTCATTCA

Cualquier combinación entre estas familias es posible: los más utilizados son repeticiones de di-, tri- y tetranucleótidos. Tienden a estar en regiones de ADN que no codifican, aunque algunos desórdenes genéticos en humanos están causados por microsatélites trinucleótidos que se encuentran en regiones codificadoras. En cada extremo de la unidad repetitiva se encuentran regiones que consisten de ADN «desordenado». Estas regiones son importantes porque permiten desarrollar microsatélites específicos para un locus. La probabilidad de encontrar una región de ADN «desordenado» de 30 a 50 pb de largo, más de una vez en el genoma, es muy baja. Por el contrario, una unidad repetitiva (por ejemplo AC₁₉) se puede encontrar miles de veces en el genoma. Esta combinación de una amplia distribución de unidades repetitivas, y una distribución más restringida de regiones que flanquean un locus específico forman parte

de la estrategia para encontrar y desarrollar iniciadores para secuencias microsatélites. Los iniciadores para el PCR son secuencias de las regiones que flanquean al microsatélite. Al tener un iniciador *forward* y uno *reverse* para cada lado del microsatélite, es posible amplificar la región microsatélite en un Locus específico. Alelos en un locus específico se identifican después de una amplificación por PCR, al comparar su migración electroforética relativa con un marcador de peso conocido (Jarne and Lagoda, 1998; McDonald, 2002).

Entre las ventajas de utilizar microsatélites están las siguientes:

- Se puede obtener información de su estructura molecular y de su velocidad de mutación;
- Aun el ADN degradado puede contener copias intactas de secuencias blanco de microsatélites, que pueden amplificarse;
- Los loci de microsatélites están ampliamente distribuidos en el genoma;
- Son fáciles de utilizar debido a que pueden acoplarse a la técnica de PCR;
- Son heredados por ambos padres, de forma mendeliana;
- Son codominantes, individuos heterocigotos se pueden distinguir de homocigotos;
- Son específicos para un Locus;
- Son altamente polimórficos en poblaciones naturales, con un promedio de heterocigosidad esperado arriba del 50%;
- Se consideran neutros, están en regiones que no se encuentran bajo selección;
- Hay muchos modelos y teorías estadísticas que se pueden utilizar para analizar microsatélites (Jarne and Lagoda, 1998; McDonald, 2002; Queller *et al.*, 1993).

b. Procesos de mutación. Los microsatélites son marcadores moleculares útiles porque tienden a ser altamente polimórficos. Esto se debe a que sus mutaciones ocurren de forma muy distinta a lo que se conoce como mutaciones puntuales «clásicas». La alta velocidad de mutación se relaciona con el mecanismo de deslizamiento de la ADN polimerasa durante la replicación. Para entender este mecanismo se puede pensar en las unidades repetitivas como pelotitas en una cadena. Durante la replicación las dos hebras se pueden deslizar o resbalar un poco de su posición relativa, pero todavía permitiendo que el zipper se deslice por las pelotitas. Una de las hebras puede alargarse o acortarse por la adición o excisión de nucleótidos. El resultado es una mutación que consiste en una unidad repetitiva que es una pelotita más larga o corta que la original. La idea que agregar o eliminar una unidad repetitiva es más factible que agregar o eliminar dos unidades repetitivas, es la base para utilizar el modelo de mutación *stepwise* (SMM, por sus siglas en inglés «stepwise mutation model», en lugar del modelo de alelos infinitos (IAM, por sus siglas en inglés «infinite alleles model»). Bajo el IAM solo existen dos estados «igual» o «diferente». Bajo el SMM se tienen potencialmente varios estados (mismo tamaño, tamaño similar, tamaño muy diferente).

