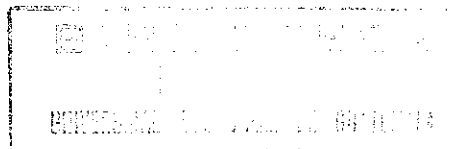


UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

EVALUACION DE LA VARIABILIDAD TEMPORAL Y GEOGRAFICA
DE LOS ESPACIADORES INTERGENICOS (IGS) DE ADN RIBOSOMAL
EN POBLACIONES DE *Anopheles albimanus* DE GUATEMALA.

CARMEN AIDA OVALLE AGUILERA



Guatemala

1994

EVALUACION DE LA VARIABILIDAD TEMPORAL Y GEOGRAFICA
DE LOS ESPACIADORES INTERGENICOS (IGS) DE ADN RIBOSOMAL
EN POBLACIONES DE *Anopheles albimanus* DE GUATEMALA.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

EVALUACION DE LA VARIABILIDAD TEMPORAL Y GEOGRAFICA
DE LOS ESPACIADORES INTERGENICOS (IGS) DE ADN RIBOSOMAL
EN POBLACIONES DE *Anopheles albimanus* DE GUATEMALA.

CARMEN AIDA OVALLE AGUILERA

Trabajo de graduación presentado para optar
al grado académico de Licenciada en Bioquímica

Guatemala

1994

Vo. Bo. :

(f) Margarita P. de Mata
Licenciada Margarita de Mata
Asesor

(f) Ana Maria Pae Mays
Licenciada Ana Maria Peralta de Merida
Co-asesor

Tribunal:

(f) Margarita P. de Mata
Licenciada Margarita de Mata

(f) Patricia de Palomo
Licenciada Patricia Palomo de Palacios

(f) Ronald Pérez Guan
Licenciado Ronaldo Pérez Guan

Fecha de aprobación: 19 de junio de 1994.

A Dios,
A mi familia, y
A mis compañeros bioquímicos.

CONTENIDO

	Páginas
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
A. Características generales del ADN ribosomal de insectos.	4
B. Importancia del mapeo de los fragmentos de restricción del IGS del ADN ribosomal.	6
C. Espaciadores no transcritos y su posible función.	10
D. Fuerzas evolucionarias que actúan sobre el ADN ribosomal.	11
1. Mecanismos de la evolución en concierto.	13
III. OBJETIVOS	18
IV. JUSTIFICACION	19
V. HIPOTESIS	21
VI. METODOLOGIA	22
A. Muestreo	22
B. Análisis bioquímico	26
C. Análisis estadístico	27
VII. RESULTADOS	30
A. Variabilidad de las frecuencias de IGS de <i>Anopheles albimanus</i> de las poblaciones analizadas desde 1989 a 1992	30
B. Análisis estadístico (Análisis log-linear)	38
VIII. DISCUSION	41
IX. CONCLUSIONES	45

	Páginas
X. RECOMENDACIONES	46
XI. LITERATURA CITADA	47
APENDICES	
A. Procedimientos	49
B. Glosario	60
C. Fotografías de filtros y tablas de interpretación de bandas	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Páginas
1. Arreglo típico de los genes de ADN ribosomal díptero	5
2. Organización del IGS de ADN ribosomal de <i>Xenopus laevis</i>	12
3. Modelos de (A) entrecruzamiento desigual y (B) conversión de genes	14
4. Zonas endémicas de malaria en Guatemala	23
5. Poblaciones de <i>Anopheles albimanus</i> de Guatemala analizadas en este estudio	25
6. Sitios de corte de las enzimas de restricción XhoI y HindIII	26
7. Frecuencias (%) de IGS de ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> , San Luis Petén, 1990 y 1992.	32
8. Frecuencias (%) de IGS de ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> , Champona, 1989 y 1991.	32
9. Frecuencias (%) de IGS de ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> , Vista Bella, 1989 y 1990.	33
10. Frecuencias (%) de IGS de ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> , Empalizada, 1990 y 1991.	34
11. Frecuencias (%) de IGS de ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> , El Motor, 1989, 1990, y 1991.	34
12. Frecuencias (%) de IGS de ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> , región norte, desde 1989 hasta 1992.	35
13. Frecuencias (%) de IGS de ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> , región sur-oriente, desde 1989 hasta 1991.	37

Figura	Páginas
14. Frecuencias (%) de IGS de ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> , región norte y sur- oriente, desde 1989 hasta 1991.	37
15. Fotografía del filtro de Champona 1989 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	63
16. Fotografía del filtro de Champona 1989 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	64
17. Fotografía del filtro de El Motor 1989 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	65
18. Fotografía del filtro de El Motor 1989 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	66
19. Fotografía del filtro de Vista Bella 1989 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	67
20. Fotografía del filtro de Vista Bella 1989 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	68
21. Fotografía del filtro de El Motor 1990 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	69
22. Fotografía del filtro de El Motor 1990 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	70
23. Fotografía del filtro de Empalizada 1990 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	71
24. Fotografía del filtro de Empalizada 1990 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	72
25. Fotografía del filtro de Vista Bella 1990 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	73
26. Fotografía del filtro de Vista Bella 1990 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	74
27. Fotografía del filtro de San Luis Petén 1990 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	75
28. Fotografía del filtro de San Luis Petén 1990 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	76

Figura	Páginas
29. Fotografía del filtro de Empalizada 1991 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	77
30. Fotografía del filtro de Empalizada 1991 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	78
31. Fotografía del filtro de Champona 1991 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	79
32. Fotografía del filtro de Champona 1991 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	80
33. Fotografía del filtro de El Motor 1991 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	81
34. Fotografía del filtro de San Luis Petén 1992 A (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	82
35. Fotografía del filtro de San Luis Petén 1992 B (A) y tabla de interpretación de bandas (B).	83

LISTA DE TABLAS

Tablas	Páginas
1. Tamaño de la muestra (número de mosquitos) de cada población y año estudiado	24
2. Porcentajes de frecuencias de IGS en <i>Anopheles albimanus</i> de la región norte	30
3. Porcentajes de frecuencias de IGS en <i>Anopheles albimanus</i> de la región sur-oriente	31
4. Resultados del análisis log-lineal (Chi-cuadrado) de las variaciones de frecuencias de IGS del ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> de Guatemala, utilizando las variables: Período de colecta por grupo de banda por región.	38
5. Resultados del análisis log-lineal (Chi-cuadrado) de las variaciones de frecuencias de IGS del ADN ribosomal de <i>Anopheles albimanus</i> de Guatemala, utilizando las variables: Período de colecta por grupo de banda por población.	39

RESUMEN

Anopheles albimanus es un importante vector de malaria, y tiene una amplia distribución en América Latina. Esta especie exhibe gran variabilidad ecológica y de comportamiento, y cualquier adelanto en su estudio es útil para contribuir al control de esta enfermedad. La variabilidad de las frecuencias de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* fue analizada en cinco poblaciones de Guatemala, dos correspondientes a la región norte y tres a la región sur-oriente, por medio del mapeo de los fragmentos de restricción y análisis de hibridización. Además, se examinó la variabilidad respecto al tiempo (3 años). Cada población posee distintas frecuencias de IGS, y se notó un claro patrón de hibridización de las bandas de mosquitos de la región norte, que es diferente del de la región sur-oriente, por lo que se sugiere un flujo genómico restringido entre regiones. Por otro lado, las frecuencias de IGS de cada población y región estudiadas, se conservaron a través del tiempo.

I. INTRODUCCION

Anopheles albimanus Wiedeman es considerado el vector de malaria más importante de América Central y parte de Sudamérica. En Guatemala existen 4 zonas principales de malaria distinguidas por su clima y la intensidad de transmisión de malaria. Estas se extienden al norte, oriente, y a lo largo de la costa del Pacífico del país (Frederickson, 1989; Mérida *et al.*, en preparación).

Estudios realizados con *Anopheles albimanus*, revelan que esta especie exhibe una gran variabilidad en su ecología y comportamiento, y que existen diferencias genéticas entre las poblaciones. Sus características de comportamiento indican que no debería ser un buen vector de malaria pues parece tener como víctimas prioritarias a los animales, por ejemplo el ganado vacuno, antes que al hombre. Aún así, esta especie es responsable de la transmisión de malaria a millones de personas en América Latina y hasta el momento, no se sabe si su rol vectorial es principalmente determinado por las grandes densidades de mosquitos o a la existencia de un complejo de especies con algunas de mayor capacidad vectorial (Frederickson, 1989; Mérida *et al.*, en preparación).

Puesto que algunas especies anofelinas consisten en complejos de especies morfológicamente similares,

actualmente se estudia la estructura genética de las mismas por medio de las unidades repetitivas del ADN que codifica para el ARN ribosomal. Esto se logra a través del mapeo de los fragmentos obtenidos con endonucleasas de restricción (Coen, Thoday y Dover, 1987; Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989; Cross y Dover, 1987; McLain y Collins, 1989), pues permiten visualizar las variantes entre mosquitos de la misma especie y entre especies. Esta gran familia de genes posee una arquitectura básica y funciones que han sido conservadas en todos los organismos multicelulares. Por tanto existe una homología en la secuencia, aún en organismos distantemente relacionados. Pero, también poseen fragmentos no transcritos llamados espaciadores intergénicos (IGS), que parecen mutar extremadamente rápido, acumulando variantes importantes que pueden difundirse y fijarse en toda una población por medio de mecanismos de homogenización que aseguran que todos los individuos de una población posean la nueva variante (Coen, Thoday y Dover, 1982; Dover, 1982; Dover y Coen, 1981; Li, Luo y Wu, 1985). Este fenómeno se conoce como evolución horizontal o en concierto, y opera independientemente de las fuerzas tradicionales de evolución, selección y derivación genética (Black, McLain y Rai, 1989; Li, Luo y Wu, 1985).

Hasta el momento, no hay ningún reporte publicado de la variación de las frecuencias de IGS en el ADN ribosomal de

Anopheles albimanus a través del tiempo. En el presente trabajo, se pretende observar la variabilidad del IGS en 5 poblaciones de *A. albimanus* de Guatemala, abarcando 3 zonas importantes de malaria, y a la vez examinar su variabilidad a través del tiempo. Siendo ésta una estructura susceptible de mutaciones, podría evidenciar la acumulación de nuevas variantes en la especie.

II. ANTECEDENTES

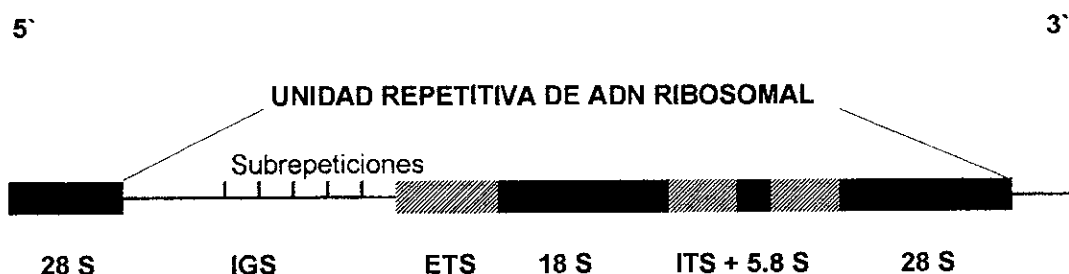
A. Características generales del ADN ribosomal de insectos.

El ADN ribosomal ha sido estudiado en muchos organismos, incluyendo los insectos. Todos los genes que codifican para el ARN ribosomal están arreglados en un pequeño número de regiones cromosomales (casi siempre sólo una). En cada una de estas regiones, cada gen de ADN ribosomal se encuentra interrumpido por un espaciador intergénico (IGS). Las transcripciones del IGS son raras, y las que ocurren, son rápidamente degradadas (Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989).

La transcripción primaria del gen es procesada para producir diferentes componentes de ARN ribosomal, y otros componentes reguladores. Estos incluyen (empezando por la terminal 5') el espaciador transcrito externo (ETS), la secuencia codificadora 18S, el espaciador transcrito interno (ITS) que contiene la secuencia codificadora 5.8S, y la secuencia 28S (ver figura 1). Esta última casi siempre se divide en dos fragmentos de tamaño similar, las secuencias 28S alfa y 28S beta (Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989). Cada uno de estos genes se encuentra separado por el IGS, cuyas unidades repetitivas en diferentes especies de insectos varía de menos de 10 a 20 kilobases (kb) dependiendo de la longitud del IGS, y si el fragmento 28S se

Figura 1.

Arreglo típico de los genes de ADN ribosomal díptero.



encuentra o no separado por intrones (Beckingham, 1982).

Las secuencias de ADN en la mayoría de la región transcrita, particularmente en las regiones codificadoras, son altamente conservadas entre las diferentes especies de Díptera (Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989). El mantenimiento de la homogeneidad de tales estructuras, es crucial para la función y estructura del ARN ribosomal; las mutaciones en el ADN ribosomal para estas regiones serían letales al organismo, pues impedirían la función del ARN ribosomal. Aunque tales regiones conservadas son funcionalmente importantes, el inverso de esta afirmación no se aplica: es falso asumir que las regiones de secuencia variable no son importantes (Gerbi, 1985).

Algunas regiones en el ARN ribosomal parecen no tener el mismo requerimiento de conservación, aunque algunas limitaciones estructurales se imponen sobre los espaciadores

(Gerbi, 1985). Los espaciadores, particularmente el IGS, divergen rápidamente aún entre especies muy relacionadas. Incluso, variaciones considerables de longitud del IGS son observadas entre los individuos de la misma especie (Collins, Paskewitz, y Finnerty, 1989). El incremento o disminución de las subrepeticiones en el IGS, es la razón principal de la variación del tamaño del IGS. Esta variabilidad es tolerada en el ARN ribosomal, porque no perturba ninguna región preexistente de importancia funcional (Gerbi, 1985).

B. Importancia del mapeo de los fragmentos de restricción del IGS del ADN ribosomal.

Algunos de los más importantes vectores de malaria como *Anopheles gambiae* Giles y *Anopheles maculipennis* Meigen son miembros de complejos taxonómicos que están compuestos de varias especies muy relacionadas, y no pueden diferenciarse morfológicamente. Se sabe también que otros vectores anofelinos de malaria pertenecen a complejos de especies hermanas (Mérida *et al.*, en preparación). La identificación de tales especies, se hacía inicialmente demostrando el aislamiento reproductivo de las mismas entre colonias de laboratorio. Estudios posteriores revelaron que la identidad de las especies podía ser determinada, con

diferentes grados de confiabilidad, analizando alozimas, hidrocarburos cuticulares, caracteres morfométricos, estructura mitótica cromosomal, y la distribución de las inversiones paracéntricas en la politenia del complemento cromosómico. Entre todos estos métodos, solamente el último era confiable para identificar especies. Desafortunadamente, los cromosomas con el grado apropiado de politenia están presentes en los insectos, únicamente bajo condiciones muy especiales de sexo y edad, por lo cual este método no podía ser utilizado en programas de análisis de rutina de vectores (Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989). Actualmente ya se han logrado métodos moleculares para la identificación de especies de Díptera (Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989).

