

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Genética de poblaciones del mosquito vector de malaria
Anopheles albimanus basada en secuencias de ADN microsatélite,
en el Caribe y Latinoamérica

Trabajo de graduación presentado por
Fernando Rodríguez Castañeda para optar
al grado académico de Licenciado en Bioquímica

Guatemala

2002

Genética de poblaciones del mosquito vector de malaria
Anopheles albimanus basada en secuencias de ADN microsatélite,
en el Caribe y Latinoamérica

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Genética de poblaciones del mosquito vector de malaria
Anopheles albimanus basada en secuencias de ADN microsatélite,
en el Caribe y Latinoamérica

Trabajo de investigación presentado por
Fernando Rodríguez Castañeda para optar
al grado académico de Licenciado en Bioquímica

Guatemala

2002

VoBo.

AMC.

f) _____
Dr. Álvaro Molina-Cruz
Asesor Principal

Tribunal Examinador

f) AMM
Licda. Ana María de Mérida
Asesora

f) Hector Aguilar
Dr. Hector Aguilar
Tribunal Examinador

f) AMC.
Dr. Álvaro Molina-Cruz
Asesor

Fecha de aprobación: Guatemala, 4 de abril del 2,002

PREFACIO

Este trabajo concluye un proyecto de investigación del principal vector de malaria en Centro América, el mosquito *Anopheles albimanus*. Fue financiado por el Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud.

En el proyecto se estudió la genética de poblaciones de *Anopheles albimanus*, basada en secuencias de ADN microsatélite, en el Caribe y Latinoamérica. El uso de los microsatélites, que son un tipo de marcadores genéticos de ADN genómico, se hizo para obtener información independiente de la genética de poblaciones de *Anopheles albimanus* con respecto a estudios anteriores, realizados por el mismo grupo de investigación, en los que se usaron marcadores genéticos de ADN mitocondrial y de ADN ribosomal.

Estos estudios de genética de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* se iniciaron con poblaciones de Guatemala y, por medio de colaboradores en otros países de Latinoamérica y el Caribe, se pudo ampliar la colección de mosquitos. Esto permitió extender el estudio y obtener una visión macroscópica de la estructura genética del mosquito en esta región.

Estos proyectos de investigación se concluyeron con éxito debido al esfuerzo de un grupo de investigadores principales, la Licda. Ana María de Mérida y el Dr. Alvaro Molina; investigadores asociados, la Licda. Margarita Palmieri; tesisistas, Licda. Carolina Schoua, Licda. Katherine Mills, Licda. María Marta Yurrita, el autor de este trabajo, entre otros y el apoyo técnico de la Licda. Eduviges Molina.

CONTENIDO

LISTADO DE CUADROS	ix
LISTADO DE FIGURAS	xii
LISTADO DE GRAFICAS	xiii
RESUMEN	xv
Capítulos	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
A. Malaria	2
1. Generalidades	2
2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	2
3. Sintomatología	4
4. Patogénesis	4
5. Epidemiología	5
6. El vector: El mosquito <i>Anopheles</i>	6
B. Genética molecular	8
1. Organización del genoma	8
2. Métodos en genética molecular de vectores	9
a. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	9
b. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)	9
c. Polimorfismo conformacional de hebra simple (SSCP)	10
d. Secuencias únicas: Minisatélites y microsatélites	11
e. Secuenciación de ADN	13
C. Genética de Poblaciones	13
1. Frecuencia de genes en las poblaciones	13
2. Equilibrio en una población	14
3. Suposiciones en el estudio de genética de poblaciones	14
a. Reproducción al azar	14
b. Tamaño de la población	15
c. Migración	15
d. Mutación	15
e. Selección	16
4. Estadísticos F de Wright	16

5. Flujo genético	17
6. Determinación de las relaciones genéticas entre poblaciones	17
7. Distribución de genotipos en poblaciones reales	18
D. Estudios de genética de poblaciones del mosquito <i>Anopheles albimanus</i> en Latinoamérica	18
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	
A. Objetivos	20
1. Objetivos generales	20
2. Objetivos específicos	20
B. Hipótesis	20
IV. MATERIALES Y METODOS	21
A. Equipo, Materiales y Reactivos	21
1. Equipo	21
2. Materiales	21
3. Reactivos	21
B. Metodología	22
1. Extracción de ADN	23
2. Reconstitución de ADN	23
3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
4. Electroforesis en gel de agarosa	24
5. Electroforesis vertical de poliacrilamida	24
a. Preparación del gel y del sistema	24
b. Preparación de la precorrida	25
c. Montaje y corrida del gel	25
6. Tinción con nitrato de plata	25
7. Purificación de los productos de PCR a secuenciar	25
8. Reacción de secuenciación	26
9. Modificaciones en la electroforesis vertical de poliacrilamida para su uso en secuenciación de ADN	26
V. RESULTADOS	28
A. Estandarización de la metodología	28
B. Frecuencias alélicas de los individuos estudiados	29
C. Análisis estadístico	57
D. Análisis de secuencias de ADN	72
VI. CONCLUSIONES	76

VII. RECOMENDACIONES	78
VIII. BIBLIOGRAFÍA	79
IX. APÉNDICE	82
X. GLOSARIO	108

LISTADO DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Comparación clínica de los tipos de malaria	4
2	Especies de <i>Anopheles</i> asociadas con la transmisión de malaria	8
3	Información general sobre las poblaciones trabajadas	34
4	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90	36
5	Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90	36
6	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14	41
7	Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14	42
8	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-25	46
9	Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-25	47
10	Alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41	52
11	Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41	53
12	Análisis de Hardy-Weinberg para las poblaciones estudiadas con cada uno de los microsatélites	58
13	Equilibrio de ligamiento de los locus por parejas para los países estudiados	59
14	Distribución de los grupos analizados por AMOVA	59
15	AMOVA de los distintos grupos en Latinoamérica y el Caribe	59
16	Estadísticos F de Wright	60

17	Matriz para los valores Fst por parejas de todas las poblaciones estudiadas	61
18	Matriz para los valores Fst por parejas de todas las poblaciones estudiadas (continuación)	62
19	Valores de P para los Fst obtenidos	63
20	Valores de P para los Fst obtenidos (continuación)	64
21	Matriz de significancia de los valores de P de Fst	65
22	Matriz de significancia de los valores de P de Fst (continuación)	66
23	Matriz de valores de migrantes (Nm)	67
24	Matriz de valores de migrantes Nm (continuación)	68
25	Matriz de valores de Fst linearizados (Fst/1-Fst)	69
26	Matriz de valores de Fst linearizados (Fst/1-Fst) (continuación)	70
27	Análisis de Mantel, correlación entre distancia geográfica (en km) y la distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas	71
28	Secuenciación del microsatélite 1-90	73
29	Secuenciación del microsatélite 2-14	74
30	Secuenciación del microsatélite 2-25	74
31	Secuenciación del microsatélite 6-41	74
32	Composición alélica para la población Panamá 1A	82
33	Composición alélica para la población Panamá 1B	85
34	Composición alélica de la población de El Carmen de Bolívar	88
35	Composición alélica para la población de Puerta Negra	91

36	Composición alélica para la población de Magdalena	93
37	Composición alélica para la población de Cuba	95
38	Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 1-90	105
39	Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 2-14	105
40	Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 2-25	106
41	Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 6-41	107

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	3
2	Distribución geográfica de la malaria	5
3	Ciclo de vida de un mosquito (<i>Diptera: Culicidae</i>)	7
4	Pasos en la detección de polimorfismos conformacionales de hebra simple	12
5	Relación entre la velocidad de migración efectiva (Nm) y la diferencia genética (F_{ST}) entre subpoblaciones	19
6	Sitios de colecta de <i>Anopheles albimanus</i> en Latinoamérica y el Caribe	27
7	Electroforesis de poliacrilamida para el microsatélite 1-90	30
8	Electroforesis de poliacrilamida para los microsatélites 2-14 y 2-25	31
9	Electroforesis de poliacrilamida para el microsatélite 6-41	32
10	Electroforesis de secuenciación para los microsatélites 1-90 y 2-14	33
11	Dendrograma de $F_{st}/(1-F_{st})$ de las poblaciones de Latinoamérica y el Caribe	71

LISTADO DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Histograma de la frecuencia de alelos obtenidos para el microsatélite 1-90	37
2	Comparación de las frecuencias alélicas de Panamá, microsatélite 1-90	38
3	Comparación de las frecuencias alélicas de Venezuela, microsatélite 1-90	38
4	Frecuencias del alelo 1-90 en Cuba	39
5	Frecuencias del alelo 1-90 en Colombia	39
6	Comparación de las frecuencias alélicas de Cuba, México y Centro América, microsatélite 1-90	40
7	Comparación de las frecuencias alélicas entre Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela, microsatélite 1-90	40
8	Histograma de la frecuencia de alelos obtenidos para el microsatélite 2-14	43
9	Comparación de las frecuencias alélicas de Panamá, microsatélite 2-14	42
10	Comparación de las frecuencias alélicas de Venezuela, microsatélite 2-14	44
11	Frecuencias alélicas del microsatélite 2-14 en Cuba	44
12	Frecuencias alélicas del microsatélite 2-14 en Colombia	45
13	Comparación de las frecuencias alélicas de Cuba, México y Centro América, microsatélite 2-14	45
14	Comparación de las frecuencias alélicas de Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela, microsatélite 2-14	46
15	Histograma de la frecuencia de los alelos obtenidos para el microsatélite 2-25	48

16	Comparación de frecuencias alélicas en Panamá, microsatélite 2-25	49
17	Comparación de frecuencias alélicas de Venezuela, microsatélite 2-25	50
18	Frecuencias alélicas del microsatélite 2-25 en Cuba	50
19	Frecuencias alélicas del microsatélite 2-25 en Colombia	51
20	Comparación de frecuencias alélicas de Cuba, México y Centro América, microsatélite 2-25	51
21	Comparación de frecuencias alélicas entre Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela, microsatélite 2-25	52
22	Histograma de la frecuencia de los alelos obtenidos para el microsatélite 6-41	54
23	Comparación de las frecuencias alélicas de Panamá, microsatélite 6-41	53
24	Comparación de frecuencias alélicas de Venezuela, microsatélite 6-41	55
25	Frecuencias alélicas del microsatélite 6-41 en Cuba	55
26	Frecuencias alélicas del microsatélite 6-41 en Colombia	56
27	Comparación de las frecuencias alélicas de Cuba, México y Centro América, microsatélite 6-41	56
28	Comparación de frecuencias alélicas entre Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela, microsatélite 6-41	57
29	Análisis de Mantel, correlación entre distancia geográfica (km) y distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas	72
30	Análisis de Mantel, correlación entre Ln de la distancia geográfica (en km) y la distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas	73

RESUMEN

En este trabajo se estudió la variación genética de los distintos individuos de diferentes poblaciones del mosquito vector de malaria, *Anopheles albimanus*, en el Caribe y América Latina, por medio del estudio de cuatro loci microsatélites (1-90, 2-14, 2-25 y 6-41). El ADN genómico de cada mosquito se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cada una de las secuencias microsatélites. Los distintos alelos en cada población se diferenciaron por medio de electroforesis de poliacrilamida con una resolución de hasta 1 par de bases. En esta forma se asignó el genotipo a cada individuo.

Al comparar las frecuencias alélicas de cada población en las distintas regiones geográficas estudiadas, se observó variación en las poblaciones de Cuba, Panamá, Colombia y Venezuela, con respecto a las poblaciones de México y Centro América estudiadas por Mills (2001).

Entre los análisis estadísticos realizados están el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada población y cada microsatélite. Se encontró que la mayoría de las poblaciones presentaban equilibrio por lo menos con tres loci. En Cuba hubo desequilibrio para los microsatélites 1-90, 2-14 y 2-25, debido a un error de muestreo y en Venezuela hubo desequilibrio para el microsatélite 6-41, que presentó un alto porcentaje de homocigosidad. El análisis de ligamiento mostró que las poblaciones de Cuba están en equilibrio de ligamiento. Las poblaciones de Venezuela presentaron desequilibrio de ligamiento en todas las parejas de loci excepto la del 1-90 con 2-14. El análisis de varianza molecular (AMOVA) se realizó dividiendo las poblaciones en los siguientes cinco grupos: México, Nicaragua, Cuba, Costa Rica y Panamá, Colombia y Venezuela. El porcentaje de variación entre grupos fue de 8.55 %, lo que indica que existe una diferencia genética significativa entre los grupos.

Se secuenciaron dos alelos de cada microsatélite para verificar si la variación en su tamaño se debe a variación en el número de las repeticiones en la secuencia microsatélite. Se encontró que para todos los microsatélites la principal variación es en el número de repeticiones.

Los resultados de este estudio son similares a los resultados obtenidos por Mérida y colaboradores (1999) al estudiar la variación en el ADN mitocondrial para las mismas poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus*. En ambos estudios se encontró diferencia genética significativa entre las poblaciones de Panamá, Colombia y Venezuela y las poblaciones de México y Centro América.

I. INTRODUCCIÓN

En 1999, 36.5 % de las personas en la región de América vivían en áreas donde las condiciones ecológicas son adecuadas para la transmisión de la malaria. En ese mismo año, en los 21 países miembros de la Organización Panamericana de la Salud que presentan transmisión activa de malaria, se detectaron 43,823 casos de esta enfermedad (PAHO, 2001).

Un factor importante entre las estrategias de control de transmisión de malaria, un factor importante es el control del vector, el mosquito del género *Anopheles*. Esto se ha logrado por medio de la reducción de los sitios de anidamiento, medidas de protección para familias y comunidades, control biológico de los vectores y uso de insecticidas en situaciones epidémicas. El uso de técnicas de estratificación, basadas en parámetros epidemiológicos y entomológicos permite la selección de la combinación de los métodos apropiados de control en cada foco de transmisión (PAHO, 2001).

El mosquito *Anopheles albimanus* es uno de los principales vectores de malaria en Centro América, el Caribe, y regiones costeras del norte de Sudamérica. En esta investigación se estudia la variación genética de este vector, por medio de cuatro secuencias de ADN microsatélite, en diferentes poblaciones del mosquito a lo largo de su distribución geográfica en América. Es necesario el estudio de la variación genética de *Anopheles albimanus* debido a su amplia distribución geográfica, a la gran variedad de hábitats en que se desarrolla, y porque en otros grupos del género *Anopheles* se han determinado especies crípticas o isomórficas, las cuales presentan diferencias en capacidad vectorial de la enfermedad.

Los resultados de este estudio se van a comparar con los de otros estudios anteriores en los que se ha determinado la variación genética de *Anopheles albimanus* con otros marcadores genéticos como secuencias de ADN mitocondrial y de ADN ribosomal. Las conclusiones que se obtengan de este estudio comparativo van a ser de gran importancia para definir la estructura genética de este importante vector de malaria en Latinoamérica.

Estudios posteriores, que correlacionen la información genética con la capacidad vectorial de *Anopheles albimanus* en las distintas poblaciones de Latinoamérica y el Caribe, formarían las bases para desarrollar estrategias de control del vector en la región. Entre las estrategias del Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud para el control de la malaria está el desarrollo de un mosquito transgénico, que no transmita la enfermedad. La información genética de poblaciones es necesaria para poder integrar los mosquitos transgénicos a las poblaciones naturales

II. ANTECEDENTES

A. Malaria

1. Generalidades

La malaria es una infección transmitida por mosquitos, causada por el protozoo del género *Plasmodium*. El hombre es infectado comúnmente por cuatro especies del parásito: *Plasmodium falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, y *P.malariae* (Katz *et al.*, 1982). La malaria es una enfermedad que se encuentra restringida a los trópicos y subtropicos (UNICEF, 2000).

La malaria es una de las enfermedades de mayor prevalencia en el mundo. Cada año se estiman entre 300 y 500 millones de casos clínicos y mata a más de un millón de personas anualmente, la mayoría de los cuales son niños. La malaria puede atacar repetidamente, por lo que las pérdidas económicas son grandes. En América Latina, Brasil es el más afectado con más del 50% de todos los casos de malaria en América (UNICEF, 2000).

2. Ciclo de vida de *Plasmodium*

La biología de las cuatro especies de *Plasmodium* que afectan al hombre es similar y consiste en dos etapas discretas, la sexual y la asexual. La fase asexual se desarrolla en el humano, primero en el hígado y luego en los eritrocitos circulantes. La fase sexual se desarrolla en el mosquito (ver Figura 1) (Katz *et al.*, 1982).

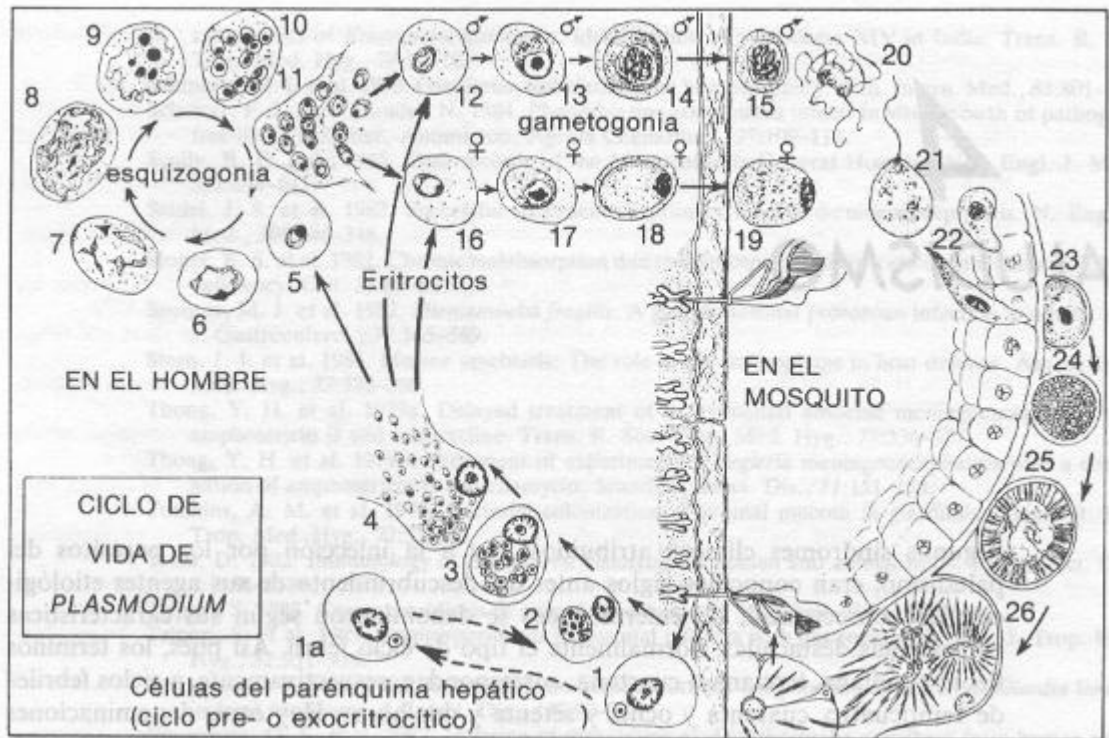
Cuando el mosquito anófeles hembra infectado pica y succiona sangre, inyecta fluidos salivares en la herida. Estos fluidos contienen esporozoitos, que son formas móviles del parásito, que inician la infección. Son removidos de la circulación como en una hora y entran a las células parenquimales del hígado. Dentro de las células hepáticas, el parásito sufre división asexual. La longitud de esta etapa exoeritrocitaria y el número de progenie (merozoitos) producidos de cada célula infectada es una característica de las especies individuales de *Plasmodium* (Katz *et al.*, 1982).

Plasmodium falciparum y *P.malariae* pasan por una sola generación asexual antes de la invasión del sistema circulatorio, y es probable que el ciclo hepático ya no continúe. En las infecciones con *P.vivax* se considera que el desarrollo exoeritrocitario puede continuar por años, esto explica el curso extenso y las numerosas recaídas que caracterizan la infección con esta especie. Lo mismo puede ser cierto para *P.ovale*, pero en este caso hay una alta tasa de cura espontánea (Markell y Voge, 1981).

Cuando los merozoitos son liberados del hígado, invaden los glóbulos rojos e inician la fase eritrocitaria de la infección (Katz *et al.*, 1982). Este proceso, conocido como esquizogonia, resulta en la formación de entre 4 y 36 nuevos parásitos en cada célula infectada. Al final del ciclo esquizogónico, los glóbulos rojos infectados se rompen y liberan los merozoitos que infectan a nuevas células (Markell y Voge, 1981).

No todos los merozoitos se desarrollan asexualmente. Algunos se diferencian en formas sexuales, los macrogametocitos (femeninos) y los microgametocitos (masculinos) que pueden completar su desarrollo sólo en el tracto digestivo de un mosquito vector apropiado. En el tracto digestivo del mosquito, los gametocitos pierden su membrana eritrocitaria protectora. Los gametocitos masculinos inician la exflagelación que produce hasta ocho microgametos flagelados, que eventualmente fertilizan a los macrogametos. Los cigotos resultantes se transforman en oocinetos diploides vermiformes que penetran el tracto digestivo y forman oocistos. Luego se desarrollan los esporozoitos que son haploides. Estos maduran en un período de 10-14 días, escapan del ooquiste e invaden las glándulas salivares. Cuando el mosquito pica otra vez a un huésped humano, el ciclo comienza de nuevo (Katz *et al.*, 1982).

Figura 1
Ciclo de vida de *Plasmodium*
(Markell *et al.*, 1990)



1-4, ciclo asexual preeritrocítico en el hígado; 1a, hipnozoito; 5-11, ciclo asexual eritrocítico; 12-15, desarrollo de los microgametocitos; 16-19, desarrollo del macrogametocito; 20, exflagelación para producir los microgametos; 21, fertilización del macrogameto; 22, el oocineto atraviesa la pared estomacal del mosquito; 23-25, formación de esporozoitos dentro del ooquiste; 26, liberación de los esporozoitos, la mayoría entran en las glándulas salivares del mosquito.

3. Sintomatología. Los últimos días de la incubación están marcados por síntomas de naturaleza no específica: fiebre, dolor de cabeza, fotofobia, dolores musculares, anorexia, náusea y a veces vómitos. Estos síntomas se observan en todos los tipos de malaria. Existen diferencias en la sintomatología, de acuerdo a la especie de *Plasmodium* que infecte al humano, como se observa en el Cuadro 1 (Markell y Voge, 1981).

Cuadro 1
Comparación clínica de los tipos de malaria

	Vivax	Ovale	Malariae	Falciparum
Período de incubación	10 a 17 Días	10 a 17 Días	18-40 días	8-11 días
Severidad de síntomas iniciales				
Patrón inicial de fiebre	++ Irregular- cotidiana	+ Irregular- cotidiana	++ Regular-72 horas	+ Continua, remitente, cotidiana
Periodicidad	48 horas	48 horas	72 horas	38-48 horas
Paroxismo inicial	Moderado- severo	Leve	Moderado- severo	Severo
Severidad usual				
Duración promedio	10 horas	10 horas	11 horas	16-36 horas
Duración del primer ataque sin tratamiento	3-8 semanas	2-3 semanas	3-24 semanas	2-3 semanas
Duración de la infección sin tratamiento	5-7 años	12 meses	20 + años	6-17 meses
Anemia	++	+	++	++++
Afección del sistema nervioso central	+	±	+	++++
Síndrome nefrótico	±	-	+++	+

(Markell y Voge, 1981).

4. Patogénesis. Los efectos patológicos primarios de cualquier infección de malaria son el resultado de la hemólisis de glóbulos rojos infectados y no infectados, la liberación de los metabolitos del parásito, la respuesta inmunológica del huésped hacia este material antigénico y la formación del pigmento malarial (Markell y Voge, 1981). En la malaria causada por *P. falciparum*, la anemia causada por hemólisis puede ser severa. El daño de los eritrocitos por hemólisis intravascular generalmente es mayor que el daño causado por la ruptura sólo de las células infectadas. También se presenta una depresión de médula ósea que contribuye con la anemia (Katz *et al.*, 1982).

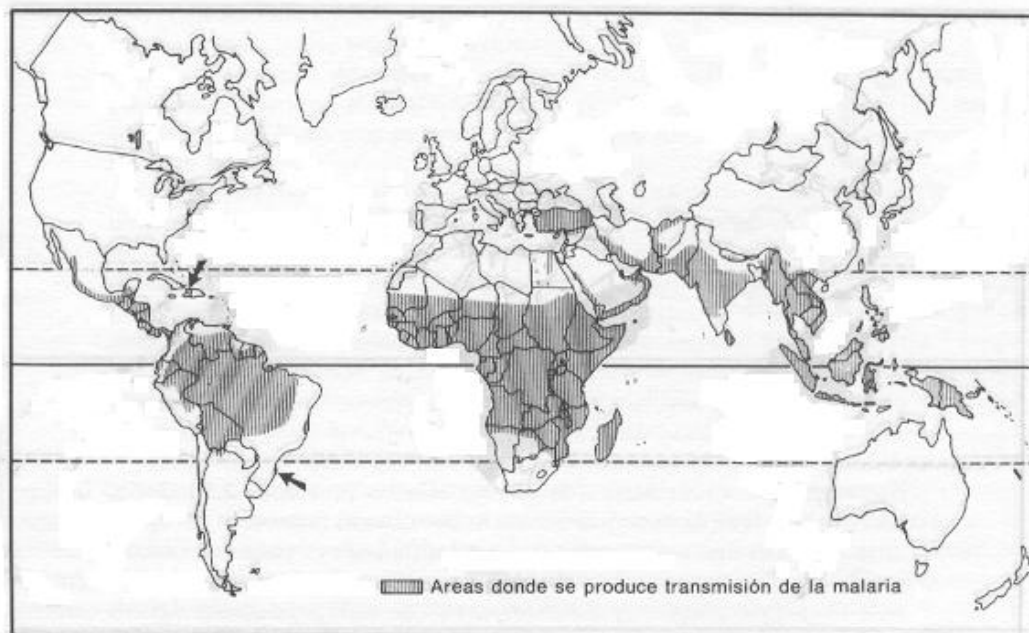
La malaria cerebral es consecuencia de una infección severa con *P. falciparum*. Es causada por el bloqueo de los capilares cerebrales con eritrocitos infectados, que se adhieren al endotelio (Katz *et al.*, 1982).

El bazo juega un papel importante en la defensa del huésped contra la malaria, las células parasitadas se acumulan en los capilares y sinusoides de éste y causan congestión general. El pigmento malarial se acumula en el bazo y es responsable del oscurecimiento de este órgano. La infección crónica, particularmente con *P. malariae*, generalmente causa esplenomegalia. En la malaria causada por *P. vivax*, el bazo puede agrandarse en forma aguda y es susceptible a ruptura (Katz *et al.*, 1982).

El tracto gastrointestinal también es afectado. Puede haber hemorragias focales, edema, y mala absorción. Los riñones muestran hemorragias y también pueden presentar necrosis tubular, particularmente en malaria severa causada por *P. falciparum* (Katz *et al.*, 1982).

5. Epidemiología. La transmisión de todos los tipos de malaria depende de la presencia de especies de mosquito *Anopheles* adecuadas y de humanos infectados (Markell y Voge, 1981). La malaria ocurre en muchos lugares del mundo tropical y en algunos lugares de los subtrópicos, ver Figura 2. La malaria es muy común en Africa subsahariana. La especie predominante es *P.falciparum*. En Asia y Oceanía, la malaria se encuentra ampliamente distribuida. Las especies predominantes son *P.falciparum*, *P.vivax* y *P.malariae*. En Sudamérica, la mayoría de casos de malaria se deben a *Plasmodium vivax*, pero también se reportan casos causados por *P.falciparum*. En el sur de México y Centroamérica, la especie dominante es *P.vivax* (MFI, 2001).

Figura 2
Distribución geográfica de la malaria
(Markell *et al.*, 1990)



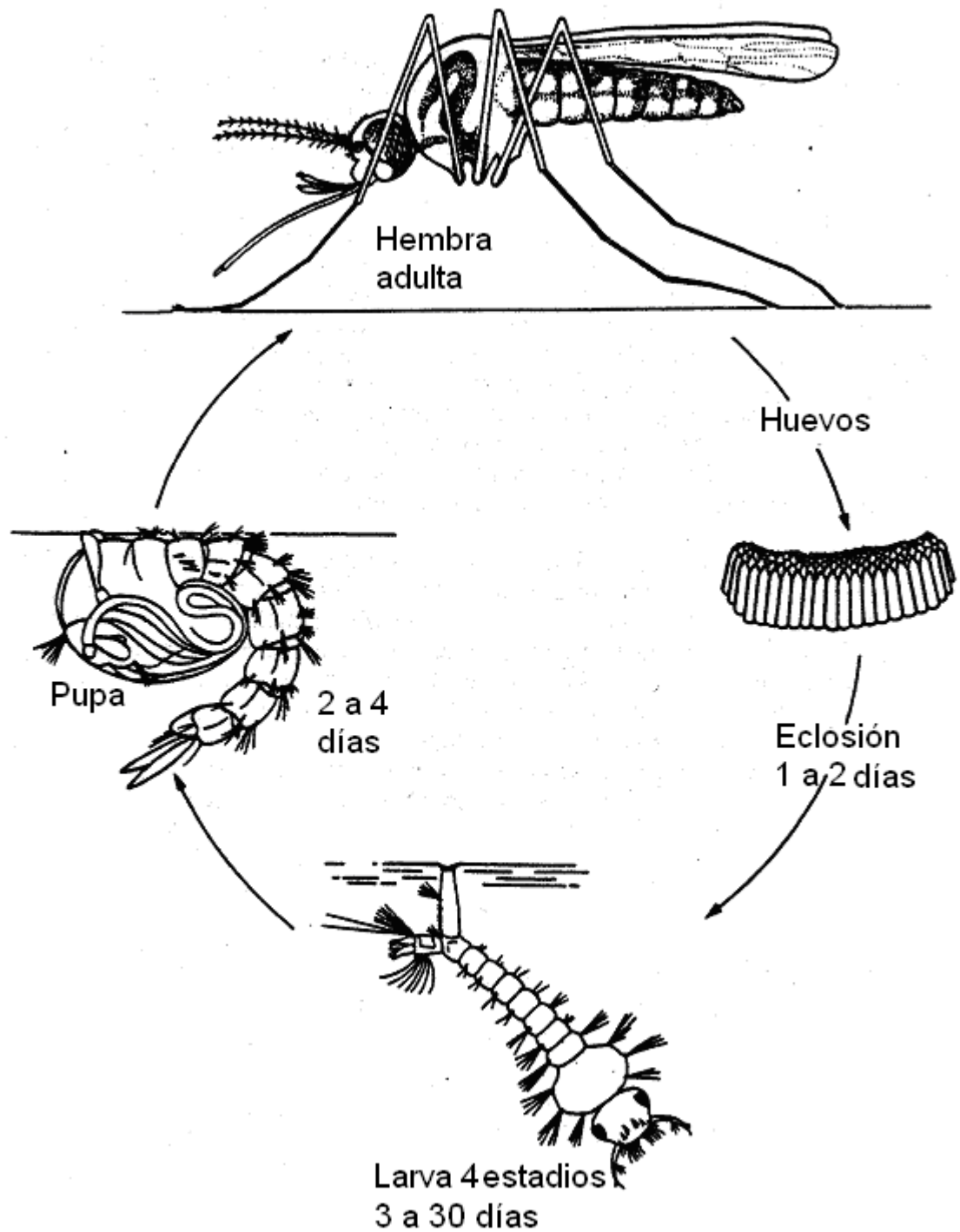
En la infección de *P. vivax*, los gametocitos se desarrollan rápidamente, en cambio los gametocitos de *P.falciparum* aparecen en el torrente sanguíneo aproximadamente a los seis días del inicio de la parasitemia. Estos gametocitos no infectan al mosquito por otros cuatro días. Por lo tanto, el paciente con malaria causada por *P. falciparum* es infeccioso después, comparado con la malaria causada por *P. vivax*. Por esto, es menos probable que el paciente con *P. falciparum* ya haya infectado mosquitos en el momento que se descubre y se trata la infección. Además de la transmisión de malaria por mosquitos, también se han reportado casos de transmisión por transfusión de sangre y por usuarios de drogas intravenosas. La transmisión congénita es rara (Markell y Voge, 1981).

6. El vector: El mosquito *Anopheles*. La capacidad del mosquito como vector de la malaria no sólo depende de la adaptación fisiológica a la infección, sino también de factores como preferencias en alimentación, horas de alimentación y vuelo, hábitos de descanso y reproducción (Markell y Voge, 1981). A pesar de que han sido descritas casi 500 especies de *Anopheles*, en seis diferentes subgéneros, probablemente no son más de veinte especies las que son vectores importantes de malaria (ver Cuadro 2). Los más importantes de estos vectores son el subgénero *Cellia*, que está restringido a los trópicos del Viejo Mundo. Las dos determinantes más importantes para un buen vector de malaria son su propensión a alimentarse de humanos y su longevidad media. Sin embargo, muchos mosquitos anofelinos son vectores ineficientes de malaria por ser fisiológicamente incapaces de proveer al parásito las condiciones necesarias para su desarrollo eficiente (Gwadz y Collins, 1996).

Los mosquitos tienen un ciclo de vida con cuatro fases: huevos, larva, pupa y adulto (ver Figura 3). La larva es acuática y tiene cabeza, tórax, y abdomen bien definidos. El mosquito adulto mide de 3 a 6 mm de largo. Las partes bucales son una proboscis larga adaptada para succionar sangre y jugos de plantas. El tórax es más amplio que la cabeza, las antenas son largas y plumosas en los machos y las hembras tienen pelos cortos en las antenas (Marquardt, 1993).

Entre los caracteres de comportamiento observados en *Anopheles*, están la capacidad aumentada o reducida de vector de malaria para humanos, que está determinada por la forma principal de alimentación de éste. Si se alimenta principalmente de humanos es antropofílico y si se alimenta principalmente de animales es zoofílico. Basándose en su hábitat, las especies se pueden clasificar como endofílicas, que permanecen en las habitaciones de los humanos, o exofílicas, que permanecen la mayor parte del tiempo afuera (Klowden, 1996).

Figura 3
Ciclo de vida de un mosquito (*Diptera: Culicidae*)
(Marquardt, 1993).



Cuadro 2
Especies de *Anopheles* asociadas con la transmisión de malaria
(Gwadz y Collins, 1996).

Regiones de principal importancia	Especies de <i>Anopheles</i>
África Subsahariana	<i>gambiae</i> <i>arabiensis</i> <i>funestus</i> <i>melas</i> <i>merus</i> <i>sergenti</i>
Oriente medio y Norte de África	<i>pharoensis</i> <i>sacharovi</i> <i>superpictus</i>
Mediterráneo	<i>labranchiae</i> <i>superpictus</i>
Lejano Este	<i>dirus</i> <i>fluviatilis</i> <i>minimus</i> <i>sinensis</i> <i>sundaicus</i> <i>aconitus</i> <i>maculatus</i> <i>culcifacies</i> <i>stephensi</i> <i>annularis</i>
Región Australasiática	<i>faurati</i> <i>punctulatus</i>
América Central y del Sur	<i>albimanus</i> <i>darlingi</i> <i>aquasalis</i> <i>pseudopunctipennis</i> <i>nuneztovari</i>

B. Genética molecular

1. Organización del genoma. La organización del genoma eucariota es compleja. Britten y Kohne (1968) demostraron la presencia de diferentes categorías de ADN en las células eucariotas: altamente repetitivo, medianamente repetitivo y secuencias únicas. Típicamente el 25% de los genomas eucariotas es altamente repetitivo, 10% medianamente repetitivo y el 65% es único (Mettler *et al.*, 1988).

Se considera que el ADN altamente repetitivo no tiene función, que es ADN “basura” que se ha acumulado a lo largo de la evolución. Las secuencias de ADN medianamente repetitivas varían en tamaños de varios cientos de unidades repetidas de familias de multigenes, como los de ARN ribosomal, ARN de transferencia, histonas,

actina, y las inmunoglobulinas, a secuencias que se repiten como 10,000 veces. Finalmente, están las secuencias únicas que contienen genes estructurales. Una pequeña fracción de la secuencia única de ADN codifica para proteínas. Se cree que sólo el 2 ó 3 % del ADN de secuencia única codifica para proteínas (Mettler *et al.*, 1988).

2. Métodos en genética molecular de vectores

a. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Los eventos de sustitución, inserción o eliminación de bases pueden ser detectados al usar endonucleasas de restricción, enzimas aisladas a partir de bacterias, que cortan al ADN en una posición constante con una secuencia de reconocimiento específica, típicamente de 4-6 pares de bases de largo. La especificidad de la ruptura por las enzimas de restricción significa que una digestión completa de un alelo de ADN va a producir un arreglo reproducible de fragmentos (Dowling *et al.*, 1996).

Las variaciones en el patrón de fragmentos reveladas por la digestión con las enzimas de restricción, se conocen como polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por su nombre en inglés “restriction fragment length polymorphism”). Las sustituciones de bases (o pequeñas inserciones o eliminaciones) pueden crear o eliminar los sitios de corte para una enzima en particular y alterar el número y tamaño de los fragmentos detectados por esa enzima en particular. Las inserciones, eliminaciones o rearrreglos grandes en el ADN alteran los patrones de fragmentación para varias enzimas de restricción simultáneamente y dan como resultado un cambio correlativo en los fragmentos de restricción y, por lo tanto, caracteres de fragmentos no independientes (Dowling *et al.*, 1996).