Lo anterior se basa en experimentos que se han hecho *in vitro*, y que son consistentes con estudios poblacionales en los cuales, por ejemplo, el tamaño de los alelos en un locus dinucleótido difieren por números constantes de las repeticiones. Otro modelo explica que el alto grado de mutación es generado por un entrecruzamiento desigual. Cualquiera que sea el mecanismo preciso, las mutaciones están claramente relacionadas con los mecanismos de recombinación y reparación de ADN (Jarne and Lagoda, 1998; McDonald, 2002).

c. **Importancia como marcadores moleculares.** Los microsatélites son marcadores útiles en un amplio rango de análisis. Actualmente son la herramienta más importante para el mapeo de genomas. Se utilizan en el diagnóstico biomédico como marcadores de ciertas patologías, debido a que están asociados con ciertas mutaciones en regiones codificadoras de ADN que pueden causar una variedad de desórdenes médicos. También se han convertido en el principal marcador de ADN para estudios forenses por su alta especificidad. En un contexto biológico evolutivo son útiles como marcadores para análisis de linajes. También se pueden utilizar para responder preguntas relacionadas al grado de relación entre individuos o grupos. Para especies cautivas o que están en peligro de extinción, los microsatélites pueden ser útiles para evaluar los niveles de apareamiento en consanguinidad (F_{IS}). A partir de esto se puede obtener información acerca de la estructura de poblaciones o subpoblaciones, utilizando herramientas como la estadística F y las distancias genéticas. Se pueden utilizar para conocer la historia demográfica, por ejemplo, buscar evidencia de que las poblaciones han sufrido el efecto de cuello de botella; conocer el tamaño efectivo de la población (N_e) y conocer la magnitud y dirección del flujo de genes entre poblaciones. Los microsatélites proveen datos útiles para estudios filogeográficos que buscan explicar la correlación entre la historia genética y la biogeografía de flora y fauna en regiones a gran escala. También son útiles para filogenias en una escala pequeña, hasta el nivel de relacionar especies cercanas (McDonald, 2002).

1. **Limitaciones.** Paradójicamente, todas las potenciales ventajas de estos marcadores también pueden aumentar la incidencia de errores de genotipificación. Es importante tomar estos errores en cuenta durante el análisis de los resultados aunque hasta la fecha han recibido poca atención (Oosterhaut, C. *et al.*, 2004).

Los errores de genotipificación pueden estar causados por una baja concentración de ADN lo que puede provocar que no se amplifique un alelo. Estos errores también pueden ocurrir porque se prefiere amplificar alelos pequeños en lugar de alelos grandes. La enzima Taq polimerasa se puede resbalar durante la amplificación produciendo picos no esperados o *stutter bands* que difieren del templado por múltiplos de la unidad repetitiva. Estos picos no esperados son comunes en Loci de dinucleótidos y dificultan la diferenciación entre individuos homocigotos y heterocigotos. Por último, es importante tomar en cuenta la

posibilidad de encontrar alelos nulos en el análisis con microsatélites. Esto alelos nulos resultan de mutación o mutaciones ubicadas en la región complementaria de los oligonucleótidos iniciadores, por lo que el microsatélite no puede ser amplificado por PCR. En este caso, algunos individuos no muestran producto de PCR para alguno (s) de los Loci pero si para otros. Los alelos nulos representan una complicación común en la interpretación de los datos de microsatélites debido a una aparente reducción en el nivel de heterocigotos observados o inhibiendo la amplificación del producto de PCR (Lehmann *et al.*, 1997; Oosterhaut, C. *et al.*, 2004).

Estos errores de genotipificación pueden causar desviaciones en las proporciones de Hardy Weinberg, particularmente provocando una disminución de heterocigotos afectando potencialmente el análisis genético. Estas desviaciones son comúnmente muy similares a aquellas causadas por apareamiento en consanguinidad, apareamiento que no es al azar o el efecto Wahlund. Sin embargo, las desviaciones causadas por la dominancia de alelos pequeños, picos no esperados y alelos nulos puede identificarse, por lo que es posible discriminar entre desviaciones producidas porque no hay panmixia de aquellas producidas por errores de genotipificación (Oosterhaut, C. *et al.*, 2004).

