

# CONTENIDO

PREFACIO .....	iv
LISTA DE CUADROS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xvi

Capítulos	Página
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES .....	2
A. Paludismo .....	2
1. Descripción .....	2
2. Epidemiología .....	2
a. Epidemiología a nivel mundial .....	2
b. Epidemiología en Guatemala .....	3
3. Ciclo de transmisión de la enfermedad .....	4
a. Parásito .....	4
b. Vector .....	5
1) Vectores de malaria en Guatemala .....	9
2) Efectos del clima .....	10
3) Genética de insectos .....	10
c. Hospedero .....	11
4. Patología .....	12
5. Tratamiento .....	13
6. Medidas de control .....	14
a. Insecticidas .....	14
b. Larvicidas .....	15
c. Mosquiteros impregnados .....	15
d. Tecnología transgénica .....	15
B. Técnicas moleculares para el estudio de genética de poblaciones .....	16
1. Principios de genética .....	16
a. Estructura básica del ADN.....	16

b. Regiones codificadoras y no codificadoras .....	16
c. Herencia Mendeliana .....	17
d. Mutaciones .....	18
2. Métodos utilizados para el estudio de genética de poblaciones .....	18
a. Generalidades .....	18
b. Variación genética nuclear para medir la estructura poblacional.....	19
1) Aloenzimas .....	19
2) Amplificación de ADN y PCR .....	20
c. Variación genética mitocondrial para medir la estructura poblacional .....	21
3. Microsatélites .....	22
a. Descripción .....	22
b. Procesos de mutación .....	23
c. Importancia como marcadores moleculares .....	24
1) Limitaciones .....	24
4. Medida de frecuencia alélica y genotípica .....	26
C. Estudios de genética de poblaciones de <i>Anopheles sp.</i> ....	28
D. Análisis de fragmentos pequeños de ADN .....	30
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	32
A. Objetivo general .....	32
B. Objetivos específicos .....	32
C. Hipótesis .....	32
IV. MATERIALES Y METODOS .....	33
A. Selección de secuencias microsatélites.....	33
B. Selección y colecta de <i>Anopheles albimanus</i> .....	34
C. Extracción de ADN .....	37
1. Procedimiento para la extracción de ADN mediante una modificación del método de Collins <i>et al.</i> , 1987 y el Kit comercial IsoQuick® (Orca Research, WA) .....	37
2. Procedimiento para la extracción de ADN con fenol/cloroformo, mediante una modificación del método de Collins <i>et al.</i> , 1987 .....	38
D. Amplificación de ADN .....	38
1. Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de ADN .....	40
a. Detección del producto amplificado durante la optimización de la	

técnica de PCR.....	41
E. Análisis de fragmentos pequeños de ADN por electroforesis capilar .....	42
F. Determinación de herencia Mendeliana de los microsatélites .....	44
G. Identificación de alelos en cada locus .....	45
1. Presencia de un solo grupo de picos .....	46
2. Presencia de dos grupos de picos .....	49
H. Análisis genético de las secuencias microsatélites .....	51
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56
A. Selección de secuencias de microsatélites.....	56
B. Extracción de ADN .....	56
C. Amplificación de ADN .....	57
1. Optimización de la técnica de PCR para la amplificación de ADN .....	57
a. Detección del producto amplificado durante la optimización de la técnica de PCR .....	58
D. Análisis de fragmentos pequeños de ADN por electroforesis capilar .....	59
E. Determinación de herencia Mendeliana de los microsatélites .....	60
F. Identificación de alelos en cada locus .....	61
G. Análisis genético de las secuencias microsatélites .....	72
1. Diversidad genética en la población de Ixcán, Quiché .....	72
2. Diversidad genética entre los cuatro grupos definidos para el estudio en Ixcán.....	73
3. Diversidad genética dentro de cada grupo .....	84
a. Diversidad genética dentro del grupo 1 .....	85
b. Diversidad genética dentro del grupo 2 .....	89
c. Diversidad genética dentro del grupo 3 .....	92
d. Diversidad genética dentro del grupo 4 .....	96
VI. CONCLUSIONES .....	100
VII. RECOMENDACIONES .....	102
VIII. BIBLIOGRAFÍA .....	104