El interés en el análisis molecular del ADN que codifica para el ARN ribosomal, se debe a la gran información que el mismo puede proveer para los cuestionamientos evolutivos en especies muy relacionadas. El ADN ribosomal de varios grupos de Díptera muy relacionados, ha sido estudiado en detalle, y el número de copias de genes, aunque varía entre los diferentes taxa, está en el rango de varios cientos de miles de copias por genoma diploide. Tales secuencias repetidas de ADN pueden formar la base de ensayos de ADN muy sensitivos que no son dependientes de condiciones especiales como el sexo o la etapa de desarrollo. Adicionalmente, puesto que el ADN es

una molécula muy estable, relativamente no degradable en muestras desecadas o conservadas en alcohol, la recolección de las muestras y su manejo puede ser simplificada (Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989).

Como medio para estudios evolutivos, el ADN ribosomal tiene varias características de interés particular. Esta gran familia de genes tiene una arquitectura y función básicas que han sido conservadas a través de todos los organismos multicelulares. Por ello se puede decir que existe una gran homología de secuencia aún entre organismos relacionados lejanamente. No obstante, regiones específicas en esta molécula parecen mutar extremadamente rápido, de modo que pueden ser detectadas diferencias significativas aún entre especies cercanamente relacionadas (Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989).

La estructura del cistrón de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* Wiedemann es similar al de otros insectos. Cada gen está separado por un espaciador intergénico (IGS), el cual contiene una serie de subrepeticiones ordenadas una tras otra, de aproximadamente 100 pares de bases de longitud. El número de subrepeticiones puede variar de un espaciador al siguiente, aún en el mismo individuo, lo que produce la variación en el tamaño del IGS. Aunque ciertas longitudes de IGS predominan, estas pueden variar de una población de mosquitos a otra, y esta variación ha sido

utilizada para diferenciar a las mismas (Mérida *et al.*, en preparación). En este estudio las enzimas de restricción utilizadas cortan el ADN ribosomal en dos fragmentos: El IGS entero y la unidad de transcripción (ver figura 6). Por lo tanto, a lo largo de este trabajo, al referirse al IGS de *Anopheles albimanus*, se estará hablando también del fragmento de restricción completo obtenido, y de interés.

Se ha encontrado variabilidad en el tamaño del IGS en poblaciones de *Aedes albopictus* (Black *et al.*, 1989), varias especies de moscas Tsetse (Cross y Dover, 1987), *Drosophila melanogaster* (Strachan *et al.*, 1985), y en plantas (Flavell *et al.*, 1986). La variabilidad de tamaños del IGS entre las diferentes poblaciones puede ser un parámetro sensitivo para evaluar la estructura de poblaciones e investigar los patrones de flujo genómico de las mismas (Dover, 1982).

Se han realizado estudios de variabilidad del IGS en poblaciones de *Anopheles albimanus* de Guatemala y de otros países de América Latina. Utilizando el patrón de bandas del IGS como criterio para determinar el origen de un mosquito y un modelo estadístico de análisis discriminante, se encontró que son asignados a su respectiva población con sólo un 11.2% de clasificación errónea. Además, se encontró que el patrón de IGS de las poblaciones del norte y oriente, era diferente del de las poblaciones del sur del país. Esto supuso un flujo genético restringido, y una estructura

genética definida de cada población, probablemente debida a las barreras geográficas poco permeables, como son las sierras que atraviesan a Guatemala en sentido poniente-oriente (Mérida *et al.*, en preparación). Estudios similares con otras especies de mosquitos demuestran que los IGS evolucionan rápidamente por el mecanismo de evolución en concierto ("concerted evolution"), dando como resultado un patrón único de espaciadores en cada población (McLain *et al.*, 1989).

C. Espaciadores no transcritos y su posible función.

Como se mencionó anteriormente, las transcripciones del IGS son raras y si ocurren, son rápidamente degradadas (Gerbi, 1985). A diferencia del alto grado de conservación de secuencia en las transcripciones para el ARN ribosomal, los espaciadores del ADN ribosomal muestran gran variabilidad entre las especies. Tal variabilidad conduce a la pregunta de si los espaciadores llevan a cabo alguna función (Gerbi, 1985).

Los promotores son secuencias cortas de ADN que se encuentran a una corta distancia arriba del ETS, hacia el extremo 5' (ver figura 1), y son el sitio de unión de la polimerasa I al ADN en el momento de la transcripción. Estudios del ADN ribosomal de *Xenopus laevis* mostraron que

en el IGS había varias copias, de 2 a 8, del promotor original (ver figura 2). Estos promotores duplicados, que normalmente no son transcritos, están localizados a intervalos de 1 kb de cada uno y del promotor del gen. Se cree que su función es incrementar las transcripciones del ADN ribosomal, pues "hay más sitios" de unión para la polimerasa I (Cross y Dover, 1987; Gerbi, 1985).

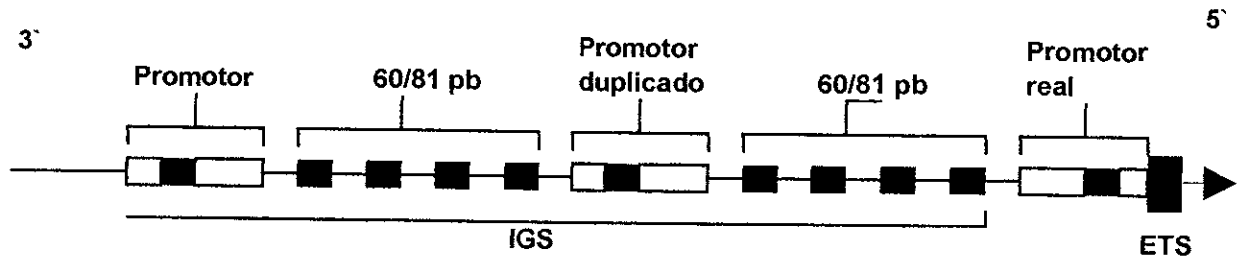
A pesar de la falta general de conservación de secuencia en la región del promotor, la polimerasa I debe guardar cierta estabilidad para todas las especies, lejanas o cercanas. Por otro lado, las polimerasas II y III del ARN transcriben diferentes tipos de genes, y poseen más restricciones para prevenir su divergencia. Como la polimerasa I sólo lleva a cabo la transcripción del ADN ribosomal, probablemente los cambios en la secuencia del promotor del ADN ribosomal estén coordinados con los cambios en dicha enzima, pues ésta evoluciona más rápidamente que las polimerasas responsables de la transcripción de otras secuencias genómicas codificadoras (Collins, Paskewitz y Finnerty, 1989).

D. Fuerzas evolucionarias que actúan sobre el ADN ribosomal.

Luego de mencionar que el ADN de organismos superiores está sujeto a tal diversidad de rearrreglos de secuencia, uno

Figura 2.

Organización del IGS del ADN ribosomal de *Xenopus laevis*.



se pregunta, ¿cómo puede mantenerse la estabilidad evolucionaria? (Coen y Dover, 1981). Aparentemente, las mutaciones son incorporadas y fijadas por ciertos mecanismos que pueden esparcir la nueva variante a todos los miembros de la familia de genes (Li, Luo y Wu, 1985), pues las fluctuaciones en el número de copias, conllevan al esparcimiento de nuevas variantes a una familia de genes (Cross y Dover, 1987), y por lo tanto, dentro de la especie, existe este fenómeno de homogeneidad paralelo con diferencias entre especies para esta familia de genes repetitivos (Gerbi, 1985).

Este fenómeno se conoce como evolución horizontal, o evolución en concierto y es el resultado de mecanismos moleculares de homogenización (Coen, Thoday y Dover, 1982), encargados de esparcir variantes en una población y la fijación de estos cambios en todos los individuos de la especie; en conjunto reciben el nombre de inducción

molecular ("molecular drive")(Gerbi, 1985). Estos mecanismos operan independientemente de las fuerzas tradicionales de evolución, selección y derivación genética. La velocidad a la cual estos mecanismos homogenizan una familia de genes está teóricamente gobernada por el tamaño de la familia, el tamaño efectivo de la población y la velocidad de mutación (Black, McLain y Rai, 1989).

1. Mecanismos de la evolución en concierto.

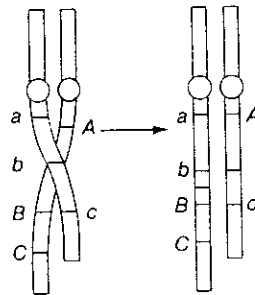
Varios mecanismos han sido propuestos para la evolución en concierto: Entrecruzamiento desigual, conversión de genes, y transposición del ADN. Los dos primeros son considerados los más importantes, pues están apoyados por observaciones y estudios teóricos. La importancia de la transposición, como un mecanismo de evolución en concierto, permanece latente hasta su justificación con datos (Li, Luo y Wu, 1985).

El entrecruzamiento desigual, es uno de los mecanismos del proceso de inducción molecular. Es un proceso de recombinación recíproco que crea una duplicación de secuencia en un cromosoma y un faltante correspondiente en el otro (ver figura 3a)(Dover, 1982). Debido a este intercambio sin igual, cada cromosoma hijo se ha vuelto más homogéneo que los cromosomas padres. Si este proceso

Figura 3.

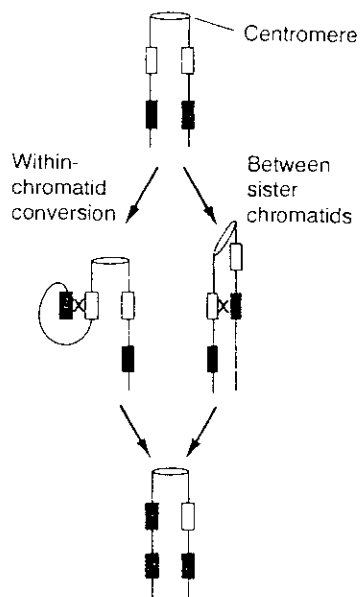
Modelos de (A) Entrecruzamiento desigual y
(B) Conversion de genes.

(A)

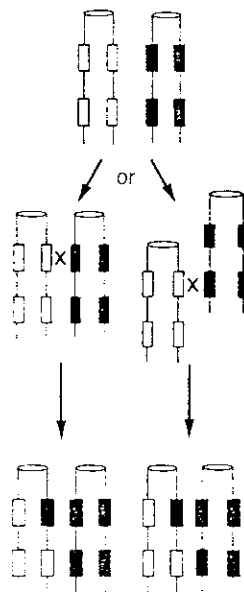


(B)

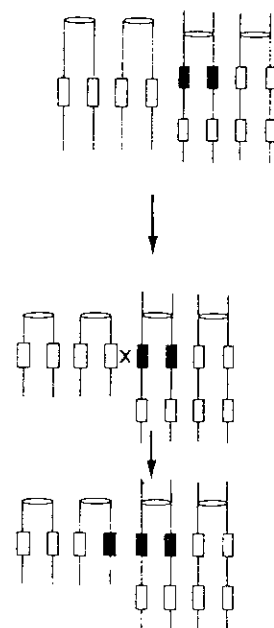
1. Mismo cromosoma



2. Entre cromosomas homólogos



3. Entre cromosomas no homólogos



continúa, el número de repeticiones mutantes fluctuarán en el cromosoma, y eventualmente un tipo de repetición será dominante en la familia (Li, Luo y Wu, 1985). Como consecuencia, todos los miembros de la familia tendrán o carecerán de la mutación (Gerbi, 1985). Es importante aclarar que como resultado del entrecruzamiento desigual ambos cromosomas hijos tienen una frecuencia alterada de los dos tipos de subrepetición cuando se comparan con los cromosomas padres. Además, el número de copias del elemento repetitivo, también es alterado en los cromosomas hijos.

La conversión de genes es un proceso de recombinación no recíproco (Li, Luo y Wu, 1985) que resulta de la reparación de bases no apareadas en una región de ADN heteroduplex formada durante la recombinación (ver figura 3b). Es un proceso no recíproco, en el hecho de que si un cromosoma "padre" tiene una forma mutante del gen y el otro cromosoma "padre" no, entonces los cromosomas "hijos" tendrán ambos el gen mutante, o ambos el gen normal. La cantidad de ADN involucrado en la conversión de genes puede ser de varias kb, y es un proceso que puede ocurrir entre cromosomas homólogos o no homólogos. Teóricamente es un evento capaz de producir evolución en concierto (Gerbi, 1985). La conversión de genes cambia la frecuencia de los dos tipos de elementos repetitivos en uno de los cromosomas hijos, pero no altera el número total de repeticiones en ambos

cromosomas (Li, Luo y Wu, 1985).

La transposición involucra la duplicación y movimiento de una secuencia de una posición a otra. Una secuencia con una alta tendencia a duplicar con movimiento de una copia a otro cromosoma, tiene una probabilidad aumentada de esparcirse en un cariotipo, y por lo tanto a una población. Los genomas eucariotas, contienen varias de tales familias (Dover, 1982).

Al parecer, la conversión de genes tiene varias ventajas sobre el entrecruzamiento desigual, puesto que puede actuar como un mecanismo de corrección no sólo en repeticiones en fila, sino en repeticiones dispersas. En cambio el entrecruzamiento desigual tiene varias restricciones cuando las repeticiones están dispersas en un cromosoma, pues puede causar pérdida o duplicación de los genes entre las repeticiones, causando un imbalance severo. Debido a que las bandas heteroduplex de ADN son sitios potenciales de ocurrencia de la conversión de genes, éste puede ocurrir más frecuentemente (Li, Luo y Wu, 1985).

Si los procesos de la inducción molecular fueran los únicos que actuaran sobre el ADN, entonces el grado de variación debería ser aproximadamente uniforme a través de la repetición de ADN ribosomal. Pero este no es el caso, y se cree que las presiones de la selección actúan sobre los productos resultantes de la inducción molecular. No se sabe

qué porcentaje de las copias del ADN ribosomal poseen una mutación antes de que cause una diferencia significativa sobre la cual la selección actúe (Gerbi, 1985). Si la dispersión de una mutación en el promotor es lenta hacia el gen de ADN ribosomal, ésta da tiempo para que algunos factores génicos de transcripción coevolucionen (Gerbi, 1985).

La coevolución puede también ocurrir para producir cambios en la región codificadora del ARN ribosomal, como áreas que interactúan directamente con las proteínas. Si más de un componente reacciona con una región del ADN ribosomal, entonces las limitaciones para permitir el cambio disminuyen, puesto que la evolución en varios genes para estos múltiples componentes, sería mucho más difícil (Gerbi, 1985).