Otra desventaja de este método es que para identificar las secuencias repetitivas se debe construir una librería genómica, o adquirirla comercialmente, lo cual consume tiempo y recursos (Roderick, 1996). Para construir una librería genómica y poder desarrollar iniciadores para microsatélites, se deben de seguir los siguientes pasos:

- a. Extraer ADN del tejido.
- b. Fragmentar el genoma en fragmentos más pequeños de 300-600 pb utilizando enzimas de restricción.
- c. Insertar los fragmentos en plásmidos para que puedan ser clonados.
- d. Transferir los plásmidos modificados en una membrana de nylon.
- e. Hibridizar la membrana con una sonda que contenga oligonucleótidos de las repeticiones deseadas (por ejemplo, AC₁₀) marcadas.
- f. Cultivar los clones positivos (los fragmentos del plásmido que se unieron a la sonda del oligo).
- g. Cortar con enzimas de restricción los insertos del plásmido y, separarlos en un gel de agarosa.
- h. Realizar un *southern blott* de las secuencias digeridas en el paso anterior, con las sondas de oligos que se utilizaron anteriormente.
- i. Secuenciar los clones positivos.
- j. Analizar las secuencias para buscar sitios adecuados para los iniciadores y secuencias repetitivas. Generalmente se busca que las secuencias tengan por lo menos ocho repeticiones y, dependiendo

de nuestros intereses, se buscan secuencias de repeticiones puras o repeticiones interrumpidas las cuales tienen menor grado de mutación. Existen ciertos criterios para seleccionar los iniciadores:

- Los dos iniciadores no pueden ser complementarios porque se unirían entre ellos. Se necesita que ambos tengan un largo y temperatura de hibridación muy similares.
- Evitar codones *stop* u otras secuencias que causarían fallas en el PCR.
- Evitar palindromas, secuencias que son idénticas a su hebra complementaria cuando cada una se lee en la dirección correcta (por ejemplo, TGGCCA).
- Calcular que el tamaño total del producto amplificado sea de 100 – 250pb, para que sea factible visualizarlo en las geles de secuenciación.
- Evitar repeticiones que estén cerca del final de la región secuenciada.
- Existen varios programas que ayudan en el diseño de los iniciadores, por ejemplo: Oligo, Primer!, MacVector entre otros.
- Ordenar los iniciadores específicos para un locus, los cuales generalmente tienen un tamaño de 20-30pb y no se encuentran adyacentes a la secuencia de unidades repetitivas (McDonald, 2002).

4. Medida de la frecuencia alélica y genotípica. Después que una muestra de individuos en una población se ha caracterizado por variación en un locus, es posible calcular la frecuencia de diferentes genotipos en ese locus y la frecuencia del alelo en la población. Otra medida de variación genética en poblaciones es la frecuencia alélica en cada Locus. Para la frecuencia genética se cuenta el número de ocurrencia de cada alelo en la población y se divide por el número total de alelos muestreados (2 veces el número de individuos muestreados en especies diploides). La frecuencia observada de heterocigotos es el número total de heterocigotos dividido por el número de individuos muestreados (Beaty and Marquardt, 1996).

Existen factores que afectan la frecuencia genotípica dentro de una población. En general el modelo más utilizado para determinar la estabilidad de un genotipo es el de Hardy-Weinberg. Esta ley establece que en una población grande y que se aparee al azar, en ausencia de selección, migración y mutación, la frecuencia de genes y genotípica permanece constante de generación en generación. Los factores responsables de cambios en la frecuencia de genes y genotípica en una población son:

- Apareamiento: el apareamiento que no es al azar causa cambios en las frecuencias genotípicas.
- Tamaño de la población: poblaciones pequeñas son objeto de mayor desplazamiento al azar en la frecuencia de genes, debido a efectos de muestreo.
- Migración: la migración diferencial de individuos con genotipos nuevos dentro y entre poblaciones, cambian la frecuencia de alelos.
- Mutación: la velocidad de mutación afecta la frecuencia de genes.

- Selección: los genes pueden variar en sus efectos de conveniencia entre individuos. La selección cambia la frecuencia de genotipo y alelos.

