

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS



Estructura genética poblacional del vector de malaria
***Anopheles darlingi* (Díptera: Culicidae)**
en la Amazonía Boliviana

Tesis de grado para optar al Título de Master en Ciencias Biológicas y Biomédicas
Mención: Genética de Poblaciones

Carla Gabriela ROMERO PÉREZ

Tutores: Dr. Frédéric LARDEUX, IRD / INLASA
Lic. Kjetil HALVORSEN, IBMB-UMSA

La Paz-Bolivia
2007

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE GENERAL.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDO	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
 Resumen.....	 1
Abstract.....	2
1.Introducción	4
2. Antecedentes	6
2.1. Malaria.....	6
2.2. <i>Anopheles darlingi</i>	11
2.3. Genética de poblaciones	14
2.3.1. Herramientas moleculares: <i>Microsatélites</i>	14
2.3.1.1. Características generales.....	15
2.3.1.2. Ventajas y propiedades	15
2.3.1.3. Factores que disminuyen la sensibilidad del marcador	17
2.3.3. Análisis de datos.....	20
2.3.3.1. Análisis de la variabilidad genética.....	20
2.3.3.2. Análisis de la estructuración genética	22
2.3.3.3. Diferenciación genética	28
3. Objetivos de estudio.....	30

3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. Material y métodos.....	32
4.1. Poblaciones de <i>An. darlingi</i>	32
4.2. Análisis molecular.....	34
4.2.1. Extracción del DNA genómico	34
4.2.2. Amplificación de microsatélites	34
4.2.3. Visualización de microsatélites	35
4.3. Análisis de datos	35
5. Resultados	39
5.1. Análisis de la variabilidad genética.....	39
5.1.1. Diversidad genética	39
5.1.2. Frecuencias alélicas	39
5.1.3. Test de equilibrio de Hardy-Weinberg	42
5.2. Análisis de la estructura poblacional y flujo génico.....	44
5.2.1. Estimación de la estructuración genética.....	44
5.2.2. Estimación del flujo génico	47
5.2.3. Tamaño efectivo de la población (N_e)	47
5.2.4. Equilibrio-Mutación-Deriva (MDE).....	49
5.3. Análisis de la diferenciación genética.....	50
5.3.1. Distancias genéticas	50
5.3.2. Aislamiento por distancia.	50
6. Discusión	52
6.1. Variabilidad genética	52
6.2. Estructura poblacional.....	55
6.3. Diferenciación genética	57
7. Conclusiones	61
8. BIBLIOGRAFÍA	63
Anexos.....	75
Anexo 1. Marcadores de MICROSATÉLITES.....	76
Anexo 2. Modelos de mutación.....	77

Anexo 3. Ejemplo de la puesta en evidencia del fenómeno de homoplasia.....	78
Anexo 4. Definiciones de Conceptos de genética de poblaciones.....	79
Anexo 5. Amplificación de loci de microsatélites.....	80
Anexo 6. Interpretación de geles	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución global de vectores de la malaria.....	7
Figura 2. Distribución de la malaria en el Mundo.....	9
Figura 3. Evolución del IPA en Bolivia y proyecciones para los años 2007 y 2015.....	10
Figura 4. Distribución geográfica de <i>Anopheles darlingi</i> en Centroamérica y Sudamérica.....	11
Figura 5. Ubicación geográfica de las poblaciones de estudio.....	31
Figura 6. Composición y distribución de las frecuencias alélicas para cada loci de microsatélites...	39
Figura 7. Agrupamiento de poblaciones de <i>Anopheles darlingi</i> geográficamente cercanas en la Amazonía Boliviana.....	43
Figura 8. Dendrograma UPGMA construido en base a distancias genéticas de Nei (1978).....	48
Figura 9. Correlación entre la distancia genética ($F_{ST}/1-F_{ST}$; $R_{ST}/1-R_{ST}$) y distancia geográfica (logaritmo de la distancia en km).....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los sitios de estudio.....	30
Tabla 2. Distancia de separación entre poblaciones en km.....	30
Tabla 3. Características de los loci aislados de <i>Anopheles darlingi</i>	32
Tabla 4. Tamaño de muestra (N), número de alelos (A), heterocigosidad esperada (H_E), heterocigosidad observada (H_o) y desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (F_{IS}).....	38
Tabla 5. Estimaciones de frecuencia de alelos nulos.....	41
Tabla 6. Pares de loci en desequilibrio de ligamiento.....	41
Tabla 7. Estimados de F_{ST} y R_{ST} para poblaciones de <i>Anopheles darlingi</i> de la Amazonía Boliviana.....	43
Tabla 8. Estimaciones de la diferenciación genética para cada par de poblaciones de <i>Anopheles darlingi</i> de la amazonía boliviana.....	44
Tabla 9. Análisis de varianza molecular (AMOVA).....	45
Tabla 10. Estimaciones del Nm (Número de migrantes por generación) y su correlación con distancias geográficas entre poblaciones.....	46
Tabla 11. Estimaciones de N_e , calculadas bajo los modelos de Desequilibrio de Ligamiento (LD) y de Exceso de Heterocigotos (HE).....	46
Tabla 12. Número de loci, exhibiendo el exceso de heterocigotos (H_e) y la heterocigosidad esperada (H_{eq}) del número de alelos observados bajo ambos modelos IAM y SMM.....	47