Los análisis RFLP son limitados debido a que sólo se puede monitorear una porción del genoma que contiene los sitios de restricción bajo examen. El uso de RFLP en mosquitos no es muy adecuado debido a las cantidades limitadas de ADN que se logran aislar de un mosquito, ya que se requiere la mayor parte de este ADN genómico para el análisis, comparado con los 5 ng (o menos) que se requiere para el análisis de polimorfismo basado en la reacción del PCR (Knudson *et al.*, 1996). Los RFLP proveen datos que permiten analizar la variación de ADN mitocondrial, de secuencias únicas y secuencias repetidas de ADN nuclear. Pueden proveer información acerca de la variación dentro y entre poblaciones, niveles de flujo genético, tamaño de población efectiva, análisis de parentesco y zonas híbridas. Los RFLPs de ADN mitocondrial se pueden usar para estimar filogenias de poblaciones (Hoy, 1994).

b. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). La técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, por su nombre en inglés, “random amplified polymorphic DNA”), se basa en la electroforesis en gel del ADN amplificado por PCR, que permite la amplificación de un gran número de marcadores genéticos (Black and DuTeau, 1997).

El RAPD-PCR usa un sólo iniciador corto (10 pares de bases) de secuencia arbitraria con un contenido mínimo de 60% GC para amplificar muchas regiones genómicas simultáneamente. Durante el RAPD-PCR, el iniciador se une al molde de ADN genómico a una baja temperatura (35°C). En teoría, los iniciadores se unen a muchas regiones del genoma simultáneamente. Sin embargo, la amplificación geométrica sólo

ocurre en aquellas regiones en las cuales el extremo 3' de los iniciadores están en bandas opuestas a una distancia no mayor de 3kb. Estas condiciones sugieren que los sitios de unión del iniciador deben ser repeticiones invertidas (Black and DuTeau, 1997).

Los polimorfismos en regiones amplificadas por RAPD-PCR se manifiestan típicamente por la presencia o ausencia de una banda entre individuos. La mayoría de las bandas amplificadas por RAPD son heredadas por alelos dominantes en forma mendeliana. Esto significa que un individuo que muestra una banda puede tener dos copias, dominante homocigoto, de un alelo amplificable en un locus RAPD. El individuo recesivo homocigoto no muestra banda. El método RAPD-PCR ha sido criticado por la falta de reproducibilidad, sin embargo, este problema se puede solucionar con una estandarización cuidadosa de las técnicas y reactivos (Black and DuTeau, 1997).

c. Polimorfismo conformacional de hebra simple (SSCP). El análisis de polimorfismo conformacional de hebra simple (SSCP, por su nombre en inglés "single strand conformational polymorphism") está basado en el principio de que la movilidad electroforética de una molécula de ADN o ARN de banda simple en un gel no desnaturizante es dependiente del tamaño y de la forma. Se generan un número de formas o conformaciones estables cuando ocurre un apareamiento de bases complementarias entre los nucleótidos de la banda simple de ADN. La longitud, localización y número de pares de bases intrabanda determina la estructura secundaria y terciaria de una conformación. Mutaciones puntuales que afecten las interacciones intrabanda pueden cambiar la forma de la molécula y alterar su movilidad durante la electroforesis. En principio, la movilidad de una molécula de banda simple renaturalizada debería ser sensible a mutaciones puntuales (Black and DuTeau, 1997).

El análisis SSCP es metodológicamente simple (ver la Figura 4). Al aumentar la temperatura, las moléculas de ADN de doble banda son desnaturizadas, a bandas simples y luego se introducen en hielo para promover la formación de los complejos intrabanda sobre la renaturalización de las bandas complementarias. Se forman dos clases de ADN de banda simple. Estas son las bandas simples desnaturizadas (DSS) y las bandas simples renaturalizadas (RSS). La movilidad de DSS es dependiente de la masa molecular de la molécula y por lo tanto es sensible a inserciones y eliminaciones. La movilidad del RSS es dependiente de la conformación formada por el apareamiento de bases intrabanda. Esta conformación y la movilidad del RSS son dependientes de la secuencia primaria de la molécula. Con frecuencia una secuencia de ADN puede tener distintas conformaciones que sean estables (Black and DuTeau, 1997).

El SSCP es una herramienta sensible para análisis de genética de poblaciones de marcadores genéticos discretos. Tiene el potencial para detectar mutaciones puntuales por lo que es más sensible que el análisis RFLP. Las variantes en los geles de SSCP pueden ser secuenciadas para determinar las mutaciones precisas asociadas con los polimorfismos SSCP (Black and DuTeau, 1997).

El SSCP puede aumentar la velocidad en el análisis de la variación intraespecífica en secuencias de genes. Se puede amplificar un gen en muchos individuos y poblaciones, los productos se pueden verificar para variación usando SSCP y aquellos que se desvían se

pueden secuenciar para obtener estimados de velocidades de sustitución (Hiss *et al.*, 1994).

d. Secuencias únicas: minisatélites y microsatélites. Los microsatélites tienen repeticiones de bases muy cortas, de 2-5 pb y los minisatélites consisten en repeticiones de 20 pb aproximadamente. Estos loci mutan a una velocidad muy alta, hasta 10^{-2} por gameto por generación y cada locus tiene muchos alelos. Los mecanismos de mutación, así como la localización en los cromosomas de estos dos tipos de loci son diferentes. Los loci microsatélites se distribuyen al azar en todo el genoma y están sujetos a deslizamiento en la replicación (*replication slippage*), mientras que los loci minisatélites tienden a estar concentrados cerca de los telómeros y varían debido a recombinación intramolecular o intralélica y conversión de genes (Dowling *et al.*, 1996).

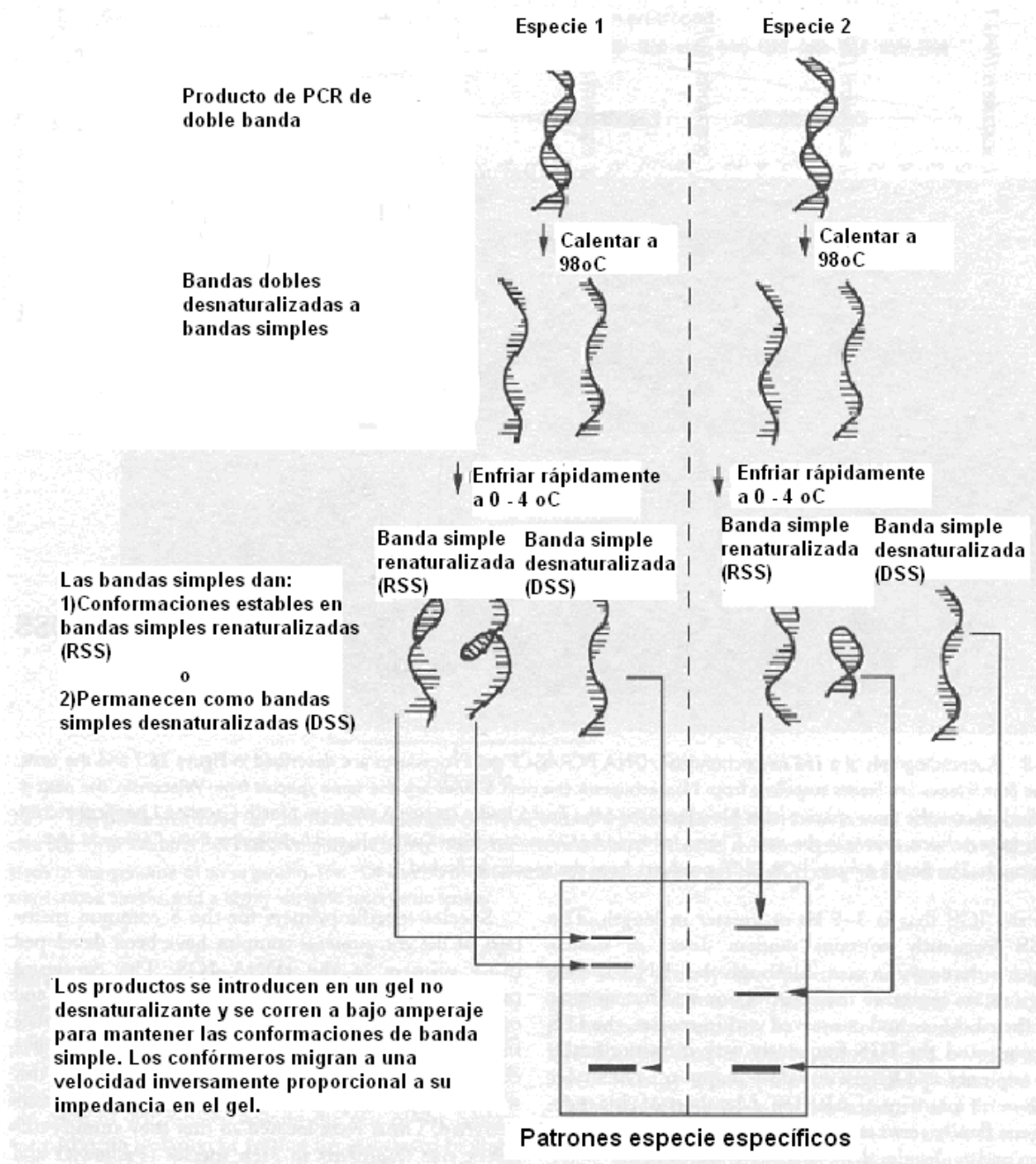
En el ADN microsatélite el número de dinucleótidos repetidos tiende a variar de individuo a individuo debido a entrecruzamiento desigual, deslizamiento en replicación y a otros mecanismos genéticos. Por lo anterior, los productos de PCR van a ser de diferentes tamaños (difieren por 2, 4, 6 bp, etc.). Al realizar electroforesis de estos productos, en gel de acrilamida, se puede estimar el número de repeticiones de pares de bases que cada individuo posee en los dos alelos del microsatélite. Las ventajas de esta técnica son su rapidez y exactitud una vez se conocen los iniciadores apropiados para el PCR y además se observa gran polimorfismo. Esto es especialmente importante al comparar un gran número de individuos en una población (Palumbi, 1996).

Los microsatélites son muy abundantes en el genoma eucariota y normalmente alcanzan un largo de hasta 150 bp. Debido a que están distribuidos por todo el genoma son muy útiles para mapeo de genomas y también como marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones (Schlötterer and Pemberton, 1994). Esto hace que haya una menor probabilidad de problemas asociados al ensayo de loci ligados en los estudios de poblaciones (Ashley and Dow, 1994).

Los microsatélites, al igual que las isoenzimas, presentan alelos discretos y co-dominantes, pero tienen más alelos y es menos probable que estén bajo selección como sucede en isoenzimas. Debido a esto los microsatélites permiten un análisis más refinado que el de las isoenzimas (Schlötterer and Pemberton, 1994).

Debido a su mecanismo de mutación, los microsatélites tienen limitaciones para algunas aplicaciones. En principio, cada mutación puede resultar en la ganancia o pérdida de una o más unidades repetidas, por lo que las mutaciones de los microsatélites no están dirigidas y la genealogía de diferentes alelos, basada en diferencias de tamaño, es poco probable que refleje verdaderas relaciones entre alelos. Sin embargo, los microsatélites tienen información filogenética en las regiones que rodean a la secuencia repetida que es ADN no codificante y probablemente evoluciona en forma neutra (Schlötterer and Pemberton, 1994).

Figura 4
Pasos en la detección de polimorfismos conformacionales de hebra simple.
(Black and Munstermann, 1996)



Las secuencias microsatélites se dividen en tres categorías: secuencias de repeticiones perfectas, secuencias de repeticiones imperfectas (con una o más interrupciones) y repeticiones compuestas, en las que se encuentran diferentes repeticiones adyacentes. La información de las repeticiones perfectas aumenta cuando éstas aumentan, especialmente

en el rango de 11 – 17 repeticiones. Se ha encontrado una variabilidad muy baja en microsatélites con menos de diez repeticiones. Las repeticiones imperfectas generalmente son menos polimórficas que las repeticiones perfectas (Ashley and Dow, 1994).

e. Secuenciación de ADN. La secuenciación directa del ADN genómico se ha popularizado debido al desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN de doble hebra producido por la amplificación de PCR puede ser secuenciado directamente o luego de la producción de ADN de banda simple a partir del producto de amplificación. El ADN de banda simple se genera por reamplificación asimétrica con un exceso de uno de los iniciadores, por tratamiento con una exonucleasa, o con el uso de iniciadores biotilados, marcados enzimáticamente (Hillis *et al.*, 1996).

Las secuencias de ADN pueden ser usadas para: construir filogenias moleculares para evaluar la evolución de genes o familias de genes particulares, evaluar los cambios evolutivos entre especies y construir filogenias de diferentes especies. También se pueden usar para estudiar la mayoría de los problemas en sistemática desde variabilidad intraespecífica hasta la filogenia de todos los organismos. Sin embargo, la secuenciación de ADN es costosa y tardada. Para los estudios donde es importante examinar muchos individuos, puede no ser efectiva por su costo (Hoy, 1994).

Es importante secuenciar ambas bandas de ADN para evitar errores. Las secuencias pueden ser alineadas con secuencias conocidas, o se pueden buscar en bases de datos como por ejemplo en GenBank (Hoy, 1994).

C. Genética de poblaciones

El enfoque en genética de poblaciones se desarrolla en unidades locales que se cruzan en poblaciones estructuradas geográficamente, ya que es en estas unidades locales en donde ocurren cambios sistemáticos en las frecuencias de alelos, que resulta en la evolución de características adaptativas. Estas unidades locales que se cruzan se llaman poblaciones locales (Hartl, 1988).

1. Frecuencia de genes en las poblaciones. Una medida de variación genética en las poblaciones es la frecuencia alélica en cada locus. Para determinar la frecuencia de genes, se cuenta el número de veces que aparece cada alelo en la población y se divide por el número total de alelos muestreados. La frecuencia observada de heterocigotos, que es el número total de heterocigotos dividido el número de individuos muestreados, también es una medida de variación genética (Tabaschnik and Black, 1996).

En forma simple, si se considera el locus *A* el cual puede tener tres estados genotípicos para un individuo diploide: *AA*, *Aa* y *aa*; la frecuencia del alelo *A* se determina al añadir la mitad del porcentaje de heterocigotos al porcentaje de homocigotos *AA* y la frecuencia del alelo *a* se determina al añadir la mitad del porcentaje de heterocigotos al porcentaje de homocigotos *aa* (Mettler *et al.*, 1988).

2. Equilibrio en una población. Los genotipos de la siguiente generación en una población, o sea de la proge, son construidos a partir de una muestra de los gametos producidos por los padres. Los tipos de gametos en la muestra son determinados por varios factores que influyen en el proceso por el cual se transmiten los genes de una generación a la siguiente (Mettler *et al.*, 1988).

Hardy y Weinberg propusieron una ley de equilibrio de los genotipos en una población, la cual tiene ciertas suposiciones; en una población grande, con reproducción al azar y ausencia de selección, migración, y mutación, las frecuencias de genes y genotipos permanecen constantes de generación en generación (Tabaschnik and Black, 1996).

Para determinar si una población está en el equilibrio de Hardy-Weinberg se muestra un número de individuos y se estiman las frecuencias genotípicas y alélicas. Los números observados y esperados se comparan por medio de una prueba no paramétrica como chi cuadrado (χ^2). Los grados de libertad se calculan como $n(n-1)/2$ donde n es el número de alelos (Tabaschnik and Black, 1996).

Al probar si una población está en el equilibrio de Hardy-Weinberg generalmente se asume que la muestra de individuos proviene de una sola población panmíctica que se reproduce al azar. Si una sola muestra es en realidad una mezcla de dos poblaciones diferentes genéticamente, la muestra no cumple con los requerimientos de Hardy-Weinberg. A este efecto de muestreo de más de una población simultáneamente se le conoce como efecto Wahlund. La magnitud del efecto Wahlund depende del grado de diferencias genéticas entre las poblaciones (Tabaschnik and Black, 1996).

Generalmente las poblaciones naturales se encuentran subdivididas por varios factores en subpoblaciones que casi siempre están parcialmente aisladas entre sí. La estratificación de individuos en subgrupos con diferentes frecuencias alélicas produce una deficiencia de heterocigotos y exceso de homocigotos. Se puede concluir que al subdividir la población, los genotipos ocurren en frecuencias como una simulación de un cierto grado de endogamia (“*inbreeding*”) a pesar de que los individuos de cada subgrupo se cruzan al azar entre sí (Spiess, 1977).

3. Suposiciones en el estudio de genética de poblaciones

a. Reproducción al azar. Al efectuar una reproducción al azar, la frecuencia de cada tipo de reproducción depende de la frecuencia de los genotipos. Cuando un individuo escoge una pareja al azar, la probabilidad de que la pareja sea de determinado genotipo es igual a la frecuencia de ese genotipo (Mettler *et al.*, 1988). Si no existe reproducción al azar entre los genotipos hay un cambio en las frecuencias genotípicas. Esto se conoce como reproducción clasificada (“*assortative mating*”). Cuando individuos con genotipos similares o idénticos se reproducen preferencialmente hay reproducción clasificada positiva. Alternativamente, cuando individuos con genotipos disimilares se reproducen preferencialmente hay reproducción clasificada negativa. La reproducción clasificada positiva es más común. El efecto general de la reproducción clasificada positiva es la reducción en el número de heterocigotos en cada generación (Tabaschnik and Black, 1996).

b. Tamaño de la población. Las variaciones en el muestreo pueden ser significativas en determinar qué genes están presentes entre la muestra de gametos que forman la generación progenie. Todas las poblaciones son finitas. El error de muestreo ocurre porque las muestras de las poblaciones tienden a variar de las frecuencias ideales y mientras más pequeña es la población, existe más variación (Mettler *et al.*, 1988).

El equilibrio de Hardy-Weinberg asume un tamaño de población constante infinito o muy grande, por lo que tamaños pequeños de población pueden cambiar las frecuencias de genes y de genotipos. Un tamaño pequeño de población aumenta la probabilidad de que las frecuencias de genes y de genotipos van a variar por el azar y se puede pensar que hay un fenómeno de muestreo. El efecto de azar causado por tamaños pequeños de población es predecible en magnitud, pero no en dirección. Los cambios en las frecuencias a través del tiempo, debido al azar, se conocen como deriva genética. La heterocigosidad disminuye debido a deriva genética en poblaciones pequeñas (Tabaschnik and Black, 1996).

c. Migración. Cuando dos poblaciones difieren en frecuencias de genes e intercambian migrantes, las frecuencias de genes en cada población cambian de acuerdo a la proporción de individuos migrantes. Si las dos poblaciones intercambian migrantes continuamente, la migración causa que las dos poblaciones tengan frecuencias de genes similares (Tabaschnik and Black, 1996).

El intercambio de individuos, que se reproducen entre poblaciones, se conoce como flujo genético. El flujo genético causa que las poblaciones se vuelvan similares genéticamente. La proporción de migrantes relativo a la población total se conoce como velocidad de migración (m). La velocidad de migración determina qué tan rápido se vuelve la población genéticamente similar debido a la migración (Tabaschnik and Black, 1996).

d. Mutación. Las mutaciones pueden cambiar el estado de un alelo a otro. El efecto en la variación genética es dependiente de la velocidad de mutación (u). Se considera que la velocidad de mutación sola no es lo suficientemente alta para afectar la genética de poblaciones de una especie. Sin embargo, la velocidad de mutación en regiones no codificantes es mayor y las velocidades de mutación no pueden ser ignoradas cuando se usan éstas en estudios de poblaciones (Tabaschnik and Black, 1996).

La mutación de un gen consiste en una alteración en el ADN. Esta alteración puede ser un cambio ya sea en la secuencia o en el número de pares de nucleótidos. Las mutaciones aumentan la variedad hereditaria en una población y proveen los recursos para la acción de la selección natural y la evolución. En general las mutaciones no dependen de las necesidades funcionales de los organismos. Las mutaciones se dan al azar, sin una determinación direccional conocida (Spiess, 1977).

e. Selección. La selección natural puede causar variación genética entre poblaciones cuando los genotipos difieran en la aptitud ("*fitness*") (W) que le confieren al individuo. La aptitud se define en términos relativos de un genotipo comparado con otros genotipos en la población (Tabaschnik and Black, 1996).

La selección que lleva a una aptitud más alta en el heterocigoto se conoce como sobredominancia o selección balanceada. Este tipo de selección mantiene dos alelos en la población. Existen otros tipos de selección como en contra de heterocigotos, selección con dominancia o efectos aditivos entre alelos y selección dependiente de la frecuencia (Tabaschnik and Black, 1996).

La velocidad en que la selección puede actuar es proporcional a las diferencias de aptitud entre genotipos, y dichas diferencias dependen del ambiente en que se encuentra la población (Tabaschnik and Black, 1996).

4. Estadísticos F de Wright. Una forma de estimar la velocidad de migración (m) es al dividir los niveles de variación en las poblaciones, con el uso de los estadísticos F de Wright. Estas divisiones son grupos de individuos (I) que forman subpoblaciones (S) dentro de una población total (T). Wright introdujo tres estadísticos F (F_{IS} , F_{ST} ; y F_{IT}) como medio de descripción de la estructura de las poblaciones naturales (Tabaschnik and Black, 1996).

La reproducción no al azar dentro de subpoblaciones se describe por F_{IS} , que se calcula como $1 - (H_{obs}/H_{exp})$ donde H_{obs} es la razón de individuos heterocigotos del total de individuos en la subpoblación y H_{exp} es el total de heterocigosidad esperada en la población y es igual a $1 - \sum p_i^2$ donde p es la frecuencia de ese alelo en la subpoblación. Si H_{obs} es igual a H_{exp} , $F_{IS} = 0$, entonces la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Si $F_{IS} > 0$, la subpoblación no está en equilibrio de Hardy-Weinberg y esto puede ocurrir cuando genotipos similares se reproducen preferencialmente (Tabaschnik and Black, 1996).

La reproducción no al azar entre subpoblaciones se describe por F_{ST} . F_{ST} , es positivo cuando hay flujo genético restringido entre subpoblaciones. El F_{ST} es una varianza estandarizada en frecuencias de alelos entre poblaciones. Wright la describió como la razón de la varianza observada en frecuencias alélicas entre subpoblaciones relativa a la varianza máxima posible, bajo el completo aislamiento de las subpoblaciones. F_{ST} se calcula como $1 - (H_{exp} \text{ en subpoblaciones} / H_{exp} \text{ en la población total})$ (Tabaschnik and Black, 1996).

Para resumir la reproducción no al azar en toda la población, Wright introdujo F_{IT} que es igual a $(H_T - H_I) / H_T$ donde $H_T = 1 - \sum p_i^2$ y H_I es la H_{obs} promedio entre subpoblaciones (Tabaschnik and Black, 1996).

5. Flujo genético. El estadístico F usado para determinar m es F_{ST} . F_{ST} está relacionado con m como $F_{ST} = 1 / (1 + 4Nm)$. El valor Nm es el producto del tamaño de la población N y la velocidad de migración m . Sin embargo, $m = \text{número de migrantes} / N$, por lo que Nm es el número absoluto de migrantes sin importar el tamaño de la población. Una gráfica de F_{ST} en función de Nm (ver Figura 5) ilustra el principio básico de genética de poblaciones: se requiere muy poca migración para mantener la homogeneidad genética entre subpoblaciones. Cuando Nm alcanza 10, F_{ST} cae rápidamente a 0 (Tabaschnik and Black, 1996).

En los estudios de genética de poblaciones se estiman las cantidades y patrones de flujo genético entre las distintas poblaciones. El movimiento de genes entre poblaciones puede ser continuo (panmixia) o restringido. Los análisis de flujo genético proveen información sobre patrones de dispersión local, lo cual es crítico para control de vectores, pues indica la distancia, dirección y velocidad de dispersión (Tabaschnik and Black, 1995).

Los estudios de genética de poblaciones que examinan el flujo genético con respecto a componentes de capacidad vectorial han dado información sobre complejos de especies, vectores y variación entre especies (Tabaschnik and Black, 1995).

6. Determinación de las relaciones genéticas entre poblaciones. Las frecuencias de genes se pueden usar para estimar la relación genética entre poblaciones. Existen varios tipos de mediciones para estimar la similitud genética y por lo tanto la distancia genética, por medio de frecuencias de genes observados para cada una de las poblaciones. Una de estas mediciones es la distancia genética (D) de Nei. La determinación de la similitud genética, I, de cualquier par de poblaciones, donde las frecuencias alélicas del locus k en la población A son: $a_1, a_2, a_3, \dots a_i$ y en la población B son: $b_1, b_2, b_3, \dots b_i$, se calcula como:

$$I = \sum a_i b_i / \sqrt{\sum a_i^2 \sum b_i^2}$$

(Tabaschnik and Black, 1996).

La similitud genética para cada locus muestreado se calcula y luego se usa para estimar la similitud total con la fórmula:

$$I = I_{ab} / \sqrt{I_a I_b}$$

Donde I_{ab} , I_a , I_b = promedios aritméticos sobre todos los locus de $\sum a_i b_i$, $\sum a_i^2$, $\sum b_i^2$, respectivamente (Tabaschnik and Black, 1996).

La distancia genética entre cualquier par de poblaciones es $D = -\ln(I)$. Cuando se hacen comparaciones entre varias poblaciones, es útil visualizar las relaciones genéticas de forma diagramática, como un dendrograma (Tabaschnik and Black, 1996).

Cuando se calculan las distancias genéticas entre subpoblaciones, casi siempre algunos loci contribuyen más a la variación total que otros loci. Esto también se puede observar cuando se calculan los estadísticos F y las estimaciones de velocidades de migración pueden estar muy influenciadas por algunos loci, por lo que los dendrogramas derivados de loci separados no siempre son congruentes (Tabaschnik and Black, 1996).

7. Distribución de genotipos en poblaciones reales. No está claro hasta qué punto los accidentes en el muestreo son responsables de los cambios observados en las poblaciones naturales o cómo es afectada la distribución presente de los elementos genéticos en esas poblaciones por combinación gamética al azar. Mientras las fuerzas determinísticas (selección, flujo genético y mutaciones recurrentes) ejerzan menos fuerza sobre los genotipos, es más probable que el azar sea responsable de los cambios y distribuciones observados. Si sólo se observa el muestreo de gametos, son posibles tres principales efectos inmediatos: (1) dispersión de las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones, (2)

fijación de alelos particulares debido a una reducción continua del tamaño de población y (3) el establecimiento de genotipos al azar en las subpoblaciones (el principio del fundador) (Spiess, 1977).

El principio fundador, enunciado, analizado y documentado por Mayr designa

«...el establecimiento de una nueva población por unos pocos fundadores originales que sólo llevan una pequeña fracción de la variación genética total de la población padre. »

Hay una gran pérdida de variabilidad genética por medio de endogamia luego de que la subpoblación se ha establecido (Spiess, 1977).

D. Estudios de genética de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* en Latinoamérica

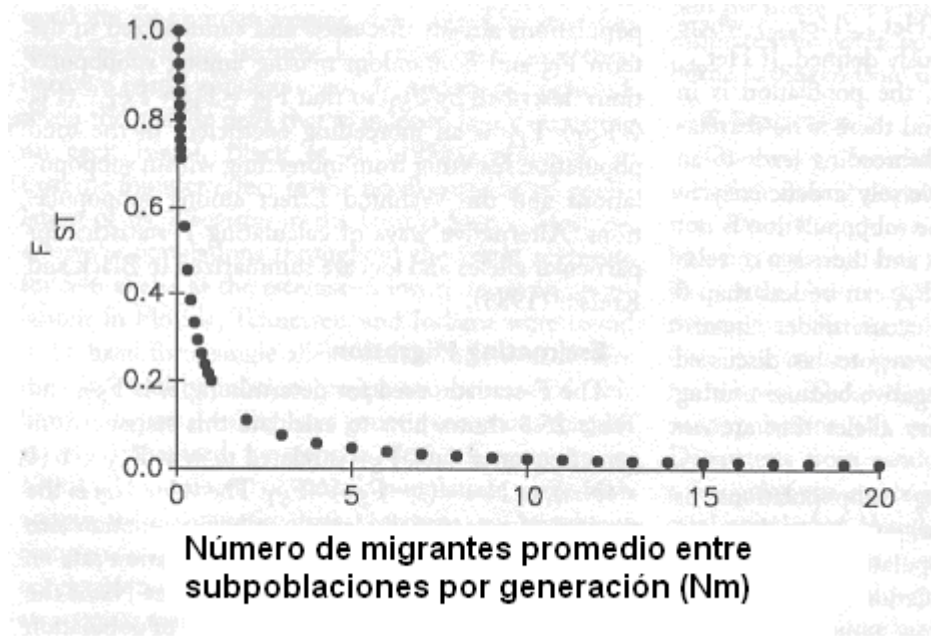
Faran (1980) describió que *Anopheles albimanus* presenta variaciones, en características de comportamiento y competencia vectorial entre distintas poblaciones. Se han realizado varios estudios en las distintas regiones de América Latina para probar la hipótesis de la existencia de especies crípticas o isomórficas dentro de *An.albimanus*. Hobbs (1962) estudió por medio de citogenética diferentes cepas de *An.albimanus* de Panamá, El Salvador, Guatemala, México, y Jamaica. No detectó heterocigotos de inversión y la progenie de estos cruces fue infértil.

Narang y colaboradores (1991) estudiaron la estructura de 11 poblaciones de *An.albimanus* de Colombia con isoenzimas. Examinaron un total de 25 isoenzimas y encontraron diferencias significativas de frecuencias de alelos en cuatro loci. En este estudio se concluyó que las 11 poblaciones de Colombia son conespecíficas.

Mérida y colaboradores (1995) estudiaron el grado de variación en frecuencia y número de copias de las variantes de longitud de los espaciadores intergénicos (IGS), de ARN ribosomal, entre individuos de *An. albimanus*. En este estudio se encontró una gran variación entre mosquitos dentro de una misma población. También se determinó un gran componente de variación entre las poblaciones de la costa atlántica y costa pacífica de Centro América. Este estudio sugirió flujo genético restringido entre poblaciones de la costa atlántica y pacífica de Centro América, por lo que se creía que la cadena de montañas proveía una barrera al flujo genético entre estas poblaciones.

Para obtener mayor evidencia, Mérida y colaboradores (1999) estudiaron un marcador genético independiente de un gen de ADN mitocondrial. Con este estudio se obtuvieron distintos resultados, pues no se encontró diferencia genética significativa entre las poblaciones de la costa atlántica y pacífica de Centro América; pero se estableció diferencia genética significativa entre las poblaciones de Costa Rica y las de Panamá, Colombia y Venezuela.

Figura 5
Relación entre la velocidad de migración efectiva (Nm) y la diferenciación genética (F_{ST})
entre subpoblaciones.
(Tabaschnik and Black, 1996)



III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

A. Objetivos

1. Objetivos generales

- Estudiar la genética de poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* en el Caribe y Latinoamérica.

2. Objetivos específicos

- Determinar si existe flujo genético entre las poblaciones de *Anopheles albimanus* en las distintas regiones geográficas bajo estudio.
- Estimar la variación genética que existe entre las distintas regiones geográficas estudiadas: entre Cuba y Centro América, Cuba y Sudamérica y Centro América y Sudamérica.
- Determinar la estructura genética de las diferentes poblaciones bajo estudio, por medio de los estadísticos F de Wright.
- Concluir sobre la estructura genética de *Anopheles albimanus* en Latinoamérica, al comparar los estudios de ADN mitocondrial y de secuencias de ADN microsatélite.
- Determinar si el polimorfismo de las secuencias microsatélites bajo estudio se debe a la variación de la secuencia repetitiva y si se comporta como una secuencia microsatélite perfecta.

B. Hipótesis

- Existe diferencia significativa en las secuencias de ADN microsatélite de las poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* de Centro América y Sudamérica, Cuba y Centro América, y Cuba y Sudamérica.
- El polimorfismo de los cuatro loci de secuencias microsatélite bajo estudio es causado principalmente por variaciones en la secuencia repetitiva.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Equipo, materiales y reactivos

1. Equipo

Agitador “vortex”

Autoclave

Balanza analítica

Balanza

Baño de agua (Temperatura ambiente a 95°C)

Bloques térmicos

Bomba de vacío

Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa

Cámara de electroforesis para geles de secuenciación

Cámara Polaroid

Centrífuga con vacío

Congelador -80°C y -20°C

Cronómetro

Destilador de agua

Espectrofotómetro

Estufa con agitador magnético

Fuente de poder, >2000V para electroforesis de acrilamida

Fuente de poder, >250V para electroforesis de agarosa

Medidor de pH

Microcentrífuga

Micropipetas (de 2µl – 1mL)

Refrigerador (4°C)

Termociclador

Transiluminador de luz ultravioleta de onda larga

Transiluminador de luz blanca

2. Materiales

Marcadores de laboratorio para rotular

Paños kimwipe

Películas fotográficas

Pipetas pasteur

Puntas para micropipetas

Termómetro

Tubos de 0.5 y 1.5 mL para microcentrífuga

3. Reactivos

Aceite mineral

Acido acético glacial
Acido bórico
Acido etilendiamino tetracético (EDTA)
Acrilamida
Agarosa del tipo “uso de rutina”
Agua desionizada
Agua desionizada y destilada
Azul de bromofenol
Bind silano
Bisacrilamida
Bromuro de etidio
Buffer para reacción de PCR 10X
Carbonato de sodio grado ACS
Cloro comercial
Cloruro de magnesio (MgCl₂)
Cloruro de sodio (NaCl)
Desoxi nucleótido trifosfato (dNTP)
Detergente Alconox
Dodecil sulfato de sodio
Enzima ADN polimerasa *Taq* para PCR
Etanol absoluto y al 95%
Formaldehído
Formamida
Hexadeciltrimetilamonio (CTAB)
Hidróxido de sodio
Iniciadores para el PCR (secuencias microsatélites 1-90, 2-14, 6-41 y 2-25)
Isopropanol 80%
Kit de purificación de producto de PCR, Wizard PCR Preps (Promega)
Kit de secuenciación de ADN con tinción de plata (Promega)
Marcador de masa molecular de ADN alto rango, 1kb ladder
Marcador de masa molecular de ADN bajo rango, digestión HaeII de pBR322
Nitrato de plata
Persulfato de amonio
Sigmacote
TEMED
Tiosulfato de sodio
Trizma HCl y Trizma Base
Urea
Xilen cianol

B. Metodología

Las muestras de mosquitos *Anopheles albimanus* de Latinoamérica y el Caribe fueron colectadas en 1999, excepto las muestras de Guatemala, que fueron colectadas en 1995 y 1996. Los países incluidos en este estudio son: México, Cuba, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia y Venezuela (ver Figura 6).

1. Extracción de ADN. Las extracciones de ADN fueron realizadas por otra persona. Se utilizó el método CTAB. El buffer de extracción tiene la siguiente composición: 100 mM clorhidrato de Tris[hidroximetil]aminometano (Tris-HCl), 1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA, 2% (p/v) hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y 0.2 % 2-mercaptoetanol. Cada mosquito se coloca en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL. Se les agrega 100 µl del buffer de extracción y se macera con un pistilo. Se incuba a 65°C por 30 minutos, luego se agregan 14 µL de acetato de potasio 8M y se incuba en hielo por 30 minutos. Se centrifuga a 14,000 revoluciones por minuto (rpm) por 10 minutos, se transfiere el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga de 0.5 mL y se agregan 200 µL de etanol absoluto frío. El ADN extraído se almacena en etanol al 70%, a -20°C.

2. Reconstitución del ADN. Se centrifuga la muestra preservada en etanol por 20 minutos a 10,000 rpm a 4°C. Se decanta el sobrenadante y se lava con 100 µl de etanol al 70% frío y luego con 100 µl de etanol absoluto frío. Se seca en la centrífuga con vacío por 20 minutos. Se disuelve el ADN con 100 µl de buffer Tris[hidroximetil]aminometano-EDTA (TE) y se deja a 4°C por lo menos 8 horas. Se hace una dilución del ADN 1 en 50 en buffer TE para usarlo en la reacción en cadena de la polimerasa.

3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se prepara el buffer 1X (MgCl₂ 1.5mM, buffer 1X, dNTP 0.2 mM) a utilizar de acuerdo al número de muestras que se va a amplificar: 24 µl de Buffer 1X y 0.05 µl de cada iniciador por muestra. Se agregan 23.75 µl de buffer en cada tubo, se agrega una gota de aceite mineral estéril y luego se irradian los tubos con luz UV por 10 minutos. Se agrega 1 µl de la muestra de ADN por tubo. Se colocan los tubos en el termociclador y se agregan 0.25 µl de la enzima ADN polimerasa *Taq* cuando la temperatura alcanza los 80°C. Se utiliza el programa “Black”:

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5 min.	95°C
2	20 min.	80°C
3	1 min.	95°C
4	1 min.	48°C/55°C ¹
5	1 min.	72°C
6	29 veces el paso 3	-
7	7 min.	72°C
8	24 horas	4°C
9	Final	-

4. Electroforesis en gel de agarosa. Se preparan 160 mL de agarosa al 1.2% (p/v) en buffer Tris[hidroximetil]aminometano-Borato-EDTA (TBE) 1X, se calienta y agita para disolver la agarosa. Se deja enfriar y se agregan 5 µl de la solución de bromuro de etidio (10mg/ml). Se vierte en el molde con el peine para hacer el gel y se deja solidificar. Se llena la cámara con buffer TBE 1X y se cargan las muestras. Se mezclan 2 µl de buffer de montaje y 8 µl del producto de PCR. Se cargan en el extremo 5 µl de marcador de masa

¹ La temperatura de complementación es de 48°C para los microsatélites 1-90 y 2-14 y de 55°C para los microsatélites 6-41 y 2-25.

molecular 1kb. Se corre la electroforesis a 80 V durante 1 hora. Se irradia con luz UV y se toma la fotografía.