El equilibrio de Hardy-Weinberg se puede observar como una hipótesis nula con respecto a estos cinco factores. Si cualquiera de éstos afecta significativamente la frecuencia genotípica, las frecuencias no van a estar en equilibrio (Beaty and Marquardt, 1996).

Para determinar si una población está en equilibrio Hardy-Weinberg, primero se estima la frecuencia alélica y genotípica de la muestra. Los números esperados y observados se comparan utilizando una prueba no paramétrica como chi cuadrado (X^2). Los grados de libertad se calculan como $n(n-1)/2$, donde n es el número de alelos. Si no existe diferencia significativa entre lo esperado y observado, la población está en equilibrio Hardy-Weinberg (Beaty and Marquardt, 1996).

Para cuantificar el efecto de procreación en consanguinidad de una subestructura poblacional, se utiliza el índice de fijación. El símbolo genético para el índice de fijación es F adornado con un subíndice que denota los niveles de jerarquía que se están comparando. Se va a calcular el F_{SR} , que es el índice de fijación de las subpoblaciones en relación a los agregados regionales:

$$F_{SR} = \frac{H_R - H_S}{H_R}$$

Esta ecuación define F_{SR} como la reducción de heterocigocidad entre subpoblaciones dentro de regiones ($H_R - H_S$), relativo a la heterocigocidad entre regiones (H_R) (Hartl and Clark, 1997).

Luego se establecerá el índice de fijación F_{RT} , que es la reducción proporcional de heterocigocidad de los agregados regionales en relación a la población total combinada:

$$F_{RT} = \frac{H_T - H_R}{H_T}$$

Comparando estos dos índices se puede saber si existe más variación entre regiones (medido por F_{RT}) o entre subpoblaciones dentro de regiones (medido por F_{SR}).

El índice de fijación F_{ST} compara el nivel menos inclusivo hasta el más inclusivo de la jerarquía de la población, y mide todos los efectos de la subestructura poblacional combinada:

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

H_T

Para examinar el nivel general de divergencia genética entre subpoblaciones, la estadística F_{ST} es la más informativa. Aunque F_{ST} tiene un mínimo teórico de 0 (indicando que no hay divergencia genética) y un máximo teórico de 1 (indicando fijación para alelos alternativos en diferentes subpoblaciones), el máximo observado es normalmente mucho menor a 1. Wright (1978) sugirió la siguiente guía cualitativa para la interpretación de F_{ST} :

- El rango 0 – 0.05 se puede considerar como poca diferenciación genética.
- El rango 0.05 – 0.15 indica diferenciación genética moderada
- El rango 0.15 – 0.25 indica diferenciación genética grande
- Valores de F_{ST} arriba de 0.25 indican diferenciación genética bastante grande (Hartl and Clark, 1997)

c. Estudios de genética de poblaciones de *Anopheles sp.* Los marcadores que más se han utilizado han sido el espaciador intergénico en ADN ribosomal (Mérida et al., 1995), inversiones cromosomales en secuencias de ADN mitocondrial, RAPDs y aloenzimas. Dentro de los marcadores moleculares, los RAPDs han sido los más disponibles para el estudio de la estructura poblacional de *Anopheles albimanus*. Uno de los mayores inconvenientes de esta técnica es que los resultados son poco reproducibles (Queller et al., 1993). En estudios que se han hecho para *Anopheles arabiensis*, se encontró que algunos de estos marcadores moleculares están correlacionados con parámetros ambientales, como por ejemplo la variabilidad espacial y temporal de la frecuencia de inversiones cromosomales, lo que puede llevar a observaciones erróneas en términos de flujo genético (Simard et al., 1999). El polimorfismo de las secuencias de ADN mitocondrial es útil para distinguir entre especies similares y entre subpoblaciones de la misma especie de diferentes regiones geográficas, pero carece de la sensibilidad para detectar variaciones sutiles que frecuentemente existen entre poblaciones que han divergido recientemente (Monteiro et al., 1999; Monteiro et al., 2001).