III. OBJETIVOS

1. Investigar si existe variabilidad en las frecuencias de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* de 2 diferentes regiones de Guatemala, a través del tiempo.
2. Investigar si existe variabilidad en las frecuencias de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* de poblaciones de Guatemala, a través del tiempo.
3. Investigar si existe variabilidad en las frecuencias de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* entre dos regiones de Guatemala; Norte y Sur-Oriente.
4. Investigar si existe variabilidad en las frecuencias de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* entre las poblaciones de cada región de Guatemala que se escogió para este estudio.

IV. JUSTIFICACION

La malaria es una enfermedad infecciosa que afecta a 270 millones de habitantes en el mundo. El número de casos clínicos es de 110 millones de personas al año, y la mortalidad esperada, de 1 a 2 millones de personas al año.

En muchos países donde la malaria es causa de morbilidad y mortalidad, las actividades de control ayudan a frenar muertes presentables y a minimizar el sufrimiento de la enfermedad. Cualquier acercamiento al control de la malaria debe estar basado en la correcta identificación de los vectores, especialmente respecto de especies isomórficas, y a entender su ecología y comportamiento.

Estudios de la variabilidad de longitud del IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* en distintas regiones de Guatemala, han revelado patrones únicos de longitud del IGS en poblaciones de cada región, lo cual sugiere la presencia de barreras geográficas poco permeables al flujo de genes. Las diferencias en frecuencias de genotipos de una región geográfica a la otra, tienen un efecto profundo en el destino evolucionario de las especies.

Este estudio, que examina la variabilidad de las frecuencias de IGS de *Anopheles albimanus* en dos regiones de Guatemala a través del tiempo, permite visualizar si las variantes acumuladas en dicha estructura permanecen

estables, y mantienen un patrón definido para cada región estudiada. Si existieran variantes bien definidas en cada región estudiada que se mantuvieran a través del tiempo, se daría el posible inicio de la formación de un complejo de especies de *Anopheles albimanus*.

V. HIPOTESIS

1. No hay asociación entre la variabilidad de las frecuencias de IGS de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* y el tiempo, en dos regiones de Guatemala.
2. No hay asociación entre la variabilidad de las frecuencias de IGS de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* y el tiempo, en cinco poblaciones de Guatemala.
3. No hay asociación entre la variabilidad de las frecuencias de IGS de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* y las dos regiones de Guatemala analizadas: norte y sur-oriente.
4. No hay asociación entre la variabilidad de las frecuencias de IGS de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* y las poblaciones estudiadas en cada región.

VI. METODOLOGIA

A. Muestreo.

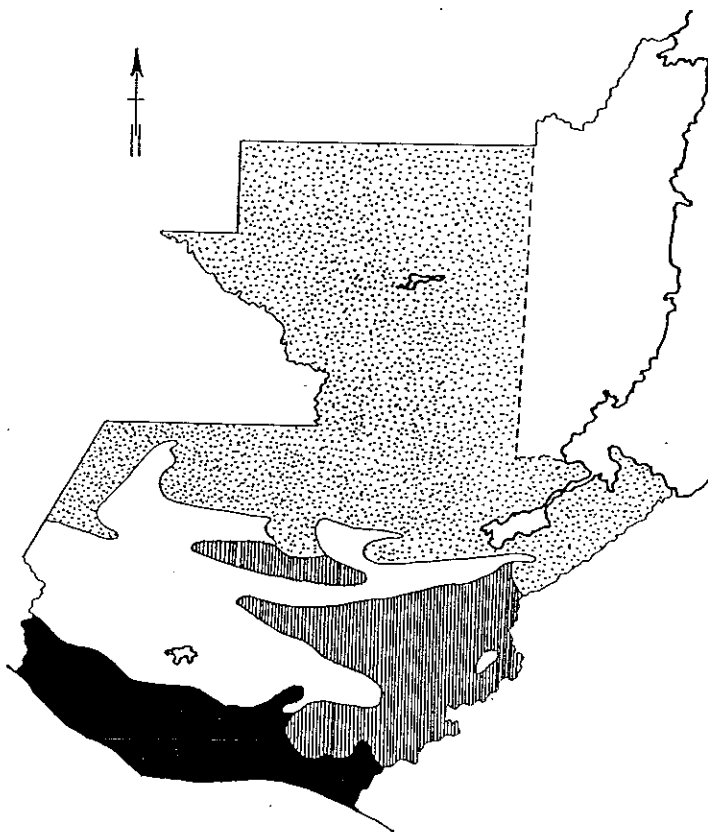
Guatemala ha sido dividida por el Servicio Nacional de Malaria (NMS) en cuatro zonas endémicas distinguidas por su clima y el grado de transmisión de malaria (ver figura 5). La zona norte, que es la de mayor extensión, está caracterizada por bosques húmedos y alta precipitación pluvial. La zona sur, que es la región de las plantaciones de caña de azúcar y algodón, también tiene alta precipitación pluvial. La zona centro-oriental tiene altas temperaturas, pero poca humedad y precipitación. La zona central posee altitudes mayores a los 1,500 pies, y la malaria no ha sido reportada aún (ver figura 4).

Para el presente estudio se escogieron 5 poblaciones de *Anopheles albimanus*, localizadas en:





1. Champona, Izabal, correspondiente a la zona norte (población 1, Figura 6).
2. San Luis, Petén, correspondiente a la zona norte (población 4, Figura 6).
3. El Motor, Jutiapa, correspondiente a la zona centro-oriental (población 2, Figura 6).
4. Empalizada, Escuintla, correspondiente a la zona sur (población 3, Figura 6).

Figura 4.

Zonas endémicas de malaria de Guatemala.



REFERENCIAS

- | | |
|---|---------------------------|
|  | Zona centro-oriental |
|  | Zona litoral del Pacífico |
|  | Zona norte |
|  | Zona indemne |

5. Vista Bella, Escuintla, correspondiente a la zona sur (población 5, Figura 6).

Las poblaciones fueron categorizadas dentro de dos regiones: (a) norte, y (b) sur-oriente, escogiéndose así, para cubrir las zonas endémicas de malaria, y por conveniencia de la recolecta.

Se hizo el muestreo a partir de 1989 hasta 1992, en la época de invierno (entre junio y agosto de cada año) para cada una de las poblaciones. Se colectaron los mosquitos de cada población (ver tabla 1) en corrales de ganado, en donde los mismos se aspiran cuando están sobre el ganado. Se alimentaron con sangre humana para que produjeran huevos, y la cantidad de ADN a analizar fuera mayor. Se mantuvieron vivos en cajas especiales hasta su llegada al laboratorio de la Unidad de Entomología Médica de la Universidad del Valle

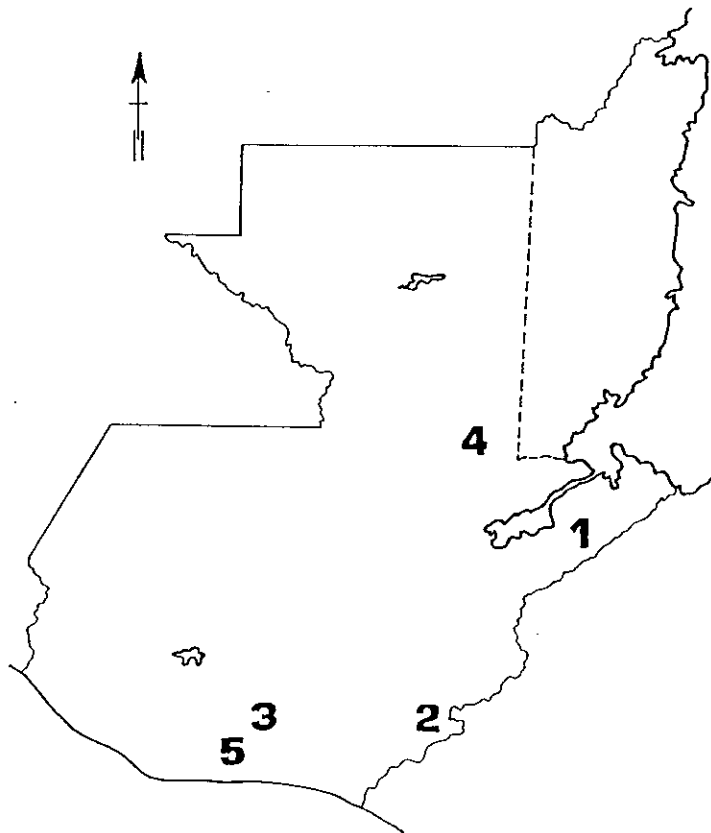
Tabla 1.

Tamaño de las muestras (número de mosquitos) de cada población y año estudiado.

Año	Región norte		Región sur-oriente		
	Sn.L.Petén	Champona	Vista Bella	Empalizada	El Motor
1989	-	26	26	-	26
1990	26	-	26	26	26
1991	-	17	-	24	6
1992	26	-	-	-	-

Figura 5.

Poblaciones de *Anopheles albimanus*
de Guatemala analizadas en este estudio.



REFERENCIAS

1. Champona.
2. El Motor.
3. Empalizada.
4. San Luis Petén.
5. Vista Bella.



estadísticos de vías múltiples: A. Período de colecta por grupo de banda por región, y B. Período de colecta por grupo de banda por población. Se le llamó período de colecta a cada año en que se colectaron mosquitos de una misma población, pues como puede observarse en la tabla 1, no en todos los años estudiados se hizo colecta de las mismas. Por ejemplo, en la población de San Luis Petén tiene dos períodos de colecta, el de 1990 y el de 1992.

Cada uno de estos factores, son las variables independientes del estudio, y cuentan con sus niveles respectivos:

- A. Región, con dos niveles: I. norte (Petén e Izabal),
II. sur-oriente (Jutiapa y Escuintla);
- B. Población, con cinco niveles: I. San Luis Petén,
II. Champona, III. Empalizada, IV. Vista Bella, y V. El Motor.
- C. Período de colecta: I. Primer año de colecta en una población, II. segundo año de colecta, y III. tercer año de colecta.
- D. Grupo de banda, con cinco niveles: I. 7 a 9 kb, II. 10 a 12 kb, III. 13 a 15 kb, IV. 16 a 18 kb, y V. 19 a 21 kb.

Por facilidad de manejo de resultados y para visualizar mejor los rasgos característicos de la aparición de ciertas longitudes de IGS para cada población estudiada, las bandas fueron agrupadas en conjuntos de tres kb: (a) de 7 a 9 kb,

(Pharmacia, USA); cada gel tenía 15 pozos, de los cuales el primero contenía un marcador de tamaño 1 kb ladder (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA), y el último una mezcla de 100 mosquitos de colonias de laboratorio (ver apéndice C). Cada gel fue fotografiado.

Los geles fueron transferidos a filtros de nylon (Magnagraph, Micron Separations Inc.). Estos filtros fueron posteriormente hibridizados con la sonda pAal 1.4 Hind III-Xho I, el cual es un fragmento subclonado de un fago clonado de ADN de *Anopheles albimanus*, y detectados inmunológicamente con un kit de detección y marcaje de ADN, GENIUS (Boehringer Mannheim, Indianapolis, USA, Cat. N. 1093 657). La detección consistió de la unión de un conjugado de anti Digoxigenina-fosfatasa alcalina al ADN marcado y la adición del sustrato de la enzima revelando la existencia de bandas de interés con la aparición de un color azul en las mismas. Estos filtros fueron fotografiados para su análisis.

El tamaño de las muestras utilizadas para cada año, por cada población fue de 26 mosquitos; o sea, se corrieron 2 geles por cada año y población.

C. Análisis estadístico.

Con los factores: Región, población, período de colecta, y grupo de banda, se elaboraron dos diseños

(b) de 10 a 12 kb, (c) de 13 a 15 kb, (d) de 16 a 18 kb, y (e) de 19 a 21 kb. A cada una de las bandas que apareció en los filtros se le asignó un valor de 1 a 0, de acuerdo a su presencia o ausencia en el mismo, respectivamente. Se utilizó como variable dependiente o variable de respuesta, la frecuencia de aparición de las bandas en los filtros.

Los datos fueron analizados utilizando tablas de contingencia jerárquicas de Chi-cuadrado, por medio del comando HILOGLINEAR del programa de estadística para computadora, SPSS PC+ Versión 2.0 (Norusis, 1990), y se referirá a él de ahora en adelante como análisis log-lineal. Los modelos log-lineal son útiles para revelar las relaciones complejas entre variables en una tabulación de contingencia de vías múltiples. En dichos modelos, todas las variables que son usadas para clasificación son variables independientes, y la variable dependiente es el número de casos en una celda de la tabla (Norusis, 1990).

VII. RESULTADOS

A. Variabilidad de las frecuencias de IGS de *Anopheles albimanus* de las poblaciones de Guatemala analizadas desde 1989 a 1992.

Los resultados de las frecuencias de bandas de cada filtro fueron anotados en tablas individuales que se muestran en el apéndice C. De estos datos se recopiló la información presentada en las tablas 2 y 3, que son los porcentajes de frecuencias de IGS en las poblaciones de *Anopheles albimanus* de la región norte y sur-oriente de Guatemala respectivamente, desde 1989 hasta 1992. Al decir porcentajes de frecuencias de IGS, se está aludiendo

Tabla 2.

Porcentajes de frecuencias de IGS en *Anopheles albimanus* de la región norte.

Poblaciones de la región norte	n	Grupo de banda Longitud de IGS (kb)				
		07-09	10-12	13-15	16-18	19-21
Champona 1989	26	50.0	12.8	15.4	11.5	1.2
É.Luis Petén 1990	26	87.2	26.9	20.5	7.6	5.1
Champona 1991	17	84.3	37.3	33.3	23.5	9.8
S.Luis Petén 1992	26	65.4	23.1	29.5	8.9	10.3

Tabla 3.

Porcentajes de frecuencias de IGS en *Anopheles albimanus* de la región sur-oriente.

Poblaciones de la región sur-oriente	n	Grupo de banda Longitud de IGS (kb)				
		07-09	10-12	13-15	16-18	19-21
El Motor 1989	26	75.6	87.2	91.0	65.4	38.5
Vista Bella 1989	26	78.2	88.5	83.3	69.2	41.0
El Motor 1990	26	48.5	52.6	56.4	29.5	12.8
Empalizada 1990	26	56.4	84.6	85.8	52.6	23.1
Vista Bella 1990	26	61.5	73.1	67.9	51.3	20.5
El Motor 1991	6	77.8	94.4	100.0	88.8	61.1
Empalizada 1991	24	50.3	68.1	69.4	51.3	19.4

al número de individuos con bandas presentes dividido entre el número de individuos, por cien.