5. Electroforesis vertical de poliacrilamida

a. Preparación del gel y del sistema. Para preparar el gel, se disuelven 42 g de urea en 32 mL de agua desionizada y destilada, se agregan 17 mL de la solución madre de acrilamida, que contiene 28.5 % (p/v) de acrilamida y 1.5% (p/v) de bis-acrilamida, y se agregan 20 mL de buffer TBE 5X. Esta solución se filtra al vacío por 30 minutos para eliminar el oxígeno disuelto.

Se prepara una solución 0.5 % (v/v) bind-silano y 0.5% (v/v) ácido acético en etanol absoluto, que sirve para cubrir la placa de vidrio. Se prepara una solución acuosa de persulfato de amonio al 25% que se usa en la reacción de polimerización del gel.

La placa de vidrio exterior se lava con un detergente que contiene hidróxido de sodio 10 M y dodecil sulfato de sodio 0.2 M. Se deja reposar por 5-10 minutos y luego se restriega con una esponja plástica. Se quita el exceso de detergente con agua corriente y luego se lava con dos litros de agua desionizada. Por último se lava con etanol al 70% y se deja secar.

La placa de plástico interior adherida a la cámara se lava con detergentealconox al 2% y se restriega con una esponja suave. Se quita el exceso de detergente con agua corriente y luego se lava con cuatro litros de agua desionizada. Por último se lava con etanol al 70% y se deja secar.

Se agrega 1 mL de la solución de Bind-silano sobre la placa de vidrio y se distribuye con un paño kimwipe. Se esperan 5 minutos para quitar el exceso de Bind-silano. Se lava 3 veces con etanol al 95%.

Se cambian los guantes y ahora se trata la placa plástica. Se le agregan 2 mL de Sigma cote, 1 mL a la vez y se distribuyen por toda la superficie de la placa.

Se ensambla la cámara, se superponen las placas, se separan con los espaciadores de 0.4 mm y se ajustan los clamps. Se deben alinear los espaciadores antes de ajustar los clamps.

Para polimerizar el gel se agregan 107 μ L de TEMED y 107 μ L de la solución de persulfato de amonio al 25%. Se toma la mezcla en una jeringa de 150 mL y luego se introduce entre las placas. En el frente de las placas se coloca la parte posterior del peine para formar un solo pozo de 7 a 8 mm de profundidad. El gel se deja polimerizar por 1 hora como mínimo. Si el gel se va a usar al día siguiente se debe tapar con plástico y refrigerar.

b. Preparación de la precorrida. Se enciende el bloque térmico a una temperatura de 95°C, para calentar los productos de PCR y de esta forma desnaturalizar el ADN. Se mezclan 6 μ L del producto de PCR con 4 μ L del buffer de montaje (10 mM NaOH, 95% formamida, 0.05 % azul de bromofenol y 0.05% xilen cianol). Se colocan 2 litros de agua

caliente en la cámara superior del gel para calentar el sistema, se coloca 1 litro a la vez y se esperan 5 minutos antes de agregar el otro litro. Luego se agrega 1 litro de buffer TBE 0.5 X caliente. Se quita el peine que formaba el pozo grande y se lava el pozo con buffer TBE 0.5X para eliminar la acrilamida que no reaccionó.

Se conecta la cámara a la fuente de poder y se corre a potencia constante de 105 vatios durante 15 minutos. Se colocan los tubos que contienen el producto de PCR y el buffer de montaje en el bloque a 95°C.

c. Montaje y corrida del gel. Luego de los 15 minutos de la precorrida se vuelve a lavar el pozo con la pipeta Pasteur y se coloca el peine hasta pinchar el gel. Se colocan clips metálicos para mantener presionadas las dos placas. Se cargan 5 µl de la mezcla que contiene el producto de PCR en los pozos formados por el peine. Se deben colocar marcadores de masa molecular de ADN de bajo rango en los extremos y al centro del gel. Además también se cargan estándares internos de cada microsatélite que ayudan en la identificación de alelos. Se corre el gel a 105 vatios por 2 horas 40 minutos, luego se apaga la fuente de poder, se tira el buffer de la cámara superior y se le agrega agua para enfriar el sistema. Se desarma el sistema y se coloca el gel que se encuentra adherido a la placa de vidrio, en 2 L de ácido acético acuoso 10% (v/v).

6. Tinción con nitrato de plata. La tinción del gel de secuenciación se basa en el protocolo de Black y DuTeau (1997). Las únicas modificaciones son que el gel se lava seis veces con agua desionizada después de la incubación con ácido acético y que sólo se usa agua desionizada y destilada para preparar las soluciones de trabajo y para el lavado corto de 10 segundos que se realiza luego de incubar con la solución de plata.

7. Purificación de los productos de PCR a secuenciar. Se mezclan 80 µl del producto de PCR con 100 µl del buffer de purificación directo. Se agrega 1 mL de la resina y se deja el ADN en contacto por lo menos 1 minuto y se agitan ocasionalmente. Se transfiere esta mezcla a la jeringa de polipropileno que contiene insertada la minicolumna del kit y se eluye el buffer con presión sobre el émbolo. Se lava la columna con 2 mL de isopropanol al 80 %, se remueve la columna, se coloca sobre un tubo de microcentrífuga y se centrifuga a 14,000 g para secar la resina. Se transfiere la minicolumna a otro tubo, se agregan 50 µl de agua libre de nucleasas y se deja incubar por 1 minuto. Se centrifuga la minicolumna por 20 segundos a 14,000 g para eluir el ADN.

8. Reacción de secuenciación. Para cada set de reacciones de secuenciación se rotulan cuatro tubos para microcentrífuga de 0.5 mL (G, A, T, C). Se agregan 2 µl de la mezcla apropiada de dNTPs y didesoxiNTPs a cada tubo. Se añade una gota de aceite mineral estéril. Se tapan los tubos y se mantienen en hielo.

Para cada set de secuenciación, se mezclan los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga: 5 µl del ADN purificado del producto de PCR, 5 µl del buffer de secuenciación 5X, 2 µl del iniciador a una concentración de 25 pmol/µl y 4 µl de agua libre de nucleasas. Por último se agrega 1.0 µl de la *Taq* ADN polimerasa grado de secuenciación (5u/µl).

Se agregan 4 μ l de la mezcla anterior a cada tubo marcado que contiene la mezcla de dNTPs y didesoxiNTPs y se mezcla. Luego se centrifuga brevemente.

Se colocan los tubos en un termociclador que ha sido precalentado a 95°C y se usa el programa "Sequen":

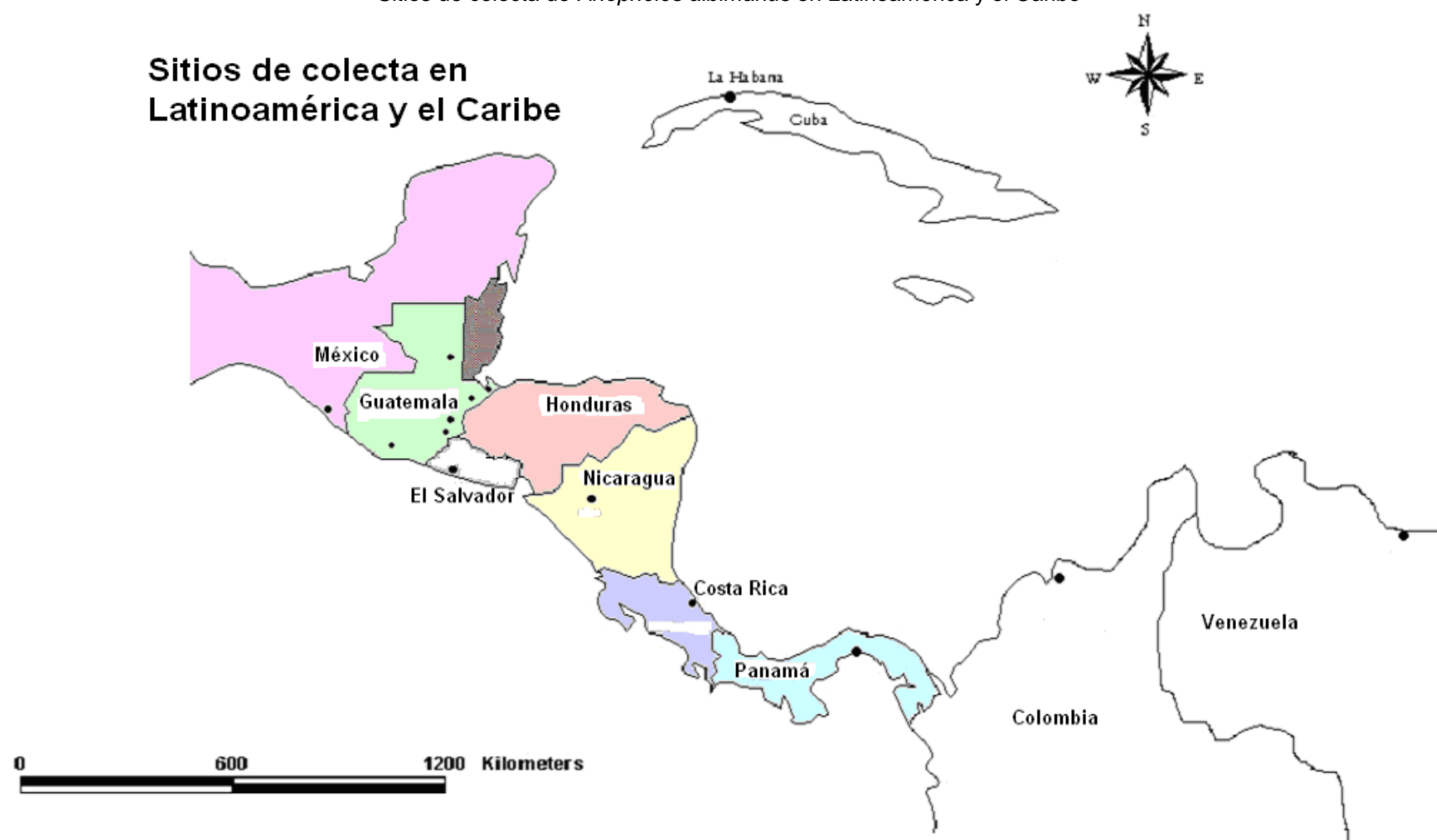
Paso	Tiempo	Temperatura
1	2 minutos	95°C
2	30 segundos	95°C
3	30 segundos	48°C/55°C ²
4	1 minuto	70°C
5	59 veces a 2	---
6	24 horas	4°C
7	FINAL	---

9. Modificaciones en la electroforesis vertical de poliacrilamida para su uso en secuenciación de ADN. La potencia para la corrida de secuenciación también es constante, pero es de 60 vatios. La precorrida dura 45 minutos y la corrida, 2 horas. La preparación del gel y la tinción de plata son iguales que en la corrida para microsátélites.

² La temperatura de complementación para los microsátélites 2-14 y 1-90 es de 48°C; para los microsátélites 2-25 y 6-41 es de 55°C

Figura 6
Sitios de colecta de *Anopheles albimanus* en Latinoamérica y el Caribe

Sitios de colecta en Latinoamérica y el Caribe



V. RESULTADOS

A. Estandarización de la metodología

La estandarización del análisis de los productos de PCR de las diferentes secuencias microsatélites fue realizado por Schoua (2000) y Mills (2001). Se estandarizaron las condiciones del PCR y de la electroforesis para cuatro microsatélites denominados 1-90, 2-14, 2-25 y 6-41. Con base a los geles de corrección de Mills (2001), se cambiaron los estándares internos (ver Anexos) para poder identificar los alelos en forma certera.

En la Figura 7 se observa un gel de análisis de microsatélites que consiste en un gel de electroforesis de poliacrilamida de alta resolución, para secuenciación, lo que permite diferenciar fragmentos de ADN hasta en un par de bases (pb). En esta figura se observa el microsatélite 1-90, que tiene un tamaño promedio de 154 pares de bases (pb).

En la Figura 8 se observa un gel de análisis de los microsatélites 2-14 y 2-25, los cuales por diferir bastante en tamaño (casi 100 pb) pueden ser separados y detectados en el mismo gel, como lo demostró Mills (2001). El tamaño promedio del microsatélite 2-14 es de 202 pb y el del microsatélite 2-25 es de 105 pb. En la Figura 9 se observa un gel de análisis del microsatélite 6-41, que tiene un tamaño promedio de 185 pb.

En este trabajo de investigación se estandarizó la metodología para la secuenciación de los distintos microsatélites. Para esto se varió la concentración de ADN a secuenciar, la concentración del iniciador y la temperatura de complementación en la reacción de secuenciación. Las condiciones de secuenciación fueron optimizadas para los microsatélites 1-90 y 2-14, que al inicio presentaron bandas poco intensas, lo cual imposibilitó la lectura de la secuencia. La temperatura de complementación para estos dos microsatélites fue de 48°C al igual que en la reacción de PCR y se demostró que no hubo mayor detección de los productos de la secuenciación al bajar la temperatura de complementación a 42°C, por lo que este parámetro ya no se varió. Luego se varió la cantidad de ADN a secuenciar. El protocolo del kit promega de secuenciación usado recomendaba emplear por lo menos 32 ng del producto de PCR y luego se varió a aproximadamente 60 ng. Sin embargo, este parámetro tampoco aumentó la detección de las bandas. Por último se varió la cantidad del iniciador. El protocolo recomendaba usar 4.5 pmol, el iniciador se aumentó a 9 pmol y no se observó aumento en la detección. Entonces se aumentó aún más la cantidad de iniciador a 25 pmol, 40 pmol y 100 pmol y se observó un aumento en la detección, en las tres variaciones.

Las condiciones finales usadas para todos los microsatélites fueron 20 ng de ADN, 40 pmol de iniciador y la misma temperatura de complementación que en el PCR. Se observó que al usar un kit de secuenciación vigente la detección aumentó y permitió leer todas las secuencias. El último parámetro que se varió fue el tiempo de revelación en la solución de carbonato de sodio. Para la detección de microsatélites esto toma 2 minutos, pero para la reacción de secuenciación se requiere de por lo menos 3 minutos, para poder detectar las bandas de ADN de baja masa molecular y poder leer así toda la secuencia repetitiva.

En la Figura 10 se observa una parte del gel de secuenciación para dos individuos del microsatélite 2-14 y dos individuos del microsatélite 1-90. Además se observa la reacción de secuenciación del ADN control del kit, que es el plásmido PGEM 3Zf(+).

B. Frecuencias alélicas de los individuos estudiados

Las poblaciones de México y Centro América fueron trabajadas por Schoua (2000) y Mills (2001). En este estudio se trabajaron las poblaciones de Panamá, Sudamérica y Cuba. Los datos generales de estas poblaciones se muestran en el Cuadro 3.

En Panamá y Cuba se presentó un individuo nulo en cada país. Para estos individuos no hubo amplificación de ADN por PCR para ningún microsatélite. Estos individuos no se tomaron en consideración para el análisis, pues se asume que la muestra de ADN estaba en mal estado o era insuficiente. En todos los países se encontraron individuos nulos para 1, 2 o hasta 3 microsatélites; estos sí se tomaron en cuenta para el análisis. En el apéndice A, se encuentran las composiciones alélicas de las poblaciones de Panamá (Cuadros 32 y 33), Colombia (Cuadro 34), Venezuela (Cuadros 35 y 36) y Cuba (Cuadro 37).

En el tamizaje inicial de los productos de PCR de las poblaciones de Venezuela en los geles de agarosa hubo gran cantidad de individuos nulos para los diferentes microsatélites, 35% para el 2-14, 22 % para el 1-90, 12 % para el 6-41 y 11 % para el 2-25. Debido al alto porcentaje de alelos nulos, se cambiaron las condiciones del PCR para los microsatélites 1-90, 2-14 y 6-41 para poder reducir el número de alelos nulos.

Se comenzó por optimizar la temperatura de hibridización del iniciador 2-14 para los individuos nulos en Venezuela. Se realizó un PCR a 44°C de hibridización, pero sólo amplificó el 24 % de los individuos nulos, por lo que fue necesario bajar la temperatura de hibridización a 40°C. En esta ocasión, amplificaron el 50% del mismo grupo de individuos nulos. Finalmente, se pudo identificar el genotipo del microsatélite 2-14 al 89 % de los individuos de Venezuela. Debido a que al disminuir la temperatura de hibridización se une mejor el iniciador, se cree que en estas poblaciones de Venezuela existen alelos con mutaciones en el sitio de unión del iniciador, lo cual impide la amplificación del ADN. De la misma forma se redujo el número de individuos nulos para los microsatélites 1-90 y 6-41. Para el microsatélite 1-90, se realizó un PCR a 40°C, se amplificó solamente el 31 % de individuos nulos. Para este microsatélite se obtuvo el genotipo del 87% de los individuos. Para el microsatélite 6-41 se realizó un PCR a 50°C de hibridización, se amplificó el 75% de los individuos nulos. Para este microsatélite se logró identificar el genotipo en todos los individuos. En el microsatélite 2-25 se identificó el genotipo al 96 % de los individuos.

Figura 7
Electroforesis de poliacrilamida para el microsatélite 1-90

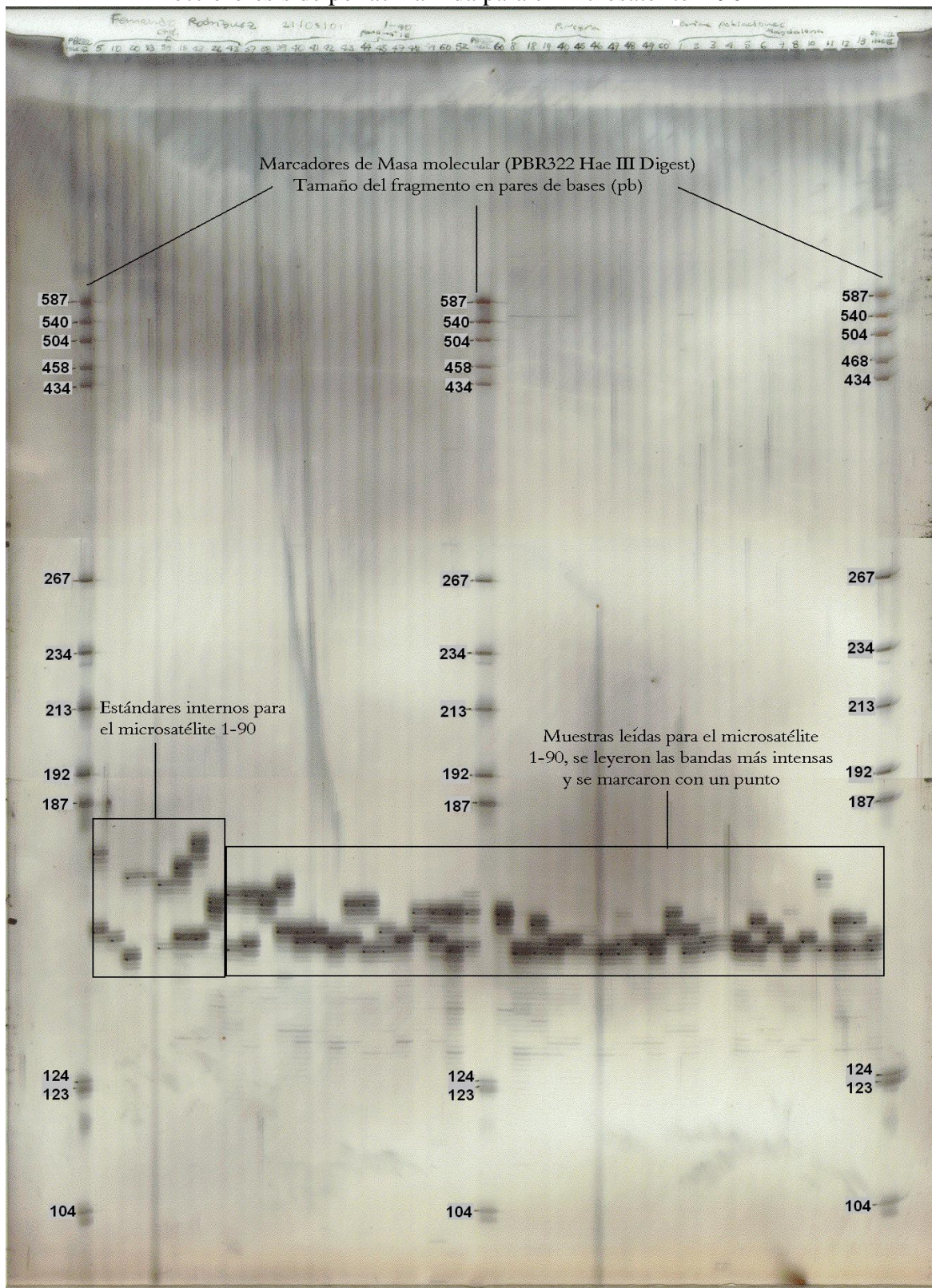


Figura 8
Electroforesis de poliacrilamida para los microsatélites 2-14 y 2-25

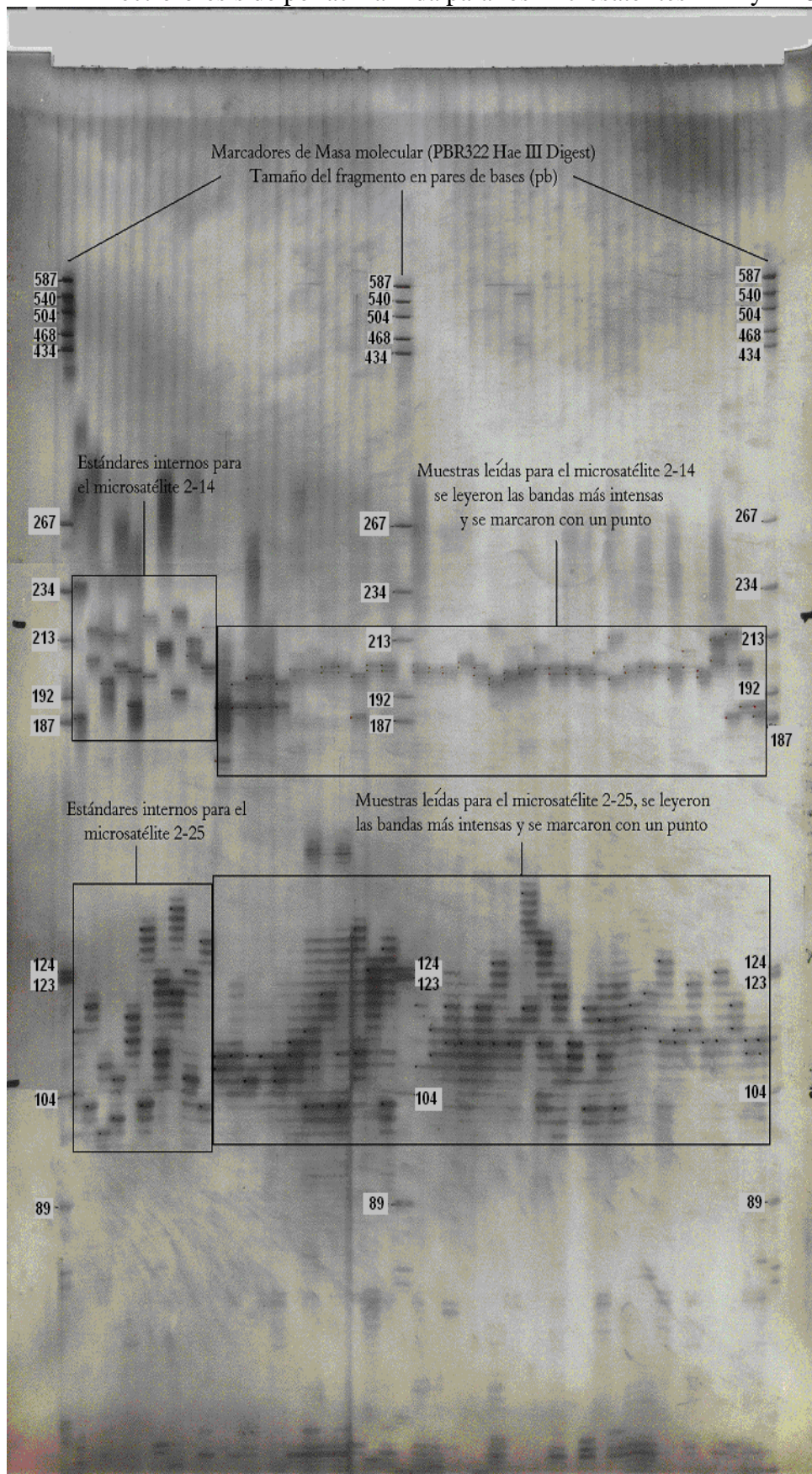


Figura 9
Electroforesis de poliacrilamida para el microsatélite 6-41

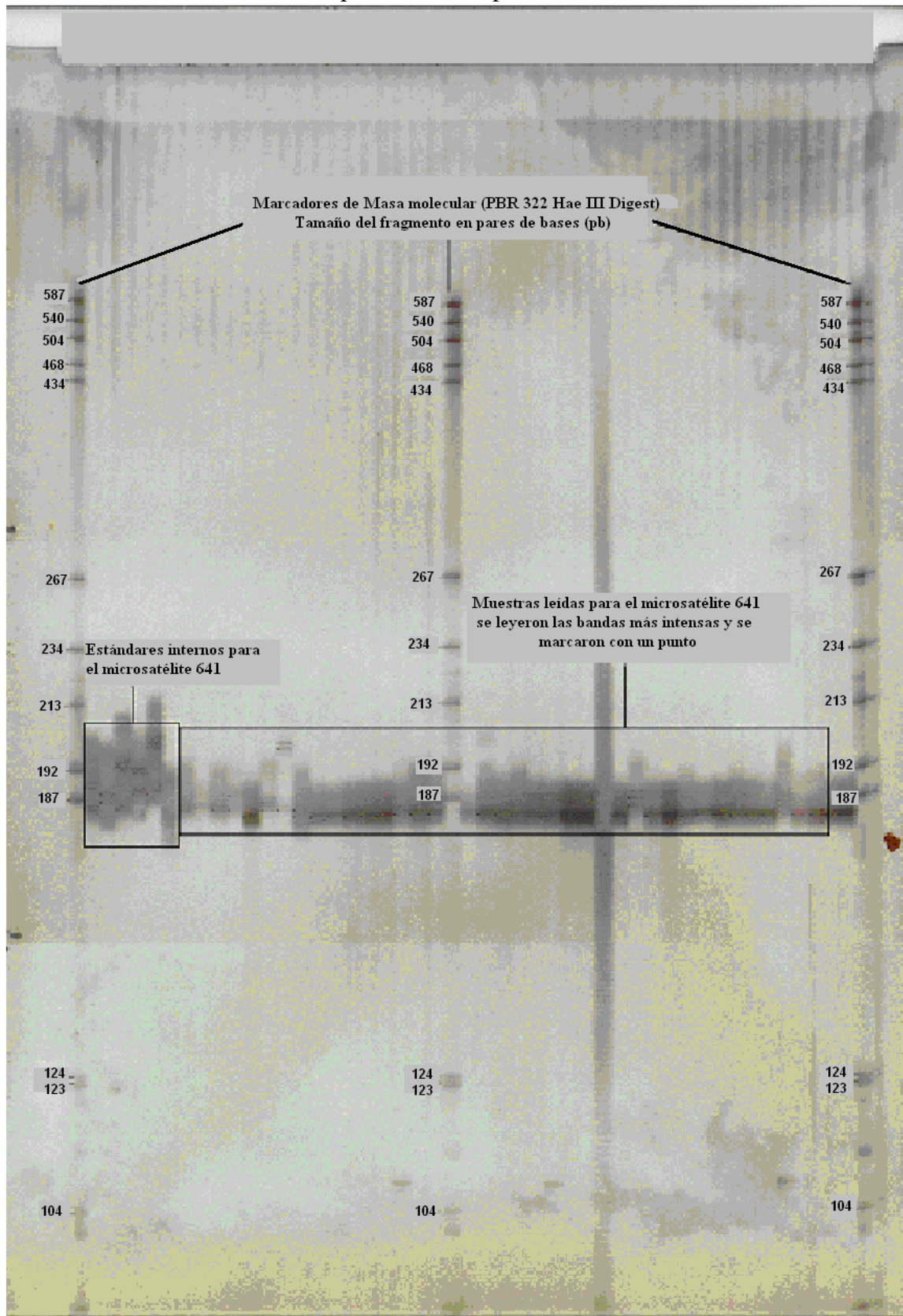
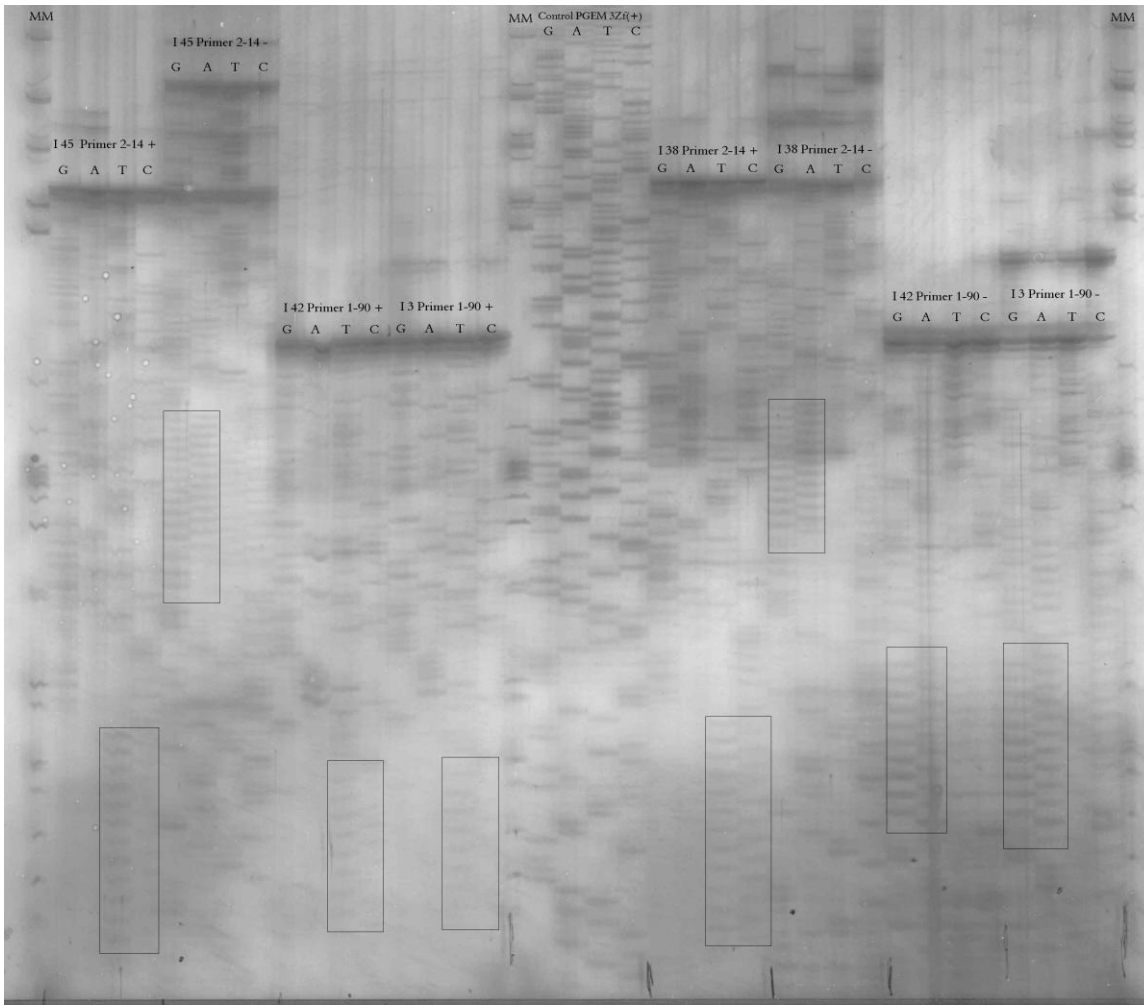


Figura 10
Electroforesis de secuenciación para los microsatélites 1-90 y 2-14



MM es el marcador de masa molecular PBR322 Hae III Digest. Encerrado en rectángulos se observa la secuencia repetitiva CT.

Cuadro 3
 Información general sobre las poblaciones trabajadas

Sitio de recolección	Fecha de recolección	Número de individuos	Individuos que resultaron + para PCR y con alelos identificados							
			1-90		2-14		2-25		6-41	
			PCR +	Genotipo identificado	PCR +	Genotipo identificado	PCR +	Genotipo identificado	PCR +	Genotipo identificado
Panamá		120	117	117	116	116	116	116	119	119
Panamá 1A	23/2/99	60	58	58	59	59	59	59	59	59
Panamá 1B	23/2/99	60	59	59	57	57	57	57	60	60
Venezuela		82	71	71	73	73	79	79	82	82
Puerta Negra	8/99	50	44	44	45	45	47	47	50	50
Magdalena	8/99	32	27	27	28	28	32	32	32	32
Colombia	1991	49	48	48	49	49	49	49	49	49
Cuba	19/5/99	171	169	168	167	167	168	168	167	167

En las poblaciones de mosquitos trabajadas por Mills (2001), los individuos con alelos nulos fueron de 0.63 % para el microsatélite 2-14 y de 1.48 % para el microsatélite 2-25. Esto muestra que en Venezuela hay muchos alelos nulos y como se expone más adelante, esto influye en el porcentaje de homocigosidad y por lo tanto en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

En Cuba, para los microsatélites 1-90, 2-14 y 2-25, se obtuvieron valores más altos en el alelo más frecuente, por lo que pareciera que los individuos fundadores de esa población presentaron adiciones en esos tres loci, en cambio para el microsatélite 6-41 el locus más frecuente era de igual tamaño al de las poblaciones de Centroamérica.

En el Cuadro 4 se observan los alelos obtenidos para las distintas poblaciones (frecuencias absolutas) con el microsatélite 1-90. En el Cuadro 5 se muestran las frecuencias relativas para cada uno de los 15 alelos obtenidos para este microsatélite en las poblaciones de Panamá, Sudamérica y Cuba. Todos los alelos tienen una diferencia en tamaño de aproximadamente 2 pb. Esta diferencia es la esperada, pues estos microsatélites son de repeticiones de dos bases (CT). Según el mecanismo de mutación de las secuencias microsatélites, por deslizamientos en la ADN polimerasa en la secuencia repetitiva del microsatélite, la nueva secuencia aumenta o disminuye sus repeticiones en múltiplos de esta secuencia repetitiva.

La Gráfica 1 representa el histograma de las frecuencias relativas de los alelos del microsatélite 1-90, para todas las poblaciones del estudio³. Esta gráfica se asemeja a dos curvas de distribución normales superpuestas con máximos en los alelos 153.85 y 162.11. El alelo 153.85 es el más frecuente en la mayoría de poblaciones en Centro y Sudamérica, pero el alelo 162.11 es el más frecuente en Cuba, y a esto se debe el aumento de la frecuencia de este alelo en el total de las poblaciones con respecto al análisis realizado por Mills (2001). La curva de esta gráfica presenta una cola en los alelos de mayor masa molecular. Esto indica que hay más mutaciones por adición de repeticiones que por delección.

Se espera que las frecuencias alélicas varíen según la distancia geográfica y por otras barreras en el flujo genético. Por lo que en colectas muy cercanas de mosquitos, las gráficas de frecuencias deberían ser muy similares, ya que hay flujo genético alto. Entre regiones donde el flujo genético es reducido, las frecuencias alélicas van a variar en forma independiente y esto hace que se establezcan grandes diferencias entre las frecuencias de alelos. La correlación entre diferenciación genética y distancia geográfica y su probabilidad de Mantel asociada se discuten más adelante.

³ Para los datos de las poblaciones de México y Centro América, referirse a Mills (2001).