Ya se han realizado estudios de variabilidad genética utilizando microsatélites, como marcadores moleculares, en poblaciones de *Anopheles*, de distintas especies (Rongnparut et al., 1999; Simard et al., 1999; Kamau, 1998; Mills, 2001; Schoua, 2000 datos no publicados). Las poblaciones que han logrado diferenciarse generalmente son el resultado del efecto fundador, la presión selectiva o el aislamiento geográfico (Donnelly et al., 2002). Los estudios realizados en Kenya sugieren que la distancia asociada con un deme para la forma de sabana de *An. gambiae* es al menos de 50 km en diámetro (Lehmann et al., 1997). La información generada hasta la fecha ha demostrado que la distancia no necesariamente constituye una barrera importante genética (Rongnparut et al., 1999; Simard et al., 1999; Kamau, 1998; Mills, 2001;

Schoua, 2000 datos no publicados). Por ejemplo, la forma sabana de *An. gambiae* del oeste de Kenia presenta una ligera diferencia de las del occidente de Africa, 5000 km aparte, pero muestra un aislamiento genético significativo entre poblaciones de la costa de Kenia, 700 km aparte (Kamau et al., 1998). Debe notarse que a la fecha puede existir sesgo en los resultados obtenidos generado debido a la forma de muestreo realizado. Las colectas se han realizado de una manera puntual abarcando diferentes escalas geográficas, lo que podría haber limitado severamente la diversidad genética observada.

Un estudio realizado para evaluar la variabilidad temporal y geográfica de las poblaciones de *A. albimanus* en Guatemala, utilizando espaciadores intergénicos (IGS) de ADN ribosomal mostró que existen barreras geográficas entre regiones de la costa del Pacífico y la Costa del Caribe de Guatemala. Esto tiene como consecuencia un flujo genético restringido entre las poblaciones de dichas regiones (Ovalle, 1994).

En un estudio realizado de poblaciones de *A. albimanus* se utilizó como marcador molecular ADN mitocondrial de estos mosquitos. El objetivo principal era encontrar si existía un buen flujo genético entre las poblaciones de Guatemala, El Salvador, México, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela. La secuencia del ADN mitocondrial amplificada, utilizando la técnica de PCR, fue una región de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenada. Las muestras fueron analizadas por medio de la técnica de polimorfismo conformacional de banda simple (SSCP, por sus siglas en inglés). Se detectaron 45 haplotipos distintos, para los cuales no se notó una diferencia significativa en frecuencia para las costas del Pacífico y del Caribe de Guatemala, pero sí se encontró que para poblaciones separadas por más de 200km existe aislamiento que está correlacionado con la distancia (Mérida et al., 1999).

D. Análisis de fragmentos pequeños de ADN. En este estudio el producto de PCR de las secuencias microsatélites se separó en el equipo de electroforesis capilar 3100 (Applied Biosystem, CA). Este equipo tiene dos funciones: 1) secuenciar, 2) analizar fragmentos pequeños de ADN. Para analizar fragmentos pequeños utiliza un arreglo de 16 capilares que contienen un polímero POP-4, como medio de separación. Al aplicar voltaje, el producto de PCR marcado con fluorescencia entra en el capilar y comienza a migrar. Al pasar por la celda de detección, el producto de PCR es iluminado por el láser de argón, lo que ocasiona que el colorante fluorescente emita luz, la cual es transmitida a la computadora, donde es procesada. El resultado es un gráfico llamado electroferograma, obtenido mediante el programa GeneScan Análisis Software (Figura 8), que es una representación gráfica de la separación de los fragmentos de ADN que representan la secuencia microsatélite. La resolución de la electroforesis en un secuenciador automatizado es tan alta que se pueden identificar fragmentos (representados por picos) que difieren hasta por un par de bases (Guía química GeneScan).