Dichos porcentajes de frecuencias de IGS, fueron graficados para cada población y cada año analizado. Las figuras 7 y 8 muestran los porcentajes de frecuencias de bandas de IGS en dos poblaciones de la región norte, San Luis Petén y Champona respectivamente, para los años analizados. Se hizo evidente en ambas figuras, que predominan los IGS de 7-9 kb. En la figura 7 la frecuencia de IGS de 7-9 kb disminuyó de 1990 a 1992, pero para el IGS de 13-15 kb aumentó en el mismo espacio de tiempo, por otro

Figura 7.

Frecuencias (%) de IGS
de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*,
San Luis Petén, 1990 y 1992.

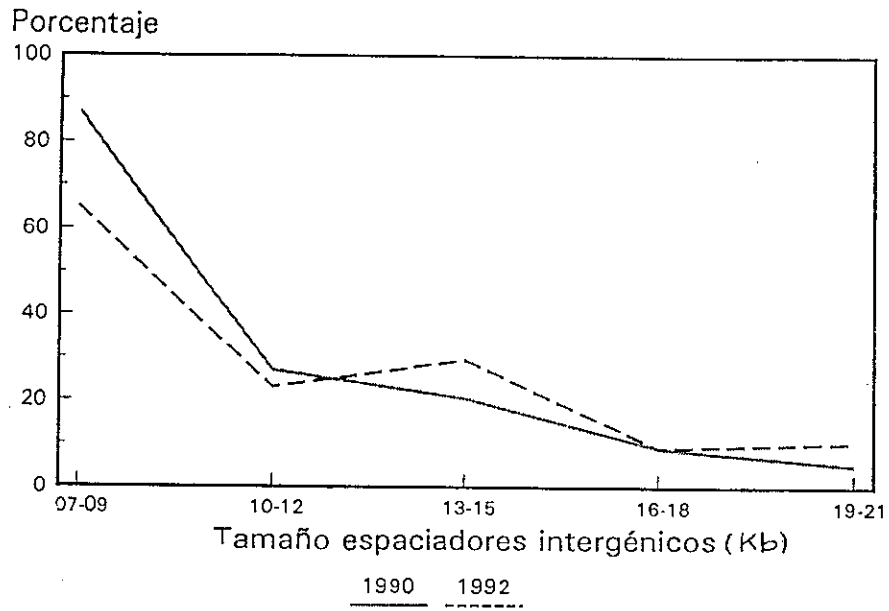
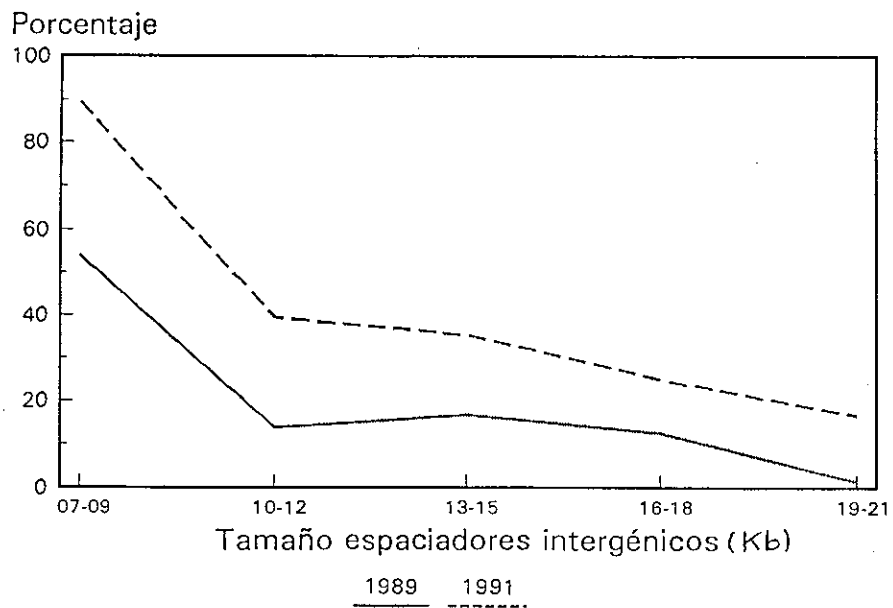


Figura 8.

Frecuencias (%) de IGS
de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*,
Champona, 1989 y 1991.



lado, en la figura 8 todas las frecuencias aumentaron de 1989 a 1991.

El patrón genético de las bandas de IGS de las poblaciones de la región sur-oriente resultó ser diferente del de las poblaciones del norte. Las figuras 9, 10 y 11 muestran que predominan las bandas de IGS que se encuentran entre las 10-12 kb y 13-15 kb teniendo también, aunque en menor frecuencia, bandas distribuidas entre 7-9 kb y 16-18 kb. En la población de Vista Bella (ver figura 9) se notó una disminución de la frecuencia de IGS de 1989 a 1990, lo mismo para las bandas encontradas entre 10-12 kb y 13-15 kb

Figura 9.

Frecuencias (%) de IGS
de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*,
Vista Bella, 1989 y 1990.

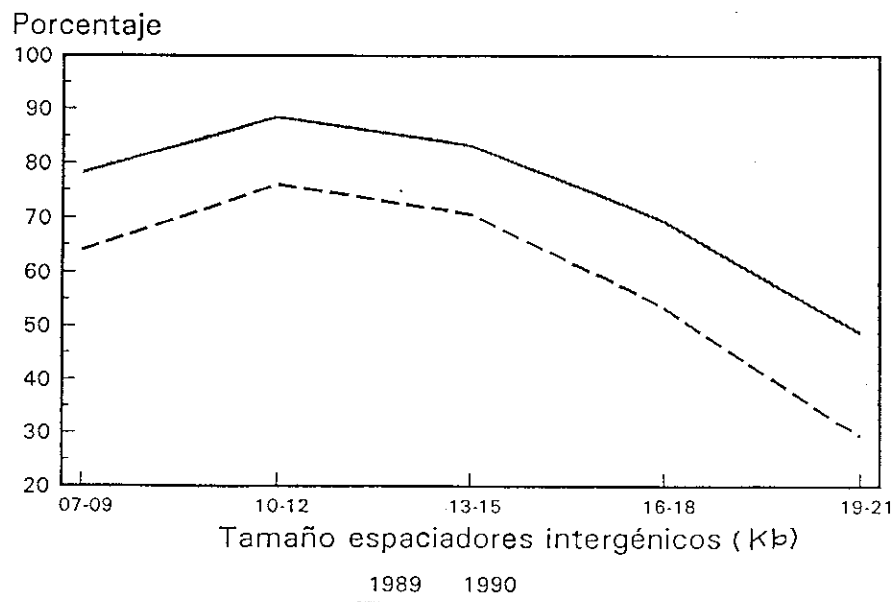


Figura 10.

Frecuencias (%) de IGS
de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*,
Empalizada, 1990 y 1991.

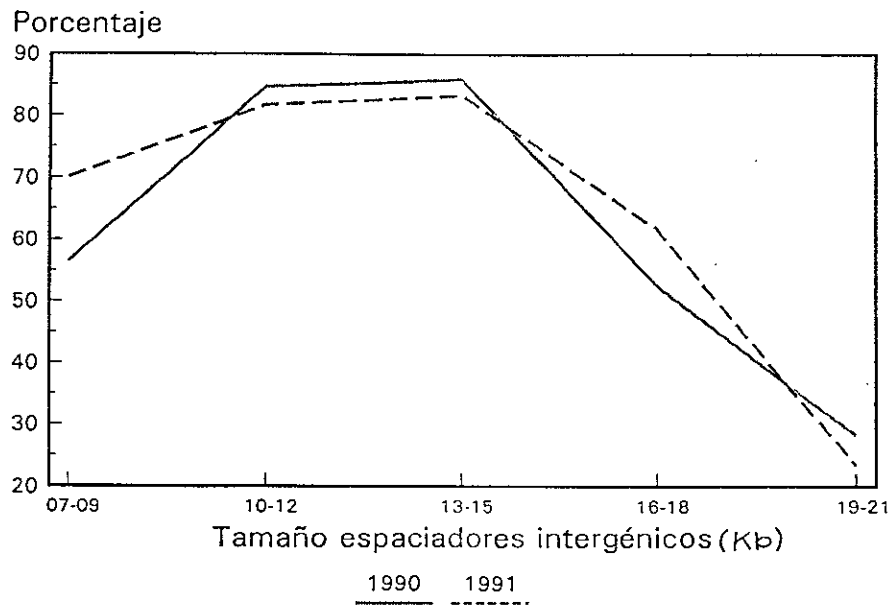
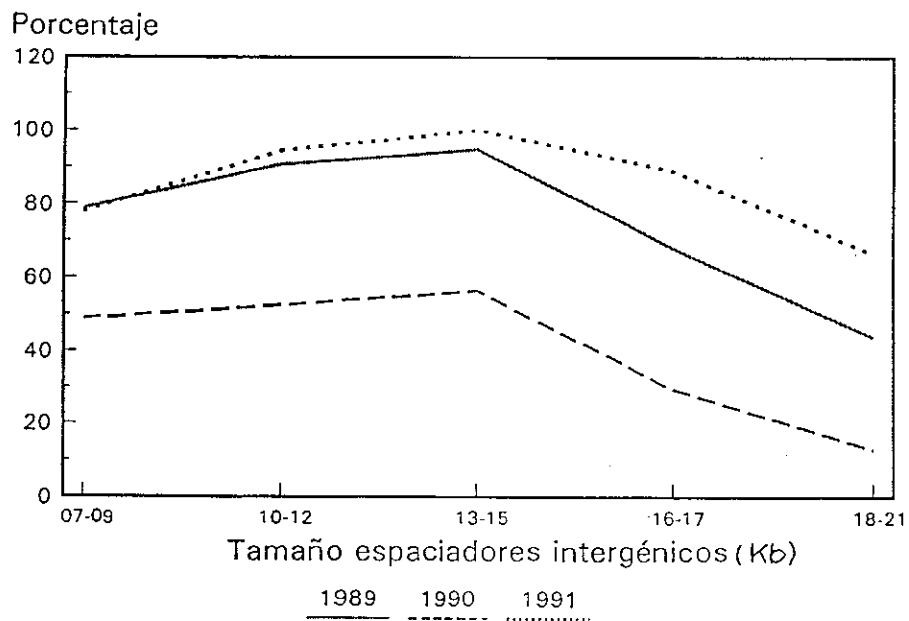


Figura 11.

Frecuencias (%) de IGS
de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*,
El Motor, 1989, 1990 y 1991.



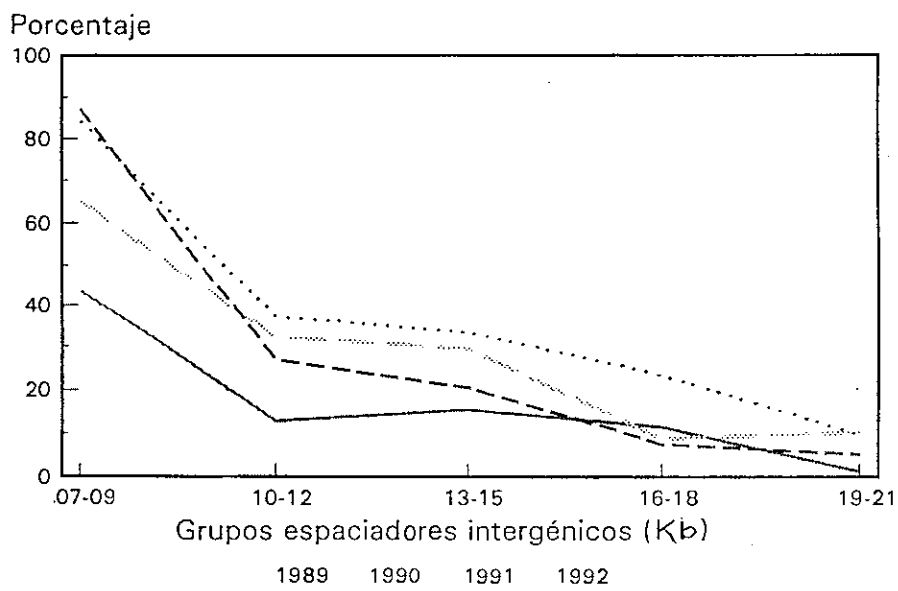
en la población de Empalizada (ver figura 10) de 1990 a 1991; sin embargo para las bandas entre 7-9 kb y 16-18 kb las frecuencias aumentaron levemente para la misma población.

La figura 11 pertenece a la población de El Motor, y muestra los porcentajes de frecuencias de IGS para los tres años analizados. Esta población pertenece a la región sur-oriente, y está situada al oriente del país (Ver figura 6). También muestra bandas predominantes entre las 10-12 kb y 13-15 kb, y además en el año 1991 entre las 16-17 kb.

En cada una de las figuras de la región norte y sur-

Figura 12.

Frecuencias (%) de IGS
de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*,
Región norte, desde 1989 hasta 1992.



oriente respectivamente, las frecuencias de las bandas han cambiado, pero el patrón de hibridización se ha conservado y es característico para cada una de las regiones.

Las figuras 12 y 13 se construyeron haciendo un promedio de los porcentajes de frecuencias de IGS de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* obtenidos para la región norte y sur-oriente de Guatemala respectivamente, a través de los años analizados. Esto se hizo para poder visualizar el patrón de hibridización de los fragmentos de IGS obtenidos para la región norte, y se han conservado a través de los años, pues los ploteos mantienen la misma forma. Lo mismo para la región sur-oriente.

Por último, se construyó una gráfica que muestra (ver figura 14), los porcentajes de las frecuencias de bandas de IGS obtenidas para la región norte y la región sur-oriente de Guatemala promediando todos los datos obtenidos a través del tiempo. Esta figura es útil para notar las diferencias en el patrón de hibridización que tienen los IGS de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* para cada región de Guatemala. En los mosquitos de la región norte, predominan los IGS entre 7-9 kb, mientras en los de la región sur-oriente lo hacen los de 10-12 y 13-15 kb.

Figura 13.

Frecuencias (%) de IGS
de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*.
Región sur-oriente, desde 1989 hasta 1991.