IX. APÉNDICES .....	108
A. Secuencias de los once microsatélites .....	109
1. Secuencia de NP94F .....	109
2. Secuencia de NP113F .....	110
3. Secuencia de NP76consA .....	110
4. Secuencia de NP128F .....	111
5. Secuencia de NP81R .....	112
6. Secuencia de NP38F .....	112
7. Secuencia de NP106F .....	113
8. Secuencia de Aa6-41 .....	114
9. Secuencia de Aa2-25 .....	114
10. Secuencia de Aa2-14 .....	115
11. Secuencia de Aa1-90 .....	115
B. Listado completo de la localidad, y fecha en que se colectó cada individuo del estudio .....	116
C. Recetas de buffers y soluciones .....	124
D. Estrategias para el análisis simultáneo de múltiples fragmentos utilizando un equipo de electroforesis capilar 3100 .....	126
1. Consideraciones para el diseño experimental .....	126
a. Rangos de tamaños de alelos que se traslapan .....	126
b. Múltiple reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	126
c. Optimización de la concentración de sales .....	127
d. Correr varias muestras en la misma línea .....	127
e. Cuantificar fragmentos .....	128
E. Métodos para marcar con fluorescencia .....	129
1. Marcaje en el extremo 5' .....	129
F. Arreglo de capilares de 36 cm .....	131
G. Marcador molecular GeneScan®-500 .....	132
H. Método <i>Local Southern</i> .....	134
I. Manual del programa <i>Allelogram</i> .....	135

J. Archivos de salida «allelogram.err», para cada marcador utilizado.....	142
K. Archivos de salida «binstats.out» con información sobre cada <i>bin</i> para cada marcador .....	149
L. Archivo «allele_gph.sh» de gráficas para cada marcador utilizado .....	156
M. Electroferogramas de muestras listadas en el archivo «allelogram.err».....	165

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Medicamentos antimaláricos clasificados por su acción en el ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	14
2	Secuencias microsátélites seleccionadas para describir su uso como marcadores polimórficos en poblaciones naturales de <i>Anopheles albimanus</i> del municipio de Ixcán, Quiché .....	34
3	Características y propiedades de los iniciadores utilizados para describir su uso como marcadores polimórficos en poblaciones naturales de <i>Anopheles albimanus</i> del municipio de Ixcán, Quiché.....	39
4	Mezcla de reacción para el PCR de cada pareja de iniciadores.....	40
5	Programa utilizado para la amplificación por PCR de cada pareja de iniciadores .....	41
6	Punto de corte utilizado para definir los grupos de alelos que pertenecen a cada microsátélite .....	51
7	Número de mosquitos capturados por grupo y por comunidad en el municipio de Ixcán, Quiché.....	53
8	Porcentaje de muestras de <i>Anopheles albimanus</i> con amplificación positiva por PCR, de acuerdo al método de extracción (1) Isoquick y (2) fenol/cloroformo, a partir de un total de 232 diferentes mosquitos, colectados en diferentes fechas y preservados a -80°C .....	57
9	Temperatura de hibridación estandarizadas para cada locus analizado.....	58

10	Determinación de la herencia Mendeliana de los microsatélites NP113F, NP38F y Aa2-25 a través de cruces con mosquitos del insectario de la Universidad del Valle .....	61
11	Porcentaje de muestras con amplificación positiva por PCR, de un total de 163 mosquitos.....	63
12	Alelos determinados para cada locus utilizando poblaciones naturales de mosquitos <i>Anopheles albimanus</i> del municipio de Ixcán .....	71
13	Diversidad genética para cada locus en la población de <i>Anopheles albimanus</i> del municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002) .....	72
14	Diversidad genética para cada locus calculada por grupo de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	74
15	Datos promedio para cada grupo de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002) .....	75
16	Análisis de Hardy-Weinberg para los grupos de <i>Anopheles albimanus</i> del municipio de Ixcán, estudiados con los microsatélites NP113F, NP38F y Aa2-25 (PopGene, 1999) .....	77
17	Identidad y distancia genética de Nei para los cuatro grupos de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999) .....	79
18	Índice de fijación total y flujo de genes para los 4 grupos de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999) .....	81
19	Diversidad genética para cada locus dentro del grupo 1 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	86

20	Datos promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 1 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	87
21	Análisis de Hardy-Weinberg con cada uno de los microsatélites dentro del grupo 1 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999).....	88
22	Indice de fijación total y flujo de genes para cada uno de los microsatélites dentro del grupo 1 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999).....	88
23	Diversidad genética para cada locus dentro del grupo 2 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	89
24	Datos promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 2 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	90
25	Análisis de Hardy-Weinberg con cada uno de los microsatélites dentro del grupo 2 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999).....	92
26	Indice de fijación total y flujo de genes para cada uno de los microsatélites dentro del grupo 2 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999) .....	92
27	Diversidad genética para cada locus dentro del grupo 3 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	93
28	Datos promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 3 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	94