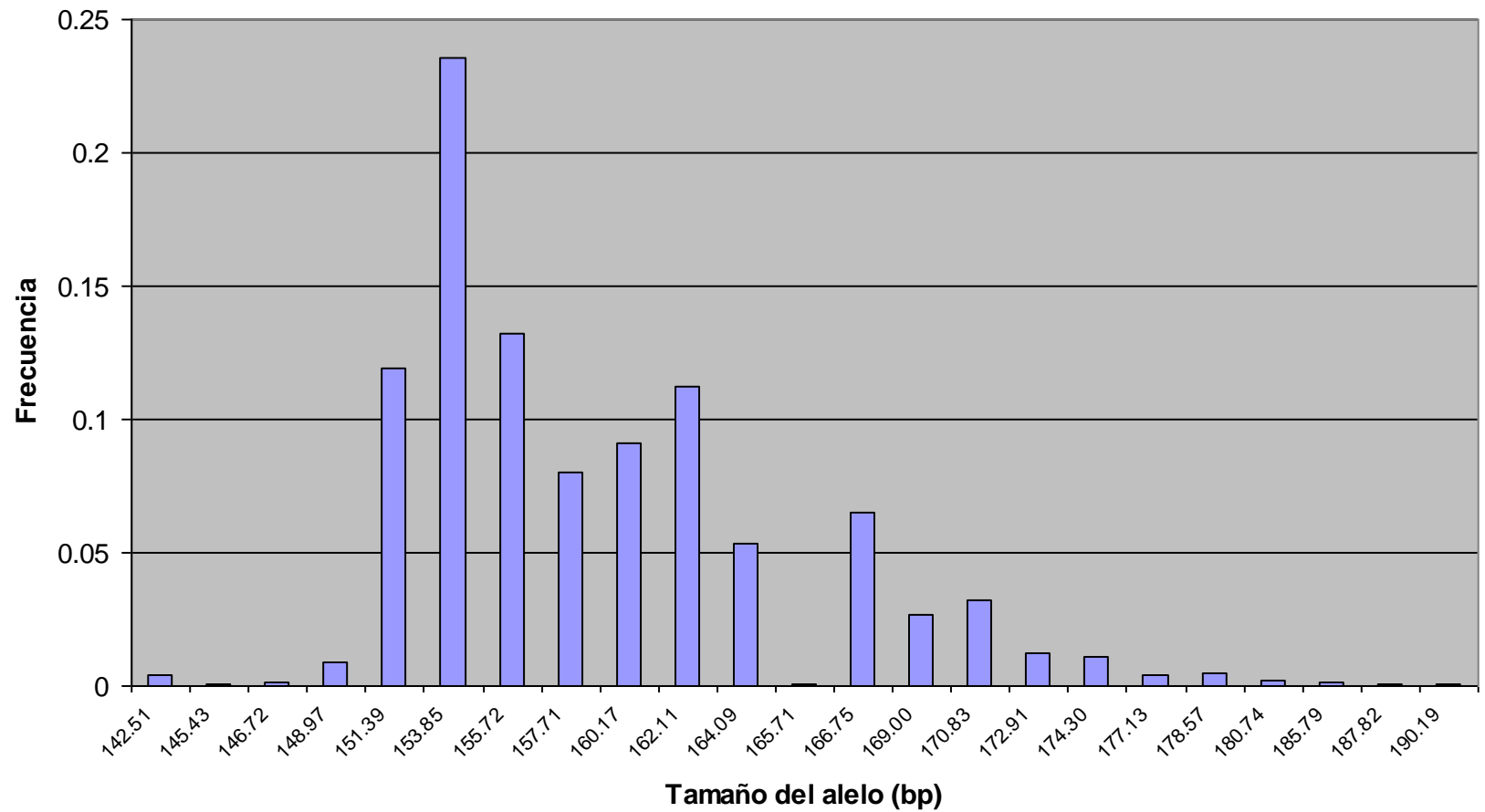
Cuadro 4
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90

Alelos	Poblaciones de Panamá			Poblaciones de Venezuela			Población de Colombia	Población de Cuba
	Panamá 1A	Panamá 1B	Total del país	Puerta Negra	Magdalena	Total del país	Bolívar, El Carmen	La Habana
146.72	-	-	-	2	-	2	-	-
148.97	-	-	-	-	-	-	2	-
151.39	26	21	47	39	27	66	20	19
153.85	37	40	77	29	15	44	25	21
155.72	12	16	28	5	4	9	20	16
157.71	4	3	7	7	4	11	7	2
160.17	7	10	17	4	1	5	3	53
162.11	6	8	14	1	-	1	2	118
164.09	5	6	11	-	-	-	1	40
166.75	6	5	11	-	-	-	5	25
169	6	1	7	1	3	4	3	28
170.83	1	1	2	-	-	-	5	10
172.91	4	5	9	-	-	-	2	1
174.3	-	-	-	-	-	-	1	4
180.74	2	2	4	-	-	-	-	-

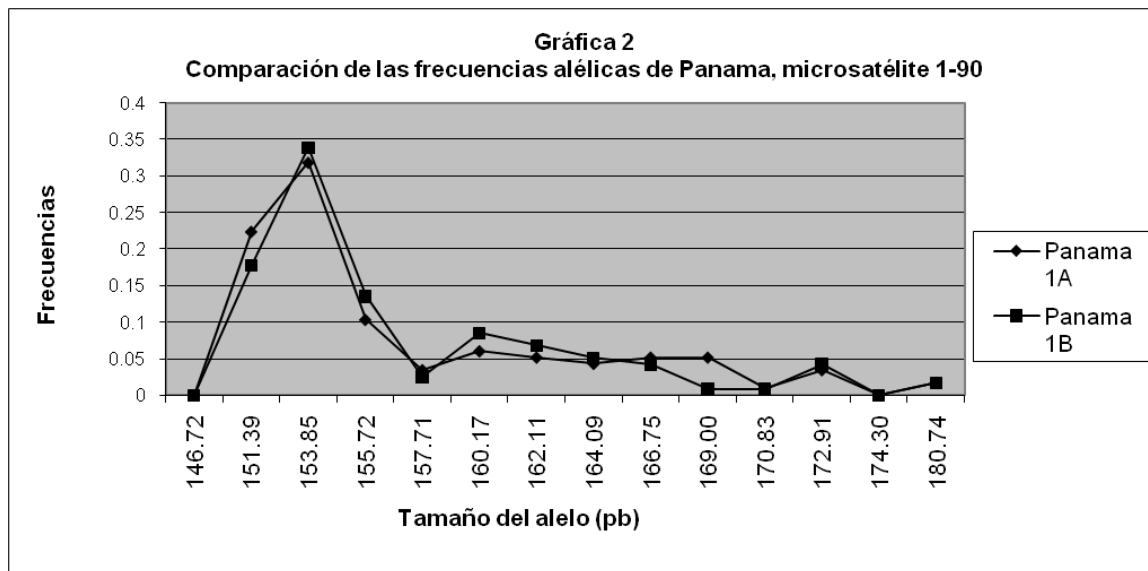
Cuadro 5
Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 1-90

Alelos	Poblaciones de Panamá			Poblaciones de Venezuela			Población de Colombia	Población de Cuba
	Panamá 1A	Panamá 1B	Total del país	Puerta Negra	Magdalena	Total del país	Bolívar, El Carmen	La Habana
146.72	-	-	-	0.023	-	0.014	-	-
148.97	-	-	-	-	-	-	0.021	-
151.39	0.224	0.178	0.201	0.443	0.500	0.465	0.208	0.056
153.85	0.319	0.339	0.329	0.330	0.278	0.310	0.260	0.062
155.72	0.103	0.136	0.120	0.057	0.074	0.063	0.208	0.047
157.71	0.034	0.025	0.030	0.080	0.074	0.077	0.073	0.006
160.17	0.060	0.085	0.073	0.045	0.019	0.035	0.031	0.157
162.11	0.052	0.069	0.060	0.011	-	0.007	0.021	0.350
164.09	0.043	0.051	0.047	-	-	-	0.010	0.119
166.75	0.052	0.042	0.047	-	-	-	0.052	0.074
169	0.052	0.008	0.030	0.011	0.056	0.028	0.031	0.083
170.83	0.009	0.008	0.009	-	-	-	0.052	0.030
172.91	0.034	0.042	0.038	-	-	-	0.021	0.003
174.3	-	-	-	-	-	-	0.010	0.012
180.74	0.017	0.017	0.017	-	-	-	-	-

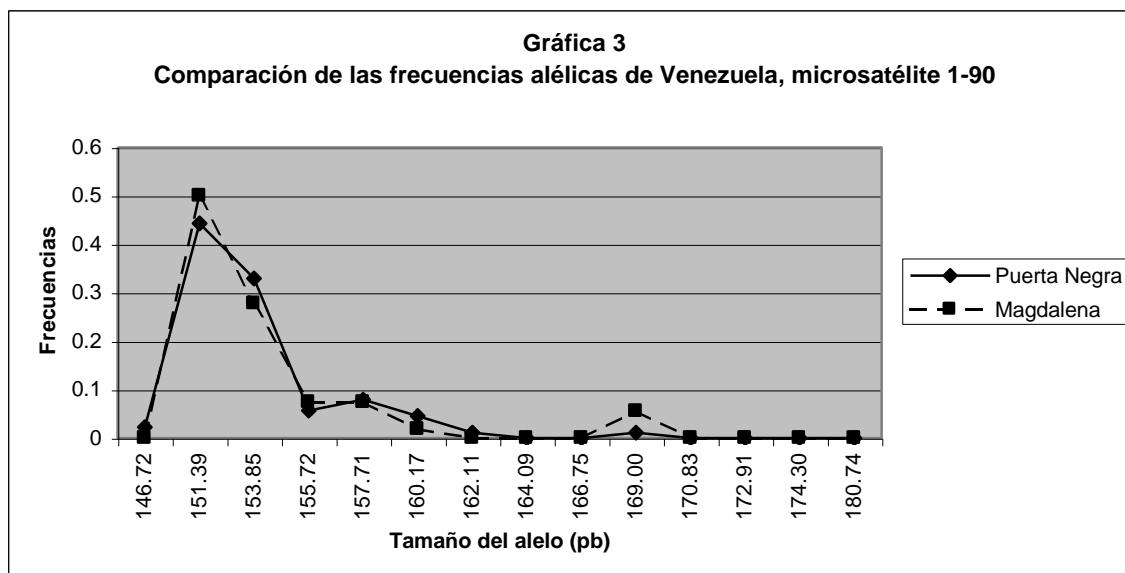
Gráfica 1
Histograma de la frecuencia de alelos obtenidos para
el microsatélite 1-90



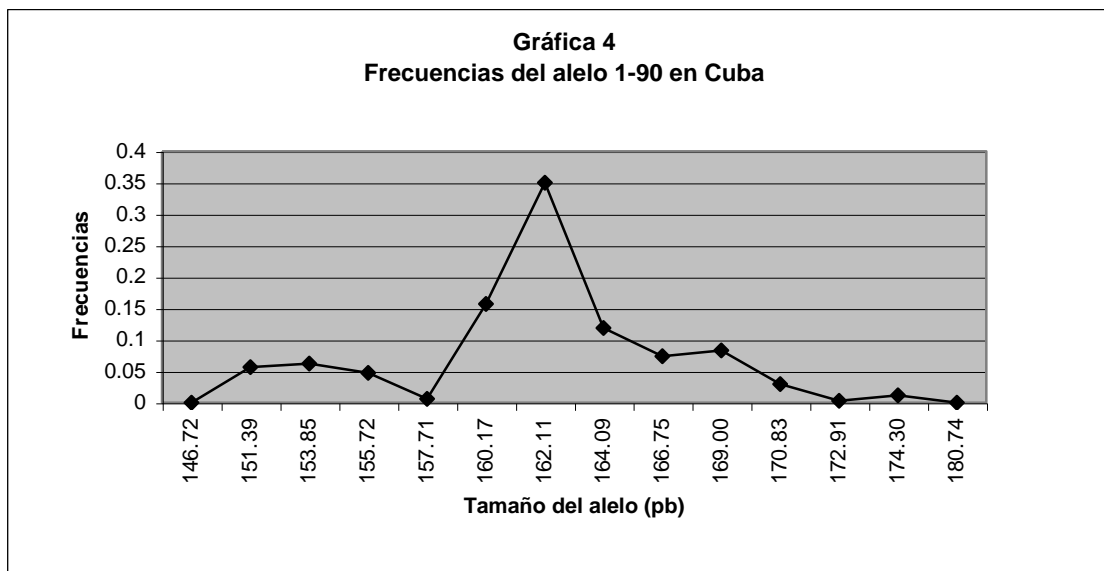
En la Gráfica 2 se muestra el polígono de frecuencias para las dos poblaciones de Panamá. Estas poblaciones están separadas entre sí por 1.5 Km., por lo que se espera que sean muy similares genéticamente. En esta gráfica se observa mucha similitud en las frecuencias de alelos de las dos poblaciones. El alelo más frecuente es el 153.85, que es el más frecuente en el total de las poblaciones.



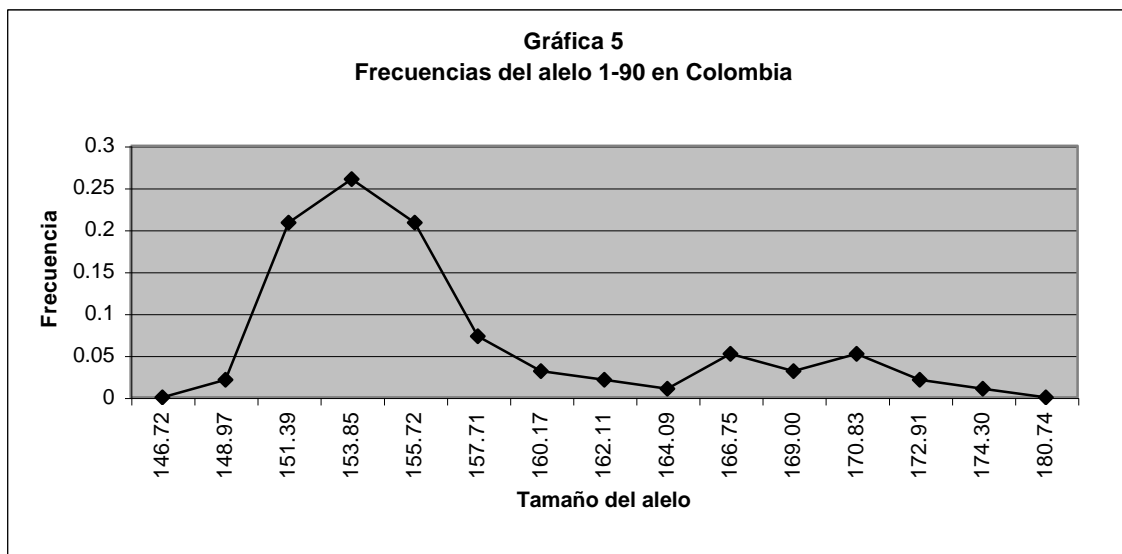
Al igual que en Panamá, en ambas poblaciones de Venezuela (Gráfica 3), se observa similitud en las frecuencias alélicas. El alelo más frecuente es el 151.39, con una alta frecuencia, 0.443 y 0.5 para Puerta Negra y Magdalena, respectivamente. Esta alta frecuencia indica el poco polimorfismo que este microsatélite presenta en esa región.



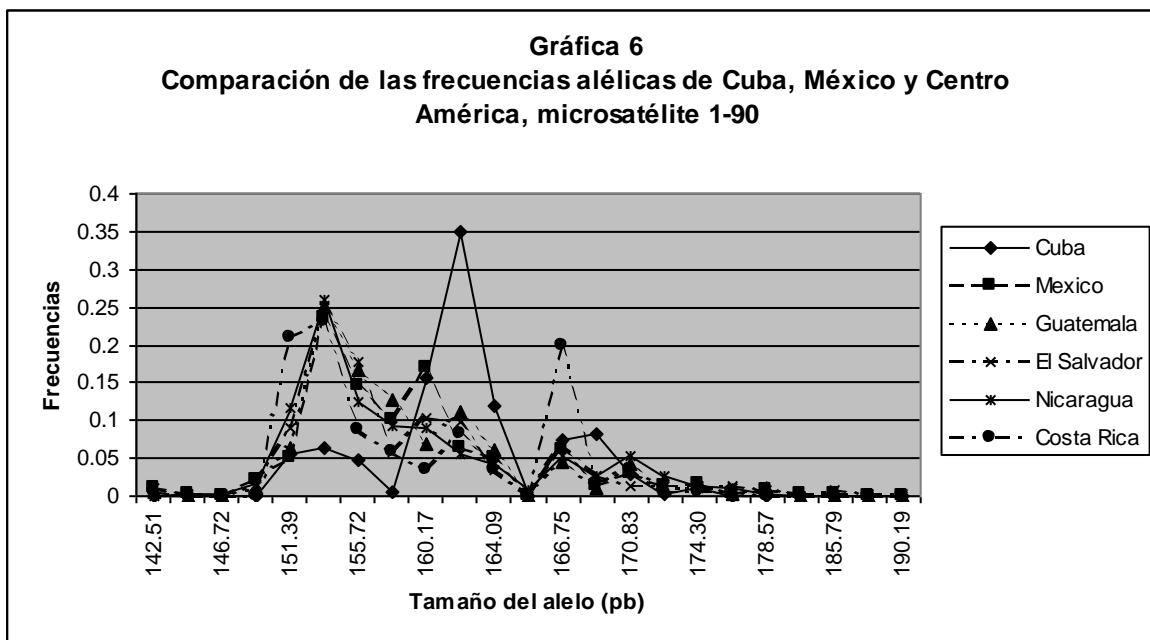
Las frecuencias alélicas de Cuba (Gráfica 4) mostraron alelos de mayor masa molecular que todas las demás poblaciones. El alelo más frecuente es el 162.11. Por lo tanto, esta gráfica se asemeja más a una curva normal, ya que tiene una mayor simetría en sus colas.



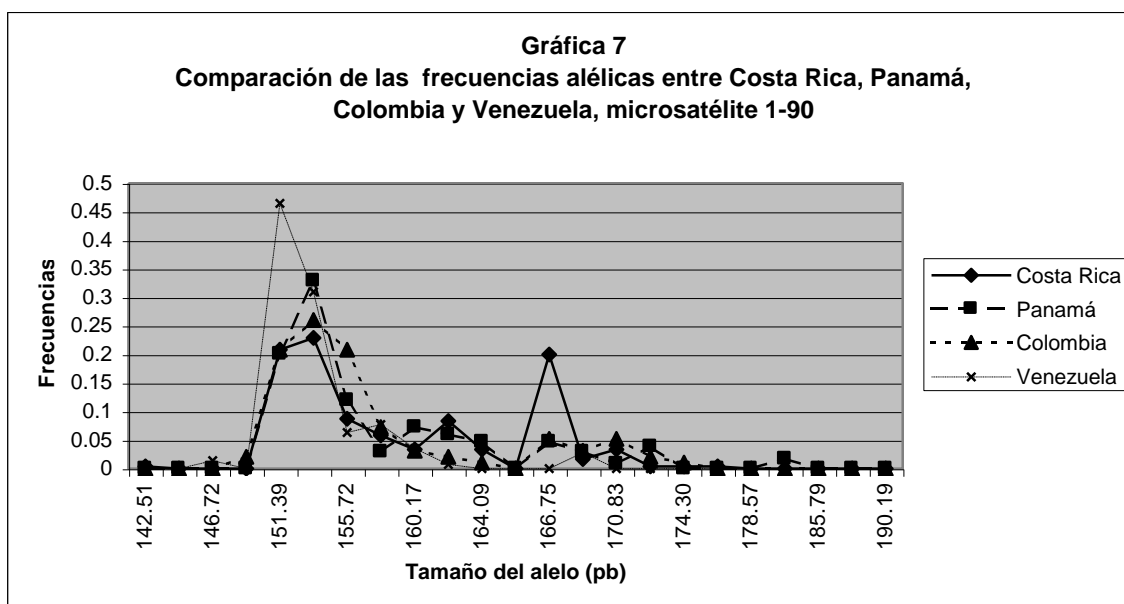
En la Gráfica 5 se muestra el polígono de frecuencias de Colombia. En esta población, el alelo más frecuente es el 153.85. La curva tiene una cola en los alelos de masa molecular alta.



En la Gráfica 6 se comparan las poblaciones de México, Centro América y Cuba. Se observa que hay diferencia en la distribución de alelos entre Cuba y las poblaciones de México y Centro América. El alelo más frecuente en Cuba es el 162.11, en cambio el más frecuente en los demás países es el 153.85. La diferencia entre los alelos es de 8 pb.



Al comparar las frecuencias entre Costa Rica, Panamá y los países de Sudamérica (Gráfica 7) se observa que los patrones de frecuencias son similares, pero las frecuencias de alelos de Costa Rica difieren por presentar una alta frecuencia del alelo 166.75. Adicionalmente, en Venezuela el alelo 151.39 es el más frecuente y no el 153.85 como en Panamá, Colombia y Costa Rica. Como ya se mencionó anteriormente Venezuela presenta poco polimorfismo para este microsatélite.



En los Cuadros 6 y 7 se muestran las frecuencias absolutas y relativas de los alelos para el microsatélite 2-14 obtenidos en las poblaciones de Panamá, Sudamérica y Cuba. En estas poblaciones se identificaron 15 alelos, la mayoría de estos difieren en un tamaño de 2 pb, además no se encontró ningún alelo mutante que difiera en 1 pb.

En la mayoría de poblaciones de Panamá y Sudamérica el alelo más frecuente fue el 200.29, que también es el más frecuente en algunas poblaciones de México y Centro América. En Magdalena, Venezuela, el alelo más frecuente fue el 192.74, el cual tiene baja frecuencia en las poblaciones de México y Centro América. Pero en Panamá y Colombia aumenta y en Venezuela es el más frecuente, y tiene una alta frecuencia relativa (0.459). Las frecuencias alélicas de Cuba también difieren bastante con las de los demás países. El alelo más frecuente en Cuba es el 206.54.

Como se observa en la Gráfica 8, el alelo más frecuente en el total de las poblaciones es el 200.29. Este histograma de frecuencias muestra la forma de una curva de distribución normal, pero al igual que el microsatélite 1-90, también presenta una cola hacia el lado derecho.

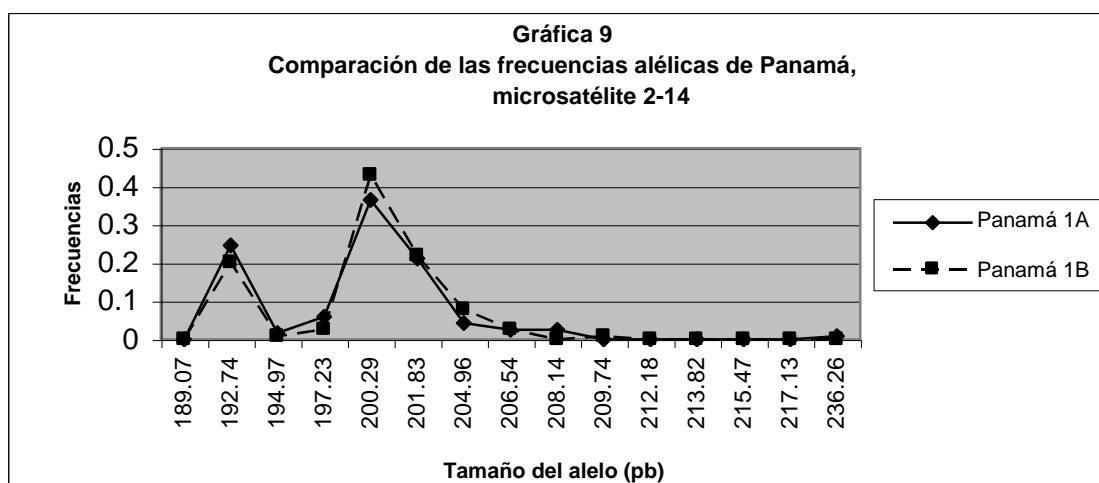
Cuadro 6
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14

Alelos	Poblaciones de Panamá			Poblaciones de Venezuela			Población de Colombia	Población de Cuba
	Panamá 1A	Panamá 1B	Total del país	Puerta Negra	Magdalena	Total del país	Bolívar, El Carmen	La Habana
189.07	-	-	-	-	-	-	-	13
192.74	29	23	52	35	32	67	21	7
194.97	2	1	3	3	-	3	-	2
197.23	7	3	10	1	-	1	4	3
200.29	43	49	92	41	16	57	43	6
201.83	25	25	50	10	6	16	18	21
204.96	5	9	14	-	-	-	7	73
206.54	3	3	6	-	-	-	-	91
208.14	3	0	3	-	-	-	2	45
209.74	-	1	1	-	-	-	2	33
212.18	-	-	-	-	-	-	-	19
213.82	-	-	-	-	2	2	-	14
215.47	-	-	-	-	-	-	1	3
217.13	-	-	-	-	-	-	-	3
236.26	1	-	1	-	-	-	-	1

Cuadro 7
Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-14

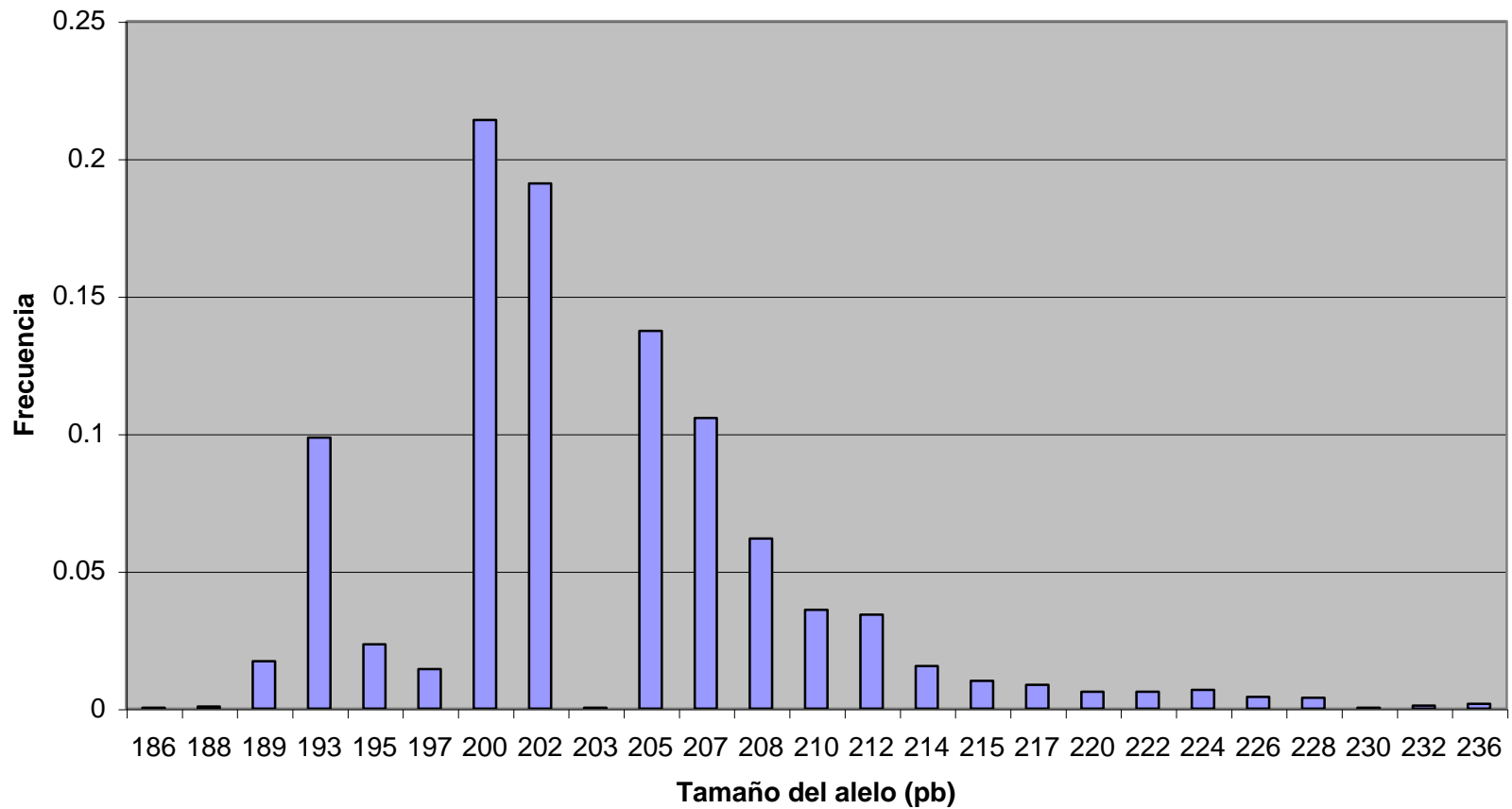
Alelos	Poblaciones de Panamá			Poblaciones de Venezuela			Población de Colombia	Población de Cuba
	Panamá 1A	Panamá 1B	Total del país	Puerta Negra	Magdalena	Total del país	Bolívar, El Carmen	La Habana
189.07	-	-	-	-	-	-	-	0.039
192.74	0.246	0.202	0.224	0.389	0.571	0.459	0.214	0.021
194.97	0.017	0.009	0.012	0.033	-	0.021	-	0.006
197.23	0.059	0.026	0.043	0.011	-	0.007	0.041	0.009
200.29	0.364	0.430	0.397	0.456	0.286	0.390	0.439	0.018
201.83	0.212	0.219	0.216	0.111	0.107	0.110	0.184	0.063
204.96	0.042	0.079	0.060	-	-	-	0.071	0.219
206.54	0.025	0.026	0.026	-	-	-	-	0.273
208.14	0.025	-	0.013	-	-	-	0.020	0.135
209.74	-	0.009	0.004	-	-	-	0.020	0.099
212.18	-	-	-	-	-	-	-	0.057
213.82	-	-	-	-	0.036	0.014	-	0.042
215.47	-	-	-	-	-	-	0.010	0.009
217.13	-	-	-	-	-	-	-	0.009
236.26	0.008	-	0.004	-	-	-	-	0.003

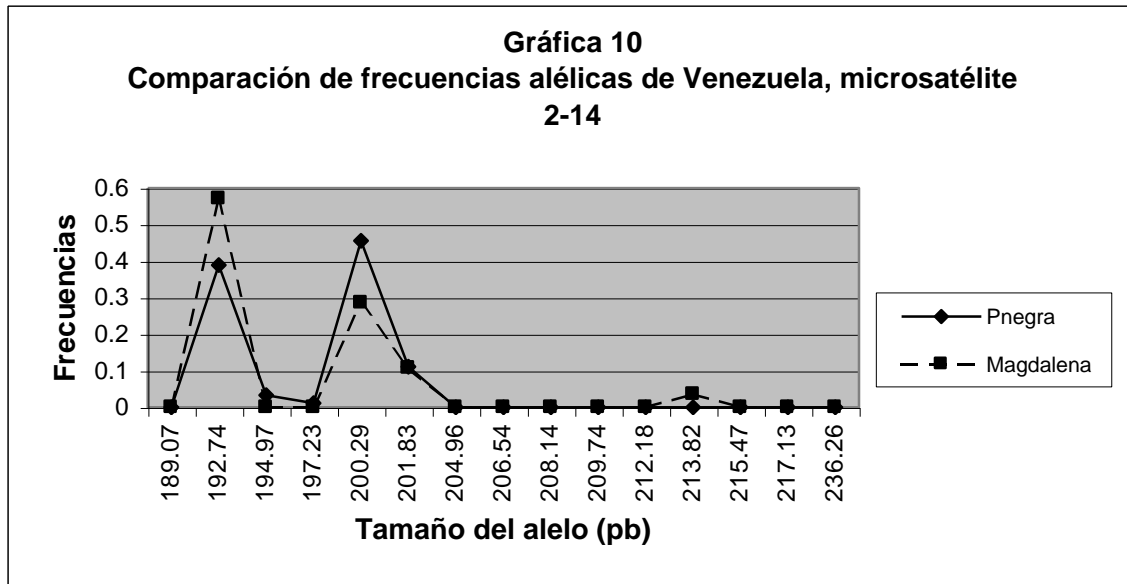
En la Gráfica 9 se observan las distribuciones de frecuencias de alelos, para las poblaciones de Panamá con el microsatélite 2-14. Esta gráfica muestra que hay bastante similitud entre las dos poblaciones. El alelo más frecuente de ambas poblaciones es el 200.29.



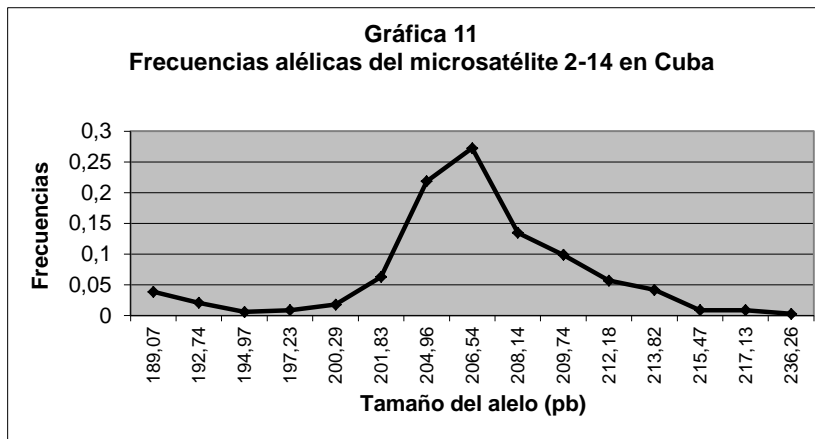
En las poblaciones de Venezuela (Gráfica 10) se observa variación entre las dos poblaciones, Puerta Negra y Magdalena. En Puerta Negra, el alelo más frecuente es el 200.29, pero en Magdalena es más frecuente el 192.74. Algo que es característico de estas poblaciones es el bajo polimorfismo de este microsatélite y la presencia de muchos individuos nulos (11 %).

Gráfica 8
Histograma de la frecuencia de alelos obtenidos para el microsatélite 2-14





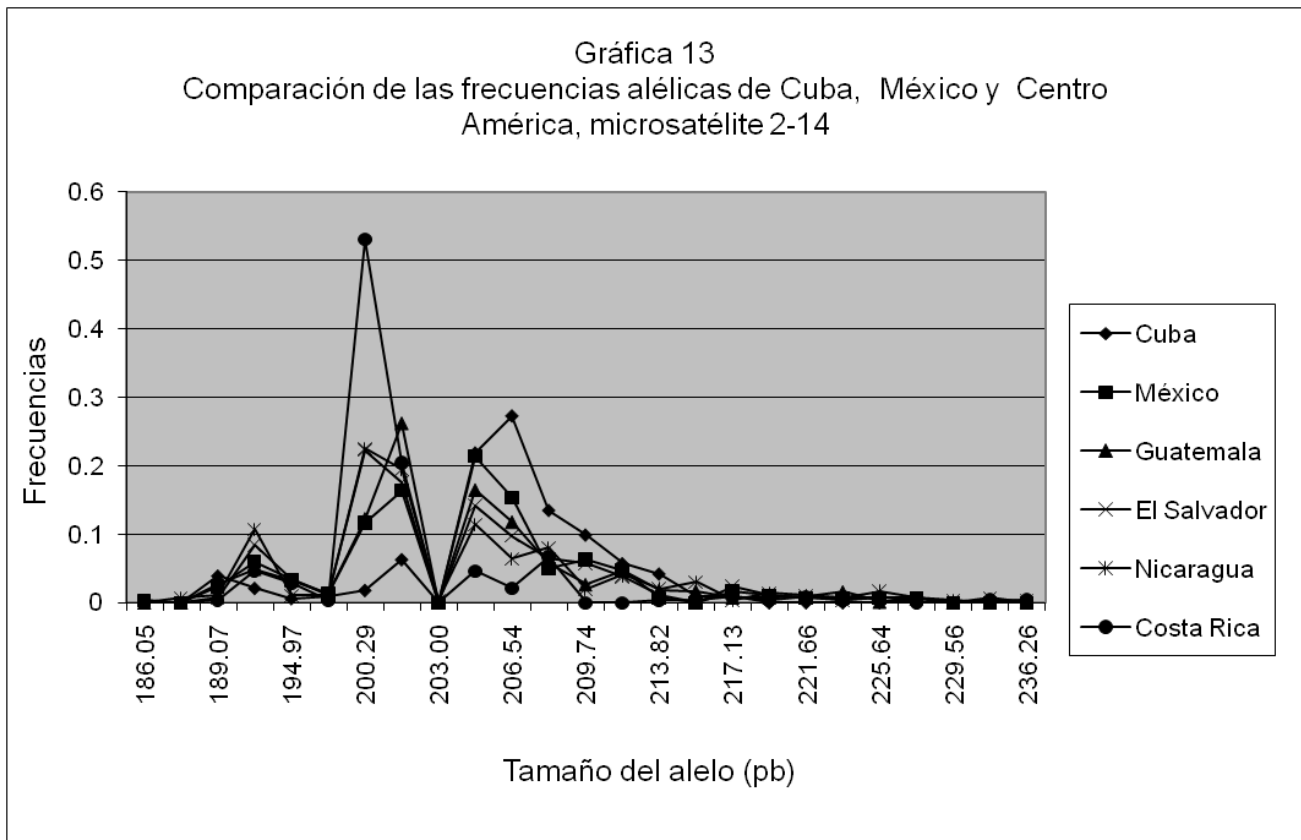
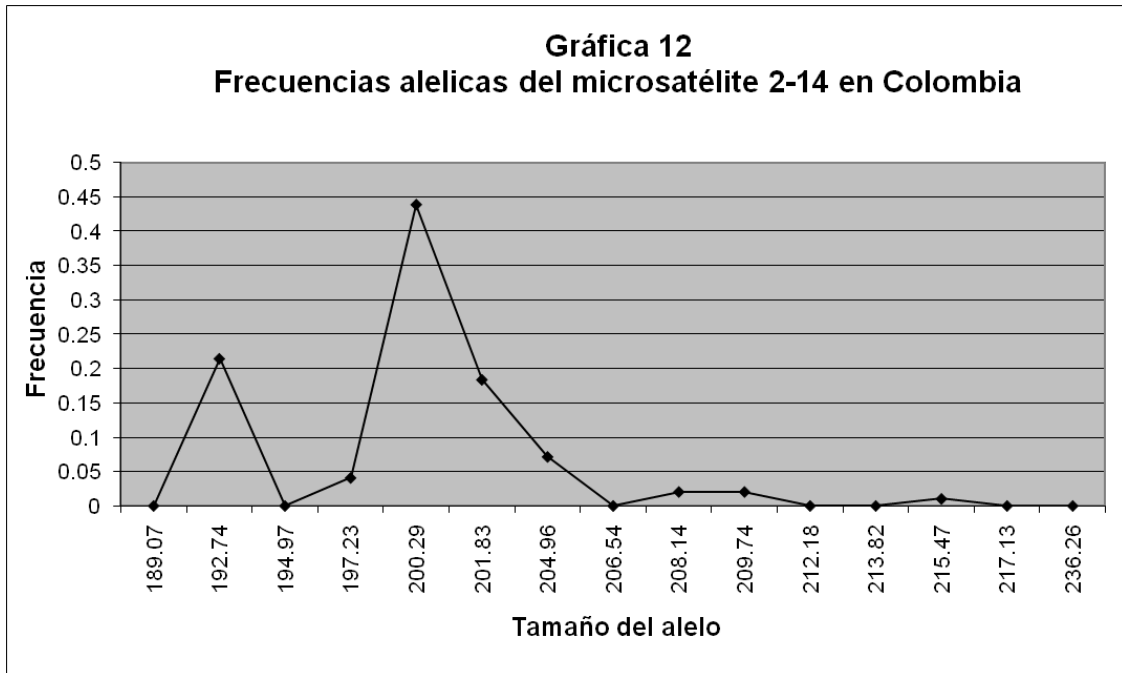
Las frecuencias alélicas para el microsatélite 2-14 en Cuba (Gráfica 11) presentaron una frecuencia máxima en el alelo 206.54. Al igual que para el microsatélite 1-90. Esta curva tiene una mayor simetría comparada con la curva del total de poblaciones y de otras poblaciones.