RESUMEN

La estructura poblacional de *Anopheles darlingi* fue estudiada a partir del uso de 5 loci de microsatélites en 251 individuos de 6 poblaciones del norte de Bolivia, *Puerto Rico*, *El Prado*, *Guayaramerín*, *Rosario de Yata*, *Cachuela Esperanza* y *San Miguel*, poblaciones distantes entre si por 10 a 240 km. El análisis de la diversidad genética a partir del promedio del numero de alelos (A) y el promedio de la heterocigosidades esperadas (H_E) reveló un alto polimorfismo en las 6 poblaciones ($A = 10.5$, $H_E = 0.885$). Significante desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg asociado a un déficit de heterocigotos fue observado en 22 de 30 tests (5 loci x 6 poblaciones), atribuido principalmente a la presencia de alelos nulos. Valores de F_{ST} (0.022) y R_{ST} (0.027) indicaron una mínima diferenciación poblacional estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Asimismo, estimas del flujo génico (Nm), calculadas a partir de estimas de F_{ST} y R_{ST} fueron superiores a 2 y 8 individuos respectivamente, lo que sugiere la ausencia de barreras físicas que impidan el flujo génico en un radio aproximado de 240 km. Valores de N_e mostraron cierta diferenciación poblacional revelando, por un lado, un N_e bajo en la población del Prado sin ser lo suficientemente extremo para ser detectado por un test de cuello de botella, por otro lado, se registró una valor de N_e alto en la población de Guayaramerin, asociado principalmente a su extensión demográfica y condiciones ecológicas favorables, que pueden ser correlacionadas con la hipótesis de una reciente expansión poblacional que conlleva a un rechazo del Equilibrio-Mutación-Deriva (EMD) en esta población.

Palabras claves: *Anopheles darlingi*, microsatélites, F_{ST} , R_{ST} , flujo génico, diferenciación poblacional, Equilibrio-Mutación-Deriva (EMD).

ABSTRACT

The population structure of *Anopheles darlingi* was studied using data from five microsatellites loci in 251 individuals from six localities of northern Bolivia *Puerto Rico, El Prado, Guayaramerín, Rosario de Yata, Cachuela Esperanza and San Miguel*, which are 10-240 km apart. The analysis of genetic diversity on the basis of the average of the number of alleles (A) and the average of expected heterozygocities (H_E) showed high polymorphism in all six populations ($A = 10.5$, $H_E = 0.885$). Significant deviation of the Hardy-Weinberg equilibrium associated with heterozygote deficits was observed in 22 of 30 tests (5 loci x 6 populations), mainly attributed to the presence of null alleles. Values from F_{ST} (0.022) and R_{ST} (0.027) indicated minimum population differentiation, statistically significant ($P < 0.05$). Likewise, high gene flow estimates computed from F_{ST} and R_{ST} , ($Nm = 2$ and 8 respectively) suggested the absence of physical barriers that obstruct gene flow in an approximate radius of 240 km. N_e values showed some population differentiation, a low N_e value in the Prado population, the N_e reduction was not intense enough to attributed to a bottleneck; on the other hand, the highest value of N_e was registered in the Guayaramerin population, its high population density mainly attributed to a favourable ecological environment that may be correlated with a recent population expansion that leads to a rejection of the Mutation-Drift-Equilibrium (MDE) in this population.

Keywords: *Anopheles darlingi*, microsatellites, F_{ST} , R_{ST} , gene flow, population differentiation, Mutation-Drift-Equilibrium (MDE).

RÉSUMÉ

La structure génétique des populations de *Anopheles darlingi* a été étudiée à partir de l'utilisation de 5 loci de microsatellites sur 251 individus de 6 populations du Nord de la Bolivie : *Puerto Rico*, *El Prado*, *Guayaramerín*, *Rosario de Yata*, *Cachuela Esperanza* et *San Miguel*, populations distantes de 10 à 240 km. L'analyse de la diversité génétique à partir du nombre moyen d'allèles (A) et de la moyenne des hétérozygoties attendues (H_E) ont révélés un polymorphisme élevé dans les 6 populations ($A = 10.5$, $H_E = 0.885$). Une déviation considérable de l'équilibre de Hardy-Weinberg, associée à un déficit en hétérozygotes, a été observée sur 22 des 30 tests (5 loci x 6 populations) et attribuée principalement à la présence d'allèles nuls. Les valeurs de F_{ST} (0.022) et R_{ST} (0.027), ont indiqué une différenciation minimale des populations, ($P < 0.05$). Les estimations des flux géniques (Nm) calculées à partir des estimations des F_{ST} et R_{ST} ont été supérieures à 2 et 8 individus respectivement, ce qui laisse supposer l'absence de barrières physiques empêchant ces flux géniques dans un rayon approximatif de 240 km. Les valeurs de N_e ont montré de légères structurations de populations : d'un côté, un N_e bas dans la population du Prado, qui n'est pas attribué à un effet goulot de bouteille compte tenu que la réduction n'a pas été suffisante pour être détectée, et de l'autre côté une valeur forte de N_e pour la population de Guayaramerín, qui a été attribuée à sa forte abondance due à des conditions écologiques favorables, qui peuvent être mises en relation avec l'hypothèse d'une extension populationnelle récente par là même a conduit à rejeter l'Equilibre-Mutation-Dérive (EMD) dans cette population.