29	Análisis de Hardy-Weinberg con cada uno de los microsatélites dentro del grupo 3 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999).....	95
30	Indice de fijación total y flujo de genes para cada uno de los microsatélites dentro del grupo 3 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999).....	96
31	Diversidad genética para cada locus dentro del grupo 4 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002) .....	97
32	Datos promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 4 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	97
33	Análisis de Hardy-Weinberg con cada uno de los microsatélites dentro del grupo 4 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999).....	98
34	Indice de fijación total y flujo de genes para cada uno de los microsatélites dentro del grupo 4 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999).....	99
35	Colorantes ABI Prism y los colores que muestran los sets de filtros virtuales.....	128
36	Tamaños moleculares, en nucleótidos, del fragmento desnaturalizado de GeneScan®-500.....	132
37	Método <i>Local Southern</i> .....	134

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución geográfica de la malaria en el mundo a nivel mundial.....	2
2	Distribución geográfica del paludismo en Guatemala .....	3
3	Ciclo de vida del parásito del paludismo .....	4
4	Anofelino tomando sangre .....	6
5	Huevos de <i>Anopheles stephensi</i> .....	6
6	Estadíos larvarios de <i>Anopheles</i> .....	8
7	Pupa de zancudo <i>Anopheles</i> .....	8
8	Electroferograma obtenido al amplificar una muestra de DNA de <i>Anopheles albimanus</i> , utilizando el microsatélite NP76consA.....	30
9	Localización del área de estudio .....	35
10	Sitios de colecta de <i>Anopheles albimanus</i> en las comunidades de Ixcán, Quiché.....	36
11	Electroferograma de microsatélite NP128F .....	46
12	Electroferograma de microsatélite NP38F .....	47
13	Electroferograma de microsatélite NP76consA .....	48
14	Electroferograma de microsatélite NP38F .....	48

15	Electroferograma de microsatélite NP113F.....	49
16	Electroferograma de microsatélite Aa2-25.....	50
17	Gel de poliacrilamida de los productos de PCR, para cada pareja de iniciadores.....	59
18	Frecuencia de alelos nulos para cada locus .....	63
19	Frecuencia alélica para locus NP76consA (Allelogram, 2003) .....	65
20	Frecuencia alélica para locus NP38F (Allelogram, 2003) .....	66
21	Frecuencia alélica para locus Aa2-25 (Allelogram, 2003) .....	66
22	Frecuencia alélica para locus NP94F (Allelogram, 2003) .....	68
23	Frecuencia alélica para locus NP113F (Allelogram, 2003) .....	68
24	Frecuencia alélica para locus NP128F (Allelogram, 2003) .....	69
25	Frecuencia alélica para locus NP81R (Allelogram, 2003) .....	70
26	Patrón alélico promedio para cada grupo de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán, utilizando los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 (GenAIEx, 2002).....	76
27	Dendrograma basado en la distancia genética de Nei para los grupos de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (PopGene, 1999).....	80
28	Frecuencia alélica en cada grupo de <i>Anopheles albimanus</i> , en el municipio de Ixcán, utilizando el locus NP113F.....	82

29	Frecuencia alélica en cada grupo de <i>Anopheles albimanus</i> , en el municipio de Ixcán, utilizando el locus NP38F.....	29
30	Frecuencia alélica en cada grupo de <i>Anopheles albimanus</i> , en el municipio de Ixcán, utilizando el locus Aa2-25.....	84
31	Patrón alélico promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 1 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	87
32	Patrón alélico promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 2 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	91
33	Patrón alélico promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 3 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	94
34	Patrón alélico promedio de los loci NP113F, NP38F y Aa2-25 dentro del grupo 3 de <i>Anopheles albimanus</i> en el municipio de Ixcán (GenAlEx, 2002).....	98
35	Efecto de la distancia, entre pozos, en la resolución de fragmentos.....	131
36	Electroferograma de GeneScan®-500 bajo condiciones desnaturalizantes.....	133
37	Electroferograma de microsatélite NP94F .....	165
38	Electroferograma de microsatélite NP128F .....	166
39	Electroferograma de microsatélite NP128F .....	167

40	Electroferograma de microsatélite NP81R .....	167
41	Electroferograma de microsatélite NP81R .....	168
42	Electroferograma de microsatélite NP81R.....	169