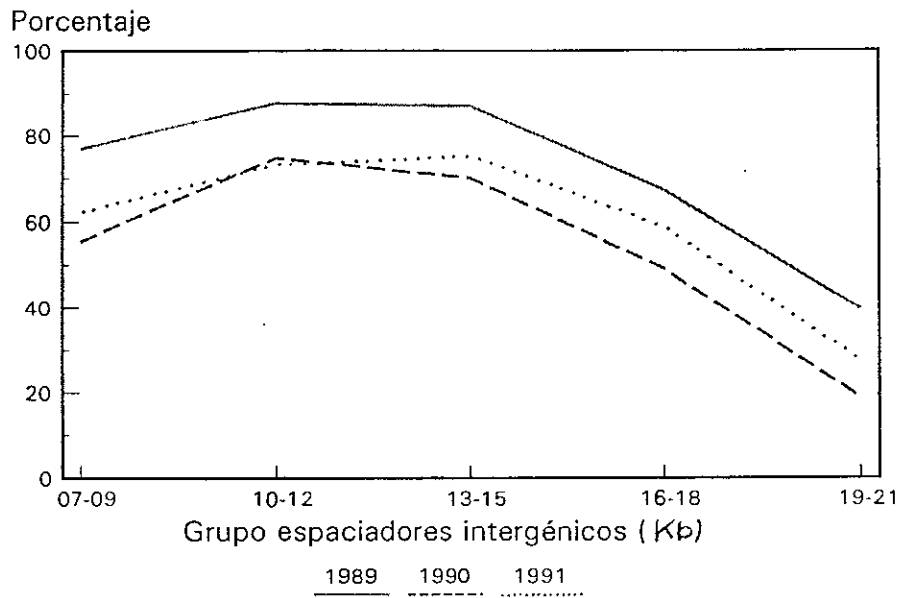
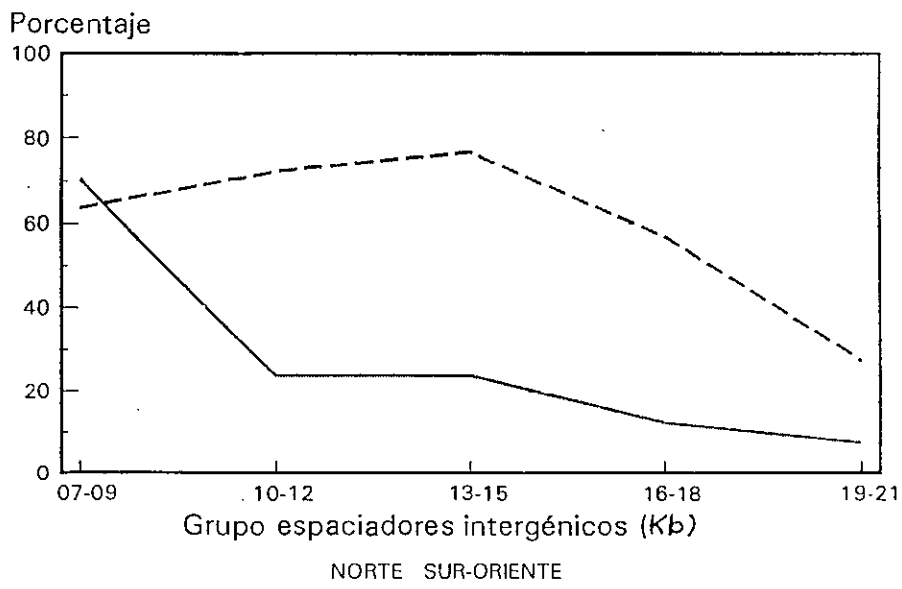


Figura 14.

Frecuencias (%) de IGS
de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*.
Región norte y sur-oriente, desde 1989 hasta 1992.



B. Análisis Estadístico. Análisis de Chi-cuadrado en tablas de contingencia jerárquicas (log-linear).

Como se mencionó previamente, los datos obtenidos se analizaron por medio de tablas de contingencia de Chi-cuadrado para las variables independientes: Región, población, período de colecta (años) y grupo de banda. La primera pregunta a contestar, era si habría variabilidad en las frecuencias de los IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* con el tiempo, en las dos regiones estudiadas, y para responder a ella, se corrió un análisis log-linear de tres vías: período de colecta por región, por grupo de banda (ver tabla 4).

Según dicho análisis, resultó altamente significativa la interacción de dos vías: Grupo de banda por región, teniendo un X^2 grande; esto confirma las diferencias, mencionadas en

Tabla 4.

Resultados del análisis log-linear (Chi-cuadrado) de las variaciones de frecuencia de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* de Guatemala, utilizando las variables: período de colecta por grupo de banda por región.

Efecto	DF	X^2	P
período de colecta x grupo banda	8	4.781	0.7807
<u>grupo banda x región</u>	4	133.413	<0.001

la sección anterior, de los patrones de hibridización de los IGS de los mosquitos de la región norte y sur-oriente. Es importante notar que en este análisis, la interacción de dos vías: período de colecta por grupo de banda, que revelaría algún cambio en las frecuencias de IGS a través del tiempo, no fue estadísticamente significativa, pues su probabilidad de ocurrencia ($P=0.7807$) debida únicamente al muestreo al azar fue mayor que $P=0.05$, que es el criterio establecido por el HILOGLINEAR para que una interacción permanezca o sea rechazada del modelo (Norusis, 1990).

Otro análisis log-lineal similar al anterior, sólo que a nivel de población, se corrió (ver tabla 5), para investigar acerca de posibles cambios significativos en las frecuencias de IGS en los mosquitos de cada población analizada, a través del tiempo.

Tabla 5.

Resultados del análisis log-lineal (Chi-cuadrado) de las variaciones de frecuencia de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus* de Guatemala, utilizando las variables: período de colecta por grupo de banda por población.

Efecto	DF	χ^2	P
período de colecta x grupo banda	8	5.138	0.7427
<u>grupo banda x población</u>	16	143.237	<0.001

Este análisis reveló, que sí hay diferencias entre los fragmentos de restricción de IGS de los mosquitos de cada población, pues la interacción de dos vías: Población por grupo de banda, tuvo una probabilidad muy baja ($P < 0.01$) de ocurrencia. Por otro lado, la interacción: período de colecta por grupo de banda, no resultó ser significativa ($P = 0.7427$), por lo que es muy probable que ocurra únicamente por el muestreo al azar.

VIII. DISCUSION

No se encontraron cambios estadísticamente significativos, según el análisis log-linear de las variantes de longitud de los IGS a nivel de región, respecto al año o período de colecta, pues tal como lo apoyan las figuras 12 y 13, el patrón de hibridización se conservó. Probablemente el período de tiempo estudiado no fue suficiente para que aparecieran cambios significativos de frecuencias de bandas de IGS, y sería conveniente complementar la técnica utilizada en este estudio con un análisis de polimorfismos de secuencia o realizando secuenciación de ADN ribosomal en los fragmentos de restricción de interés, para lograr verdaderamente una visión más detallada de dichos cambios, si es que ocurren. Tampoco se encontró variabilidad significativa en las frecuencias de las variantes de longitud de los IGS, a nivel de población a través de los años, pues hay una alta probabilidad de que ocurran las frecuencias observadas al azar.

Los resultados sugieren mucha variación intraespecífica de los IGS de ADN ribosomal en *Anopheles albimanus*, de las regiones norte y sur-Oriente. Las poblaciones del norte de Guatemala, mostraron bandas predominantes en el rango de 7 a 9 kb, y las poblaciones del sur-oriente mostraron un arreglo

de banda muy diferente, pues los IGS se encontraron en un amplio rango de longitudes (kb); las bandas predominantes se encontraron entre las 10-12 kb y 13-15 kb. Como pudo observarse en la figura 14, las frecuencias de los IGS para cada región en todos los años analizados, muestran un ploteo característico para cada región, y de acuerdo a éste, podría ser fácil asignar los mosquitos a su región de origen.

Estas diferencias en las frecuencias de las variantes de longitud de los IGS de las poblaciones del norte y las del sur-oriente, podría estarlas diferenciando rápidamente, ya que los mecanismos de la evolución en concierto, conversión de genes y entrecruzamiento desigual, pueden estar actuando rápidamente para homogenizar los espaciadores.

El análisis log-linear, confirmó las diferencias significativas entre el set de espaciadores que poseen los mosquitos de una región y otra, y aún entre cada una de las poblaciones, ya que las interacciones de dos vías: Región por grupo de banda, y población por grupo de banda resultaron altamente significativas ($P < 0.01$). La marcada diferencia del patrón de hibridización de los IGS de los mosquitos de una región y otra, ya se explicó. Pero la alta significancia de la interacción: población por grupo de banda, podría explicarse al ver las gráficas, de la 7 a la 11. Cada una de ellas muestra oscilaciones en las frecuencias de los IGS de un año al otro. Por ejemplo, en

algunas poblaciones, todas las frecuencias disminuyeron en el segundo año de colecta (ver figura 9), pero en otras disminuyó la frecuencia de espaciadores encontrados entre 13 y 15 kb con respecto al primer año de colecta, y aumentó la frecuencia de IGS en el rango de 16 a 18 kb.

Parte de las limitaciones del presente estudio, las constituyeron las diferencias en el tamaño de las muestras de mosquitos analizadas (ver tabla 1), ya que las colectas sí cubren cada uno de los años en que se analizó cada región. Pero no hubo colecta para todos los años analizados de cada población, y debido a ello fue que se analizó el período de la colecta. Además, la forma de muestreo podría mejorar y proporcionar más datos, si las colectas de las poblaciones fueran más cercanas en cada región. La técnica utilizada tiene varios pasos delicados, que incluyen: El almacenaje y transporte de las muestras de mosquitos, y el logro de una buena hibridización con la sonda de ADN utilizada (PAa1 1.4 HX), pues de ella depende la clara aparición e intensidad de las bandas de IGS en los filtros y así lograr una buena interpretación de resultados. Esto lo reflejan las fotografías de los filtros ya transferidos (ver apéndice C), pues pudo notarse la clara presencia de bandas en algunos, y sin embargo en otros, fue muy difícil la interpretación.

Los resultados del presente trabajo, también sugieren

que a medida que pasa el tiempo, los patrones de hibridización de los IGS de los mosquitos se conservan para cada población y región estudiadas, y se hacen más característicos de ellas, por lo que hay evidencia de una estructura genética definida en las poblaciones, y un flujo de genes restringido, especialmente entre las regiones norte y sur-oriente de Guatemala. Los IGS van cambiando como sets y no independientemente.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se aplicaron técnicas de restricción e hibridización de ácidos nucleicos para estudiar la variabilidad temporal y geográfica de *Anopheles albimanus* en Guatemala, que permitieron profundizar más allá de lo que la morfología clásica habría logrado. De acuerdo al análisis de frecuencias de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*, se puede concluir que:

1. No hay asociación de frecuencias de IGS del ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*, entre las regiones norte y sur-oriente de Guatemala y el tiempo.
2. No hay asociación de frecuencias de IGS de ADN ribosomal de *Anopheles albimanus*, entre cinco poblaciones de Guatemala y el tiempo.
3. Sí hay asociación entre las frecuencias de IGS y las regiones analizadas, norte y sur-oriente.
4. Sí hay asociación entre las frecuencias de IGS y las cinco poblaciones de Guatemala analizadas.
5. Los patrones de fragmentos de restricción de IGS según tamaño de bandas (kb) son característicos para cada región de Guatemala, y se mantienen a través del tiempo.

X. RECOMENDACIONES

1. Hacer un muestreo en una mayor cantidad de poblaciones de cada región de Guatemala, así como obtener colectas cada año en forma consecutiva para cada población.
2. Hacer un estudio de variabilidad de secuencia del IGS, por ejemplo con marcadores genéticos como RAPD-PCR, para así poder diferenciar poblaciones divergentes. Además, podría analizarse la organización del IGS, y examinar si existen en su estructura duplicaciones de promotores.
3. Profundizar en el significado biológico de las diferencias detectadas en este estudio. En particular, si los patrones de bandas de *Anopheles albimanus* del norte y sur-oriente, están relacionados con una mayor capacidad como vectores de malaria, o alguna otra característica de importancia médica.
4. Investigar qué otros factores influyeron en los resultados de este estudio, por ejemplo: Diferencias de vegetación, distinto uso de plaguicidas en norte y sur.
5. Comparar los resultados obtenidos del análisis estadístico de Chi-cuadrado log-lineal, con el análisis de discriminantes, pues las hipótesis de los dos son diferentes, y este último es capaz de detectar diferencias más finas.

XI. LITERATURA CITADA

- Beckingham, K. "Insect rDNA". The Cell Nucleus. New York, Academic Press. 10 v. 65 pp.
1982
- Black, W.C.; D.K. McLain; y K.S. Rai. "Patterns of variation in the rDNA cistron within and among world populations of a mosquito *Aedes albopictus*". Genetics (Estados Unidos); 151:539-550.
1989
- Coen, E.S.; J.M. Thoday; y G. Dover. "Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*". Nature (Estados Unidos); 295(18):564-568.
1982
- Collins, F.H.; S.M. Paskewitz; y V. Finnerty. "Ribosomal RNA genes of the *Anopheles gambiae* species complex". Advances in Disease Vector Research. New York, Springer-Verlag. 6 v. 28 pp.
1989
- Cross, N.C.; y G.A. Dover. "A novel arrangement of sequence elements surrounding the rDNA promoter and its spacer duplications in Tsetse species". Journal of Molecular Biology (Estados Unidos); 195:63-74.
1987
- Dover, G. "Molecular Drive: a cohesive mode of species evolution". Nature(Estados Unidos); 299(9): 111-117.
1982
- Dover, G.; y E. Coen. "Springcleaning ribosomal DNA: A model for multigene evolution?". Nature (Estados Unidos); 290(30):731-732.
1981
- Flavell, R.B.; M. O'dell; P. Sharp; E. Nevo; y A. Belles. "Variation in the intergenic spacer of ribosomal DNA of wild wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel". Molecular Biology Evolution (Estados Unidos); 3(6): 547-558.
1986
- Frederickson, C. "Bionomics and Control of *Anopheles albimanus*". 144 p.
1992

- Futuyma, D.J. "Evolutionary Biology". 2a. ed. Sinauer
1986 Associates (Massachusetts): 600 p.
- Gerbi, S.A. "Evolution of ribosomal DNA". Molecular
1985 Evolutionary Genetics. New York, Plenum
Press. 610 pp.
- Lewin, B. "Genes". 3a. ed. John Wiley & Sons (New
1987 York):761 p.
- Li, W.; C. Luo; y C. Wu. "Evolution of DNA Sequences".
1985 Molecular Evolutionary Genetics. New York,
Plenum Press. 610 pp.
- Livak, K. "Organization and mapping of a sequence on
1984 *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes
that is transcribed during spermatogenesis".
Genetics (Estados Unidos); 107:611-634.
- McLain, D.K.; y F.H. Collins. "Structure of rDNA in the
1989 mosquito *Anopheles gambiae* and rDNA sequence
variation within and between species of the
A. gambiae complex". Heredity(Inglaterra);
62:233-242.
- McLain, D.K.; F.H. Collins; A.D. Brandling-Bennett; y
1989 J.B.O. Were. "Microgeographic variation in
rDNA intergenic spacers of *Anopheles gambiae*
in Western Kenya". Heredity(Inglaterra);
62:257-264.
- Mérida, A.M.; W.C. Black; C.H. Porter; E. Molina; M.
Mata; y R. Beach. "The use of rDNA spacer
length variants to differentiate eight
populations of *Anopheles albimanus* in
Guatemala". (en preparación):1-20.
- Norusis, M.J. SPSS/PC+ Statistics 4.0 for the IBM
1990 PC/XT/AT and PS/2. New York, SPSS.
- Stacham, T.; D. Webb; y G.A. Dover. "Transition stages
1985 of molecular drive in multicopy DNA families
in *Drosophila*". The EMBO Journal; 4(7):
1701-1708.