Mots clés: *Anopheles darlingi*, microsatellites, F_{ST} , R_{ST} , flux de gènes, différenciation populationnelle, Equilibre-Mutation-Dérive (EMD)

1. INTRODUCCIÓN

La malaria humana es una enfermedad de proporción global que afecta aproximadamente al 40% de la población mundial principalmente a las regiones más pobres del mundo. Asimismo, esta enfermedad es causante de mortalidad y morbilidad en niños y adultos de regiones tropicales y subtropicales. Mundialmente se estima que es responsable de mas de 300 millones de casos y al menos 1 millón de muertes cada año (OMS, 2005).

La malaria en Bolivia es considerada un problema prioritario de salud pública por estar presente en 8 de 9 departamentos del país con una población en riesgo de 1.430.017 habitantes aproximadamente. Entre 14.000 y 25.000 casos de malaria son registrados anualmente. El 2007, 14.610 casos de malaria fueron registrados, de los cuales el 84% provenian del norte del país de la región amazonica, departamentos de Beni y Pando (MS y D, 2007).

La cantidad de casos de malaria regitrados anualmente en nuestro país constituyen una importante perdida economica caracterizandola como una enfermedad con un alto imapcto económico y social (MS y D, 2007). Uno de los factores determinantes del grado de endemidad de la malaria en una región geográfica susceptible es la presencia del mosquito vector. En Bolivia *Anopheles darlingi* es considerado el principal vector responsable de esta enfermedad en el norte del país.

Anopheles darlingi es el vector mas importante de la cuenca amazónica. Su amplia distribución geográfica en las Americas (Forattini, 1962), su marcada antropofilia y exofagia (Charlwood & Alecrim, 1989; Charlwood, 1996) y su rango de infección con *Plasmodium*, lo han convertido en el mayor contribuidor del presente resurgimiento de la malaria en Sudamérica (Manguin *et al.*, 1999).

Se han realizado varios estudios de análisis de la sistemática y la genética poblacional de *Anopheles darlingi* en Sudamérica y Centroamérica, en base a caracteres morfológicos y uso de varias técnicas moleculares (Isoenzimas, RAPD-PCR, ITS2, genes mitocondriales). Los mismos indican que *Anopheles darlingi* es considerada una sola especie y no un complejo de especies a pesar

de mostrar una alta heterogenidad en cuanto a características morfológicas y de comportamiento (Conn *et al.*, 1998; Manguin *et al.*, 1999). La heterogeneidad registrada en *Anopheles darlingi*, a llevado a realizar otros estudios (Conn *et al.*, 1998; Manguin *et al.*, 1999; Malafronte *et al.*, 1999; Pinedo *et al.*, 2006; Conn *et al.*, 2006, Mirabello & Conn, 2006; Scarpassa & Conn, 2007), a partir del uso de marcadores genéticos en distintas poblaciones, con el fin de proporcionar información sobre la diversidad, estructuración y diferenciación genética existente en distintas regiones endémicas de la amazonía Centro y Sudamericana.

Estudios genéticos sobre poblaciones de vectores maláricos son seriamente reconsiderados en lo que respecta al control vectorial, por proporcionar información acerca del nivel de intercambio genético y/o acerca de los patrones de dispersión entre poblaciones, los mismos que permiten predecir cuan lejos y cuan rápido pueden dispersarse genes de interés, como genes responsables de la resistencia a insecticidas, o transgenes (genes responsables para refractar la infección del mosquito por el parásito de la malaria), que forma parte de un programa de control vectorial a largo plazo.

Hasta el momento, pocos a escasos son los datos registrados acerca de la genética de poblaciones de *An. darlingi* en la amazonía boliviana, es en este entendido, que el presente estudio propone cuantificar el grado de diferenciación genética de poblaciones distribuidas en el norte de Bolivia a partir del uso de marcadores de microsatélites, afín de obtener información acerca del nivel de intercambio genético y patrones de dispersión existente entre las poblaciones endémicas de malaria del norte de Bolivia.

2. ANTECEDENTES

2.1. Malaria

La Malaria humana o paludismo es una enfermedad parasitaria producida por cuatro protozoarios del género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) y transmitida por la picadura de mosquitos del género *Anopheles*. Más de 40 especies de mosquitos anophelinos, tienen gran importancia en la transmisión de la malaria, estas especies difieren en su potencial de transmisión de acuerdo a su bio-ecología (capacidad vectorial) y condiciones climáticas (temperatura, humedad y precipitación) que determinan la presencia o ausencia de estos vectores así como del parásito. Regiones tropicales del mundo tienen la mejor combinación de condiciones climáticas adecuadas, que permiten la sobrevivencia de estos mosquitos. Los vectores mas competentes y eficaces en la transmisión de esta enfermedad son: *An. gambiae*, *An. funestus*, *An. arabiensis* en África, *An. dirus* en Asia, *An. darlingi* y *An. pseudopunctipennis* en América (OMS, 2005) (Figura 1).