La Gráfica 12 es el polígono de frecuencias de la población de Colombia. El alelo más frecuente fue el 200.29. Al comparar las distribuciones de las frecuencias alélicas de México, Centro América y Cuba hay diferencia entre Cuba y las poblaciones de México y Centro América (Gráfica 13).

En la Gráfica 14 se comparan las frecuencias alélicas entre Costa Rica, Panamá y los países de Sudamérica. Se nota que los patrones de frecuencias son similares, pues los alelos más frecuentes son el 192.74 y el 200.29. Sin embargo, la frecuencia del alelo 200.29 disminuye en los países de Sudamérica pero la frecuencia del alelo 192.74 aumenta, y como ya se mencionó, el alelo 192.74 es

el más frecuente en Venezuela. Los resultados del microsatélite 2-14 son congruentes con los del 1-90. En ambos microsatélites, la población de Cuba se diferencia de todos los demás países y en Sudamérica, en especial Venezuela, se observa poco polimorfismo y por lo tanto alelos con frecuencias muy altas (hasta 0.5).



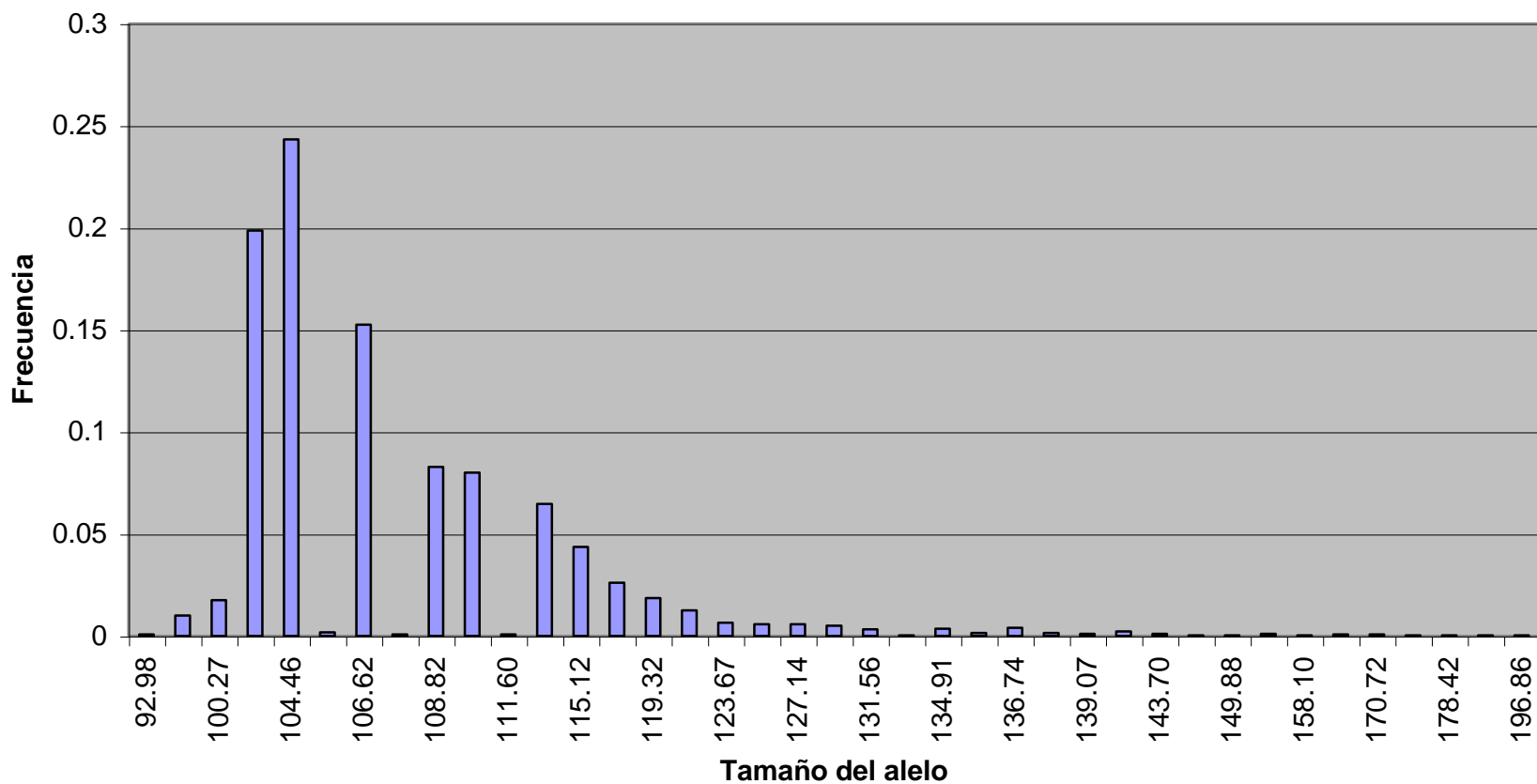
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-25 (continuación)

125.09	-	-	-	-	-	-	-	10
127.14	-	-	-	-	-	-	-	7
129.57	-	-	-	-	-	-	-	3
131.56	-	-	-	-	-	-	-	3
134.91	-	-	-	-	-	-	-	2
135.49	-	-	-	-	-	-	-	1
136.74	-	-	-	-	-	-	-	2
141.42	-	-	-	-	-	-	-	1
143.7	-	-	-	-	-	-	-	1
178.42	1	-	1	-	-	-	-	-

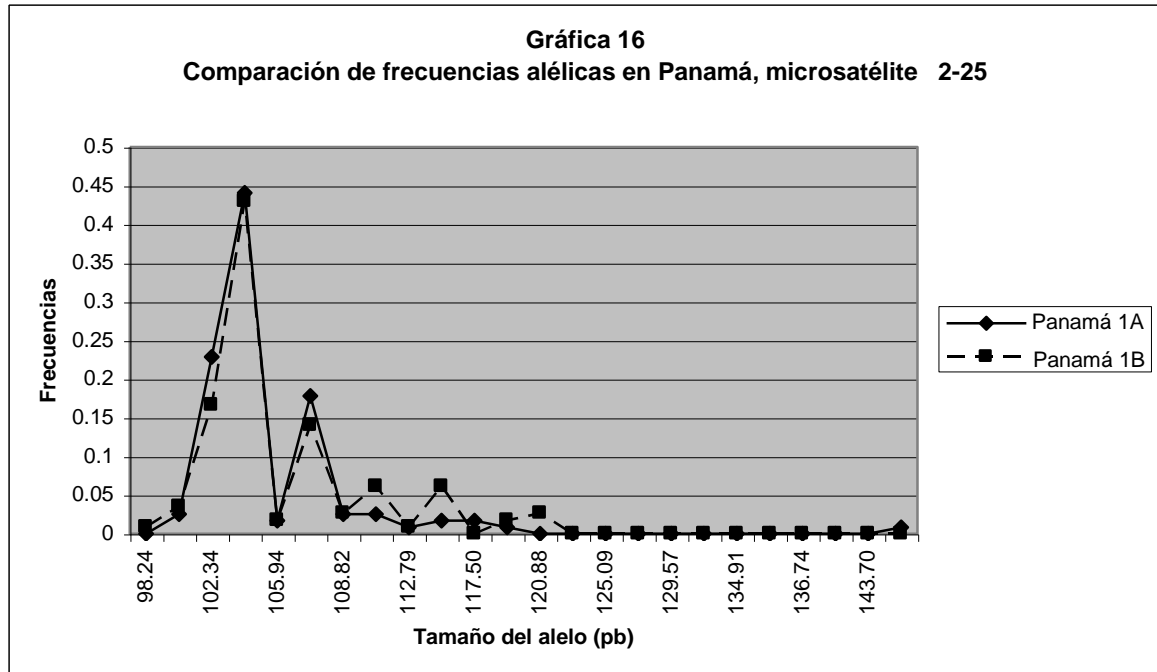
Cuadro 9
Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 2-25

Alelos	Poblaciones de Panamá			Poblaciones de Venezuela			Población de Colombia	Población de Cuba
	Panamá 1A	Panamá 1B	Total del país	Puerta Negra	Magdalena	Total del país	Bolívar, El Carmen	La Habana
98.24	-	0.009	0.004	0.011	-	0.006	0.010	-
100.27	0.025	0.035	0.030	0.043	0.031	0.038	-	-
102.34	0.229	0.167	0.198	-	-	-	0.122	0.042
104.46	0.441	0.430	0.435	0.191	0.031	0.127	0.194	0.027
105.94	0.017	0.018	0.017	-	-	-	0.010	-
106.62	0.178	0.140	0.159	0.457	0.375	0.424	0.276	-
108.82	0.025	0.026	0.026	0.069	0.047	0.057	0.133	0.021
110.5	0.025	0.061	0.043	0.202	0.484	0.316	0.143	0.220
111.6	-	-	-	-	-	-	0.020	-
112.79	0.008	0.009	0.009	-	0.016	0.006	0.041	0.310
115.12	0.017	0.061	0.039	-	-	-	0.020	0.101
117.5	0.017	-	0.009	0.011	0.016	0.013	-	0.051
119.32	0.008	0.018	0.013	0.011	-	0.006	0.020	0.063
120.88	-	0.026	0.013	0.011	-	0.006	0.010	0.060
123.67	-	-	-	-	-	-	-	0.018
125.09	-	-	-	-	-	-	-	0.030
127.14	-	-	-	-	-	-	-	0.021
129.57	-	-	-	-	-	-	-	0.009
131.56	-	-	-	-	-	-	-	0.009
134.91	-	-	-	-	-	-	-	0.006
135.49	-	-	-	-	-	-	-	0.003
136.74	-	-	-	-	-	-	-	0.006
141.42	-	-	-	-	-	-	-	0.003
143.7	-	-	-	-	-	-	-	0.003
178.42	0.008	-	0.004	-	-	-	-	-

Gráfica 15
Histograma de la frecuencia de los alelos obtenidos para el microsatélite 2-25



En la Gráfica 16 se observan las distribuciones de alelos para las poblaciones de Panamá con el microsatélite 2-25. Esta gráfica muestra que hay similitud entre las dos poblaciones. El alelo más frecuente es el 104.46, que presenta una frecuencia relativa de 0.435, lo cual muestra que Panamá no es muy polimórfica para este microsatélite.

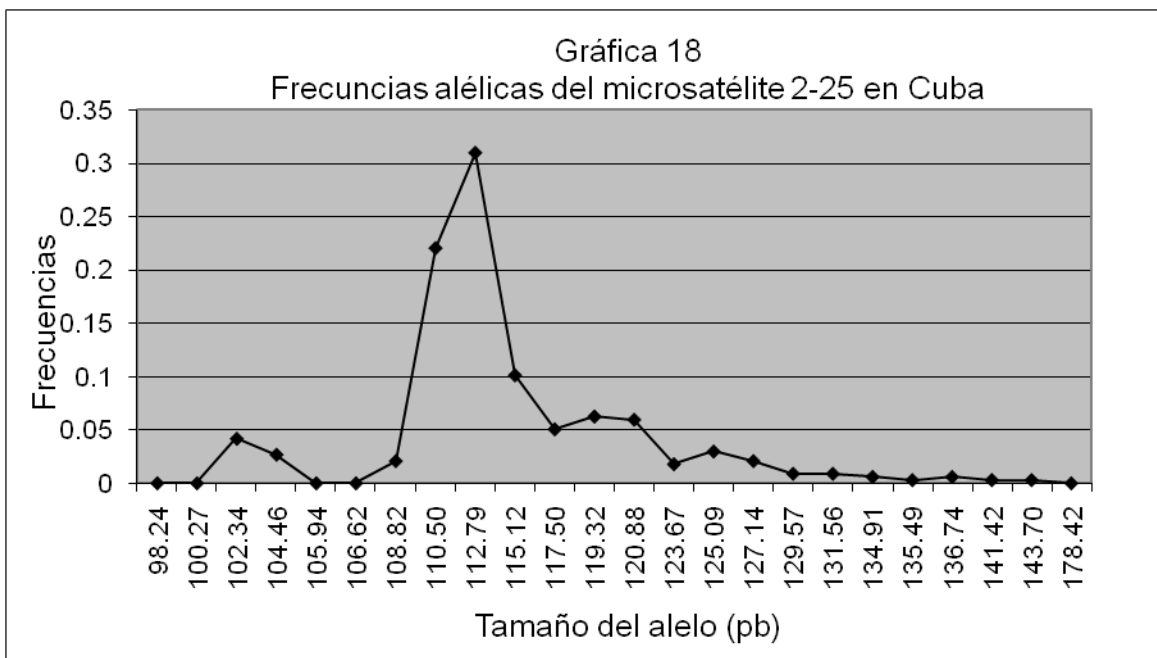
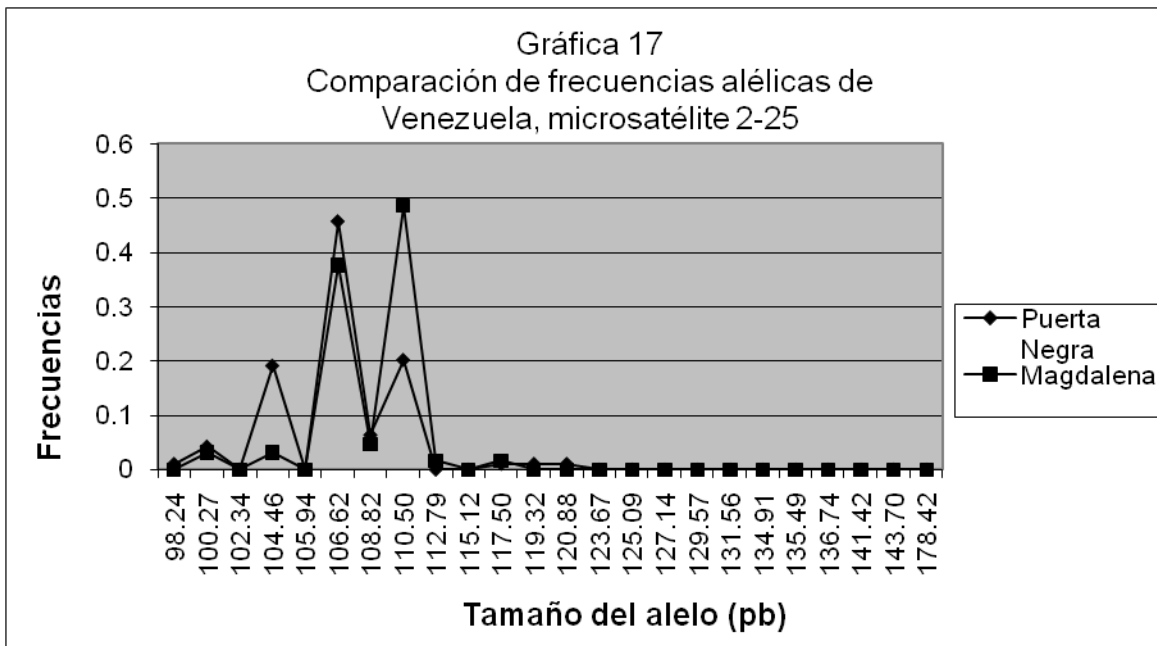


En la Gráfica 17 se muestra el polígono de frecuencias para las poblaciones de Venezuela, en el que se observa cierta variación entre las dos poblaciones: Puerta Negra y Magdalena. En Puerta Negra, el alelo más frecuente es el 106.62; en cambio en Magdalena el alelo más frecuente es el 110.5. Al igual que para los otros microsatélites, Venezuela también muestra poco polimorfismo para este microsatélite.

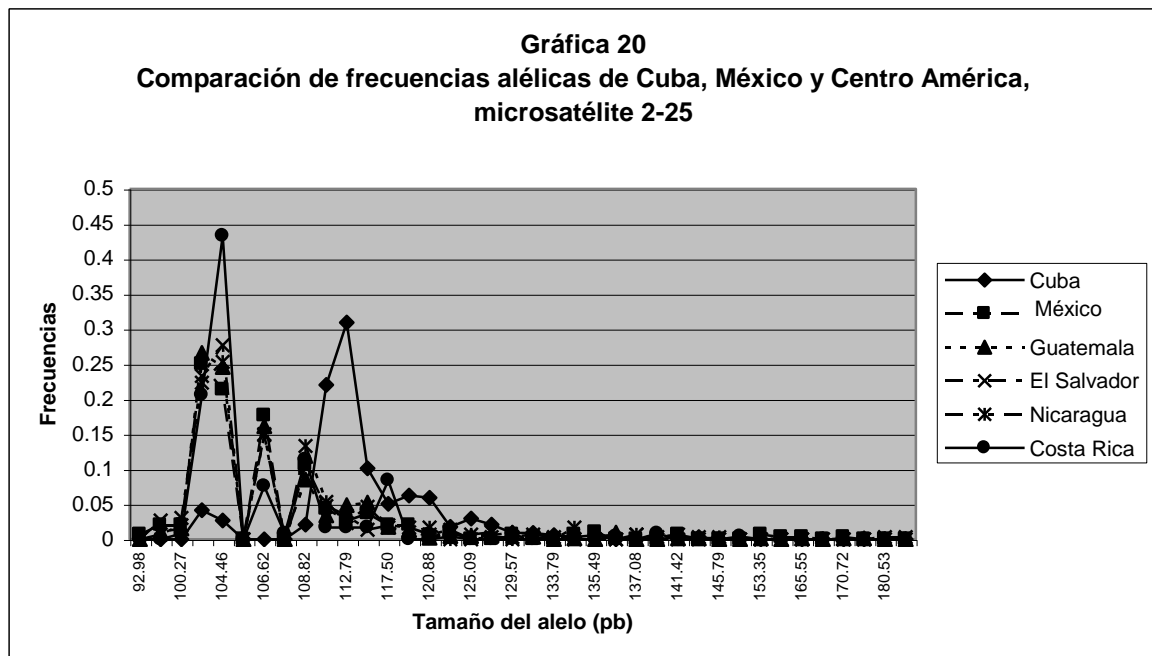
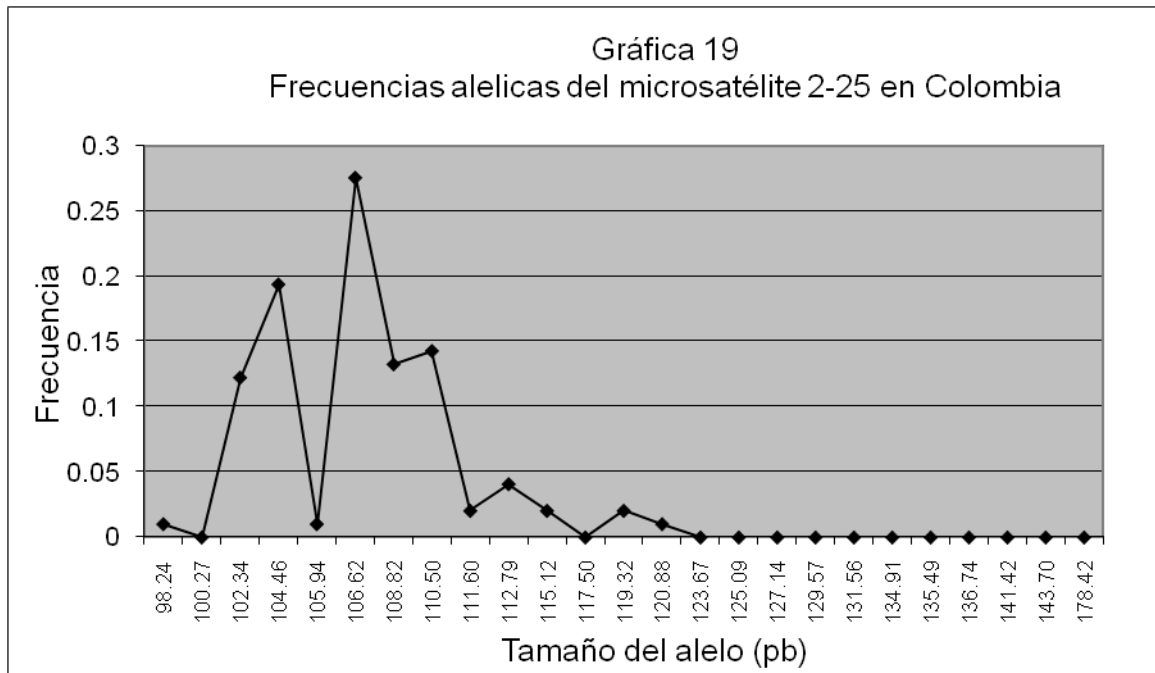
La distribución de frecuencias alélicas de Cuba (Gráfica 18), al igual que para los dos microsatélites anteriores, es bastante diferente, muestra una curva más simétrica, pues el alelo más frecuente es el 112.79. Este microsatélite difiere en aproximadamente 8 pb del microsatélite más frecuente en la población total que es el 104.46. Por lo que los resultados para este microsatélite son consistentes con los resultados de los microsatélites 1-90 y 2-14.

En la población de Colombia (Gráfica 19), se observa que el microsatélite más frecuente es el 106.62. También se observa que esta población es más polimórfica que las de Panamá y Venezuela, pues tiene bastantes alelos con frecuencias relativas bajas.

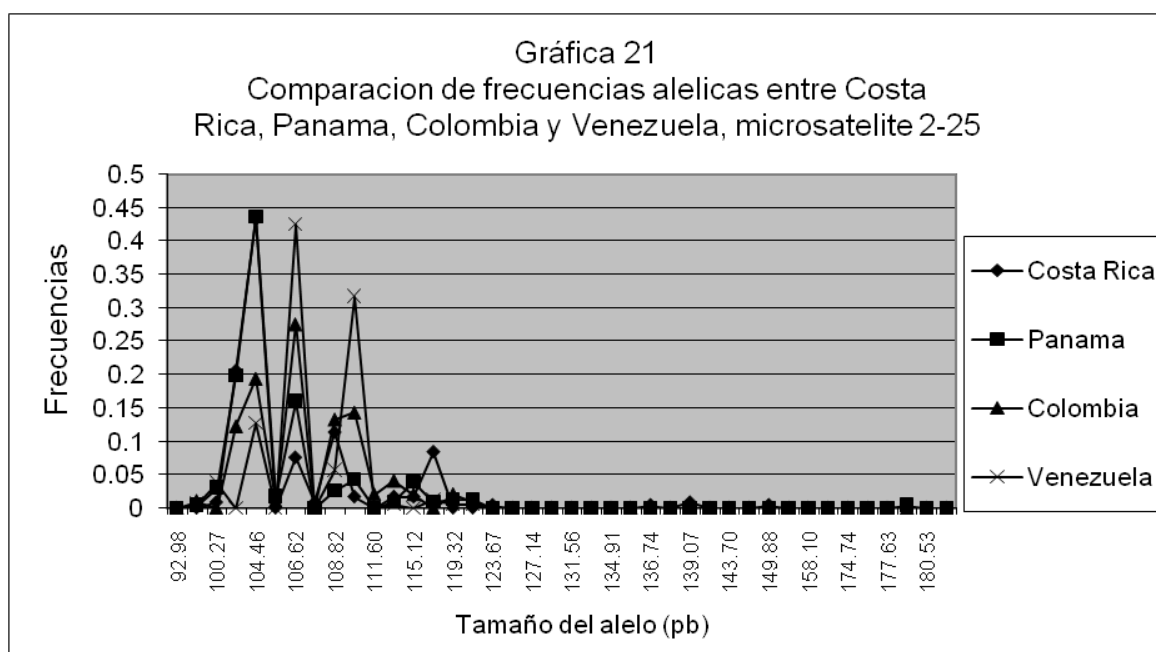
Al comparar las distribuciones de frecuencias de las poblaciones de Cuba, México y Centro América, se encontró diferencia en la distribución de alelos, como se muestra en la Gráfica 20. Las poblaciones de Cuba y Costa Rica son las que más se diferencian del resto de poblaciones. Este resultado es consistente con el obtenido para el microsatélite 2-14.



En la Gráfica 21 se comparan las distribuciones de frecuencias alélicas entre Costa Rica, Panamá y los países de Sudamérica. Se observa que las frecuencias de Panamá y Costa Rica son muy similares y que las de Colombia y Venezuela también son similares, pero difieren bastante en los valores de frecuencia, por lo que la población de Colombia es más polimórfica que la de Venezuela.



En los Cuadros 10 y 11 se muestran las frecuencias absolutas y relativas para los alelos obtenidos en las poblaciones de Panamá, Sudamérica y Cuba para el microsatélite 6-41. El número de alelos para este microsatélite es pequeño, sólo se identificaron 9 alelos en estas poblaciones. La mayoría también difiere en la magnitud esperada de aproximadamente 2 pb.



En la Gráfica 22 se muestra el histograma de frecuencias de los alelos del microsatélite 6-41 para el total de poblaciones del estudio. El alelo más frecuente es el 185.48, con una frecuencia relativa de 0.428. Esta alta frecuencia, comparada con las frecuencias totales de los microsatélites anteriores, indica el bajo polimorfismo para este microsatélite. Se considera que esto se debe a que este locus no tiene una secuencia microsatélite perfecta, sino imperfecta.

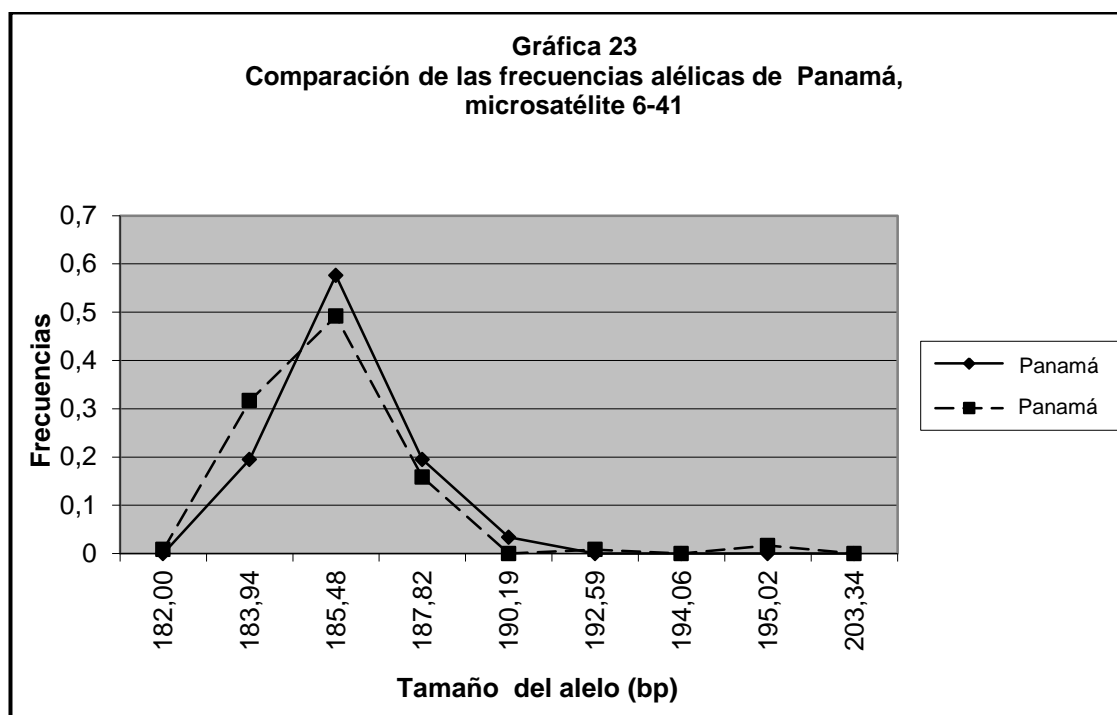
Cuadro 10
Alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41

Alelos	Poblaciones de Panamá			Poblaciones de Venezuela			Población de Colombia	Población de Cuba
	Panamá 1A	Panamá 1B	Total del país	Puerta Negra	Magdalena	Total del país	Bolívar, El Carmen	La Habana
182	-	1	1	1	-	1	-	-
183.94	23	38	61	88	53	141	54	5
185.48	68	59	127	5	8	13	24	214
187.82	23	19	42	3	1	4	19	76
190.19	4	-	4	1	1	2	-	22
192.59	-	1	1	-	-	-	1	11
194.06	-	-	-	-	-	-	-	6
195.02	-	2	2	-	-	-	-	-
203.34	-	-	-	2	1	3	-	-

Cuadro 11
Frecuencia de alelos obtenidos por población con el microsatélite 6-41

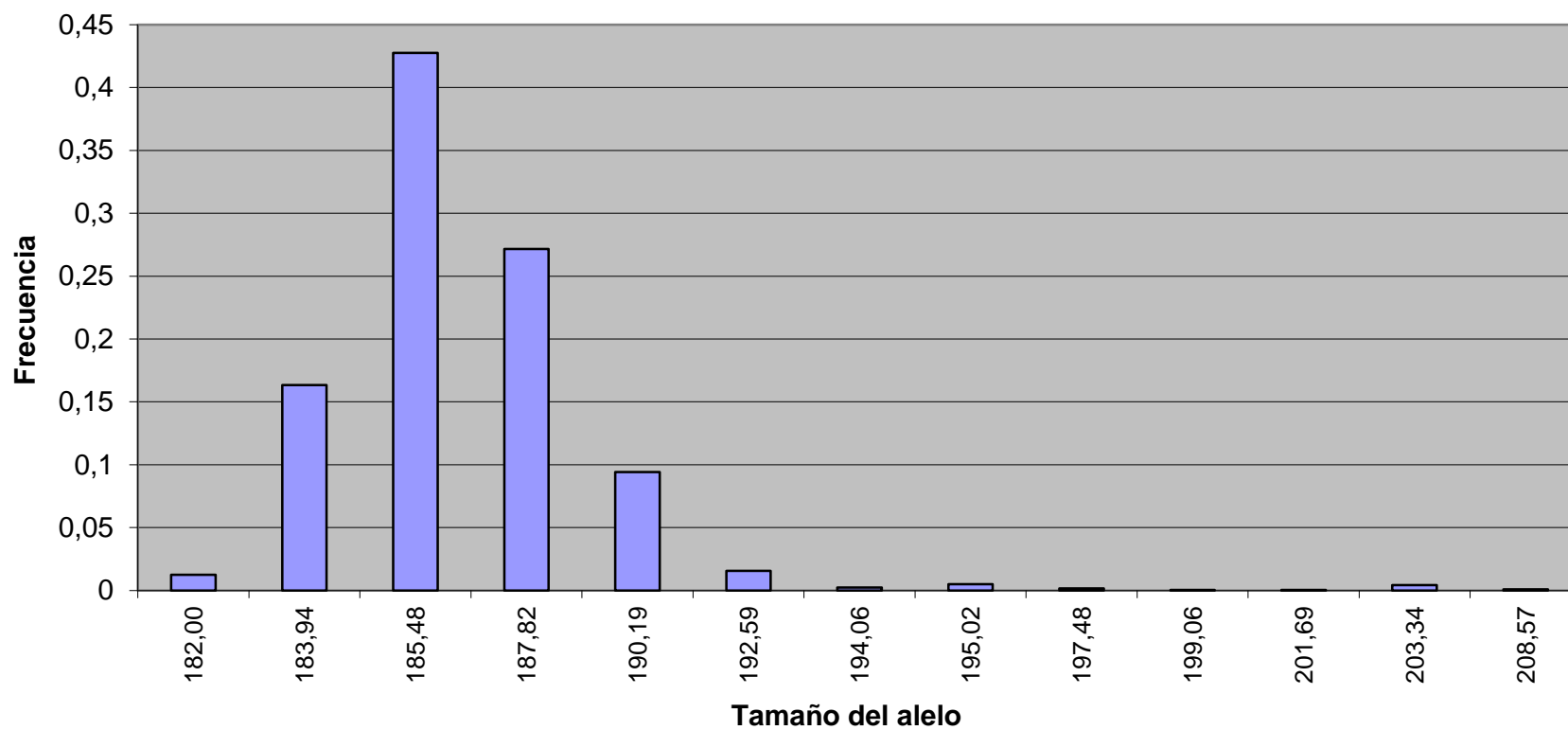
Alelos	Poblaciones de Panamá			Poblaciones de Venezuela			Población de Colombia	Población de Cuba
	Panamá 1A	Panamá 1B	Total del país	Puerta Negra	Magdalena	Total del país	Bolívar, El Carmen	La Habana
182	-	0.008	0.004	0.01	0	0.006	-	-
183.94	0.195	0.317	0.256	0.88	0.828	0.860	0.551	0.015
185.48	0.576	0.492	0.534	0.05	0.125	0.079	0.245	0.641
187.82	0.195	0.158	0.176	0.03	0.016	0.024	0.194	0.228
190.19	0.034	-	0.017	0.01	0.016	0.012	-	0.066
192.59	-	0.008	0.004	-	-	-	0.010	0.033
194.06	-	-	-	-	-	-	-	0.018
195.02	-	0.017	0.008	-	-	-	-	-
203.34	-	-	-	0.02	0.016	0.018	-	-

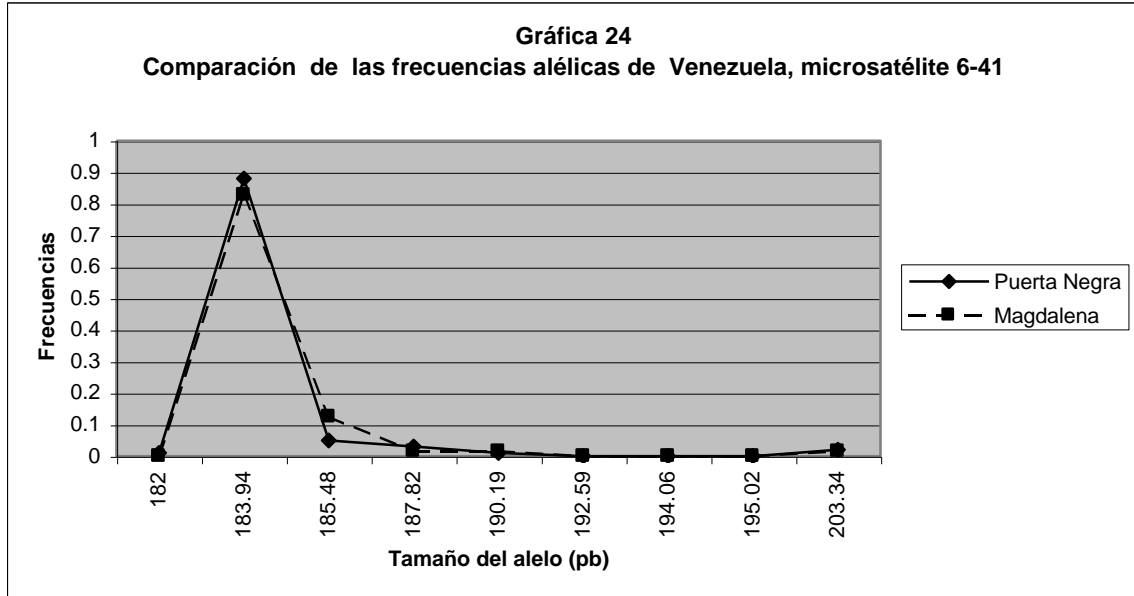
En la Gráfica 23 se observan las distribuciones de las frecuencias de alelos para las poblaciones de Panamá, con el microsatélite 6-41. Esta gráfica muestra que hay similitud entre las dos poblaciones, aunque ésta no es tan marcada como en los otros microsatélites. El alelo más frecuente para estas poblaciones es el 185.48.



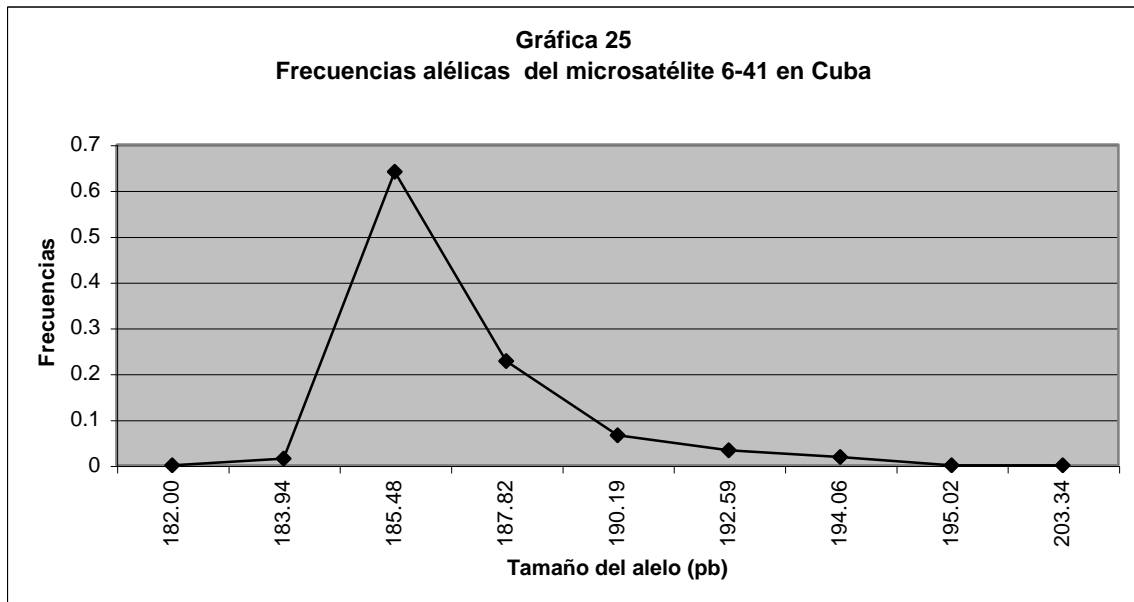
En la Gráfica 24 se muestra el polígono de frecuencias de las poblaciones de Venezuela. Se observa que hay similitud entre las dos poblaciones, Puerta Negra y Magdalena. El alelo más frecuente es el 183.94 y se puede observar que este alelo casi se encuentra fijado en la población, ya que tiene una frecuencia relativa de 0.86. Este resultado de bajo polimorfismo es consistente con los otros microsatélites estudiados. Sin embargo el bajo polimorfismo para este microsatélite en Venezuela se puede deber a la presencia de alelos nulos y por eso la mayoría de individuos son homocigotos y sólo presentan el alelo 183.94.