APENDICE A
PROCEDIMIENTOS

A. Extracción del ADN ribosomal de los mosquitos

Soluciones necesarias:

A. BUFFER DE EXTRACCION.

NaCl 5M	1.6 mL
Sacarosa	5.48 gr
EDTA 0.5M	170.0 L
Tris base 1M	2.4 mL
SDS 20%	2.5 mL
Tris HCl	1.21 gr

Disolver todas las sustancias en agua destilada y desionizada, y aforar a 100 mL. Esta solución es estable a 4°C.

B. ACETATO DE POTASIO, 8M.

Acetato de Potasio	39.25 gr
--------------------	----------

Disolver la sal en agua destilada y desionizada, y aforar a 50 mL.

C. ETANOL AL 70%.

Etanol absoluto	70.0 mL
-----------------	---------

Aforar a 100 mL con agua destilada y desionizada.

Procedimiento:

1. Deshacer el mosquito en 100 L de buffer de extracción en un microtubo de 1.5 mL con la ayuda de los

homogenizadores Kontes. El mosquito debe quedar completamente molido.

2. Incubar los mosquitos a 65°C, por 30 min. Para ello, cada tubo debe colocarse en un baño térmico de agua tan pronto como esté listo. Puesto que cada tubo no puede incubarse más del tiempo indicado, debe tomarse el tiempo al colocar el primero y el último, para así poder calcular el período de cada uno.
3. Al sacar los tubos del baño térmico se les añade 14 L de acetato de potasio, 8M, y se van colocando en un baño de hielo en donde se dejan incubando por 30 min.
4. Centrifugar en una microcentrífuga fría a 5°C , durante 10 min. a una velocidad de 10,000 rpm.
5. Transferir el sobrenadante a microtubos de 1.5 mL limpios, y agregar 200 L de etanol absoluto frío, mezclando bien (el ADN puede guardarse indefinidamente en este paso, así como es posible alicuotarlo).
6. Centrifugar en una microcentrífuga fría a 5°C durante 20 min. a 10,000 rpm. Descartar el sobrenadante (un pequeño sedimento puede observarse).
7. Lavar el sedimento con 100 L de etanol al 70% frío, y luego con 100 L de etanol al 100% frío.
8. Dejar secar el sedimento al aire.
9. Digerir el ADN entre cuatro y veinte horas con las enzimas de restricción, HindIII y XhoI. Añadir por lo

menos cinco unidades de cada enzima por ADN.

10. Congelar la mezcla a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ si la muestra no va a ser utilizada. Esta muestra ya está lista para ser separada en un gel por electroforesis.

B. Procedimiento para montar la electroforesis del ADN ribosomal.

Soluciones necesarias:

A. BUFFER TBE 10X:

Tris Base	108.0 gr
Acido Bórico	55.0 gr
Na EDTA.2H O	9.3 gr

Disolver las sales en agua destilada y desionizada, y ajustar el pH a 8.3. Aforar a 1 L. Esta solución es estable a temperatura ambiente.

Procedimiento:

1. Preparar 1250 mL de buffer TBE 1X.
2. Disolver 1.48 gr de agarosa en 160 mL de buffer TBE 1X, en un erlenmeyer de 500 mL.
3. Calentar la solución con agitación, hasta que se disuelva la agarosa (normalmente lleva de 10 a 15 min).
4. Dejar enfriar un poco la solución, y añadir 5 L de bromuro de etidio. Antes de que la solución se enfríe aproximadamente a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, verterla en la cámara de electroforesis, evitando la formación de burbujas con

- los moldes (peines) para dar forma a los pozos.
5. Dejar que el gel solidifique antes de retirar los peines de los pozos.
 6. Vertir el resto del buffer TBE 1X en los depositos grandes de manera que cubra el gel.
 7. A cada muestra que se va a vertir en el gel, se le deben añadir 2 μ L de colorante de montaje dejando la punta de la micropipeta en el microtubo pues servirá para montar la muestra en el pozo del gel.
 8. Llenar los pozos cuidadosamente con 30 μ L de la muestra preparada. Recordar que en el primer pozo y en el último se coloca el marcador de 1 kb y el pool de mosquitos respectivo, tratado de igual forma que las muestras.
 9. Conectar la fuente de poder.
 10. Dejar correr las muestras por 16 horas aproximadamente, o hasta que el colorante se encuentre a 1 cm del final del gel.

C. Transferencia del ADN ribosomal a filtros de nylon

Soluciones necesarias:

A. BUFFER DE DESNATURALIZACION, 2X.

Hidróxido de sodio	40.0 gr
Cloruro de sodio	175.3 gr

Disolver las sales en agua destilada y desionizada, y

- gel. Sobre el filtro se colocan 4 cuadros de papel filtro del tamaño del gel mojados con SSC 10X. Tratar de quitar todas las burbujas de aire. Colocar el gel sobre este soporte con los pozos hacia abajo.
6. Poner una pequeña cantidad de tinta china en los pozos picando con un palillo de dientes. Así se conoce la posición del inicio de la electroforesis en el filtro. Además, es necesario colocar en una esquina del filtro la identificación del contenido del gel, e indicar cual es el primer pozo. El tamaño del filtro es de 20x20 cm.
 7. Colocar el filtro en SSC 10X durante 15 minutos, y luego colocarlo sobre el gel con el lado cóncavo hacia abajo, el lado no marcado. Quitar todas las burbujas de aire, y cubrir con 4 cuadros de papel filtro remojados en SSC 10X y aproximadamente 3 pulgadas de toallas absorbentes.
 8. Cubrir con un vidrio de tamaño apropiado y colocar suficiente peso encima de todo, con el fin de facilitar el paso del ADN hacia el filtro por capilaridad.
 9. Dejar que la transferencia proceda por lo menos 18 horas (hasta 48 horas está bien).
 10. Una vez terminada la transferencia, desnaturalizar el filtro en 50 mL de NaOH 0.4 M, durante 30 segundos.
 11. Neutralizar el filtro en 50 mL de SSC 2X, o buffer de neutralización 1X, por 30 segundos.
 12. Dejar secar el filtro con el lado del ADN hacia arriba

(El filtro puede guardarse seco en este paso).

D. Marcaje del ADN y detección inmunológica con el kit no radioactivo GENIUS.

1. Marcaje de la sonda de ADN pAa1 1.4 HX.

Soluciones necesarias:

(El kit trae la mayoría de soluciones preparadas en viales debidamente identificados).

A. MEZCLA DE HEXANUCLEOTIDOS.

Mezcla de reacción de hexanu-

cleótidos 2.0 L

B. MEZCLA DE dNTP.

Mezcla de dNTP (dATP 1mmol/L,
dGTP 1 mmol/L, dTTP 0.65 mmol/L,

Dig-dUTP 0.35 mmol/L) 2.0 L

C. ENZIMA KLENOW.

D. ETANOL ABSOLUTO

E. SOLUCION 0.2 M y 1.0 M de EDTA.

F. SOLUCION 4 M de LiCl.

G. SOLUCION 10 mmol/L de Tris-HCl.

Procedimiento:

1. El ADN se desnaturaliza calentando a 95 °C durante 10 minutos, y enfriando rápidamente en hielo/cloruro de sodio.

2. En un microtubo de centrifuga agregar 10 μ L de agua estéril, 5 μ L de ADN desnaturalizado, 2 μ L de mezcla de hexanucleótidos, 2 μ L de mezcla de dNTP, y 1 μ L de enzima Klenow.
3. Incubar 1 hora a 37 °C. Una incubación más larga puede aumentar el ADN marcado.
4. Parar la reacción añadiendo 2 μ L de EDTA 0.2 M.
5. Precipitar el ADN marcado con 2 μ L de cloruro de litio, 4 M, y 60 μ L de etanol absoluto frío.
6. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos a 5 °C. Lavar el sedimento con etanol al 70%, secar al vacío y disolver en una mezcla de EDTA 1 mmol/L, y Tris-HCl 10 mmol/L con pH 8.0.

2. Hibridización.

Soluciones necesarias:

A. BUFFER SSC 20X:

Cloruro de sodio	175.3 gr
Acido cítrico (sal trisódica)	88.2 gr

Disolver las sales en agua destilada y desionizada,

ajustar el pH a 7.5, y aforar a 1 L.

B. SOLUCION DE HIBRIDIZACION.

SSC 20X	50.0 mL
Reactivo de bloqueo	1.0 gr

N-Laurilsarcosina	2.0 gr
SDS 20%	0.2 mL

Disolver los reactivos en agua destilada y desionizada, y aforar a 200 mL. Para un filtro de 20x20 cm se utilizan 200 mL de esta solución.

C. SOLUCION DE LAVADO 1.

SSC 20X	20.0 mL
SDS 20%	1.0 mL

Disolver los reactivos en agua destilada y desionizada, y aforar a 200 mL. Para un filtro de 20x20 cm se utilizan 200 mL de esta solución.

D. SOLUCION DE LAVADO 2.

SSC 20X	1.0 mL
SDS 20%	1.0 mL

Disolver los reactivos en agua destilada y desionizada, y aforar a 200 mL. Para un filtro de 20x20 cm se utilizan 200 mL de esta solución.

Procedimiento:

1. Fijar el ADN a los filtros de nylon, horneándolos a 80 °C por 2 horas.
2. Prehibridizar los filtros en una bolsa plástica sellada con 40 mL de la solución de hibridización a 68 °C por 1 hora con movimiento constante.
3. Desnaturalizar la sonda de ADN calentando a 95 °C por 10

minutos, enfriando inmediatamente en hielo.

4. Reemplazar la solución anterior con 10 mL de solución de hibridización conteniendo 20 L de ADN recién desnaturalizado.
5. Incubar los filtros con la solución anterior, por 6 horas a 60 °C, con movimiento constante.
6. Lavar los filtros 2 veces durante 5 minutos con 200 mL de la solución de lavado 1, y dos veces durante 15 minutos con la solución de lavado 2.

3. Detección inmunológica.

Soluciones necesarias:

A. BUFFER 1.

Tris-HCl	12.11 gr
Cloruro de sodio	8.77 gr

Disolver todas las sales en agua destilada y desionizada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1 L.

B. BUFFER 2.

Agente bloqueador	5.0 gr
-------------------	--------

Disolver en 1 L de buffer 1 a 50-70 °C durante 1 hora y la solución siempre permanece turbia. Almacenar a -20 °C, y antes de utilizar llevar a temperatura ambiente.

C. BUFFER 3.

Tris-HCl	12.11 gr
----------	----------

Cloruro de sodio	5.84 gr
Cloruro de magnesio	4.76 gr

Disolver todas las sales en agua destilada y desionizada, ajustar el pH a 9.5 y aforar a 1 L.

D. BUFFER 4.

Tris-HCl	1.21 gr
EDTA	0.37 gr

Disolver todas las sales en agua destilada y desionizada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 1 L.

E. SOLUCION DE COLOR.

Sal de nitroazul de tetrazolio, en dimetilformamida, 70% (v/v).	90.0 L
5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato sal de toluidinio, en dimetilfor- mamida, 50 mg/mL	70.0 L

Añadir las dos soluciones a 20 mL de buffer 3.

Procedimiento:

- A. Lavar los filtros en 100 mL de buffer 1 durante 1 minuto.
- B. Incubar durante 30 minutos en 200 mL de buffer 2.
- C. Lavar de nuevo durante 3 minutos con buffer 1.
- D. Diluir el anticuerpo-conjugado , 8 L en 40 mL para un filtro, e incubar por 30 minutos.
- E. Lavar 2 veces con buffer 1 durante 15 minutos
- F. Equilibrar la membrana con 40 mL de buffer 3 durante 2

minutos.

- G. Incubar el filtro con 20 mL de la solución de color en una caja plástica en la oscuridad. La reacción se completa después de 1 día. No se debe mover.
- H. Pare la reacción lavando el filtro en 100 mL de buffer 4 durante 5 minutos.
- I. Los filtros pueden guardarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en bolsas de plástico con un poco de buffer 4 para mantener el color.
- J. Fotografíar los filtros para posterior análisis.

APENDICE B

GLOSARIO

ADN ribosomal: Secuencias de ADN que codifican para la síntesis del ARN ribosomal.

ARN ribosomal: Secuencias de ARN responsables de la incorporación de las subunidades de los ribosomas.

Alozimas: Enzimas cuya actividad en el sitio catalítico puede ser modulada por la presencia de efectores, en un sitio alostérico.

Amplificación: Incremento en la transcripción de un gen, con el objeto de obtener varias copias del mismo.

Análisis discriminante: Técnica estadística utilizada para clasificar individuos en uno, dos, o más grupos alternativos (o poblaciones) en base a un conjunto de mediciones.

Anofelino: Término común para referirse al género *Anopheles*.

Cistrón: Unidad más pequeña de expresión genética, que codifica para la estructura de la subunidad de una molécula de proteína.

Endonucleasas de restricción: Enzimas que cortan al ADN en secuencias específicas dentro de la molécula.

Espaciador intergénico: Fragmento de ADN que interrumpe un conjunto de genes, y que consta de una serie de subrepeticiones.

Evolución horizontal, o en concierto: Proceso dinámico que se encarga de esparcir variantes genéticas en una población.

Familia de genes: Conjunto de secuencias de ADN similares, que codifican para una familia de proteínas relacionadas.

Fenotipo: Características físicas de un ser, originadas en base a su material genético.

Homología: Parecido en la estructura como resultado de un origen común.