La malaria humana es un problema de salud pública para aproximadamente 3.2 billones de personas, se estima que entre 350 a 500 millones de casos clínicos y mas de 1 millon de muertes, ocurren cada año en el mundo a causa de esta enfermedad. El 60 % de los casos clínicos y 90% de las muertes ocurren en África subsahariana, siendo América del sur y Asia otras regiones afectadas. Hasta fines del 2004, 107 países y territorios reportaron áreas de riesgo de transmisión de esta enfermedad (Fig. 2), registrándose casos por el norte a 64° de latitud en Arcángel (Rusia) y por el sur a 32° de latitud en Córdoba (Argentina) (OMS, 2005).

Asimismo, se sabe que esta enfermedad contribuye significativamente a la anemia en niños y mujeres embarazadas, además de estar asociada a otras causas como: bajo peso al nacer, partos prematuros y mortalidad infantil, lo que la hace una enfermedad responsable de la reducción del crecimiento económico en un estimado promedio de 1.3% en países con alto índice de malaria (OMS, 2005).

La gran variación observada en la carga de la malaria entre diferentes regiones del mundo es manejada por varios factores. Uno de ellos es la gran variación en la dinámica de transmisión parásito-vector-humano que favorece o limita la transmisión de esta enfermedad, y otro, son las

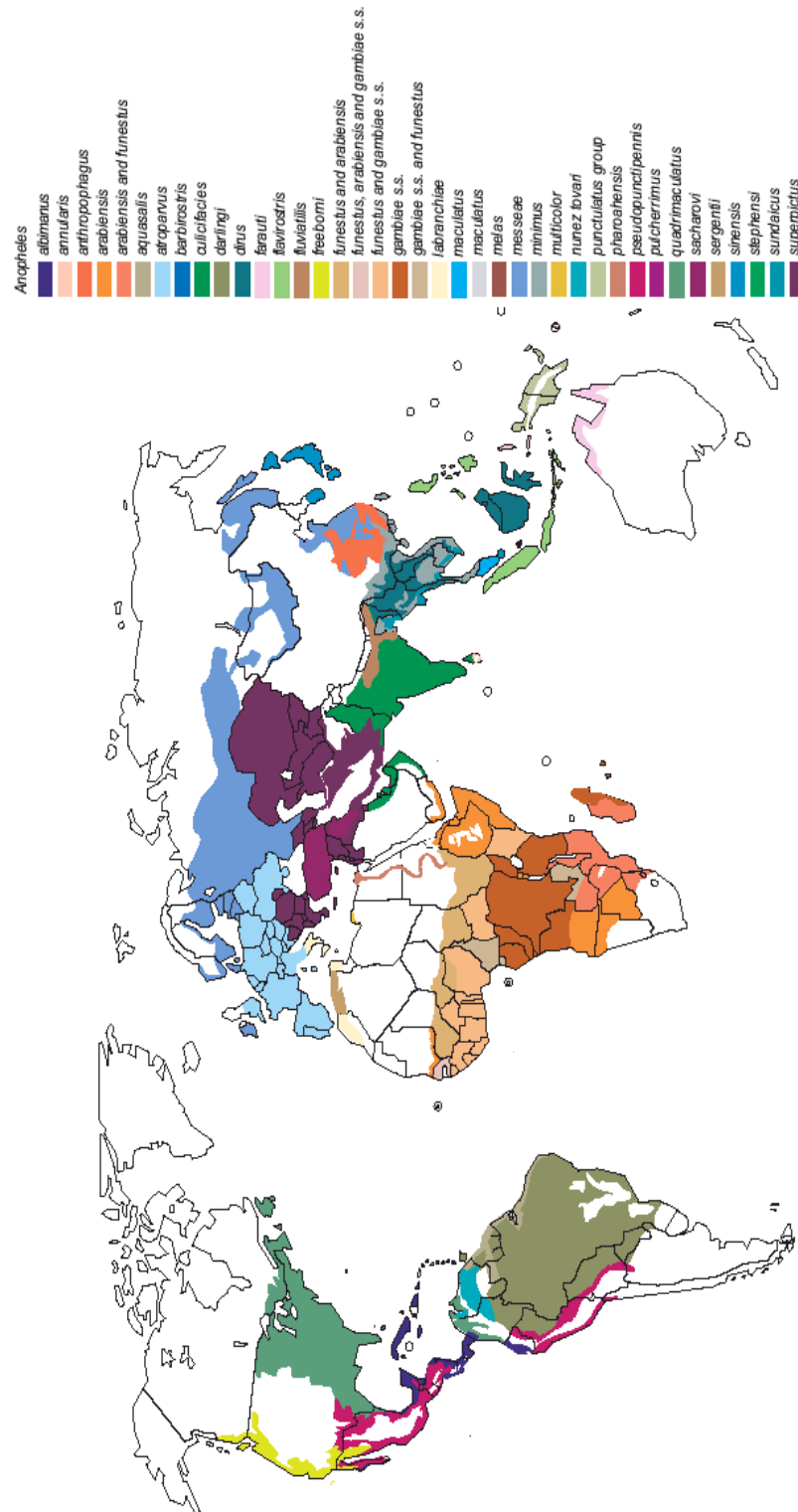


Figura 1. Distribución global de vectores de la malaria (OMS, 2005)

diferencias en cuanto al nivel de desarrollo socioeconómico, determinantes como la pobreza impiden el acceso a programas de salud y control vectorial (OMS, 2005).