Gráfica 22
Histograma de la frecuencia de los alelos obtenidos para el microsatélite 6-41

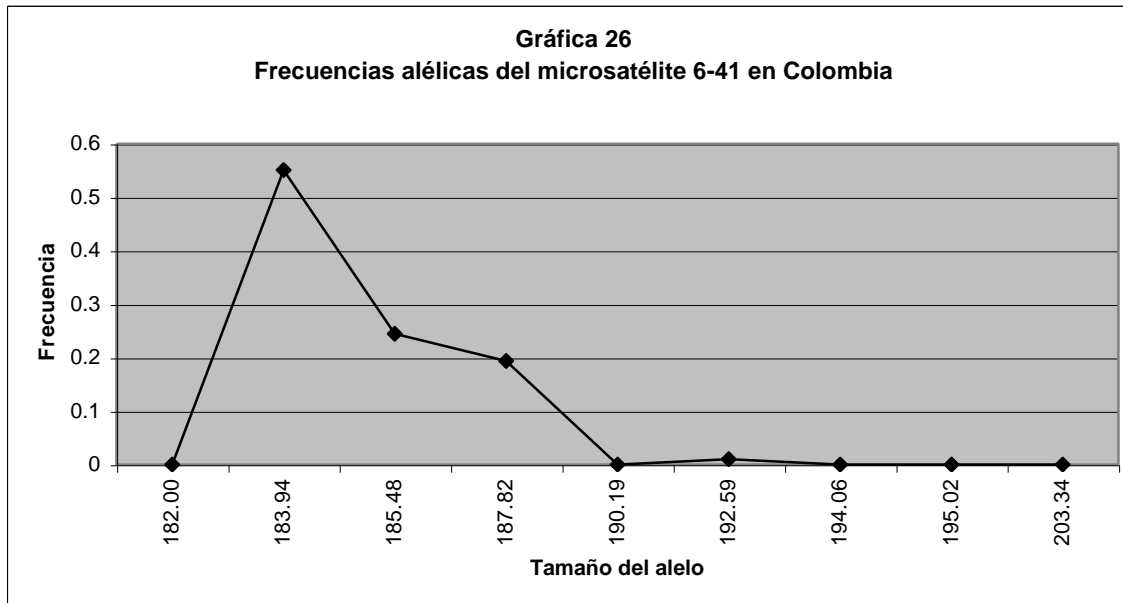




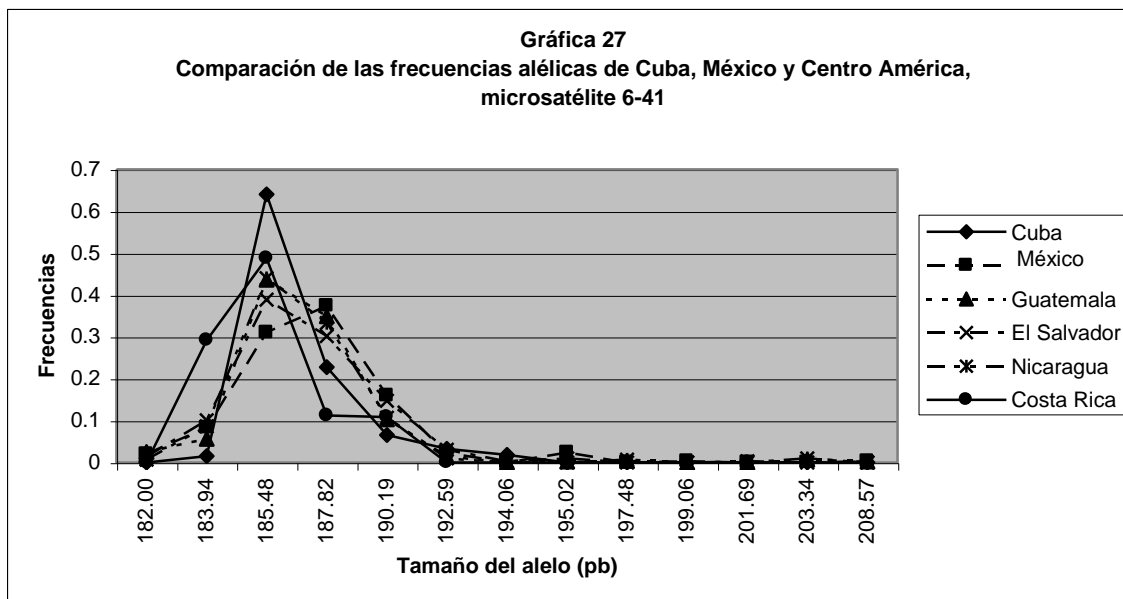
En Cuba (Gráfica 25) se observa que el alelo más frecuente, el 185.48, tiene una frecuencia relativa de 0.641, lo cual es muy alto y demuestra que en Cuba este microsatélite es menos polimórfico que en México y Centro América, en los cuales esta frecuencia no sobrepasa el valor de 0.5. En este caso, también se puede observar simetría en la curva, pero tiene una pequeña cola al lado derecho de la curva.



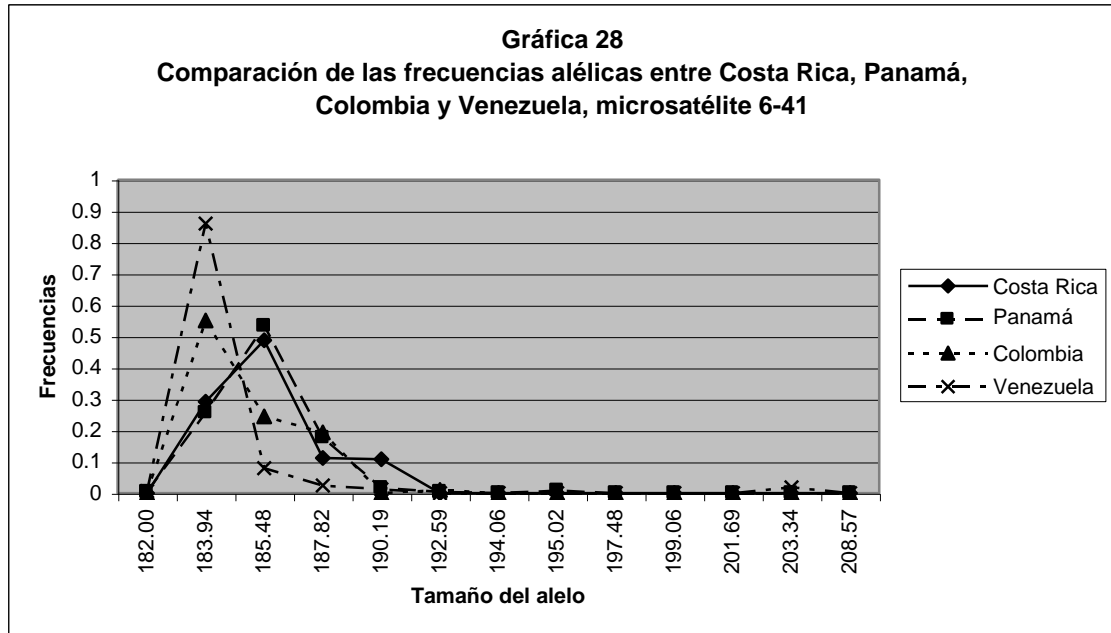
En la Gráfica 26 se muestra el polígono de frecuencias de Colombia. El alelo más frecuente es el 183.94. En esta población también hay bajo polimorfismo, pues sólo tres alelos, el 183.94, 185.48 y 187.82 muestran una frecuencia relativa alta (mayor de 0.2).



En la Gráfica 27 se comparan las frecuencias alélicas del microsatélite 6-41, entre las poblaciones de Cuba, México y Centro América. De nuevo se observa que las gráficas más distintas corresponden a las poblaciones de Costa Rica y Cuba.



En la Gráfica 28 se comparan las frecuencias alélicas de las poblaciones de Costa Rica, Panamá y Sudamérica. Se observa que las frecuencias alélicas de Panamá y Costa Rica son muy parecidas y que las frecuencias de Colombia y Venezuela tienen un patrón similar, pero Venezuela pareciera tener fijado el alelo 183.94. Sin embargo también es posible que esta alta frecuencia relativa sea efecto de alelos nulos en esas poblaciones.



C. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se hizo con el programa para genética de poblaciones Arlequín versión 2.000 (Schneider *et al.*, 2000). Estos análisis consisten en la determinación de los diferentes parámetros de genética de poblaciones descritos en los antecedentes. Estos parámetros permiten definir la estructura genética en las diferentes poblaciones.

El análisis básico es el del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus. Mediante esta prueba estadística, que compara los individuos heterocigotos observados contra los esperados, se puede determinar si hay algún factor que esté afectando a las poblaciones estudiadas. El factor más crítico para que una población esté en equilibrio de Hardy-Weinberg, en este estudio, es el tamaño de la muestra, pues los otros factores que afectan este análisis como la selección, son mínimos debido a que los marcadores microsatélites son neutros.

En el Cuadro 12 se muestran los resultados del análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg para cada población y los cuatro microsatélites estudiados. La mayoría de poblaciones presentaron equilibrio en por lo menos dos loci. Sin embargo, Puerta Negra sólo presentó equilibrio en el microsatélite 6-41 y 1-90.

Las poblaciones de Venezuela no estaban en equilibrio para el microsatélite 6-41, esto se debe posiblemente a la presencia de alelos nulos en estas poblaciones, lo cual se evidencia con la alta homocigosidad y la presencia de un alelo (el 183.94) que pareciera estar fijado, con una frecuencia relativa de 0.86.

Cuadro 12
Análisis de Hardy-Weinberg para las poblaciones estudiadas con cada uno de los
microsatélites

Población	Microsatélite (Valor de P en la prueba de χ^2)				Significancia			
	1-90	2-14	2-25	6-41	1-90	2-14	2-25	6-41
Panamá 1A	0.37751	0.95081	0.06453	0.13753	+	+	+	+
Panamá 1B	0.43539	0.48118	0.03322	0.01306	+	+	-	-
Puerta Negra, Venezuela	0.4933	0.01144	0.27752	0.00039	-	-	+	-
Magdalena, Venezuela	0.90899	0.09278	0.48433	0.00000	+	+	+	-
Colombia	0.46370	0.01785	0.17228	0.07877	+	-	+	+
Cuba	0.08890	0.04941	0.0000	0.90838	+	-	-	+

Un estudio que establece la independencia de cada locus, con respecto a los demás, es el de equilibrio de ligamiento. Los resultados de este estudio, realizado por parejas de loci en cada país, se muestran en el Cuadro 13. La única pareja de loci que mostró equilibrio de ligamiento para todos los países de este estudio fue la del 1-90 con el 2-14. Luego se observa que Venezuela presenta desequilibrio para todas las demás parejas de microsatélites. De nuevo, es probable que este resultado se haya obtenido por la presencia de alelos nulos y el alto porcentaje de homocigosidad en estas poblaciones. Colombia presentó desequilibrio de ligamiento en las parejas de loci 2-14 con 2-25 y 2-14 con 6-41. Este desequilibrio es consistente con el desequilibrio de Hardy-Weinberg. En Panamá hubo desequilibrio de ligamiento en la pareja de loci 2-14 con 6-41; esto concuerda con el desequilibrio de Hardy-Weinberg en la población de Panamá 1B para el microsatélite 6-41. La población de Cuba, a pesar de corresponder en realidad a tres poblaciones mezcladas, no presentó ligamiento para ninguna pareja de loci.

Al analizar las distribuciones de frecuencias alélicas de las diferentes poblaciones, se identificaron grupos que parecían ser distintos genéticamente de las poblaciones de México – Nicaragua. Esto era claro para el caso de Cuba, Costa Rica, Panamá, y Sudamérica. Luego, al analizar la matriz de parejas de F_{st} para el total de las poblaciones (Cuadro 17), se definieron los grupos mostrados en el Cuadro 14, que se agruparon según sus diferencias o similitudes en frecuencias alélicas y en F_{st} por parejas.

En el Cuadro 15 se muestra el resultado del AMOVA realizado entre los 5 grupos definidos anteriormente. De nuevo se observa una gran variación dentro de las poblaciones (89.91 %), pero se observa que hay diferencia genética significativa (variación de 8.55 %) entre estos cinco grupos.

Cuadro 13
Equilibrio de ligamiento de los locus por parejas para los países estudiados

MS	1-90	2-14	2-25	6-41
1-90	-	Todos en equilibrio	Venezuela en desequilibrio	Venezuela en desequilibrio
2-14	Todos en equilibrio	-	Colombia y Venezuela en desequilibrio	Panamá, Colombia y Venezuela en desequilibrio
2-25	Venezuela en desequilibrio	Colombia y Venezuela en desequilibrio	-	Venezuela en desequilibrio
6-41	Venezuela en desequilibrio	Panamá, Colombia y Venezuela en desequilibrio	Venezuela en desequilibrio	-

Cuadro 14
Distribución de los grupos analizados por AMOVA

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
11 Poblaciones Guatemala 3 Poblaciones México 3 Poblaciones El Salvador 3 Poblaciones Nicaragua	Población Cuba	2 Poblaciones Costa Rica 2 Poblaciones Panamá	Población Colombia	2 Poblaciones Venezuela

Cuadro 15
AMOVA de los distintos grupos en Latinoamérica y el Caribe

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	4	254.744	0.14439 Va	8.55
Entre poblaciones dentro de grupos	23	89.531	0.02617 Vb	1.55
Dentro de poblaciones	2794	4244.580	1.51918 Vc	89.91
Total	2821	4588.855	1.68973	

Los valores F de Wright en este análisis también demuestran la diferenciación genética y el restringido flujo genético entre estas cinco regiones estudiadas, ya que el F_{ST} obtenido fue de 0.10094 (Ver Cuadro 16), lo cual corresponde a una diferencia genética moderada, según los criterios establecidos por Hartl (1988).

Cuadro 16
Estadísticos F de Wright

F_{ST}	0.10094
F_{SC}	0.01693
F_{CT}	0.08545

En los Cuadros 17 y 18 se muestran los valores de F_{ST} por parejas de poblaciones. Además en los Cuadros 19 y 20 aparecen los valores de P para cada valor de F_{ST} . En los Cuadros 21 y 22 se muestra la significancia de los valores P obtenidos. En las poblaciones trabajadas por Mills (2001) y Schoua (2000) no hay diferencia genética significativa entre la mayoría de poblaciones de México a Nicaragua, pero se observó diferencia genética significativa entre las poblaciones de Costa Rica y las del grupo México-Nicaragua. En las poblaciones incluidas en este estudio se observa que todas las poblaciones de Panamá, Colombia, Venezuela y Cuba presentan diferencia genética significativa entre sí y con todas las demás poblaciones, a excepción de las dos poblaciones de Panamá que tienen flujo genético entre sí.

Los Cuadros 23 y 24 muestran los valores de migrantes (N_m) entre las parejas de poblaciones. La mayoría de poblaciones tiene un alto valor de migrantes, lo que significa que hay bastante flujo genético; sin embargo, los valores de migrantes de Cuba, Panamá, Colombia y Venezuela son bajos, lo que indica que el flujo genético de estas poblaciones con las de México y Centro América es restringido. Venezuela es el país con menores valores de migrantes, en la mayoría de poblaciones menores a 2. Esto indica que esta población está bastante aislada de las demás poblaciones estudiadas.

En los Cuadros 25 y 26 se muestran los valores de los F_{ST} linearizados, llamados F_{ST} de Slatkin. Esta linearización es una transformación del F_{ST} a la forma $F_{ST}/(1-F_{ST})$. Esta transformación permite hacer otros análisis que determinan la similitud entre las distintas poblaciones el dendrograma (Figura 11), el análisis de correlación con la distancia geográfica y la probabilidad de Mantel. En el dendrograma se observa que las poblaciones de Panamá se agrupan con las de Costa Rica, aunque no son tan similares genéticamente. Además las poblaciones de Colombia, Cuba y las de Venezuela no se agrupan con ninguna otra. Las poblaciones de Venezuela parecen ser las más distintas genéticamente. En esta figura se distinguen claramente las cinco agrupaciones comparadas en el AMOVA.

Estos resultados son similares a los obtenidos con el estudio de ADN mitocondrial realizado por Mérida y colaboradores (1999) quienes trabajaron las mismas poblaciones de mosquitos. En ese estudio se encontraron diferencias entre la población de Panamá con respecto a las de Centro América. Además las poblaciones de Colombia y Venezuela también eran distintas entre sí y con todas las demás poblaciones.

Cuadro 17

Matriz para los valores Fst por parejas de todas las poblaciones estudiadas

	Cuto (GS)	Lauro (GS)	El Mango (GS)	Ruperto (GS)	Tallado (GS)	Champona (GN)	Nahuá (GN)	SLPetén (GN)	SLP Bue (GN)	El Motor (GE)	Pte Blanco (GE)	Cosalapa (MX)	Zapata (MX)	Nva Ind (MX)
Cuto (GS)	0													
Lauro (GS)	0.00467	0												
El Mango (GS)	0.01424	0.00694	0											
Ruperto (GS)	0.03528	0.00573	0.02319	0										
Tallado (GS)	0.00743	-0.00336	0.01551	0.01281	0									
Champona (GN)	0.04968	0.01577	0.03235	0.0258	0.04596	0								
Nahuá (GN)	0.0256	0.01489	0.02817	0.02866	0.02776	0.02403	0							
SLPetén (GN)	0.05317	0.01741	0.0491	0.01952	0.04038	0.00929	0.04146	0						
SLP Bue (GN)	0.03377	0.00779	0.03328	0.01911	0.03177	0.00713	0.01188	0.00702	0					
El Motor (GE)	0.0202	0.0007	0.01976	0.01135	0.01035	0.02562	0.01459	0.02454	0.01387	0				
Pte Blanco (GE)	0.01018	0.01262	0.01777	0.03309	0.01973	0.04611	0.01431	0.0605	0.02333	0.01858	0			
Cosalapa (MX)	0.02809	0.00304	0.01166	0.00806	0.0179	0.01202	0.0255	0.02027	0.02125	0.01236	0.02487	0		
Zapata (MX)	0.023	0.00929	0.01306	0.02337	0.0307	0.01333	0.01923	0.02866	0.01762	0.01904	0.02141	0.00509	0	
Nva Ind (MX)	0.02559	0.00709	0.00456	0.01863	0.01982	0.01933	0.01909	0.03753	0.02573	0.01191	0.02112	0.00475	0.01295	0
Sn Alfredo (ES)	0.01187	0.00553	0.01073	0.02542	0.02296	0.02844	0.02221	0.04513	0.01965	0.0163	0.00412	0.01279	0.00555	0.01066
Sn Diego (ES)	0.02923	0.00856	0.00631	0.01601	0.02489	0.02108	0.01677	0.0378	0.02207	0.01146	0.02453	0.00543	0.00506	0.00736
Sta Lucía (ES)	0.00091	-0.00182	0.00449	0.01735	0.00329	0.03348	0.0195	0.03506	0.01904	0.00592	0.00542	0.01201	0.01409	0.01139
Corral 1 (NI)	0.01338	-0.00221	0.00704	0.01104	0.01254	0.0176	0.02036	0.02527	0.01234	0.0071	0.01275	0.00524	0.00584	0.01045
Corral 2 (NI)	0.01157	0.00058	0.00823	0.0193	0.01694	0.03259	0.02743	0.04021	0.01859	0.01241	0.00721	0.01412	0.01433	0.01331
Corral 3 (NI)	0.00849	-0.00404	0.0077	0.01474	0.00785	0.02144	0.02102	0.02612	0.01068	0.00672	0.01045	0.01171	0.01166	0.00971
Bananito (CR)	0.03083	0.04023	0.03937	0.06631	0.04471	0.08945	0.063	0.09692	0.06601	0.0558	0.03541	0.06236	0.05319	0.06367
Batán (CR)	0.06407	0.08137	0.06055	0.11066	0.08906	0.12857	0.10748	0.14495	0.10897	0.09135	0.0653	0.10303	0.08669	0.09402
Panamá 1A	0.03896	0.03649	0.04261	0.05337	0.04214	0.08763	0.07611	0.09085	0.06487	0.0441	0.0366	0.0593	0.06301	0.05814
Panamá 1B	0.04309	0.04679	0.03583	0.06079	0.05187	0.09258	0.08001	0.10053	0.07241	0.05257	0.04067	0.06193	0.06452	0.05633
P Negra (VE)	0.23344	0.24504	0.17686	0.23157	0.25259	0.24558	0.26774	0.27721	0.26708	0.22677	0.2335	0.21562	0.2187	0.19422
Magdalena (VE)	0.24154	0.25067	0.19525	0.23322	0.25374	0.25086	0.26871	0.27411	0.26785	0.2281	0.23811	0.21606	0.226	0.20028
Colombia	0.08782	0.08871	0.04619	0.09922	0.10305	0.10212	0.10031	0.12148	0.09369	0.08745	0.07814	0.08567	0.08101	0.07144
Cuba	0.08043	0.07456	0.09866	0.09457	0.07688	0.10793	0.07455	0.10646	0.09059	0.08679	0.08073	0.0826	0.09516	0.07685

Cuadro 18

Matriz para los valores Fst por parejas de todas las poblaciones estudiadas (continuación)

	Sn Alfredo (ES)	Sn Diego (ES)	Sta Lucía (ES)	Corral 1 (NI)	Corral 2 (NI)	Corral 3 (NI)	Bananito (CR)	Batán (CR)	Panamá 1A	Panamá 1B	P Negra (VE)	Magdalena (VE)	Colombia	Cuba
Cuto (GS)														
Lauro (GS)														
El Mango (GS)														
Ruperto (GS)														
Tallado (GS)														
Champona (GN)														
Nahuá (GN)														
SLPetén (GN)														
SLP Bue (GN)														
El Motor (GE)														
Pte Blanco (GE)														
Cosalapa (MX)														
Zapata (MX)														
Nva Ind (MX)														
Sn Alfredo (ES)	0													
Sn Diego (ES)	0.0113	0												
Sta Lucía (ES)	0.00096	0.01072	0											
Corral 1 (NI)	-0.00085	0.005	0.00053	0										
Corral 2 (NI)	-0.00221	0.01033	0.00071	-0.0024	0									
Corral 3 (NI)	0.00064	0.01328	-0.00128	-0.00139	-0.00114	0								
Bananito (CR)	0.02321	0.05076	0.02246	0.02898	0.02695	0.03071	0							
Batán (CR)	0.04751	0.08444	0.04956	0.06172	0.0554	0.0591	0.01618	0						
Panamá 1A	0.02393	0.04921	0.01994	0.02646	0.01783	0.0278	0.02189	0.03099	0					
Panamá 1B	0.02573	0.04992	0.02203	0.03171	0.02297	0.03078	0.01862	0.02144	-0.00024	0				
P Negra (VE)	0.19064	0.19398	0.19212	0.1915	0.19106	0.19237	0.18732	0.15884	0.16951	0.13981	0			
Magdalena (VE)	0.20183	0.19959	0.201	0.19677	0.19703	0.19763	0.21112	0.20228	0.18834	0.16598	0.03192	0		
Colombia	0.05587	0.06684	0.05955	0.05994	0.05494	0.0607	0.06121	0.05037	0.05259	0.03007	0.0494	0.07508	0	
Cuba	0.08156	0.09221	0.07975	0.08285	0.08816	0.08257	0.12002	0.17197	0.13287	0.13344	0.28249	0.26118	0.16783	0

Cuadro 23
Matriz de valores de migrantes (Nm)

	Cuto (GS)	Lauro (GS)	El Mango (GS)	Ruperto (GS)	Tallado (GS)	Champona (GN)	Nahuá (GN)	SLPetén (GN)	SLP Bue (GN)	El Motor (GE)	Pte Blanco (GE)	Cosalapa (MX)	Zapata (MX)	Nva Ind (MX)
Cuto (GS)														
Lauro (GS)	106.48563													
El Mango (GS)	34.61395	71.50929												
Ruperto (GS)	13.67413	86.75648	21.06429											
Tallado (GS)	66.7779	∞	31.73663	38.51782										
Champon (GN)	9.56375	31.2145	14.95493	18.87829	10.37824									
Nahuá (GN)	19.02997	33.0829	17.25041	16.94654	17.51292	20.31118								
SLPetén (GN)	8.90453	28.22322	9.68253	25.11202	11.88377	53.29489	11.55905							
SLP Bue (GN)	14.30394	63.64694	14.52551	25.65801	15.23866	69.58836	41.58934	70.77171						
El Motor (GE)	24.25604	711.78906	24.80903	43.54969	47.80402	19.01257	33.76861	19.87705	35.54491					
Pte Blanco (GE)	48.6088	39.10661	27.63636	14.61121	24.843	10.34401	34.43341	7.76423	20.92838	26.41146				
Cosalapa (MX)	17.29896	163.86296	42.37708	61.52524	27.43395	41.10682	19.10763	24.1635	23.03448	39.94894	19.60855			
Zapata (MX)	21.23727	53.31886	37.79669	20.89629	15.78506	37.01572	25.50303	16.94474	27.87634	25.76137	22.85678	97.80531		
Nva Ind (MX)	19.03561	69.974	109.04789	26.33245	24.73247	25.36266	25.6902	12.82196	18.93105	41.48376	23.17431	104.79609	38.09955	
Sn Alfredo (ES)	41.62785	89.92419	46.09983	19.17292	21.27961	17.08204	22.01675	10.57886	24.94566	30.17116	120.94633	38.57981	89.56356	46.41391
Sn Diego (ES)	16.60552	57.89674	78.75993	30.73646	19.58708	23.21408	29.32033	12.72923	22.15499	43.13784	19.88503	91.5609	98.22551	67.47544
Sta Lucía (ES)	550.10333	∞	110.75305	28.31161	151.38246	14.43231	25.13714	13.76057	25.76285	83.94939	91.6835	41.14127	34.98587	43.40869
Corral 1 (NI)	36.86279	∞	70.52975	44.77671	39.36341	27.90979	24.06172	19.28858	40.01534	69.94785	38.7253	94.95506	85.15446	47.33026
Corral 2 (NI)	42.71799	855.87158	60.26001	25.40641	29.0112	14.84345	17.72734	11.93478	26.39479	39.77745	68.85905	34.91833	34.39718	37.05888
Corral 3 (NI)	58.39249	∞	64.41994	33.41018	63.20103	22.82142	23.289	18.64579	46.31851	73.91536	47.35093	42.18282	42.39246	51.00782
Bananito (CR)	15.71777	11.92961	12.20105	7.04086	10.68378	5.08942	7.43612	4.65884	7.07482	8.46048	13.62065	7.51734	8.90114	7.35269
Batán (CR)	7.30374	5.64453	7.75721	4.01825	5.11403	3.38895	4.1521	2.94958	4.08834	4.97319	7.15664	4.35288	5.26792	4.81809
Panamá 1A	12.33265	13.20154	11.23435	8.86794	11.36554	5.20572	6.06957	5.0035	7.20732	10.83718	13.16082	7.93183	7.4356	8.09943
Panamá 1B	11.10403	10.18683	13.45389	7.72484	9.14031	4.90094	5.74892	4.47354	6.40544	9.01095	11.79379	7.57375	7.24975	8.37553
P Negra (VE)	1.64184	1.54047	2.32711	1.65916	1.47946	1.53602	1.36746	1.30366	1.37209	1.70485	1.64134	1.8189	1.78626	2.07436
Magdalena (VE)	1.57001	1.49463	2.06086	1.64386	1.47055	1.49317	1.36077	1.3241	1.3667	1.69204	1.59987	1.81415	1.71243	1.99656
Colombia	5.1934	5.13641	10.32451	4.53933	4.35191	4.39604	4.48474	3.61606	4.83667	5.21757	5.89866	5.33644	5.67188	6.49912
Cuba	5.71675	6.20569	4.56809	4.787	6.00365	4.13261	6.20717	4.19655	5.01927	5.26095	5.69338	5.55351	4.75409	6.00588

Cuadro 24
Matriz de valores de migrantes Nm (continuación)

	Sn Alfredo (ES)	Sn Diego (ES)	Sta Lucía (ES)	Corral 1 (NI)	Corral 2 (NI)	Corral 3 (NI)	Bananito (CR)	Batán (CR)	Panamá 1A	Panamá 1B	P Negra (VE)	Magdalena (VE)	Colombia	Cuba
Cuto (GS)														
Lauro (GS)														
El Mango (GS)														
Ruperto (GS)														
Tallado (GS)														
Champona (GN)														
Nahuá (GN)														
SLPetén (GN)														
SLP Bue (GN)														
El Motor (GE)														
Pte Blanco (GE)														
Cosalapa (MX)														
Zapata (MX)														
Nva Ind (MX)														
Sn Alfredo (ES)														
Sn Diego (ES)	43.75777													
Sta Lucía (ES)	520.29126	46.14247												
Corral 1 (NI)	∞	99.44526	943.45551											
Corral 2 (NI)	∞	47.92084	699.21265	∞										
Corral 3 (NI)	778.57141	37.15066	∞	∞	∞									
Bananito (CR)	21.04621	9.34944	21.76297	16.75135	18.05317	15.78237								
Batán (CR)	10.02456	5.42163	9.58879	7.60073	8.52524	7.96047	30.4096							
Panamá 1A	20.39637	9.66039	24.56956	18.39505	27.5411	17.48689	22.33642	15.63562						
Panamá 1B	18.93482	9.51605	22.19825	15.26901	21.27089	15.74273	26.3563	22.81554	∞					
P Negra (VE)	2.1227	2.07754	2.1026	2.11098	2.11703	2.09913	2.16919	2.64789	2.44973	3.07618				
Magdalena (VE)	1.9773	2.00512	1.98756	2.04104	2.03772	2.02995	1.86831	1.97181	2.15483	2.51248	15.16323			
Colombia	8.4489	6.98057	7.89691	7.84202	8.6014	7.73662	7.66915	9.42584	9.00792	16.12536	9.62226	6.15967		
Cuba	5.63015	4.92234	5.76962	5.53534	5.17132	5.55577	3.66593	2.40748	3.26306	3.2471	1.26997	1.41436	2.47925	

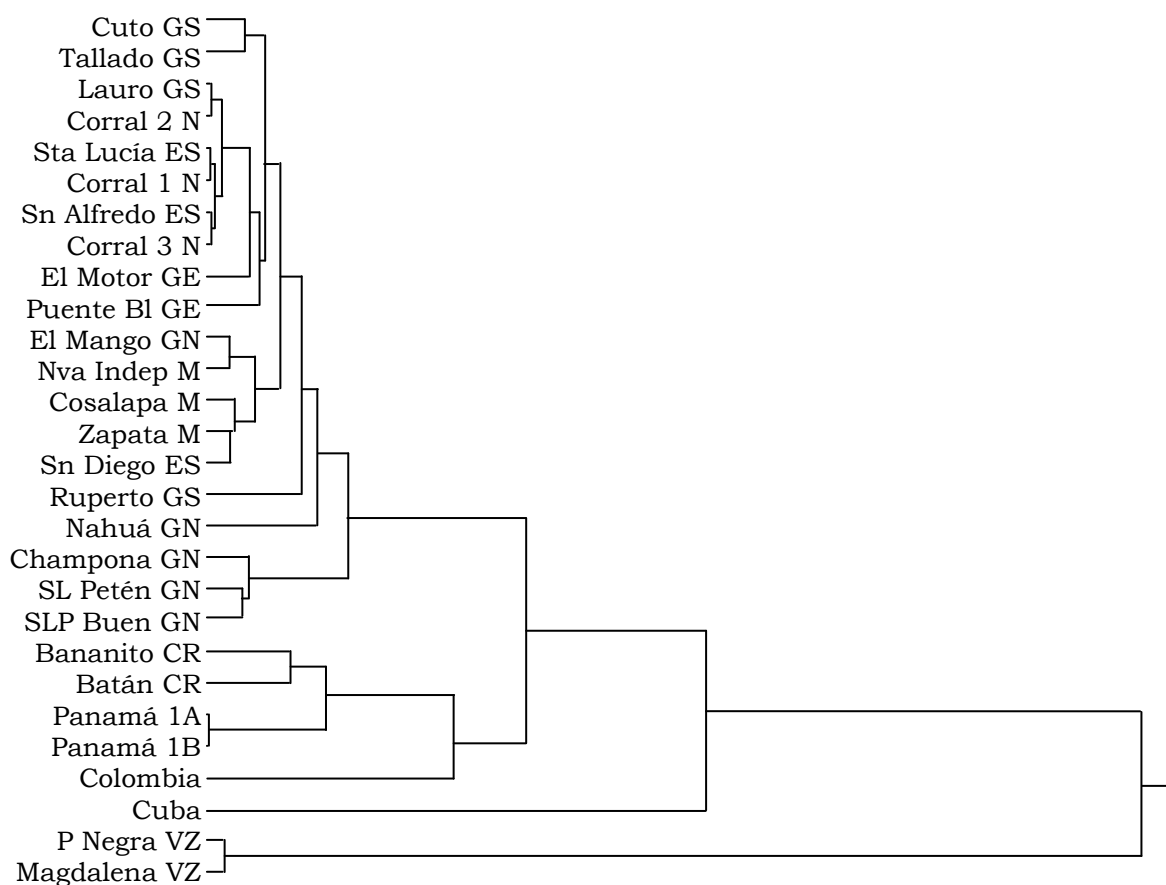
Cuadro 25
Matriz de valores de Fst linearizados (Fst/(1-Fst))

	Cuto (GS)	Lauro (GS)	El Mango (GS)	Ruperto (GS)	Tallado (GS)	Champona (GN)	Nahuá (GN)	SLPetén (GN)	SLP Bue (GN)	El Motor (GE)	Pte Blanco (GE)	Cosalapa (MX)	Zapata (MX)	Nva Ind (MX)
Cuto (GS)	0													
Lauro (GS)	0.0047	0												
El Mango (GS)	0.01445	0.00699	0											
Ruperto (GS)	0.03657	0.00576	0.02374	0										
Tallado (GS)	0.00749	0	0.01575	0.01298	0									
Champona (GN)	0.05228	0.01602	0.03343	0.02649	0.04818	0								
Nahuá (GN)	0.02627	0.01511	0.02898	0.0295	0.02855	0.02462	0							
SLPetén (GN)	0.05615	0.01772	0.05164	0.01991	0.04207	0.00938	0.04326	0						
SLP Bue (GN)	0.03496	0.00786	0.03442	0.01949	0.03281	0.00719	0.01202	0.00706	0					
El Motor (GE)	0.02061	0.0007	0.02015	0.01148	0.01046	0.0263	0.01481	0.02515	0.01407	0				
Pte Blanco (GE)	0.01029	0.01279	0.01809	0.03422	0.02013	0.04834	0.01452	0.0644	0.02389	0.01893	0			
Cosalapa (MX)	0.0289	0.00305	0.0118	0.00813	0.01823	0.01216	0.02617	0.02069	0.02171	0.01252	0.0255	0		
Zapata (MX)	0.02354	0.00938	0.01323	0.02393	0.03168	0.01351	0.01961	0.02951	0.01794	0.01941	0.02188	0.00511	0	
Nva Ind (MX)	0.02627	0.00715	0.00459	0.01899	0.02022	0.01971	0.01946	0.039	0.02641	0.01205	0.02158	0.00477	0.01312	0
Sn Alfredo (ES)	0.01201	0.00556	0.01085	0.02608	0.0235	0.02927	0.02271	0.04726	0.02004	0.01657	0.00413	0.01296	0.00558	0.01077
Sn Diego (ES)	0.03011	0.00864	0.00635	0.01627	0.02553	0.02154	0.01705	0.03928	0.02257	0.01159	0.02514	0.00546	0.00509	0.00741
Sta Lucía (ES)	0.00091	0	0.00451	0.01766	0.0033	0.03464	0.01989	0.03634	0.01941	0.00596	0.00545	0.01215	0.01429	0.01152
Corral 1 (NI)	0.01356	0	0.00709	0.01117	0.0127	0.01791	0.02078	0.02592	0.0125	0.00715	0.01291	0.00527	0.00587	0.01056
Corral 2 (NI)	0.0117	0.00058	0.0083	0.01968	0.01723	0.03368	0.02821	0.04189	0.01894	0.01257	0.00726	0.01432	0.01454	0.01349
Corral 3 (NI)	0.00856	0	0.00776	0.01497	0.00791	0.02191	0.02147	0.02682	0.01079	0.00676	0.01056	0.01185	0.01179	0.0098
Bananito (CR)	0.03181	0.04191	0.04098	0.07101	0.0468	0.09824	0.06724	0.10732	0.07067	0.0591	0.03671	0.06651	0.05617	0.068
Batán (CR)	0.06846	0.08858	0.06446	0.12443	0.09777	0.14754	0.12042	0.16952	0.1223	0.10054	0.06987	0.11487	0.09491	0.10378
Panamá 1A	0.04054	0.03787	0.04451	0.05638	0.04399	0.09605	0.08238	0.09993	0.06937	0.04614	0.03799	0.06304	0.06724	0.06173
Panamá 1B	0.04503	0.04908	0.03716	0.06473	0.0547	0.10202	0.08697	0.11177	0.07806	0.05549	0.0424	0.06602	0.06897	0.0597
P Negra (VE)	0.30454	0.32458	0.21486	0.30136	0.33796	0.32552	0.36564	0.38354	0.36441	0.29328	0.30463	0.27489	0.27991	0.24104
Magdalena (VE)	0.31847	0.33453	0.24262	0.30416	0.34001	0.33486	0.36744	0.37762	0.36584	0.2955	0.31252	0.27561	0.29198	0.25043
Colombia	0.09628	0.09734	0.04843	0.11015	0.11489	0.11374	0.11149	0.13827	0.10338	0.09583	0.08477	0.0937	0.08815	0.07693
Cuba	0.08746	0.08057	0.10945	0.10445	0.08328	0.12099	0.08055	0.11915	0.09962	0.09504	0.08782	0.09003	0.10517	0.08325

Cuadro 26
Matriz de valores de Fst linearizados (Fst/(1-Fst)) (continuación)

	Sn Alfredo (ES)	Sn Diego (ES)	Sta Lucía (ES)	Corral 1 (NI)	Corral 2 (NI)	Corral 3 (NI)	Bananito (CR)	Batán (CR)	Panamá 1A	Panamá 1B	P Negra (VE)	Magdalena (VE)	Colombia	Cuba
Cuto (GS)														
Lauro (GS)														
El Mango (GS)														
Ruperto (GS)														
Tallado (GS)														
Champon (GN)														
Nahuá (GN)														
SLPetén (GN)														
SLP Bue (GN)														
El Motor (GE)														
Pte Blanco (GE)														
Cosalapa (MX)														
Zapata (MX)														
Nva Ind (MX)														
Sn Alfredo (ES)	0													
Sn Diego (ES)	0.01143	0												
Sta Lucía (ES)	0.00096	0.01084	0											
Corral 1 (NI)	0	0.00503	0.00053	0										
Corral 2 (NI)	0	0.01043	0.00072	0	0									
Corral 3 (NI)	0.00064	0.01346	0	0	0	0								
Bananito (CR)	0.02376	0.05348	0.02297	0.02985	0.0277	0.03168	0							
Batán (CR)	0.04988	0.09222	0.05214	0.06578	0.05865	0.06281	0.01644	0						
Panamá 1A	0.02451	0.05176	0.02035	0.02718	0.01815	0.02859	0.02238	0.03198	0					
Panamá 1B	0.02641	0.05254	0.02252	0.03275	0.02351	0.03176	0.01897	0.02191	0	0				
P Negra (VE)	0.23555	0.24067	0.2378	0.23686	0.23618	0.23819	0.2305	0.18883	0.2041	0.16254	0			
Magdalena (VE)	0.25287	0.24936	0.25157	0.24497	0.24537	0.24631	0.26762	0.25357	0.23204	0.19901	0.03297	0		
Colombia	0.05918	0.07163	0.06332	0.06376	0.05813	0.06463	0.0652	0.05305	0.05551	0.03101	0.05196	0.08117	0	
Cuba	0.08881	0.10158	0.08666	0.09033	0.09669	0.09	0.13639	0.20769	0.15323	0.15398	0.39371	0.35352	0.20167	0

Figura 11
Dendrograma de Fst/1-Fst de las poblaciones de Latinoamérica y el Caribe



Para determinar si existe correlación entre la diferencia genética entre las poblaciones y la distancia geográfica entre éstas, se realizó el análisis de correlación y el de probabilidad de Mantel, que determinan si la correlación es estadísticamente significativa.