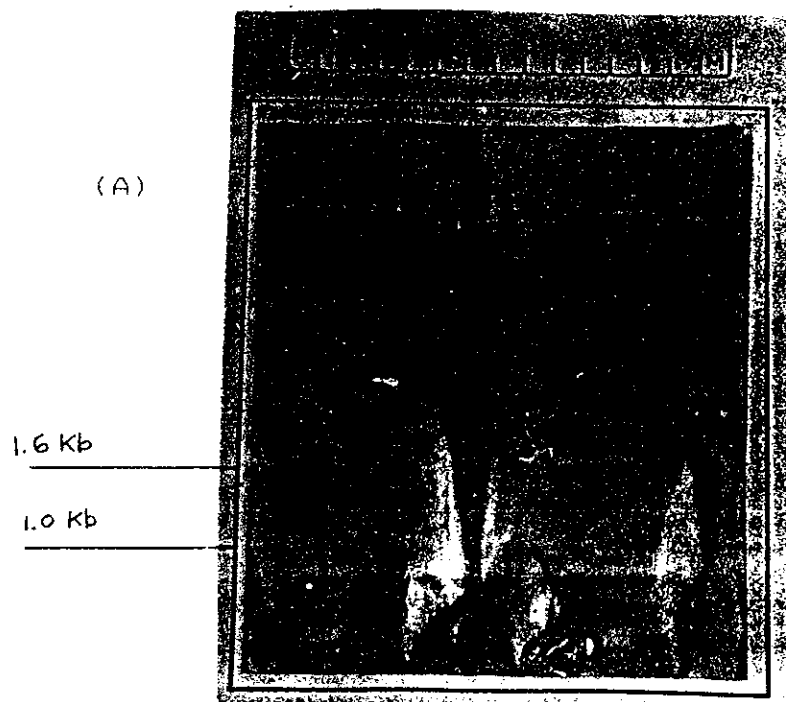
S, Svedberg: Unidad utilizada para expresar el coeficiente de sedimentación de una partícula.

APENDICE C

Fotografías de los filtros de hibridización,
y tablas de interpretación de bandas.

Figura 15.

Fotografía del filtro de Champona 1989 A (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



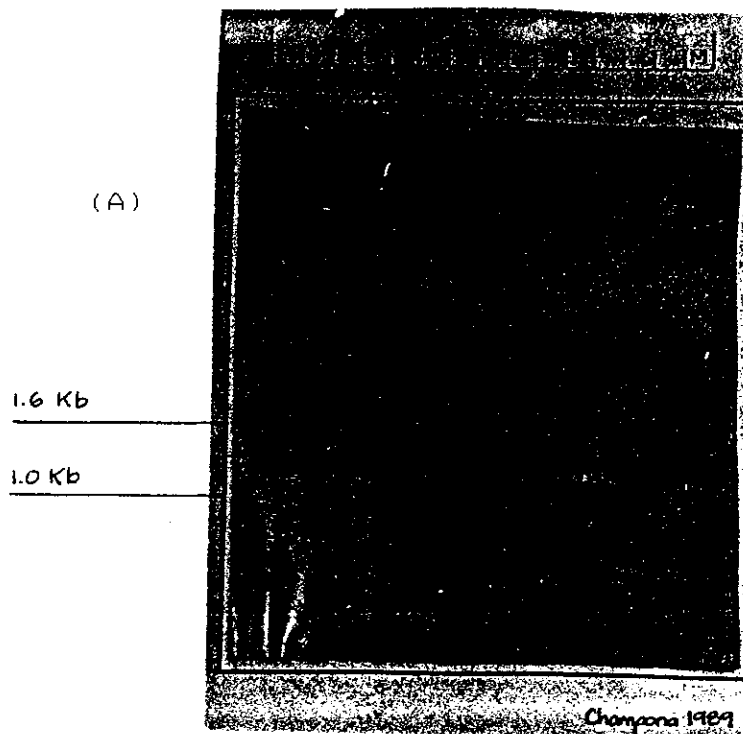
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
1.3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1.2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.9	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	
0.8	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	

Figura 16.

Fotografía del filtro de Champona 1989 B (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



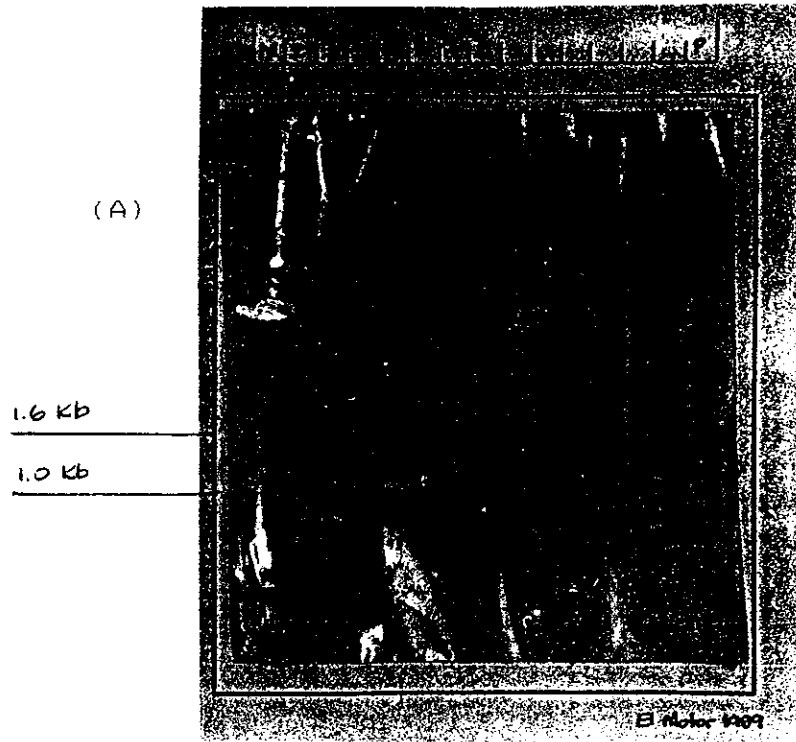
(B)

MOSQUITO No.

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
1.7	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	
1.6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	
1.5	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	
1.4	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
1.3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
1.2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
1.1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
1.0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.9	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	
0.8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
0.7	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	

Figura 17.

Fotografía del filtro de El Motor 1989 A (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



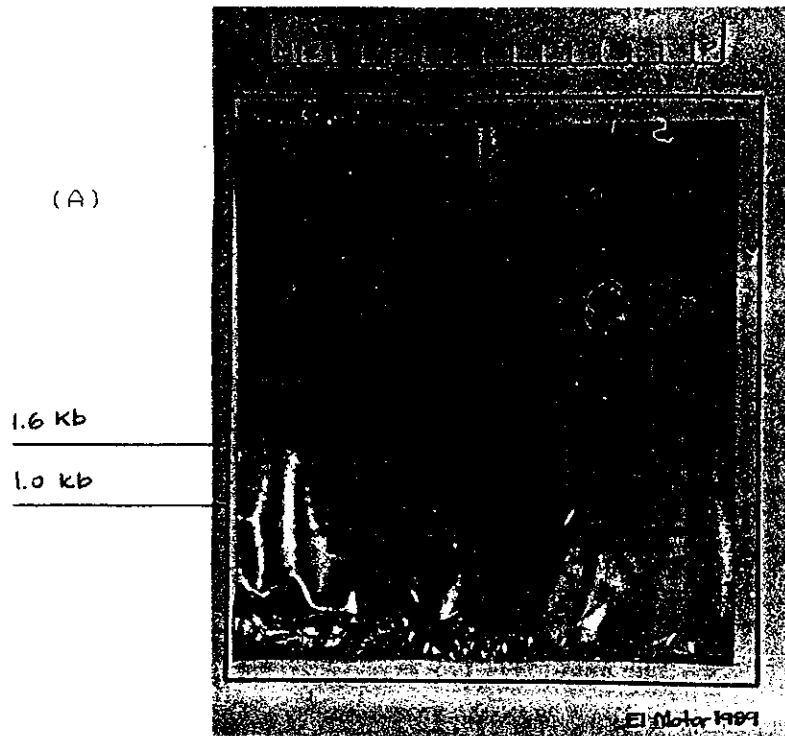
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
2.0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
1.9	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	
1.8	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	
1.7	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	
1.6	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	
1.5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
1.4	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	
1.3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
1.2	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	
1.1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
1.0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
0.9	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
0.8	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	
0.7	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	

Figura 1B.

Fotografía del filtro de El Motor 1989 B (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



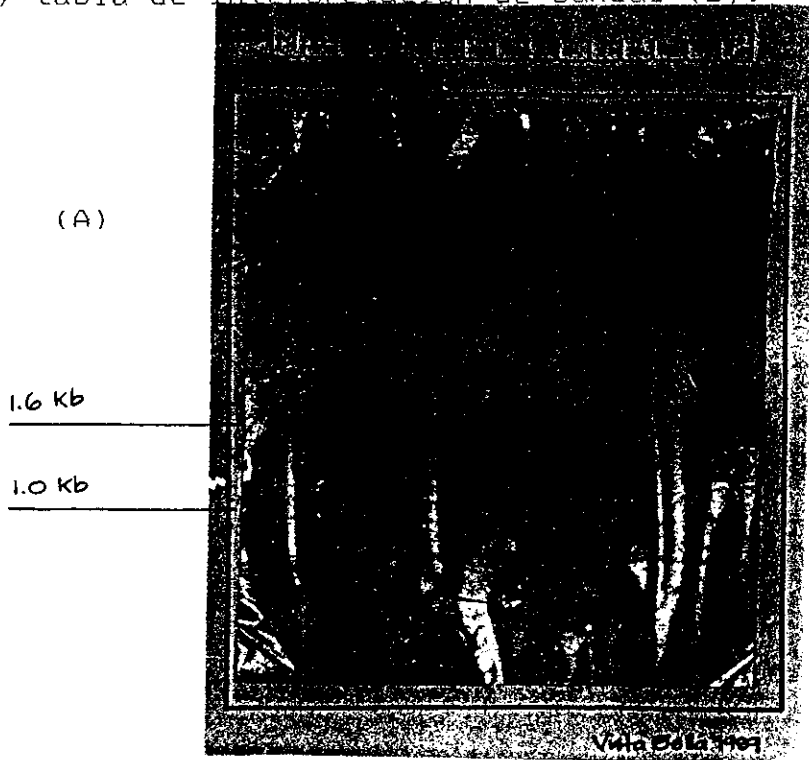
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	
2.0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	
1.9	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	
1.8	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	
1.7	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	
1.6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
1.5	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
1.4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
1.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1.2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1.1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
1.0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
0.9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0.8	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	
0.7	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	

Figura 19.

Fotografía del filtro de Vista Bella 1989 A (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



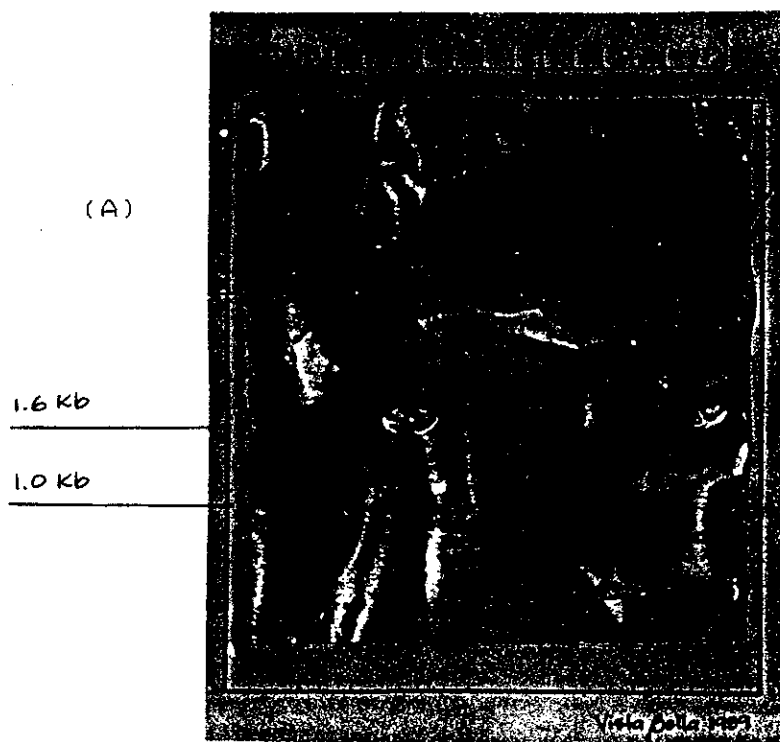
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	
2.0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	
1.9	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	
1.8	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	
1.7	0	1	0	1	1	1	1	1	1		0	0	1	
1.6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
1.5	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
1.4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
1.2	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	
1.1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	
1.0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
0.9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
0.8	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
0.7	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	

Figura 20.

Fotografía del filtro de Vista Bella 1989 B (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



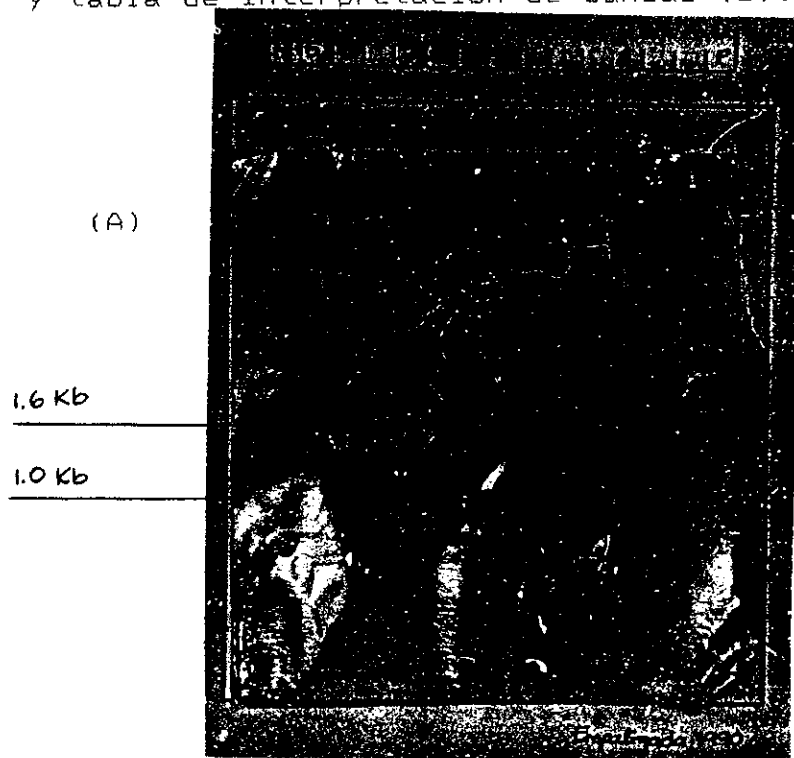
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1		o	o	o		o	o	o		o	o			
2.0	o		o	o		o				o	o		o	
1.9	o		o	o	o			o	o	o	o		o	
1.8						o					o	o	o	
1.7			o					o		o	o	o		
1.6			o	o								o		
1.5			o				o	o		o	o			
1.4		o								o				
1.3														
1.2				o										
1.1				o										
1.0				o										
0.9														
0.8	o													
0.7	o	o					o				o		o	

Figura 24.