La malaria ha sido combatida de manera eficaz desde la primera década del siglo a través de programas de control y campañas de erradicación global, la misma ha sido erradicada en varios países (en particular Europa). Sin embargo, hoy en día la enfermedad permanece con alta endemidad en la mayoría de los países con clima tropical y subtropical (Nchinda 1988; WHO 2002). Actualmente, la OMS sugiere una estrategia de control de la enfermedad basada en 3 elementos (OMS, 2000):

- El diagnóstico temprano, a través de un tratamiento rápido y efectivo de la enfermedad (reducción de morbilidad y mortalidad) en áreas donde las personas están en riesgo, sin distinción de clase social.
- La aplicación selectiva de medidas de control vectorial a través, de la reducción del número de mosquitos o número de sitios criadero (destrucción de larvas, pupas y mosquitos adultos) y reduciendo el contacto humano-mosquito por medio del uso de Mosquiteros Tratados con Insecticidas (MTI).
- La detección o pronóstico temprano de epidemias, y una rápida aplicación de medidas de control.

En América, alrededor de 960.000 casos son reportados anualmente, los principales sitios de transmisión de esta enfermedad ocurren en 9 países que comparten los bosques tropicales de la amazonía Sudamericana (Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Guyana, Perú, Surinam y Venezuela), 8 países de Centroamérica (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, México) y en 2 países del Caribe (Haití y la República Dominicana). A la vez, un número pequeño de casos son reportados en Argentina y Paraguay, en Sudamérica (OMS, 2005)

Todos los países afectados recurren a la estrategia sugerida por la OMS (2000), particularmente, al rociamiento intra-domiciliario con insecticidas de acción residual y a la aplicación de larvicidas en zonas de riesgo focalizadas, y algunos países incluyen la distribución de MTI.

La malaria en Bolivia es reportada en 86 municipios, los mismos son clasificados en municipios con hiperendemia $IPA > 50$ (5 municipios), alta endemia $IPA > 10$ (14 municipios), mediana endemia $IPA > 1$ (30 municipios) y baja endemia $IPA < 1$ (37 municipios) (MS y D, 2007).

Los municipios con hiperendemia se encuentran en la amazonia boliviana, dos en el departamento del Beni (Riberalta y Guayaramerin) y 3 en el departamento de Pando (Sena, Nueva Esperanza y Santos Mercado). Asimismo, 8 de los 14 municipios con alta endemia pertenecen al departamento de Pando el resto, se encuentran distribuidos en el departamento de Chuquisaca (2), Tarija (2), Beni (1) y Potosí (1) (MS y D, 2007) (Figura 2).

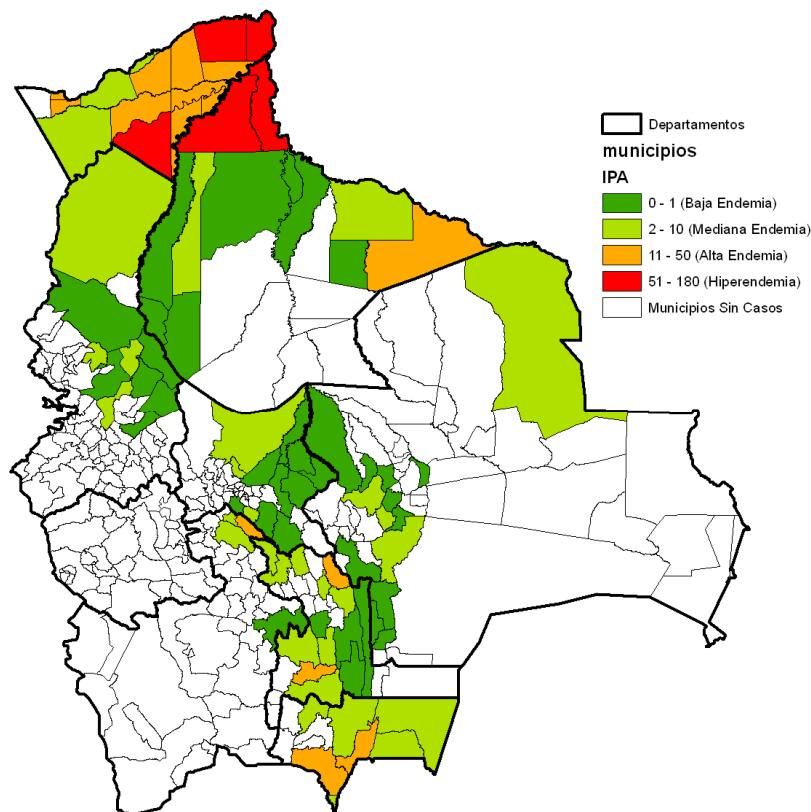


Figura 2. Situación epidemiológica de la malaria en Bolivia, estratificada por municipios (MSyD, 2007)