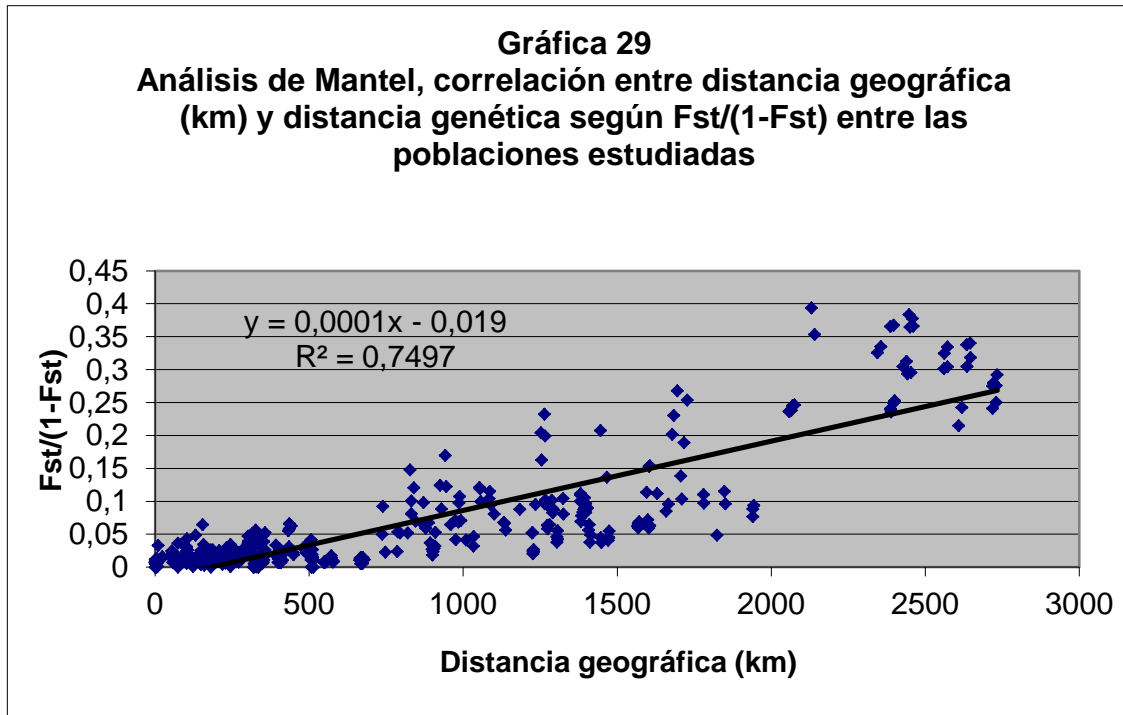
En el Cuadro 27 y en las Gráficas 29 y 30 se muestran los resultados de la correlación y de la probabilidad de Mantel. Los resultados muestran que la diferencia genética de *Anopheles albimanus* es mayor al aumentar la distancia geográfica. Los coeficientes de correlación son significativamente mayores que cero según las probabilidades de Mantel.

Cuadro 27
Análisis de Mantel, correlación entre distancia geográfica (en km) y la distancia genética según Fst/(1-Fst) entre las poblaciones estudiadas

Correlación	Pendiente	Intercepto	Coefficiente de correlación (R ²)	Probabilidad de Mantel
Fst/(1-Fst) y distancia geográfica	0.0001	-0.019	0.7497	0.000000
Fst/(1-Fst) y Ln(distancia geográfica)	0.0383	-0.1645	0.3403	0.000000

D. Análisis de secuencias de ADN

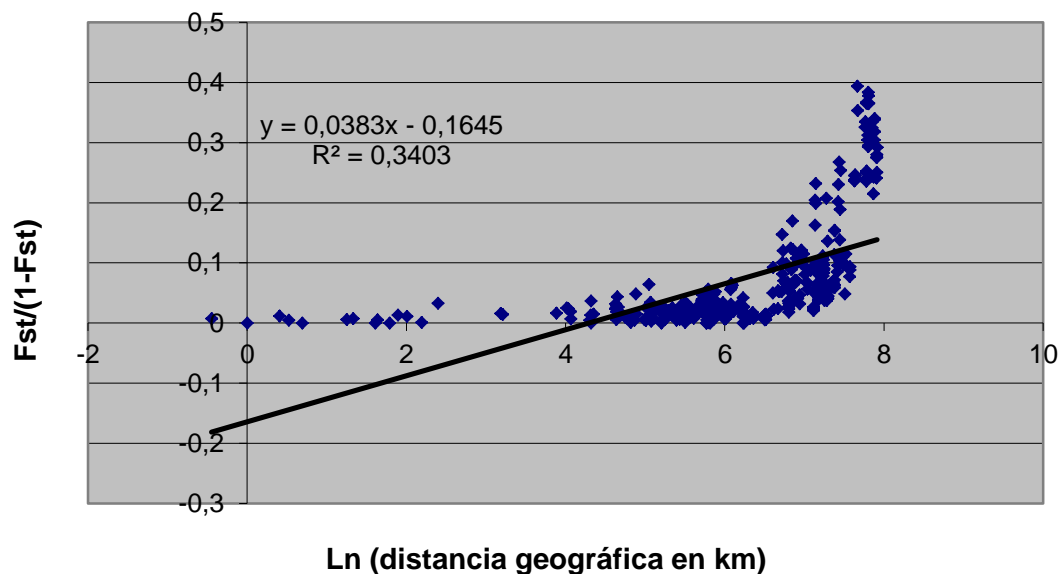
Para verificar la hipótesis propuesta, que la variación en el tamaño de las diferentes secuencias microsatélites se debe únicamente a la variación en el número de repeticiones que tiene éste, se secuenciaron dos alelos para cada microsatélite. Para cada alelo escogido se secuenciaron dos individuos homocigotos distintos, para comprobar si estos tienen el mismo número de repeticiones.



En el Cuadro 28 se muestran las secuencias obtenidas para los cuatro individuos escogidos del microsatélite 1-90. El alelo más frecuente en el total de poblaciones, el 153.85, tiene un total de 12 repeticiones 11 TC y 1 TG para ambos individuos. Para el alelo 160.17, los individuos presentaron un total de 15 repeticiones, pero el individuo de San Diego 6 no presentó repeticiones TG, sino sólo repeticiones TC. La diferencia en el número de repeticiones de estos dos alelos es la esperada, ya que el alelo 160.17 tiene seis pares de bases más que el alelo 153.85. Según estos resultados, la variación en el microsatélite 1-90 se debe a la variación en el número de repeticiones TC.

En el Cuadro 29 se observan las secuencias obtenidas para los cuatro individuos escogidos del microsatélite 2-14. El alelo más frecuente en el total de poblaciones, el 200.29, tiene un total de 13 repeticiones TC para ambos individuos. Para el alelo 206.54, el individuo 54 de Cuba presentó un total de 15 repeticiones TC, pero el individuo 112 de Cuba sólo presentó 15 repeticiones TC. La diferencia en el número de repeticiones de estos dos alelos es la esperada, ya que el alelo 206.54 tiene seis pares de bases más que el alelo 200.29. Sin embargo el número de repeticiones no concuerda con el esperado para el individuo 112. Esto pudo haber sido por un error en la identificación del alelo, o que tenga una mutación fuera de la secuencia repetitiva. Sin embargo, parece que la variación en este microsatélite también se debe a la variación en el número de repeticiones TC.

Gráfica 30
Análisis de Mantel, correlación entre Ln de la distancia geográfica (en km) y la distancia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ entre las poblaciones estudiadas



Cuadro 28
Secuenciación del microsatélite 1-90

Individuo	Tamaño del alelo	Secuencia	Numero de repeticiones TC/TG
Batán 42	153.85	5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTCCTTT-3' 3' -AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGGAAA-5'	11 TC 1 TG
Sn. Alfredo 3	153.85	5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTCCTTT-3' 3' -AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGGAAA-5'	11 TC 1 TG
Sn. Diego 6	160.17	5' -TTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTT-3' 3' -AAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAA-5'	15 TC
Sn. Alfredo 23	160.17	5' -TTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTCCTTTGG-3' 3' -AAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGACAGGAAAACC-5'	14 TC 1 TG

En el Cuadro 30 se muestran las secuencias obtenidas para los cuatro individuos escogidos del microsatélite 2-25. El alelo más frecuente en el total de poblaciones, el 104.46, tiene un total de 19 repeticiones CT para ambos individuos. Al secuenciar este microsatélite no se observó un traslape entre la banda + y -, por lo que el número de repeticiones no es certero. Para el alelo 108.82, los individuos presentaron un total de 21 repeticiones TC. A pesar de que el número de repeticiones de cada microsatélite no es certero, se sabe que la diferencia en el número de repeticiones de estos dos alelos es la esperada, pues difieren en cuatro pares de bases. Según estos resultados, la variación en este microsatélite se debe al número de repeticiones TC.

Cuadro 29
Secuenciación del microsatélite 2-14

Individuo	Tamaño del alelo	Secuencia	Número de repeticiones CT
Colombia 38	200.29	5' CCGGGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCGGCGCGGCC 3' GGCCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGCCGCGCGGG CGGTGACGGGTGAAGGTTGTTCGTAAG-3' GCCACTGCCACTTCCAACAAGGCATTC-5'	13
Panamá 1A 45	200.29	5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCC-3' 3' -AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGG-5'	13
Cuba 54	206.54	5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCGGCGC-3' 3' -AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGCCGCG-5'	16
Cuba 112	206.54	5' -TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCGGCGC-3' 3' -AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGCCGCG-5'	15

Cuadro 30
Secuenciación del microsatélite 2-25

Individuo	Tamaño del alelo	Secuencia	Repeti-ciones CT
Nva. Indep 3	104.46	5' -GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATTTCATA-3' 5' -CTAAGTAT-3'	19
Sta. Lucía 22	104.46	5' -GACATAA-3' 3' -CTGTATT-5'	19
Sn. Diego 21	108.82	5' -GAAATATA-3' 3' -CTTTATAT-5'	21
Batán 17	108.82	5' -GAAAATAT-3' 3' -CTTTTATA-5'	21

Cuadro 31
Secuenciación del microsatélite 6-41

Individuo	Tamaño del alelo	Secuencia	Número de repeticiones CA/GA
Sn. Alfredo 11	185.48	5' -GAACACACACAGACACACACACACACACAGATCC-3' 3' -CTTGTGTGTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTCTAGG-5'	12 CA 2 GA
Sn. Diego 41	185.48	5' -TAACACACACACAGACACACACACACACACAGACC-3' 3' -ATTGTGTGTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTCTGG-5'	12 CA 2 GA
Sn. Alfredo 44	190.19	5' -GCAACACACACACAGACACACACACACACACAGATCT-3' 3' -CGTTGTGTGTGTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTCTAGA-5'	14 CA 2 GA
Corral 3 17	190.19	5' -TCAACACACACACAGACACACACACACACACAGAGGG-3' 3' -AGTTGTGTGTGTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTCTCCC-5'	14 CA 2 GA

En el Cuadro 31 se muestran las secuencias obtenidas para los cuatro individuos escogidos del microsatélite 6-41. El alelo más frecuente en el total de poblaciones, el 185.48, tiene un total de 14 repeticiones 12 CA y 2 GA para ambos individuos. Para el alelo 190.19, los individuos presentaron un total de 16 repeticiones 14 CA y 2 GA. La diferencia en el número de repeticiones de estos dos alelos es la esperada, ya que el alelo 190.19 tiene cuatro pares de bases más que el alelo 185.48. Según estos resultados, la variación en el microsatélite 6-41 se debe a la variación en el número de

repeticiones TC. Sin embargo, se observa que ésta no es una secuencia microsatélite perfecta, ya que tiene una repetición GA inserta dentro de las repeticiones CA. Posiblemente, el bajo polimorfismo de este microsatélite se deba a que esta secuencia microsatélite es imperfecta, por lo que disminuye así la velocidad de mutación, como lo describen Ashley y Dow (1994).

VI. CONCLUSIONES

1. En Venezuela se encontraron individuos nulos para los loci 2-14, 1-90 y 2-25. Sólo se identificó el genotipo del 89% de los individuos para el loci 2-14, el 87% para el 1-90 y el 96% para el 2-25. Para el microsatélite 6-41 se identificó el genotipo a todos los individuos, pero hay alelos nulos, debido al alto porcentaje de homocigosidad en estas poblaciones.
2. La distribución de frecuencias alélicas para los microsatélites 1-90, 2-14, 2-25 y 6-41 en las poblaciones de Cuba, Panamá, Venezuela y Colombia difieren entre sí y con respecto a las distribuciones de frecuencias alélicas de las poblaciones de México y Centro América.
3. Las poblaciones de Panamá y Colombia presentaron equilibrio de Hardy-Weinberg en por lo menos tres loci. La población de Cuba sólo presentó equilibrio en el microsatélite 6-41. Se piensa que este resultado se debe a un error en la identificación de las muestras durante la colecta, pues hay individuos de distintas poblaciones de Cuba mezclados como una sola. Las poblaciones de Venezuela mostraron desequilibrio para el microsatélite 6-41. Este resultado está de acuerdo con el alto porcentaje de homocigotos para este microsatélite en esas poblaciones.
4. En el análisis de equilibrio de ligamiento por parejas de loci, se obtuvieron resultados similares a los del equilibrio de Hardy-Weinberg. Las poblaciones de Venezuela presentaron desequilibrio en todas las parejas de loci, excepto la del microsatélite 1-90 con el 2-14. Panamá presentó desequilibrio en las parejas de loci en las cuales no había equilibrio de Hardy-Weinberg, pero en Cuba, a pesar de ser varias poblaciones mezcladas, no hubo desequilibrio de ligamiento para ninguna pareja de loci.
5. En el análisis de varianza molecular, AMOVA, realizado para los cinco grupos establecidos en toda América (México-Nicaragua, Cuba, Costa Rica-Panamá, Colombia y Venezuela), se obtuvo una variación de 8.55 % entre los grupos, lo que indica que hay diferencia genética significativa entre estas poblaciones.
6. Los estadísticos F de Wright indican que hay una diferencia genética moderada entre los cinco grupos descritos, pues se obtuvo un F_{st} de 0.10094 entre estas poblaciones, lo que indica que hay diferencia genética.
7. La matriz de valores de F_{st} por parejas y la matriz de significancia de estos valores indica que las poblaciones de Venezuela, Colombia, Cuba y Panamá son genéticamente distintas de todas las demás poblaciones y entre sí, a excepción de las poblaciones Panamá 1A y 1B que son similares genéticamente. Por lo tanto hay poco flujo genético entre estas poblaciones. Esto también se puede observar con el bajo número de migrantes (N_m) entre estas poblaciones.
8. El dendrograma de todas las poblaciones estudiadas muestra la diferencia genética entre los cinco grupos establecidos. El grupo más distinto es Venezuela y luego Cuba.
9. En el estudio de ADN mitocondrial con las mismas poblaciones de mosquitos, realizado por Mérida y colaboradores (1999), se obtuvieron resultados similares a

los de este estudio, ya que las poblaciones de México a Nicaragua constituyen un grupo y las poblaciones de Costa Rica, Colombia, Venezuela y Panamá son grupos diferenciados genéticamente.

10. El análisis de correlación entre la diferencia genética según $F_{st}/(1-F_{st})$ y la distancia (o el logaritmo natural) en km muestra que hay una correlación positiva significativa, según la probabilidad de Mantel. Por lo que al aumentar la distancia geográfica entre las poblaciones también aumenta la distancia genética.
11. El estudio de las secuencias de ADN de los distintos microsatélites estudiados indica que, en la mayor parte de los casos, hay concordancia entre el tamaño del alelo y el número de repeticiones en el alelo, por lo que la variación en el tamaño de los alelos se debe principalmente a la variación en el número de repeticiones y no a otras mutaciones fuera de la secuencia repetitiva. Con el análisis de las secuencias se demostró que los loci 1-90, 2-14 y 2-25 son secuencias microsatélite repetitivas perfectas y que el 6-41 es una secuencia microsatélite repetitiva imperfecta, pues tiene una repetición GA inserta entre las repeticiones CA.

VII. RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores se recomienda analizar poblaciones del mosquito *Anopheles albimanus* de otras regiones de Sudamérica como Ecuador y Perú, ya que en este estudio no se incluyeron esas poblaciones debido a que había un gran porcentaje de individuos que no amplificaron al realizar el PCR, lo que sugiere una gran cantidad de alelos nulos para los marcadores microsatélites estudiados. Posiblemente se pueden diseñar nuevos iniciadores para estos microsatélites en esa región y así poder caracterizar los alelos de esas poblaciones, que parecen estar más aisladas que las otras poblaciones de Sudamérica que se estudiaron.

Los resultados obtenidos en la secuenciación de los alelos más frecuentes son preliminares. Para completar la caracterización de cada microsatélite sería necesario secuenciar todos los alelos de éstos.

Otros puntos de colecta que ampliarían el estudio son: otras regiones del Caribe como la península de Yucatán, el Estado de Florida y otras islas del Atlántico, hasta llegar a las islas cercanas a las costas de Venezuela.

Otro trabajo posterior, que sería de interés en el control de la enfermedad es estudiar, en forma comparativa, la capacidad vectorial de *Anopheles albimanus* en la región de México-Nicaragua y las regiones que son genéticamente distintas, como Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colombia y Cuba. La información genética se puede obtener de este trabajo de investigación, la información epidemiológica se debe obtener mediante un diseño experimental adecuado, que permita correlacionar la distancia genética con la capacidad vectorial entre las poblaciones.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Ashley, M. V., Dow, B.D., 1994. "The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications". In: *Molecular ecology and evolution approaches and applications*. Shonwater, B., Streut, B., Wagner, G.P., DeSaile, R. (Eds).
- Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (Eds.). 1996. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado. U.S.A. 632pp.
- Black, W.C., DuTeau, N.M., 1997. "RAPD-PCR and SSCP Analysis for Insect Population Genetic Studies". In: *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual.*, Crampton, J.M., Beard, C.B., Louis, K. (Eds.). Chapman & Hall. U.S.A.
- Dowling, T.E., Moritz, C., Palmer, J.D., 1996. "Nucleic Acids III: Analysis of Fragments and Restriction Sites". In: *Molecular Systematics.*, Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.). 2nd. Ed. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. 655pp.
- Faran, M., 1980. "A revision of the *albimanus* section of the *Nyssorhynchus* of *Anopheles*." *Contrib Am Entomol Inst* 15: 1-215.
- Gwadz, R., Collins, F.H., 1996. "Anopheline Mosquitoes and the Agents they Transmit". In: *The Biology of Disease Vectors.*, Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (Eds.). University Press of Colorado. U.S.A. 632pp.
- Hartl, D.L., 1988. *A Primer of Population Genetics*. 2nd. Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. U.S.A. 305pp.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K., Larson, A., Davis, S.K., Zimmer, E.A., 1996. "Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning". In: *Molecular Systematics.*, Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.). 2nd. Ed. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. 655pp.
- Hiss, R.H., Norris, D.E., Dietrich, C.H., Whitcomb, R.F., West, D.F., Bosio, C.F., Kambhampati, S., Piesman, J., Antolin, M.F., Black, W.C., 1994. "Molecular Taxonomy Using Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) analysis of mitochondrial ribosomal DNA genes". *Insect Molecular Biology* 3(3): 171-182.
- Hobbs, J., 1962. "Cytogenetics of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae)". *Ann Entomol Soc Am* 55: 245-251.
- Hoy, M.A., 1994. *Insect molecular genetics: An introduction to principles and applications*. Academic Press. U.S.A. 546pp.

- Katz, M., Despommier, D.D., Gwadz, R.W., 1982. *Parasitic Diseases*. Springer-Verlag. U.S.A. 264pp.
- Klowden, M.J., 1996. "Vector behaviour". In: *Biology of Disease Vectors.*, Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (Eds.). University Press of Colorado. U.S.A. 632pp.
- Knudson, D.L., Zheng, L., Gordon, S.W., Brown, S.E., Kafatos, F.C., 1996. "Genome Organization of Vectors". In: *Biology of Disease Vectors.*, Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (Eds.). University Press of Colorado. U.S.A. 632pp.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Darnell, J., 1998. *Molecular Cell Biology*. 3rd. Ed. W.H. Freeman and Company. U.S.A. 1344pp.
- Malaria Foundation International (MFI), 2001. Where Does Malaria Occur?
- Markell, E.K., Voge, M., 1981. *Medical Parasitology*. 5th. Ed. W.B. Saunders Company. U.S.A. 374pp.
- Markell, E.K., Voge, M., John, D.T., 1990. *Parasitología Médica*. 6^{ta}. Ed. McGraw-Hill. Madrid. 395pp.
- Marquardt, W.C., 1993. "Natural History Insect Morphology and Identification". In: *Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado. U.S.A. 632pp.
- Mérida, A.M., De Mata, M.P., Molina, E., Porter, C.H., Black, W.C., 1995. Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among Populations of *Anopheles albimanus* in South and Central America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(5): 469-477.
- Mérida, A.M., Palmieri, M., Yurrita, M.M., Molina, A., Molina, E., Black, W.C., 1999. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(2): 230-239.
- Mettler, L.E., Gregg, T.G., Schaffer, H.E. 1988. *Population Genetics and Evolution*. 2nd. Ed. Prentice-Hall, Inc. U.S.A. 325pp.
- Mills, K., 2001. *Estudio de la variabilidad genética de poblaciones de Anopheles albimanus de América Latina, mediante el uso de microsatélites como marcadores moleculares*. Trabajo de Graduación Licenciatura en Bioquímica. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 146pp.
- Narang, S.K., Seawright, J.A., Suarez, M.F., 1991. "Genetic structure of natural populations of *Anopheles albimanus* in Colombia." *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7: 337-345.

- PAHO, 2001. "Situation of Malaria Programs in the Americas". *Epidemiological Bulletin*, 22(1).
- Palumbi, S.R., 1996. "Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction". In: *Molecular Systematics.*, Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (Eds.). 2nd. Ed. Sinauer Associates, Inc. U.S.A. 655pp.
- Schlötterer, C., Pemberton, J., 1994. "The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations". In : *Molecular ecology and evolution approaches and applications.* Shonwater, B., Streut, B., Wagner, G.P., DeSaile, R. (Eds.).
- Schneider, S., Kueffer, J.M., Roessli, D., and Excoffier, L., 2000. *Arlequin Ver 1.1: A software for population genetic data analysis.* Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland. 82pp.
- Schoua, C., 2000. *Estudio Genético de poblaciones del mosquito Anopheles albimanus mediante secuencias microsatélites.* Trabajo de Graduación Licenciatura en Bioquímica. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 111pp.
- Spiess, E.B., 1977. *Genes in Populations.* John Wiley & Sons. New York. 780pp.
- Tabaschnik, W.J., Black, W.C., 1995. "Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors." *Parasitology Today* 11(1): 27-30.
- Tabaschnik, W.J., Black, W.C., 1996. "Population Genetics in Vector Biology". In: *Biology of Disease Vectors.*, Beaty, B.J., Marquardt, W.C. (Eds.). University Press of Colorado. U.S.A. 632pp.
- UNICEF, 2000. *The Global Malaria Burden.* UNICEF's Programme Division in cooperation with the World Health Organisation. No. 18.

IX. APÉNDICE

A. Datos obtenidos en el estudio para las cuatro secuencias microsátélites

1. Panamá

Cuadro 32
Composición alélica para la población Panamá 1A

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	155.72	200.29	110.5	187.82
	151.39	200.29	110.5	185.48
2	166.75	200.29	178.42	185.48
	153.85	192.74	104.46	185.48
3	180.74	192.74	104.46	185.48
	151.39	192.74	104.46	185.48
4	153.85	206.54	104.46	185.48
	151.39	201.83	102.34	185.48
5	166.75	200.29	104.46	187.82
	155.72	200.29	104.46	185.48
6	?	200.29	104.46	187.82
	?	201.83	102.34	185.48
7	?	?	?	?
	?	?	?	?
8	162.11	201.83	104.46	185.48
	153.85	192.74	104.46	185.48
9	160.17	200.29	104.46	187.82
	151.39	201.83	100.27	185.48
10	153.85	197.23	106.62	187.82
	153.85	192.74	102.34	185.48
11	157.71	200.29	106.62	185.48
	153.85	201.83	104.46	185.48
12	153.85	200.29	104.46	185.48
	151.39	201.83	102.34	185.48
13	162.11	208.14	106.62	190.19
	153.85	192.74	106.62	185.48
14	151.39	201.83	108.82	187.82
	151.39	194.97	104.46	185.48
15	153.85	200.29	104.46	185.48
	151.39	192.74	104.46	185.48
16	155.72	200.29	106.62	185.48
	151.39	201.83	106.62	183.94
17	155.72	200.29	102.34	185.48
	153.85	192.74	102.34	185.48

Composición alélica para la población Panamá 1A (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
18	166.75	201.83	104.46	185.48
	164.09	192.74	104.46	183.94
19	166.75	197.23	112.79	185.48
	153.85	192.74	106.62	185.48
20	169	200.29	106.62	187.82
	169	200.29	102.34	187.82
21	155.72	200.29	104.46	185.48
	153.85	192.74	104.46	183.94
22	155.72	200.29	104.46	185.48
	153.85	201.83	104.46	183.94
23	157.71	201.83	104.46	187.82
	151.39	201.83	102.34	183.94
24	153.85	200.29	108.82	187.82
	153.85	204.96	104.46	185.48
25	172.91	201.83	104.46	185.48
	170.83	192.74	104.46	185.48
26	169	194.97	106.62	185.48
	151.39	192.74	100.27	183.94
27	155.72	200.29	102.34	183.94
	153.85	201.83	102.34	183.94
28	162.11	200.29	104.46	187.82
	155.72	200.29	102.34	185.48
29	164.09	200.29	102.34	185.48
	151.39	192.74	102.34	183.94
30	153.85	200.29	108.82	187.82
	153.85	200.29	106.62	187.82
31	166.75	201.83	105.94	185.48
	153.85	192.74	104.46	185.48
32	169	201.83	106.62	185.48
	166.75	201.83	102.34	185.48
33	172.91	201.83	106.62	187.82
	160.17	192.74	102.34	187.82
34	164.09	200.29	104.46	185.48
	153.85	192.74	102.34	183.94
35	153.85	200.29	117.5	190.19
	153.85	192.74	104.46	185.48
36	151.39	197.23	104.46	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
37	151.39	201.83	104.46	185.48
	151.39	200.29	104.46	183.94

Composición alélica para la población Panamá 1A (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
38	180.74	201.83	104.46	187.82
	153.85	200.29	102.34	185.48
39	153.85	201.83	106.62	183.94
	151.39	200.29	106.62	183.94
40	169	200.29	106.62	185.48
	157.71	192.74	104.46	185.48
41	162.11	206.54	110.5	187.82
	155.72	200.29	102.34	185.48
42	160.17	204.96	104.46	185.48
	153.85	192.74	102.34	183.94
43	162.11	200.29	106.62	185.48
	157.71	192.74	106.62	185.48
44	153.85	208.14	119.32	185.48
	153.85	192.74	104.46	185.48
45	155.72	200.29	104.46	185.48
	153.85	200.29	102.34	185.48
46	153.85	201.83	104.46	185.48
	153.85	197.23	102.34	185.48
47	160.17	201.83	104.46	190.19
	160.17	200.29	100.27	190.19
48	164.09	200.29	104.46	187.82
	153.85	197.23	104.46	185.48
49	153.85	200.29	104.46	187.82
	153.85	192.74	102.34	185.48
50	172.91	200.29	115.12	187.82
	169	197.23	104.46	185.48
51	153.85	197.23	104.46	185.48
	151.39	192.74	102.34	183.94
52	153.85	236.26	106.62	185.48
	151.39	200.29	106.62	185.48
53	151.39	192.74	106.62	187.82
	151.39	192.74	102.34	183.94
54	164.09	200.29	104.46	185.48
	151.39	201.83	104.46	183.94
55	172.91	204.96	117.5	185.48
	155.72	200.29	104.46	185.48
56	155.72	200.29	104.46	185.48
	151.39	192.74	102.34	185.48
57	160.17	201.83	104.46	185.48
	151.39	204.96	102.34	183.94

Composición alélica para la población Panamá 1A (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
58	160.17	200.29	104.46	187.82
	153.85	208.14	102.34	185.48
59	153.85	200.29	106.62	187.82
	151.39	206.54	105.94	183.94
60	162.11	204.96	115.12	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94

Cuadro 33
Composición alélica para la población Panamá 1B

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	180.74	192.74	104.46	187.82
	155.72	192.74	104.46	185.48
2	172.91	201.83	104.46	183.94
	153.85	194.97	104.46	183.94
3	155.72	201.83	104.46	187.82
	153.85	192.74	104.46	185.48
4	155.72	200.29	115.12	183.94
	151.39	200.29	100.27	183.94
5	164.09	200.29	104.46	185.48
	153.85	201.83	104.46	183.94
6	164.09	204.96	120.88	185.48
	153.85	197.23	102.34	183.94
7	162.11	200.29	106.62	187.82
	155.72	201.83	104.46	185.48
8	153.85	200.29	102.34	185.48
	153.85	201.83	102.34	183.94
9	166.75	206.54	104.46	185.48
	160.17	200.29	104.46	183.94
10	155.72	200.29	115.12	185.48
	153.85	200.29	110.5	183.94
11	160.17	204.96	115.12	185.48
	153.85	204.96	102.34	185.48
12	153.85	200.29	104.46	187.82
	151.39	192.74	104.46	185.48
13	169	200.29	106.62	187.82
	166.75	201.83	104.46	185.48
14	166.75	200.29	106.62	185.48
	151.39	201.83	102.34	183.94
15	153.85	200.29	104.46	185.48
	151.39	200.29	104.46	185.48

Composición alélica para la población Panamá 1B (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
16	151.39	200.29	106.62	187.82
	151.39	200.29	104.46	185.48
17	153.85	200.29	104.46	185.48
	151.39	200.29	104.46	183.94
18	153.85	200.29	112.79	187.82
	153.85	192.74	102.34	183.94
19	162.11	204.96	104.46	185.48
	153.85	201.83	100.27	185.48
20	153.85	200.29	104.46	185.48
	153.85	204.96	104.46	185.48
21	157.71	206.54	102.34	185.48
	157.71	192.74	102.34	185.48
22	160.17	200.29	120.88	187.82
	153.85	192.74	120.88	185.48
23	164.09	201.83	104.46	185.48
	162.11	201.83	102.34	183.94
24	155.72	200.29	106.62	187.82
	151.39	201.83	104.46	183.94
25	162.11	200.29	115.12	185.48
	153.85	201.83	104.46	183.94
26	172.91	206.54	106.62	185.48
	151.39	204.96	104.46	183.94
27	155.72	201.83	106.62	185.48
	153.85	192.74	104.46	183.94
28	164.09	197.23	104.46	185.48
	153.85	192.74	102.34	183.94
29	153.85	200.29	104.46	185.48
	151.39	200.29	104.46	185.48
30	162.11	200.29	?	185.48
	151.39	192.74	?	185.48
31	155.72	200.29	?	185.48
	153.85	192.74	?	183.94
32	172.91	200.29	106.62	187.82
	160.17	201.83	104.46	185.48
33	155.72	204.96	104.46	185.48
	153.85	192.74	102.34	185.48
34	155.72	200.29	104.46	185.48
	151.39	200.29	104.46	183.94
35	172.91	200.29	104.46	187.82
	153.85	200.29	98.24	183.94

Composición alélica para la población Panamá 1B (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
36	172.91	192.74	119.32	185.48
	151.39	192.74	104.46	185.48
37	164.09	200.29	104.46	185.48
	151.39	200.29	102.34	183.94
38	164.09	200.29	106.62	187.82
	162.11	201.83	104.46	185.48
39	166.75	201.83	106.62	183.94
	155.72	201.83	104.46	183.94
40	155.72	201.83	105.94	187.82
	153.85	192.74	104.46	187.82
41	155.72	201.83	104.46	187.82
	153.85	192.74	100.27	185.48
42	151.39	200.29	104.46	185.48
	151.39	200.29	104.46	183.94
43	162.11	201.83	106.62	185.48
	153.85	192.74	100.27	183.94
44	162.11	200.29	105.94	185.48
	153.85	204.96	104.46	183.94
45	155.72	200.29	115.12	183.94
	151.39	200.29	110.5	183.94
46	153.85	?	110.5	187.82
	151.39	?	108.82	182
47	153.85	200.29	108.82	183.94
	153.85	201.83	106.62	183.94
48	160.17	200.29	106.62	185.48
	155.72	200.29	104.46	185.48
49	160.17	200.29	110.5	187.82
	153.85	192.74	104.46	185.48
50	160.17	200.29	102.34	185.48
	151.39	197.23	102.34	185.48
51	153.85	200.29	110.5	185.48
	153.85	201.83	104.46	183.94
52	160.17	204.96	110.5	192.59
	151.39	201.83	106.62	183.94
53	170.83	200.29	115.12	187.82
	153.85	192.74	104.46	183.94
54	153.85	201.83	106.62	185.48
	151.39	200.29	102.34	183.94
55	155.72	201.83	104.46	185.48
	153.85	200.29	102.34	183.94

Composición alélica para la población Panamá 1B (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
56	180.74	209.74	102.34	185.48
	166.75	192.74	102.34	183.94
57	153.85	192.74	106.62	185.48
	153.85	192.74	102.34	183.94
58	?	?	110.5	185.48
	?	?	108.82	185.48
59	160.17	?	?	195.02
	153.85	?	?	195.02
60	160.17	200.29	119.32	187.82
	157.71	192.74	115.12	185.48