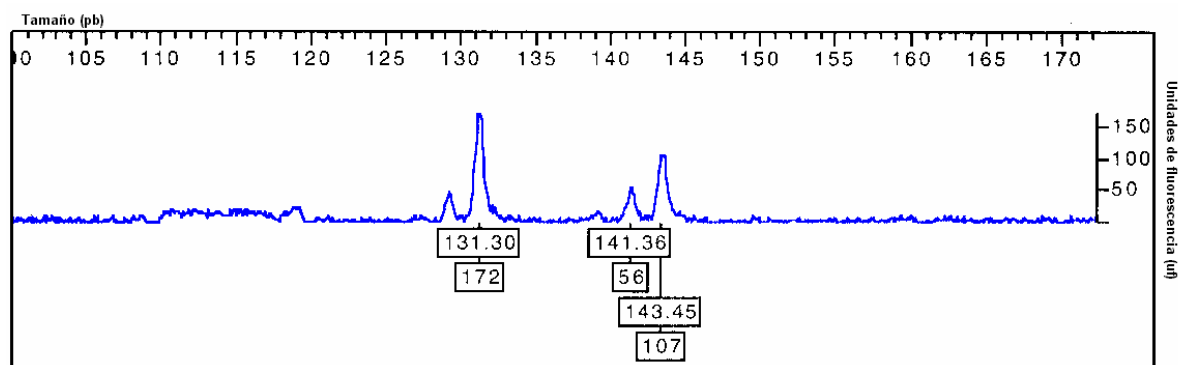


Figura 8. Electroferograma obtenido al amplificar una muestra de DNA de *Anopheles albimanus*, utilizando el microsatélite NP76consA.

En el eje-x se presenta el tamaño del alelo, en pares de bases (pb), y la señal de fluorescencia se presenta en el eje-y, en unidades de fluorescencia (uf).

Este método tiene ventajas sobre el uso de geles de secuenciación de poliacrilamida, ya que el tamaño del pico, que representa al tamaño del alelo, tiene mejor resolución que las bandas observadas en los geles de secuenciación. En el equipo de electroforesis capilar el tamaño del alelo es calculado por medio del método *Local Southern*, que promedia el resultado obtenido de tres regresiones lineales para obtener dicho tamaño de forma automática, lo cual representa otra ventaja sobre el otro método en el cual se realiza una sola regresión lineal, manualmente, utilizando el programa Microsoft® Excel. El tiempo de corrida en ambos sistemas es similar, ya que para correr 192 muestras en el equipo de electroforesis capilar se necesitan aproximadamente 9 horas y con los geles de secuenciación de poliacrilamida se necesita entre 1hr 40 min a 2hrs 45 min (Mills, 2001; Schoua, 2000), pero hay que tomar en cuenta la preparación de la gel, la tinción con nitrato de plata, medir manualmente la distancia que recorrió cada fragmento, calcular el tamaño de los alelos, y descartar la gel. Solo esta última etapa dura 7 horas mínimo (Mills, 2001; Schoua, 2000). Con ambos métodos se pueden correr dos productos de PCR en un mismo pozo, con la diferencia que con un equipo de electroforesis capilar se pueden correr productos con el mismo tamaño pero marcados con diferente fluorescencia, y en las geles de secuenciación de poliacrilamida sólo se pueden correr productos de PCR con tamaños moleculares distintos.

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

A. Objetivo general

Determinar si existe estructuración en la población de *Anopheles albimanus* en el municipio de Ixcán.

B. Objetivos específicos

1. Identificar si los loci correspondientes a los microsatélites seleccionados se detectan en poblaciones naturales.
2. Definir e identificar los alelos en cada Locus.
3. Determinar el polimorfismo, alelos por Locus, número efectivo de alelos y heterocigosidad esperada y observada de los 11 microsatélites en poblaciones naturales de *Anopheles albimanus* de Ixcán, Quiché.
4. Establecer si los 11 microsatélites son aptos como marcadores moleculares para futuros estudios poblacionales.

C. Hipótesis

1. Hipótesis nula

No existe flujo de genes de *Anopheles albimanus* en localidades cercanas entre sí, en el municipio de Ixcán.

2. Hipótesis alternas

- a. Los loci correspondientes a los microsatélites se detectan en el 100% de los individuos analizados.
- b. El número de alelos por locus es mayor o igual a 2.
- c. El 100% de los Loci son Bpolimórficos.