Desde 1950 en Bolivia se a venido registrando un aumento anual del Índice Parasitario Anual (IPA) (numero de casos anuales por 1000 habitantes), donde la incidencia de esta enfermedad aumento dramáticamente a principios y mediados de los años noventa, habiéndose incrementado los casos de 19.000 en 1991 a mas de 74.000 en 1998 con un IPA de 24.8. Posteriormente, gracias al compromiso de lucha contra la enfermedad, a través de un control vectorial y el diagnóstico y tratamiento de personas infectadas, se logró reducir de un IPA de 24.8 en 1998 a un IPA de 5.4 en 2007 (MS y D, 2007) (Figura 3).

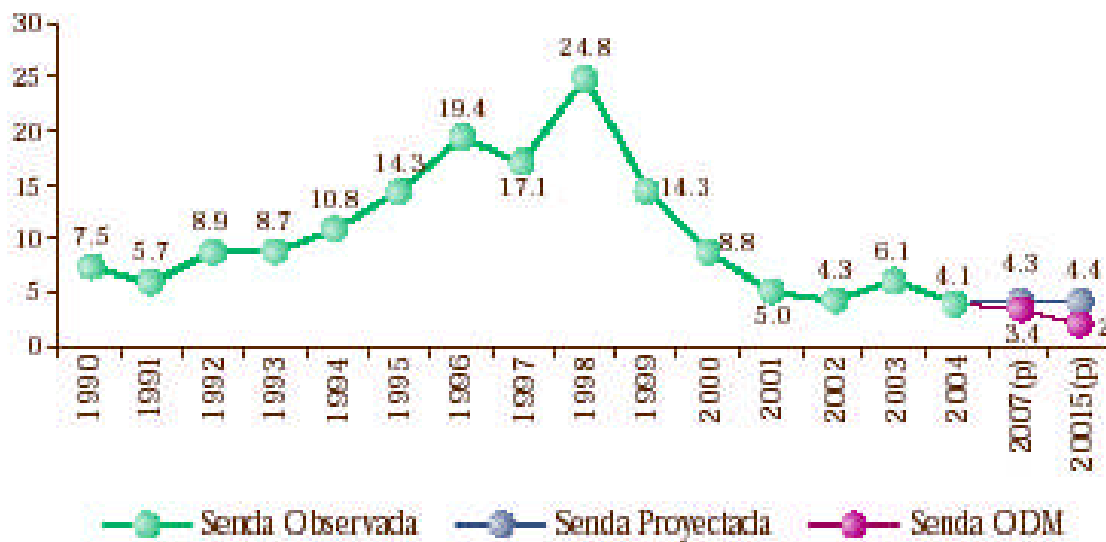


Figura 3. Evolución del IPA en Bolivia y proyecciones para los años 2007 y 2015 (según: UDAPE, 2005)
ODM: Objetivos de Desarrollo del Milenio

Dos de los 4 parásitos maláricos ocurren en Bolivia, *P. vivax* (80% de los casos), *P. falciparum* (20% de los casos).

En cuanto a las medidas de control de la enfermedad, Bolivia sigue las recomendaciones de la OMS (2000) a través: i) del diagnóstico y tratamiento adecuado (administración de cloroquina, primaquina/artemisinina) una vez identificado el parásito en pacientes infectados, ii) del rociamiento intradomiciliario con insecticidas y aplicación de larvicidas, iii) y la distribución de MTI.

Los principales vectores incriminados en la transmisión de la malaria en nuestro país son: *Anopheles pseudopunctipennis* en las regiones interandinas y *Anopheles darlingi* en la región amazónica (Pando, Beni y Santa Cruz) donde se presentan el mayor número de casos de malaria humana en Bolivia.

2.2. *Anopheles darlingi*

Anopheles (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root tiene una amplia distribución geográfica. En Sudamérica esta especie se distribuye desde Colombia hasta al noreste de la Argentina, y en Centroamérica esta presente en México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá (Linthicum, 1988; Manguin *et al.*, 1999) (Figura 4).



Figura 4. Distribución geográfica de *Anopheles darlingi* en Centroamérica y Sudamérica

Anopheles darlingi es considerado el principal vector de la malaria en las Américas, debido: i) a su amplia distribución geográfica ii) a su marcada antropofilia, iii) su capacidad de colonización y adaptación a ambientes humanos y iv) a su rango de infección con *Plasmodium falciparum*, *vivax*, y *malariae*. Además de ser el vector primario de la amazonía, es el mayor contribuidor del presente resurgimiento de la malaria en Sudamérica (Manguin *et al.*, 1999), y el responsable del 80% de los casos que ocurren en las Américas, constituyendo un problema de salud pública en las zonas boscosas de la cuenca amazónica.

La transmisión de la malaria humana por *Anopheles darlingi* ocurre principalmente en bosques calientes y húmedos, en ríos y en áreas de tierras bajas, algunas veces en eco-regiones de pie de monte con bastante lluvia, y en los bosques tropicales.