1. Colombia

Cuadro 34

Composición alélica de la población de El Carmen de Bolívar

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	160.17	200.29	106.62	185.48
	153.85	200.29	102.34	183.94
2	169	204.96	119.32	192.59
	151.39	192.74	110.5	187.82
3	172.91	200.29	108.82	183.94
	170.83	200.29	104.46	183.94
4	169	200.29	110.5	185.48
	153.85	200.29	102.34	183.94
5	155.72	201.83	106.62	185.48
	153.85	200.29	106.62	183.94
6	155.72	201.83	106.62	183.94
	151.39	200.29	102.34	183.94
7	160.17	201.83	106.62	185.48
	153.85	200.29	102.34	183.94
8	157.71	204.96	111.6	187.82
	155.72	192.74	102.34	183.94
9	151.39	201.83	110.5	187.82
	151.39	200.29	102.34	183.94
10	155.72	200.29	106.62	187.82
	153.85	200.29	104.46	183.94
11	166.75	200.29	110.5	185.48
	151.39	200.29	106.62	183.94
12	155.72	201.83	102.34	185.48
	155.72	200.29	102.34	183.94

Composición alélica de la población de El Carmen de Bolívar (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
13	153.85	200.29	106.62	183.94
	153.85	200.29	106.62	183.94
14	155.72	197.23	120.88	185.48
	153.85	192.74	104.46	183.94
15	155.72	200.29	106.62	187.82
	155.72	192.74	104.46	183.94
16	166.75	201.83	106.62	187.82
	151.39	200.29	104.46	185.48
17	170.83	192.74	104.46	187.82
	153.85	192.74	104.46	183.94
18	172.91	200.29	106.62	185.48
	151.39	200.29	104.46	183.94
19	?	200.29	110.5	183.94
	?	192.74	110.5	183.94
20	174.3	201.83	108.82	183.94
	155.72	201.83	106.62	183.94
21	155.72	208.14	104.46	187.82
	153.85	192.74	104.46	185.48
22	160.17	201.83	104.46	187.82
	151.39	200.29	104.46	183.94
23	153.85	200.29	119.32	185.48
	151.39	192.74	106.62	183.94
24	164.09	204.96	110.5	183.94
	155.72	201.83	98.24	183.94
25	162.11	204.96	112.79	183.94
	151.39	201.83	106.62	183.94
26	151.39	200.29	106.62	183.94
	151.39	200.29	102.34	183.94
27	155.72	201.83	106.62	187.82
	153.85	192.74	102.34	183.94
28	153.85	201.83	108.82	185.48
	153.85	201.83	104.46	185.48
29	166.75	192.74	110.5	185.48
	155.72	192.74	104.46	183.94
30	151.39	201.83	110.5	185.48
	151.39	192.74	104.46	183.94
31	169	200.29	112.79	187.82
	153.85	192.74	110.5	183.94
32	157.71	208.14	111.6	185.48
	155.72	192.74	104.46	183.94

Composición alélica de la población de El Carmen de Bolívar (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
33	157.71	197.23	112.79	187.82
	153.85	192.74	108.82	183.94
34	155.72	204.96	112.79	185.48
	151.39	200.29	110.5	183.94
35	157.71	201.83	108.82	187.82
	155.72	200.29	102.34	183.94
36	151.39	200.29	106.62	187.82
	151.39	192.74	106.62	183.94
37	157.71	204.96	115.12	187.82
	155.72	200.29	106.62	183.94
38	170.83	200.29	108.82	183.94
	162.11	200.29	106.62	183.94
39	166.75	200.29	110.5	185.48
	155.72	200.29	110.5	183.94
40	153.85	209.74	106.62	187.82
	151.39	209.74	104.46	187.82
41	153.85	201.83	108.82	187.82
	151.39	200.29	108.82	183.94
42	153.85	200.29	108.82	185.48
	153.85	192.74	108.82	183.94
43	153.85	200.29	106.62	185.48
	148.97	200.29	104.46	183.94
44	153.85	200.29	106.62	185.48
	148.97	192.74	105.94	185.48
45	170.83	204.96	108.82	183.94
	153.85	200.29	106.62	183.94
46	153.85	200.29	110.5	187.82
	151.39	192.74	102.34	183.94
47	155.72	200.29	108.82	185.48
	153.85	192.74	108.82	183.94
48	170.83	215.47	106.62	185.48
	157.71	201.83	104.46	183.94
49	166.75	197.23	115.12	183.94
	157.71	197.23	106.62	183.94

2. Venezuela

Cuadro 35
Composición alélica para la población de Puerta Negra

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	155.72	200.29	106.62	183.94
	151.39	200.29	106.62	183.94
2	153.85	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
3	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
4	153.85	201.83	106.62	183.94
	151.39	201.83	106.62	183.94
5	146.72	200.29	?	187.82
	146.72	192.74	?	185.48
6	157.71	201.83	106.62	183.94
	151.39	200.29	106.62	183.94
7	151.39	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
8	151.39	200.29	110.5	183.94
	151.39	200.29	110.5	183.94
9	157.71	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
10	157.71	200.29	106.62	183.94
	153.85	192.74	104.46	183.94
11	160.17	200.29	110.5	183.94
	153.85	192.74	98.24	183.94
12	160.17	200.29	106.62	183.94
	151.39	200.29	106.62	183.94
13	?	200.29	110.5	190.19
	?	192.74	108.82	185.48
14	153.85	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
15	157.71	192.74	108.82	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
16	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
17	153.85	200.29	108.82	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
18	157.71	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
19	153.85	192.74	108.82	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94

Composición alélica para la población de Puerta Negra (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
20	153.85	200.29	110.5	183.94
	153.85	194.97	110.5	183.94
21	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	200.29	104.46	183.94
22	?	?	?	187.82
	?	?	?	183.94
23	155.72	200.29	106.62	183.94
	153.85	200.29	106.62	183.94
24	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
25	151.39	200.29	108.82	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
26	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
27	?	?	120.88	183.94
	?	?	110.5	182
28	157.71	200.29	110.5	187.82
	157.71	192.74	110.5	185.48
29	?	?	110.5	203.34
	?	?	104.46	183.94
30	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
31	151.39	201.83	106.62	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
32	?	?	117.5	203.34
	?	?	110.5	185.48
33	151.39	201.83	106.62	183.94
	151.39	200.29	106.62	183.94
34	151.39	201.83	110.5	183.94
	151.39	201.83	104.46	183.94
35	?	201.83	110.5	185.48
	?	192.74	100.27	183.94
36	155.72	201.83	110.5	183.94
	153.85	194.97	104.46	183.94
37	153.85	200.29	106.62	183.94
	153.85	192.74	104.46	183.94
38	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
39	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	200.29	104.46	183.94

Composición alélica para la población de Puerta Negra (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
40	153.85	192.74	106.62	183.94
	153.85	192.74	104.46	183.94
41	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	104.46	183.94
42	160.17	197.23	?	183.94
	151.39	192.74	?	183.94
43	169	201.83	108.82	183.94
	151.39	200.29	106.62	183.94
44	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	100.27	183.94
45	162.11	200.29	106.62	183.94
	155.72	192.74	100.27	183.94
46	151.39	192.74	106.62	183.94
	151.39	192.74	100.27	183.94
47	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	194.97	106.62	183.94
48	153.85	?	119.32	183.94
	153.85	?	106.62	183.94
49	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
50	160.17	200.29	110.5	183.94
	155.72	192.74	104.46	183.94

Cuadro 36
Composición alélica para la población de Magdalena

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	155.72	192.74	106.62	183.94
	151.39	192.74	100.27	183.94
2	153.85	201.83	110.5	183.94
	151.39	200.29	106.62	183.94
3	151.39	192.74	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
4	153.85	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
5	157.71	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	110.5	183.94
6	155.72	192.74	110.5	203.34
	153.85	192.74	100.27	183.94
7	151.39	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94

Composición alélica para la población de Magdalena (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
8	153.85	192.74	110.5	183.94
	153.85	192.74	106.62	183.94
9	?	?	110.5	187.82
	?	?	106.62	185.48
10	169	192.74	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
11	157.71	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
12	157.71	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
13	153.85	201.83	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
14	155.72	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
15	169	201.83	110.5	183.94
	153.85	192.74	104.46	183.94
16	160.17	200.29	110.5	183.94
	151.39	200.29	106.62	183.94
17	153.85	192.74	110.5	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
18	?	213.82	110.5	185.48
	?	213.82	110.5	185.48
19	151.39	?	110.5	183.94
	151.39	?	110.5	183.94
20	151.39	200.29	112.79	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
21	169	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	108.82	183.94
22	153.85	200.29	117.5	183.94
	153.85	200.29	104.46	183.94
23	153.85	200.29	106.62	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
24	151.39	201.83	106.62	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
25	?	192.74	110.5	185.48
	?	192.74	110.5	185.48
26	157.71	192.74	106.62	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94
27	153.85	200.29	110.5	183.94
	151.39	192.74	110.5	183.94

Composición alélica para la población de Magdalena (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
28	155.72	201.83	110.5	183.94
	151.39	192.74	108.82	183.94
29	?	?	110.5	185.48
	?	?	110.5	185.48
30	153.85	201.83	110.5	183.94
	153.85	192.74	106.62	183.94
31	?	?	110.5	190.19
	?	?	110.5	185.48
32	153.85	200.29	108.82	183.94
	151.39	192.74	106.62	183.94

3. Cuba

Cuadro 37
Composición alélica para la población de Cuba

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
1	162.11	204.96	112.79	192.59
	162.11	204.96	110.5	185.48
2	169	204.96	115.12	185.48
	162.11	204.96	102.34	185.48
3	162.11	206.54	120.88	185.48
	162.11	204.96	102.34	185.48
4	169	206.54	110.5	185.48
	162.11	204.96	102.34	185.48
5	164.09	201.83	134.91	187.82
	153.85	189.07	110.5	185.48
6	162.11	206.54	125.09	187.82
	160.17	204.96	125.09	185.48
7	166.75	206.54	129.57	187.82
	160.17	204.96	102.34	185.48
8	164.09	204.96	119.32	190.19
	162.11	204.96	108.82	190.19
9	166.75	206.54	115.12	185.48
	160.17	204.96	110.5	185.48
10	162.11	204.96	119.32	187.82
	155.72	204.96	112.79	187.82
11	162.11	206.54	112.79	185.48
	151.39	204.96	112.79	185.48
12	174.3	206.54	119.32	187.82
	164.09	204.96	112.79	185.48

Composición alélica para la población de Cuba (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
13	160.17	209.74	127.14	190.19
	153.85	206.54	112.79	185.48
14	162.11	206.54	112.79	190.19
	153.85	201.83	112.79	185.48
15	169	201.83	141.42	187.82
	164.09	200.29	119.32	185.48
16	170.83	206.54	131.56	192.59
	155.72	204.96	112.79	185.48
17	166.75	204.96	120.88	185.48
	151.39	201.83	120.88	185.48
18	162.11	206.54	112.79	185.48
	160.17	204.96	110.5	185.48
19	162.11	204.96	119.32	185.48
	151.39	204.96	102.34	185.48
20	164.09	213.82	117.5	185.48
	162.11	206.54	110.5	185.48
21	164.09	206.54	117.5	187.82
	160.17	204.96	102.34	185.48
22	169	206.54	119.32	187.82
	155.72	204.96	115.12	187.82
23	162.11	206.54	120.88	187.82
	151.39	204.96	115.12	185.48
24	162.11	212.18	127.14	187.82
	160.17	204.96	112.79	185.48
25	174.3	217.13	115.12	185.48
	164.09	201.83	112.79	185.48
26	169	213.82	123.67	185.48
	153.85	209.74	115.12	185.48
27	170.83	206.54	112.79	194.06
	162.11	204.96	112.79	185.48
28	166.75	206.54	125.09	187.82
	164.09	204.96	112.79	185.48
29	169	206.54	119.32	187.82
	164.09	204.96	115.12	185.48
30	162.11	212.18	112.79	187.82
	162.11	204.96	110.5	185.48
31	162.11	206.54	112.79	185.48
	162.11	201.83	110.5	185.48
32	169	206.54	120.88	185.48
	162.11	204.96	115.12	185.48

Composición alélica para la población de Cuba (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
33	166.75	212.18	117.5	187.82
	155.72	206.54	112.79	185.48
34	169	204.96	112.79	185.48
	164.09	201.83	112.79	185.48
35	162.11	215.47	112.79	190.19
	153.85	209.74	112.79	187.82
36	164.09	217.13	112.79	185.48
	160.17	189.07	112.79	185.48
37	169	206.54	112.79	187.82
	160.17	192.74	110.5	185.48
38	166.75	192.74	123.67	185.48
	162.11	189.07	110.5	185.48
39	169	208.14	110.5	185.48
	160.17	206.54	110.5	185.48
40	169	206.54	112.79	185.48
	162.11	204.96	112.79	185.48
41	162.11	209.74	119.32	187.82
	151.39	204.96	119.32	185.48
42	162.11	213.82	117.5	187.82
	160.17	212.18	112.79	185.48
43	172.91	206.54	112.79	185.48
	162.11	204.96	110.5	185.48
44	162.11	213.82	115.12	185.48
	162.11	204.96	112.79	185.48
45	162.11	209.74	117.5	190.19
	162.11	206.54	110.5	187.82
46	164.09	204.96	115.12	185.48
	155.72	192.74	115.12	185.48
47	166.75	212.18	112.79	192.59
	164.09	206.54	112.79	185.48
48	164.09	209.74	119.32	187.82
	153.85	204.96	115.12	185.48
49	160.17	206.54	117.5	192.59
	153.85	204.96	112.79	185.48
50	164.09	208.14	119.32	194.06
	162.11	204.96	110.5	187.82
51	162.11	208.14	115.12	185.48
	160.17	206.54	110.5	185.48
52	169	206.54	120.88	185.48
	162.11	201.83	112.79	185.48

Composición alélica para la población de Cuba (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
53	155.72	206.54	115.12	187.82
	151.39	206.54	112.79	185.48
54	169	206.54	119.32	187.82
	155.72	206.54	112.79	185.48
55	162.11	206.54	120.88	187.82
	160.17	206.54	110.5	185.48
56	166.75	206.54	117.5	185.48
	160.17	206.54	110.5	183.94
57	160.17	212.18	131.56	187.82
	160.17	201.83	110.5	185.48
58	162.11	204.96	115.12	185.48
	160.17	192.74	112.79	183.94
59	162.11	208.14	125.09	187.82
	162.11	204.96	110.5	185.48
60	169	209.74	117.5	185.48
	160.17	189.07	110.5	185.48
61	162.11	206.54	112.79	187.82
	162.11	206.54	110.5	185.48
62	?	213.82	120.88	185.48
	?	189.07	112.79	185.48
63	164.09	206.54	112.79	185.48
	162.11	206.54	110.5	183.94
64	162.11	206.54	112.79	187.82
	162.11	204.96	110.5	185.48
65	162.11	213.82	115.12	185.48
	153.85	204.96	110.5	185.48
66	160.17	208.14	112.79	192.59
	153.85	206.54	112.79	185.48
67	166.75	206.54	115.12	185.48
	162.11	201.83	115.12	183.94
68	169	?	120.88	187.82
	162.11	?	120.88	185.48
69	162.11	206.54	119.32	192.59
	160.17	201.83	119.32	187.82
70	169	209.74	119.32	185.48
	153.85	208.14	110.5	185.48
71	?	?	?	?
	?	?	?	?
72	160.17	213.82	125.09	185.48
	160.17	208.14	112.79	185.48

Composición alélica para la población de Cuba (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
73	160.17	209.74	123.67	185.48
	151.39	189.07	117.5	185.48
74	162.11	213.82	112.79	190.19
	162.11	204.96	104.46	185.48
75	164.09	204.96	117.5	185.48
	164.09	201.83	110.5	185.48
76	162.11	208.14	110.5	185.48
	162.11	200.29	110.5	185.48
77	162.11	206.54	115.12	185.48
	162.11	204.96	112.79	185.48
78	169	206.54	110.5	194.06
	164.09	197.23	110.5	185.48
79	166.75	201.83	112.79	190.19
	164.09	192.74	112.79	185.48
80	164.09	206.54	112.79	190.19
	162.11	206.54	112.79	185.48
81	166.75	208.14	112.79	190.19
	160.17	204.96	110.5	185.48
82	162.11	209.74	115.12	187.82
	160.17	201.83	104.46	185.48
83	166.75	208.14	117.5	187.82
	155.72	206.54	112.79	185.48
84	170.83	208.14	127.14	187.82
	155.72	204.96	127.14	185.48
85	162.11	204.96	112.79	187.82
	160.17	194.97	112.79	185.48
86	162.11	212.18	115.12	187.82
	160.17	206.54	110.5	185.48
87	160.17	206.54	120.88	190.19
	160.17	206.54	120.88	187.82
88	169	204.96	112.79	187.82
	162.11	201.83	110.5	185.48
89	166.75	213.82	112.79	185.48
	162.11	208.14	110.5	185.48
90	162.11	204.96	112.79	187.82
	162.11	204.96	110.5	185.48
91	166.75	206.54	112.79	187.82
	162.11	206.54	112.79	185.48
92	162.11	209.74	119.32	187.82
	160.17	200.29	104.46	185.48

Composición alélica para la población de Cuba (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
93	162.11	212.18	115.12	187.82
	160.17	204.96	112.79	185.48
94	162.11	209.74	135.49	185.48
	162.11	201.83	112.79	185.48
95	162.11	209.74	117.5	187.82
	153.85	209.74	112.79	185.48
96	169	206.54	112.79	187.82
	169	206.54	110.5	185.48
97	162.11	212.18	143.7	192.59
	160.17	208.14	112.79	187.82
98	170.83	208.14	115.12	187.82
	162.11	189.07	112.79	185.48
99	162.11	206.54	110.5	187.82
	162.11	204.96	110.5	185.48
100	164.09	209.74	112.79	185.48
	155.72	208.14	112.79	185.48
101	162.11	208.14	125.09	187.82
	153.85	189.07	110.5	185.48
102	164.09	209.74	110.5	187.82
	162.11	200.29	110.5	185.48
103	164.09	208.14	110.5	?
	162.11	204.96	104.46	?
104	169	204.96	115.12	187.82
	157.71	204.96	110.5	185.48
105	162.11	206.54	117.5	185.48
	151.39	204.96	110.5	185.48
106	162.11	206.54	129.57	185.48
	151.39	204.96	102.34	185.48
107	162.11	197.23	110.5	185.48
	151.39	197.23	110.5	185.48
108	166.75	215.47	110.5	185.48
	162.11	209.74	110.5	185.48
109	169	206.54	115.12	190.19
	160.17	204.96	110.5	185.48
110	164.09	208.14	120.88	187.82
	162.11	208.14	120.88	185.48
111	162.11	206.54	119.32	185.48
	162.11	206.54	112.79	185.48
112	162.11	206.54	112.79	187.82
	162.11	206.54	112.79	187.82

Composición alélica para la población de Cuba (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
113	160.17	213.82	112.79	185.48
	155.72	189.07	112.79	185.48
114	160.17	236.26	110.5	185.48
	151.39	206.54	102.34	185.48
115	166.75	206.54	134.91	187.82
	162.11	206.54	112.79	185.48
116	160.17	213.82	110.5	185.48
	160.17	189.07	102.34	185.48
117	170.83	206.54	112.79	192.59
	162.11	201.83	104.46	185.48
118	166.75	212.18	110.5	190.19
	162.11	208.14	110.5	185.48
119	160.17	208.14	?	185.48
	160.17	206.54	?	185.48
120	162.11	212.18	127.14	185.48
	160.17	209.74	112.79	185.48
121	162.11	212.18	125.09	187.82
	155.72	200.29	112.79	185.48
122	160.17	209.74	136.74	187.82
	151.39	208.14	102.34	185.48
123	162.11	206.54	112.79	190.19
	155.72	189.07	110.5	185.48
124	162.11	206.54	112.79	185.48
	151.39	189.07	112.79	185.48
125	164.09	212.18	117.5	185.48
	162.11	204.96	117.5	185.48
126	160.17	208.14	123.67	185.48
	151.39	206.54	102.34	185.48
127	166.75	208.14	112.79	185.48
	162.11	204.96	104.46	185.48
128	162.11	208.14	115.12	185.48
	153.85	206.54	104.46	185.48
129	164.09	213.82	112.79	185.48
	162.11	208.14	112.79	183.94
130	164.09	212.18	119.32	187.82
	162.11	192.74	110.5	187.82
131	162.11	204.96	112.79	194.06
	160.17	204.96	112.79	185.48
132	166.75	209.74	112.79	187.82
	151.39	206.54	112.79	187.82

Composición alélica para la población de Cuba (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
133	160.17	204.96	119.32	192.59
	153.85	204.96	108.82	185.48
134	169	208.14	117.5	190.19
	160.17	206.54	112.79	185.48
135	153.85	209.74	112.79	190.19
	153.85	208.14	112.79	185.48
136	162.11	215.47	115.12	187.82
	153.85	209.74	108.82	185.48
137	162.11	208.14	115.12	185.48
	153.85	200.29	110.5	185.48
138	162.11	212.18	112.79	185.48
	151.39	208.14	112.79	185.48
139	166.75	209.74	129.57	187.82
	162.11	206.54	112.79	185.48
140	162.11	209.74	127.14	187.82
	155.72	206.54	112.79	185.48
141	170.83	208.14	112.79	190.19
	169	204.96	110.5	185.48
142	174.3	209.74	108.82	187.82
	174.3	206.54	108.82	185.48
143	153.85	209.74	112.79	?
	153.85	206.54	112.79	?
144	162.11	208.14	115.12	192.59
	162.11	192.74	115.12	187.82
145	162.11	206.54	123.67	185.48
	153.85	206.54	110.5	185.48
146	162.11	212.18	110.5	185.48
	162.11	206.54	110.5	185.48
147	162.11	201.83	120.88	190.19
	160.17	201.83	112.79	187.82
148	169	206.54	119.32	190.19
	162.11	204.96	110.5	187.82
149	162.11	208.14	104.46	187.82
	151.39	206.54	104.46	187.82
150	160.17	208.14	115.12	185.48
	160.17	206.54	110.5	185.48
151	166.75	?	?	?
	166.75	?	?	?
152	157.71	212.18	120.88	185.48
	155.72	194.97	110.5	185.48

Composición alélica para la población de Cuba (Continuación)

Individuo	1-90	2-14	2-25	6-41
153	169	204.96	120.88	185.48
	162.11	189.07	115.12	185.48
154	166.75	208.14	120.88	190.19
	160.17	204.96	120.88	185.48
155	162.11	212.18	123.67	185.48
	162.11	206.54	110.5	185.48
156	164.09	208.14	127.14	187.82
	162.11	208.14	110.5	185.48
157	160.17	208.14	112.79	192.59
	?	208.14	112.79	185.48
158	160.17	208.14	136.74	194.06
	160.17	206.54	102.34	185.48
159	162.11	?	112.79	187.82
	162.11	?	112.79	187.82
160	170.83	209.74	110.5	185.48
	151.39	208.14	110.5	185.48
161	155.72	209.74	112.79	190.19
	151.39	201.83	110.5	185.48
162	170.83	217.13	119.32	185.48
	169	204.96	102.34	185.48
163	166.75	209.74	110.5	185.48
	162.11	209.74	108.82	185.48
164	166.75	209.74	131.56	187.82
	164.09	209.74	115.12	185.48
165	169	206.54	125.09	187.82
	164.09	204.96	120.88	185.48
166	164.09	208.14	125.09	185.48
	164.09	201.83	102.34	185.48
167	164.09	208.14	117.5	187.82
	164.09	204.96	108.82	185.48
168	170.83	213.82	125.09	185.48
	164.09	208.14	110.5	185.48
169	170.83	209.74	110.5	185.48
	164.09	204.96	110.5	185.48
170	164.09	208.14	115.12	194.06
	164.09	206.54	110.5	190.19
171	164.09	213.82	112.79	185.48
	162.11	212.18	112.79	185.48

A. Secuencias de los cuatro microsatélites

La secuencia repetitiva para cada microsatélite está en negrilla y la región donde se complementa el iniciador para el PCR está subrayada.

1. Secuencia del microsatélite 1-90

5'-
 GATCTGGGTGCACCCACCCCGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTTCGTTCTCGGC
 CATCACCATGCGCCACCATTTTGGTTTTTGGGCAAATGGCAGCTTGGCTCT
 GGTGTTGCTGGCCGAGATTTATCACAAATCAGCACCATCAACACATCCCGT
 GCGCTGTTCCGGGCGACGGTCCGATGAGGAATCTTCCTTTAATCCG
 ATCCGAGTCACTCATCCAAAACCTTCCCGGTCCCTTGGACAACACACC
 GCACGGCAGAAGCATAATTAATTAGCATAAATAATAGCCGAACATATTA
 ATGCCTTTTGCCGCTCTCTGTCTCTGCCTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTC
TCTCTCTCTGTGTCCTTTGGTCATAAAAGGGTCGGTTACGTGTACTACGTC
CTGGATGTGCGTATTTGTAGTCGGAAGTGTGACTGCCGATGGCCATTTTCA
 TTGATATTAATGCACCATAATCATCCGGATAGTGCGCCCTCGTGTACTCGA
 GGATC-3'

2. Secuencia del microsatélite 2-14

5'-
 GATCGCCGTTGCCAAGATAAAAATGGAAATCGAACCCCTACGCTGGCTCGCT
 CCTTAGCGCCCGGGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCGGCGCGG
 CCGCGGTGACGGGTGGTGAAGTTGTTCCGTAAGACGCGCGAACGGCGAA
 CCATTCGGTTCGGTGCRCGAGTTGGACGGTGTTTTAGGATTATTTGAATTA
 GATTTGATTTGATTTAATTCGCTCACCCAGCAATTTAGCCCCCCCCGCCATG
 GGCATGCGGGGTTTACGGAGGTCTCAAACCCACCTGGCCCCGGAGCAGCAG
 CAGCAGCAGCAGCAGGGGCGGGGAATGTTTGATTGATTCCAGCGGCAGCGC
 GATAGAGCGCGCACGCCAGCCCATGGGCCAGGCCACGCAGTGAGCACAA
 CAATGAGCGCATAAGCGCGGTGGCACGCACGGTGGCACCAGACAGATGCT
 GTGCACAGTACCCAGCCTGCAGCAACAGCTTCTTGGCTTCACTCGGTTGCC
 CACGAGTGCGTGGAAGGGCCCCCGATCG-3'

3. Secuencia del microsatélite 2-25

5'-
 CTGCGCTCAGTCTATTCGCTCTTTTCCTTCATTTTTCCCTTCCTTTCCCCTCTT
 TCTTTTCTGTAATTCCCGTTTCCTCCGTTCCGGTTCCACGCTCCATTCTCTTT
 ATGTTTCGCTCGCTATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCTGCATAGGATTTCGAAATCGTGTTCCAGCACAGTAAGGGCGTTGGGG
GGGGAGTGGGAGGTGGGGAGAGATAGAGGGCTGAGGTTTCACTGATGGTC
GGGTGCGGACCTGTGGACTGTCCCGGCGACAAA-3'

4. Secuencia del microsatélite 6-41

5´-

GATCGCGGGCACCTCCCACCGCCCAGCAAACGGGAATTTAATCAACGGC
ATCCATCCTTTCTCTGTGGTGAGCAAGGGTAGAAGGGGTTGAGGAGGAGG
 TGGAACAGACACACACAGACACACACACACACAGAGCCCGCCCGGAAA
 CACGGGGGCCCCACACCGTTAGGGCAAACGCACCTGATTCTCAGAGGCAG
 TTGATGCGCCGTTATGACAAGGCGCGAGGTCGGCGATAAC-3´

B. Individuos utilizados como estándares internos para los cuatro microsatélites

1. Microsatélite 1-90

Cuadro 38
 Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 1-90

Número de individuos y lugar de colecta		Alelos que representa
Tallado	5	155.72 174.30
	10	153.85 172.91
	20	142.51 148.97
	24	155.72 164.09
	26	151.39 162.11
Nahuá	6	153.85 160.17
	15	155.72 170.83
Puente blanco	43	155.72 177.13

2. Microsatélite 2-14

Cuadro 39
 Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 2-14

Número de individuos y lugar de colecta		Alelos que representa
Lauro 27/3/96	13	189.07 236.26

Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 2-14
(Continuación)

Número de individuos y lugar de colecta		Alelos que representa
San Luis Petén Buenaventura	14	209.74 220.00
	Puente blanco	9
25		206.54 217.13
30		192.74 204.96
46		201.83 223.91
Champona	27	212.18 213.82
Corral 1	5	215.47 209.74

3. Microsatélite 2-25

Cuadro 40

Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 2-25

Número de individuos y lugar de colecta		Alelos que representa
Cosalapa	8	115.12 104.46
	24	119.32 102.34
		27
	29	106.62 100.27
	30	117.50 112.79
		34
	38	123.67 110.50
San Diego	42	136.70 121.86

Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 2-25
(Continuación)

Número de individuos y lugar de colecta		Alelos que representa
Corral 3	35	125.09
		106.62
Corral 2	31	131.56
		102.34

4. Microsatélite 6-41

Cuadro 41

Individuos utilizados como estándares internos para el microsatélite 6-41

Número de individuos y lugar de colecta		Alelos que representa
Ruperto 4/10/95	6	185.48
	35	192.59
Cuto	15	187.82
	22	190.19
Nahuá	15	185.48
	22	197.48
Zapata	14	189.40
	42	203.34
Zapata	42	183.94
		182.00

X. GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico (ADN): Consiste en secuencias de nucleótidos unidos químicamente, cada uno de los cuales contiene un anillo heterocíclico de átomos de carbono y nitrógeno (bases nitrogenadas), un azúcar de cinco carbonos en forma de anillo (pentosa) y un grupo fosfato. Las bases nitrogenadas son de dos tipos, pirimidinas (citosina y timina) y purinas (adenina y guanina). Los nucleótidos están unidos en una cadena polinucleotídica por un esqueleto que consiste en una serie alternada de residuos de azúcar y fosfato. Las bases nitrogenadas se unen entre sí por puentes de hidrógeno, la A con la T y la G con la C, para formar cadenas polinucleotídicas complementarias en una doble hélice (Hoy, 1994).

ADN genómico: Todas las secuencias de ADN que componen el genoma de una célula o de un organismo (Lodish *et al.*, 1998).

ADN polimerasa: Enzima que cataliza la síntesis de ADN bajo la dirección de un molde de ADN de una sola banda (Hillis *et al.*, 1996).

Alelo: Es una forma particular de un gen en un locus particular (Hillis *et al.*, 1996).

Aptitud: Es la capacidad de supervivencia y reproducción de un genotipo comparada con otros genotipos en la población (Beatty and Marquardt, 1996).

Capacidad vectorial: Es la habilidad general de una especie vector en un lugar específico, en una época específica para transmitir un patógeno. Cuantitativamente se puede definir la capacidad vectorial, como el número de picaduras infecciosas que recibe una persona al día. (Beatty and Marquardt, 1996).

Carácter: Una característica variable en un taxón dado o secuencia que toma uno de un juego de dos o más estados diferentes (e.g., color de ojos o posición 12 de un aminoácido en una proteína en particular) (Hillis *et al.*, 1996).

Complementación: Hybridization en inglés, es el proceso de unión de dos bandas de ADN según la similitud de sus secuencias, en base a la complementariedad de las bases (Hoy, 1994).

Conversión de genes: Proceso genético por el cual, una de las secuencias reemplaza a la otra en un locus ortólogo o parólogo. Puede resultar de la reparación de heteroduplas (Hillis *et al.*, 1996).

Cromosoma: En los eucariotas, es la unidad estructural del material genético. Consiste de una sola molécula de ADN de doble banda y sus proteínas asociadas (Lodish *et al.*, 1998).

Dendrograma: Cualquier diagrama con forma de árbol con ramas (Hillis *et al.*, 1996).

Deriva genética: Variación espontánea en la secuencia de genes duplicados, la cual se desarrolla durante la evolución (Lodish *et al.*, 1998).

Desequilibrio de ligamiento: El alejamiento de las frecuencias predichas de los tipos de gametos de loci múltiples al asumir que los alelos se asocian al azar (Hillis *et al.*, 1996).

Diploide: Se refiere a una célula u organismo que tiene dos juegos completos de cromosomas homólogos y por tanto dos copias (alelos) de cada gen o locus (Lodish *et al.*, 1998).

Electroforesis: Es la separación de moléculas en un campo eléctrico (Hillis *et al.*, 1996).

Endogamia: La correlación de los genes entre individuos, o la correlación de los genes entre individuos entre distintas poblaciones (Hillis *et al.*, 1996).

Endonucleasa de restricción: Es una enzima que corta el ADN de doble banda. Las endonucleasas de restricción tipo I son inespecíficas con respecto a la secuencia de ADN. Las endonucleasas de restricción tipo II cortan el ADN en secuencias de reconocimiento particulares (típicamente secuencias palindrómicas de 4-6 pares de bases) (Hillis *et al.*, 1996).

Entrecruzamiento desigual: Entrecruzamiento físico entre repeticiones de una familia multigénica alineadas imperfectamente, lo que resulta en una molécula de ADN grande y otra pequeña (Hillis *et al.*, 1996).

Especies crípticas: Son especies cercanamente relacionadas que están aisladas reproductivamente, pero que parecen una sola especie incluso para los especialistas (Beaty and Marquardt, 1996).

Filogenética: Reconstrucción de la historia evolutiva de un grupo de organismos o genes (Hoy, 1994).

Filogenia: La historia evolutiva de un grupo de taxones o genes y sus ancestros (Hoy, 1994).

Flujo genético: Es el intercambio de individuos que se reproducen entre poblaciones (Beaty and Marquardt, 1996).

Gameto: Célula haploide especializada producida por la meiosis de células germinales. En la reproducción sexual, la unión del espermatozoide y el óvulo que inicia el desarrollo de un nuevo individuo (Lodish *et al.*, 1998).

Gen: Un segmento de ADN que codifica para un ARN y/o una molécula polipeptídica (Hoy, 1994).

Genoma: Es la información genética total que posee una célula o un organismo (Lodish *et al.*, 1998).

Genotipo: Es la constitución genética de un organismo (Hoy, 1994).

Heterocigoto: Se refiere a una célula u organismo diploide que tiene dos alelos diferentes en un gen particular (Lodish *et al.*, 1998).

Homocigoto: Se refiere a una célula u organismo diploide que tiene dos alelos idénticos en un gen particular (Lodish *et al.*, 1998).

Iniciador: Son oligonucleótidos usados para iniciar la síntesis de ADN por una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa. Un iniciador se une a la secuencia complementaria en cromosomas fijos, con extensión subsiguiente de la ADN polimerasa (Hillis *et al.*, 1996).

Isoenzima: Es un isómero de una enzima. Son varias formas estructuralmente relacionadas de la misma enzima que tiene el mismo mecanismo, pero difieren entre sí en características químicas o inmunológicas (Hoy, 1994).

Locus (plural Loci): Es el sitio específico de un gen en un cromosoma. Todos los alelos de un gen particular ocupan el mismo locus (Lodish *et al.*, 1998).

Marcadores genéticos: Son marcadores moleculares basados en ADN. Son útiles en la determinación de la variación genética al nivel de los nucleótidos. (Beaty and Marquardt, 1996).

Microsatélites: Secuencias de ADN repetitivas caracterizadas por repeticiones cortas de 2 a 5 pares de bases, con una alta velocidad de variación en el número de copias entre los individuos. Estos loci tienden a distribuirse al azar en todo el genoma y están sujetos a deslizamiento en la replicación que da lugar a la variación en el tamaño de la secuencia (Hillis *et al.*, 1996).

Minisatélites: Secuencias de ADN repetitivas caracterizadas por unidades de repetición de aproximadamente 20 pares de bases. Estos loci tienden a concentrarse cerca de los telómeros y varían en la longitud de la secuencia debido a recombinación intramolecular o intralélica y conversión de genes (Hillis *et al.*, 1996).

Mutación: Es un cambio permanente y transmisible en la secuencia de nucleótidos de un cromosoma, usualmente sólo en un gen, lo que origina un cambio o la pérdida de su función normal (Lodish *et al.*, 1998).

Nucleótido: Es una pequeña molécula compuesta de una base purina o pirimidina unida a una pentosa y uno o más grupos fosfato unidos al azúcar por un enlace ester. El ADN y ARN son polímeros de nucleótidos (Lodish *et al.*, 1998).

Polimorfismo: Dos o más clases genéticamente distintas en la misma población (Hoy, 1994).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es un proceso para amplificar una secuencia de ADN muchas veces, en el cual una serie de ciclos térmicos resulta en la desnaturalización del ADN de doble banda, hibridación del iniciador oligonucleótido, y la extensión del iniciador catalizada por una ADN polimerasa termoestable (Hillis *et al.*, 1996).

Recombinación: Intercambio de segmentos entre dos moléculas de ADN que pueden resultar en una progenie de dos padres que tengan diferentes combinaciones de alelos no mostrados por ningún padre (Hoy, 1994).

Repetición invertida: Es una región de una cadena de ácido nucleico autocomplementaria que tiene un eje de simetría y es capaz de doblarse y unirse a las bases nitrogenadas por complementariedad en el eje de simetría (Lodish *et al.*, 1998).

Sistemática: El estudio de la clasificación, basado en el cambio evolutivo (Hoy, 1994).

Telómeros: Regiones terminales de un cromosoma eucariota que contienen secuencias teloméricas características (TEC) que se replican por un proceso especial catalizado por una telomerasa. Este proceso contrarresta la tendencia del cromosoma a ser acortado durante cada ronda de replicación (Lodish *et al.*, 1998).