Fotografía del filtro de Empalizada 1990 B (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



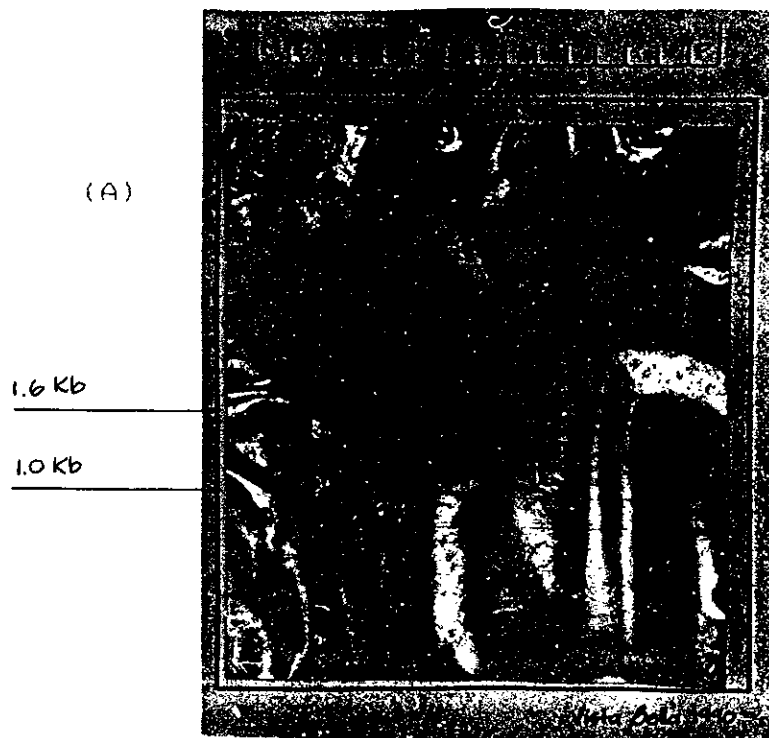
(B)

MOSQUITO No.

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
2.0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	
1.9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
1.8	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	
1.7	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	
1.6	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
1.5	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	
1.4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1.2	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	
1.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1.0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0.9	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
0.8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0.7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	

Figura 25.

Fotografía del filtro de Vista Bella 1990 A (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



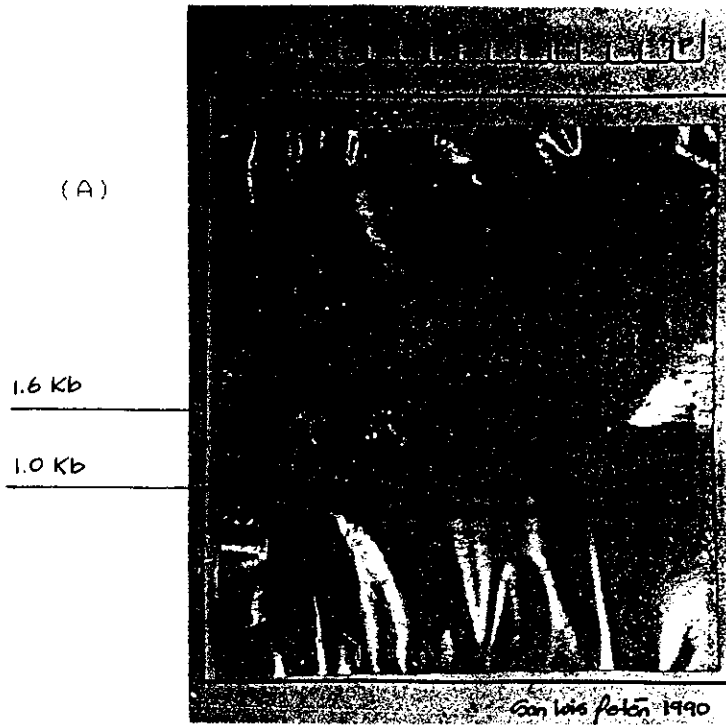
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
2.0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
1.9	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	
1.8	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	
1.7	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	
1.6	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
1.5	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	
1.4	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	
1.3	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	
1.2	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	
1.1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
1.0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	
0.9	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
0.8	1	1	0	2	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
0.7	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	

Figura 27.

Fotografía del filtro de San Luis Petén 1990 A (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



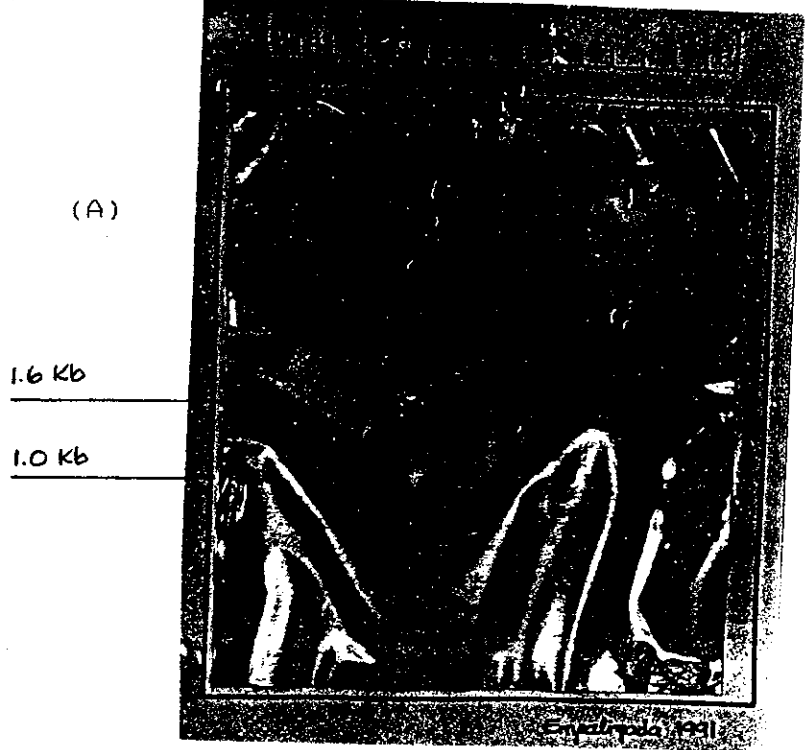
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
1.4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1.3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
1.2	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	
1.1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	
1.0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
0.9	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
0.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
0.7	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1		

Figura 29.

Fotografía del filtro de Empalizada 1991 A (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



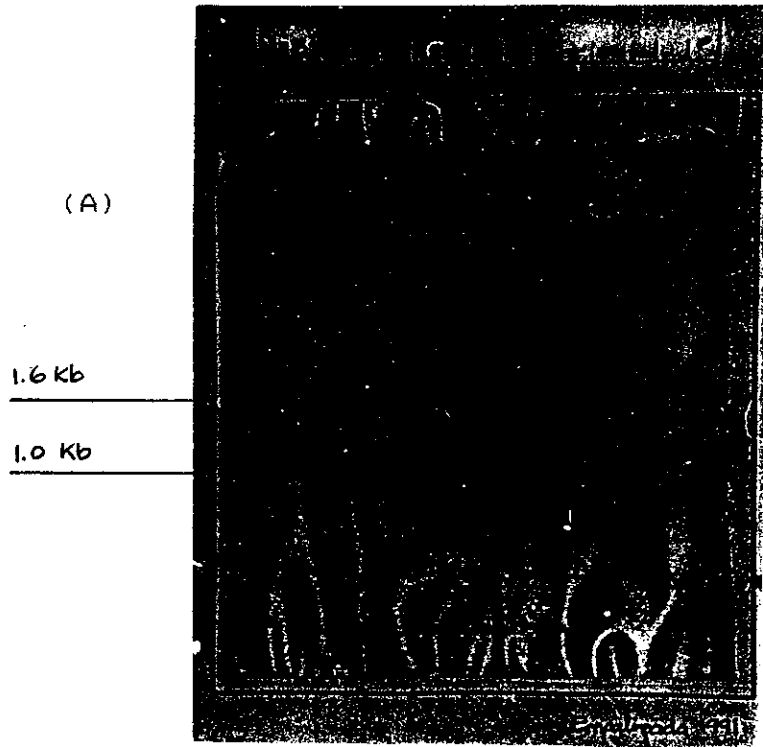
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
2.0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
1.9	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0		
1.8	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0		
1.7	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0		
1.6	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0		
1.5	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0		
1.4	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0		
1.3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0		
1.2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0		
1.1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0		
1.0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0		
0.9	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0		
0.8	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
0.7	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0		

Figura 30.

Fotografía del filtro de Empalizada 1991 B (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



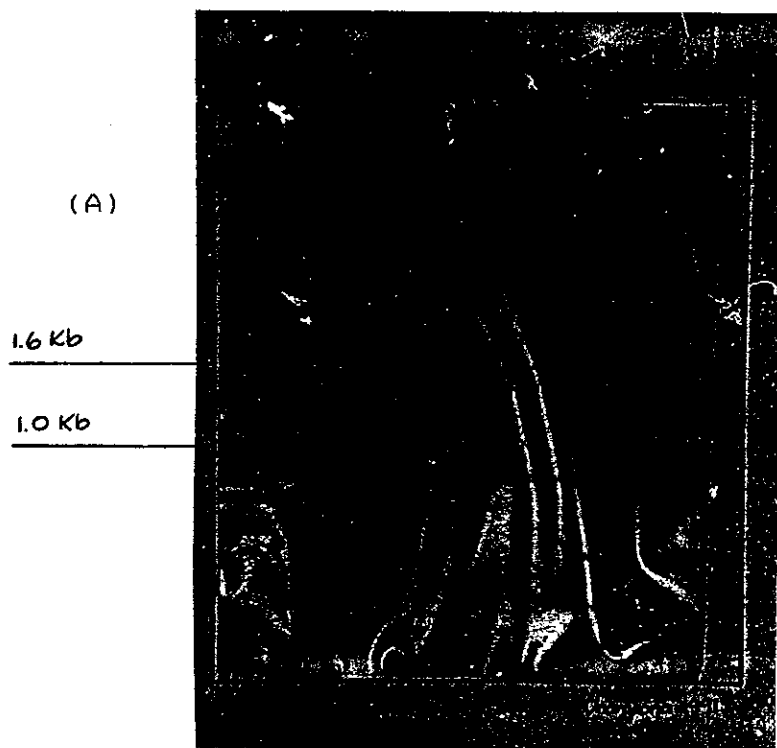
(B)

MOSQUITO No.

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
2.0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0		
1.9	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
1.8	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
1.7	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0		
1.6	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0		
1.5	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0		
1.4	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0		
1.3	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0		
1.2	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0		
1.1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0		
1.0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
0.9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
0.8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
0.7	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0		

Figura 31.

Fotografía del filtro de Champona 1991 A (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



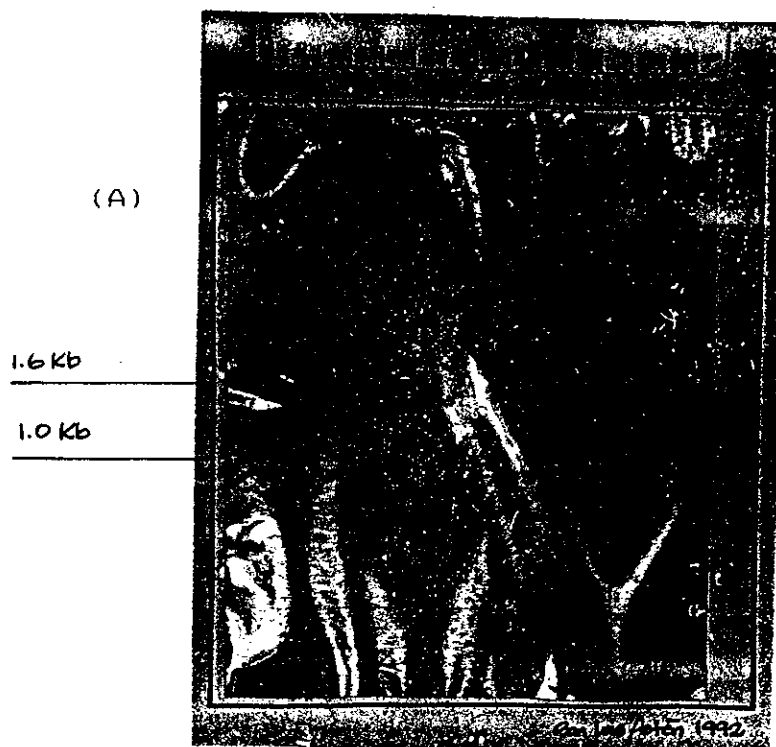
MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
2.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
1.9	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
1.8	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
1.7	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	
1.6	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	
1.5	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	
1.4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	
1.3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	
1.2	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	
1.1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	
1.0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	
0.9	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
0.8	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
0.7	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	

Figura 34.

Fotografía del filtro de San Luis Petén 1992 A (A)
y tabla de interpretación de bandas (B).



MOSQUITO No.

(B)

Kb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2.1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
2.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1.9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1.8	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1.7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1.6	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
1.5	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	
1.4	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
1.2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
1.1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
1.0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
0.9	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	
0.0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
0.7	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	

1. OBJETIVO DE LA ENCICLICA:

Es hacer conciencia que: Lo primordial de un matrimonio es transmitir vida a pesar de dificultades y sacrificios heróicos, aunque esto en todos los tiempos ha creado serios problemas de conciencia a los cónyuges.

2. PRETEXTOS O RAZONES QUE EL HOMBRE EXPONE:

- Rápido crecimiento demográfico
- Las reservas naturales disponibles no alcanzan
- Falta de fuentes de trabajo
- Aumento de las exigencias en el campo económico y educativo. Todos estos cambios hacen difícil el mantenimiento de un número elevado de hijos. Por eso es que el hombre ha ideado los métodos anticonceptivos (no naturales) para espaciar ó limitar el número de hijos).
- El puesto de la mujer en la sociedad se ha valorado, así como el amor conyugal en el espacio que se le debe dar al significado de los actos conyugales.
- Finalmente, el hombre ha llegado a progresar y dominar las fuerzas de la naturaleza, tendiendo al dominio de su mismo ser hasta regular la transmisión de vida. En base a ésto, el hombre se pregunta:
¿No es posible someter el control de la natalidad a la razón y voluntad del hombre moderno (debido a su creciente sentido de responsabilidad) más que a los ritmos biológicos de su organismo?

3. PRINCIPIOS DOCTRINALES:

La Iglesia consciente de su misión, da una doctrina coherente sobre la naturaleza del matrimonio, como sobre el recto uso de los derechos conyugales y sobre las obligaciones de los esposos.

La Iglesia reconoce que el problema de la natalidad no se puede enfocar solamente desde un punto de vista espiritual, sino que hay que considerarlo desde un punto de vista biológico, psicológico, demográfico