Para que se de la transmisión de la malaria un número suficiente de estos vectores deben estar presentes en sitios cercanos a hábitats humanos, por tanto, su abundancia dependerá: i) de la intrusión humana en ecosistemas naturales (construcción de plantas hidroeléctricas, la minería y proyectos de asentamiento rural), ii) de la modificación de los nichos ecológicos (deforestación, obstrucción parcial de ríos, construcción de caminos) (Lourenco-de-Oliveira *et al.*, 1989; Tadei *et al.*, 1993; Marques & Cárdenas, 1994; Quintero *et al.*, 1996; Guimaraes *et al.*, 1997), iii) y de la ecología de los sitios larvarios (sitios descontaminados, protegidos del sol, y con un buen nivel de agua en el reservorio), que proporcionen un hábitat adecuado para que las hembras anophelinas depositen sus huevos (Guimaraes *et al.*, 2004).

La heterogeneidad observada en el comportamiento de *An. darlingi* es revelada, con la variación del tiempo de picadura, donde dos patrones han sido principalmente descritos. Por un lado, ciertas poblaciones muestran el índice mas alto de picaduras en un tiempo corto después de la puesta del sol, y por otro, algunas regiones revelan que esta actividad ocurre alrededor de la media noche, con ausencia de actividad crepuscular. En la amazonía Boliviana el pico máximo de esta actividad se da entre las 19:00 y 21:00 horas, donde el 83% de las picaduras se dan hasta las 22:00 (Harris *et al.*, 2006).

El patrón de dispersión de estos mosquitos, probablemente depende en gran medida del medio ambiente, y de factores intrínsecos (abundancia de hospederos y sitios de oviposición). La habilidad de *Anopheles darlingi* de buscar sus victimas en pequeños y remotos asentamientos de

áreas recién colonizadas, en bosques tropicales, es un importante aspecto de la transmisión de la malaria, el hecho de que mini epidemias de malaria ocurran entre comunidades de bosques tropicales ampliamente esparcidas, indica, que el rango de vuelo de estos vectores puede ser considerable.

Hasta el momento varios son los estudios genético-moleculares que se han llevado a cabo en poblaciones de *Anopheles darlingi* de Centro y Sudamérica a partir de distintos marcadores moleculares (isoenzimas, RAPD-PCR, ITS2, genes mitocondriales, microsatélites), los mismos, revelan resultados acerca de la estructuración y diferenciación genética entre las distintas poblaciones de la amazonía (Conn *et al.*, 1998; Manguin *et al.*, 1999, Pinedo *et al.*, 2006 Conn *et al.*, 2006, Mirabello & Conn, 2006).

Algunos estudios, muestran una significativa diferenciación genética entre poblaciones de *Anopheles darlingi*, es el caso del estudio realizado a partir de DNA mitocondrial en poblaciones distribuidas en Venezuela, Bolivia y Brasil, las mismas revelan un aislamiento por distancia entre localidades separadas por mas de 200 km. (Conn *et al.*, 1999). Asimismo, un estudio reciente, a partir de marcadores de microsatélite reveló una significativa estructuración entre 2 distritos del este de Brasil, dicha diferenciación fue igualmente atribuida a un aislamiento por distancia, que impide el flujo génico entre estos distritos (Conn *et al.*, 2006).

Sin embargo, otro análisis genético entre poblaciones de Centroamérica y Sudamérica, a partir de DNA mitocondrial, revela una importante diferenciación entre estas poblaciones, señalando una posible expansión de poblaciones Sudamericanas a Centroamérica y un efecto débil de la distancia sobre la diferenciación (Mirabello & Conn, 2006).

Contrariamente, otros análisis sobre poblaciones de *An. darlingi* de Centro y Sudamérica, basados en marcadores de enzimas, RAPD-PCR, secuencias ITS2 y análisis morfológicos, muestran un grado de similaridad genética, que respalda la hipótesis de existencia de una sola especie, (Manguin *et al.*, 1999), con ausencia de estructuración poblacional y un moderado flujo génico, (Malafronte *et al.*, 1999; Pinedo *et al.*, 2006).

2.3. Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es el estudio de la repartición de la variabilidad genética entre y en el seno de las poblaciones naturales, y de las fuerzas genéticas, ecológicas y medio ambientales que la gobiernan. Estas fuerzas numerosas e interactivas son particularmente, la mutación, la recombinación, la selección, la migración, la distancia geográfica entre individuos y el sistema de reproducción. Reconocer y cuantificar estos factores es esencial para determinar o predecir la evolución de las poblaciones y de las especies.

2.3.1. Herramientas moleculares: *Microsatélites*

En la pasada década varios avances en la genética molecular, como, el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la aplicación de primers evolutivamente conservados, el advenimiento de secuencias hiper-variables como los loci de microsatélites y el advenimiento de la secuenciación del DNA, han incrementado enormemente la importancia de la genética de poblaciones sobre la biología.

Estas innovaciones, junto a la reciente explosión de poderosas herramientas estadísticas, computacionales, han permitido revelar que los marcadores moleculares son una herramienta útil, de acceso directo al polimorfismo del ADN, con una amplia variedad de aplicaciones incluyendo el estudio de la genética de poblaciones. En este sentido los marcadores más utilizados son:

- los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA),
- los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism),
- los SSCPs (Single Strand Conformation Polymorphism),
- los micro y minisatélites multilocus,
- los microsatélites,
- las secuencias de ADN (mitocondrial o nuclear).

A continuación, se describirá a detalle las propiedades del marcador utilizado en este estudio, los **microsatélites**.

2.3.1.1. Características generales

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN no codificante de 1 a 6 pares de bases (pb) que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma nuclear de la mayoría de los taxa. Ellos también son conocidos como, SSR por “Simple Séquense Repeats”, STR por “Simple Tandem Repeats”, o VNTR por “Variable Number of Tandem Repeats”. Un locus de microsatélite normalmente varía en longitud entre 5 y 40 repeticiones, pero cadenas mas largas de repeticiones son posibles. Las repeticiones dinucleótidas, trinucleótidas y tetranucleótidas son las mas comúnmente escogidas para estudios de genética molecular (Anexo 1) (Li *et al.*, 2002).

Los microsatélites son considerados por los autores como una de las herramientas más poderosas para estudios genéticos. Algunas de las características de estos marcadores son: presentan un alto grado de polimorfismo, su herencia es mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, son repetitivos y automatizables (Goldstein & Schlötterer, 1999).

Desde su descubrimiento en 1989, el uso de microsatélites ha tenido un gran impacto en el estudio de los organismos eucariotas (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989), en estudios de genética de poblaciones y en la ecología (Zhang & Hewitt, 2003). Para muchos genetistas este marcador ha evolucionado muchos mas rápido que genes mitocondriales, o genes que codifican isoenzimas, siendo posible resolver la estructura poblacional a una escala geográfica y evolutiva mucho mas fina. Es por esto, que este marcador fue seleccionado, para el estudio de la genética de poblaciones de mosquitos vectores de la malaria en la amazonía boliviana

2.3.1.2. Ventajas y propiedades

Los microsatélites resultan ser un marcador ideal, por permitir el uso de pequeñas cantidades de tejido muestra los cuales son fácilmente preservados para futuros usos, además la estabilidad del DNA comparado con las enzimas permite el uso de un tejido simple conservado Los microsatélites son usualmente secuencias mas cortas en longitud que loci secuenciados (100-300 vs. 500-1500), lo

que les favorece al poder aun ser amplificados con PCR a pesar de alguna degradación (Taberlet *et al.*, 1999).

Los microsatélites tienen una elevada tasa de mutación que genera un importante polimorfismo. La tasa de mutación ha sido estimada en un rango que oscila entre 10^{-3} y 10^{-5} mutaciones por gameto (Bowcock *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1995), sin embargo, los mecanismos moleculares que dan origen a este polimorfismo no han sido hasta ahora perfectamente elucidados. Dos mecanismos son los que principalmente han sido propuestos, un desigual cruce en la meiosis, y un desliz de la hebra del ADN durante la replicación (Goldstein & Schlotterer, 1999). La elevada tasa de mutación que presentan los microsatélites los hace marcadores altamente polimórficos y potencialmente resolutivos para los estudios de genética de poblaciones.

La conservación de loci de microsatélites de una especie a otra ha sido demostrada en varios grupos como los cetáceos (Schötterer *et al.*, 1991), los pájaros (Primmer *et al.*, 1996a), los primates (Deka *et al.*, 1994; Garza *et al.*, 1995; Blanquer-Maumont & Crouau-Roy, 1995), las tortugas marinas (FritzSimmons *et al.*, 1995) y en los mamíferos en general (Stallings, 1995), y puede permitir la utilización de primers heterólogos para estudios comparativos de la variabilidad genética entre especies próximas. En el caso de los vectores maláricos, muchos de estos marcadores altamente polimórficos han sido mapeados en el genoma de *An gambiae* lo que ha permitido facilitar la investigación en la selección de marcadores de microsatélites para otras especies anophelinas.

Varios modelos de mutación han sido propuestos para el estudio de la genética de poblaciones (Anexo 2). El modelo de mutación generalmente utilizado para las isoenzimas es el IAM (Infinite Allele Model) descrito por Kimura & Crow (1964). Este modelo, adaptado a este marcador, supone que la mayoría de nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir, los nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existían en la población original. Shiver *et al.* (1993) y Valdès *et al.* (1993) mostraron por simulaciones en computadora, que la evolución de microsatélites humanos para motivos di-nucleótidos sería mejor descrita por un modelo de tipo SMM (Stepwise Mutation Model; Kimura & Ohta, 1978). El SMM supone que cada mutación crea un nuevo alelo, por adición o deleción de una sola unidad de repetición del microsatélite con una igual probabilidad de mutación $u/2$ en ambas direcciones. Consecuentemente, alelos de diferente tamaño estarán más relacionados que aquellos de similar tamaño. La idea del modelo SMM es reflejar la

forma de mutación de los microsatélites y es un postulado de los *R-estadísticos*. Sin embargo, ninguno de los modelos descritos parece ajustarse perfectamente a todos los loci de microsatélites.

Ambos, el tradicional estimador de la diferenciación (*F*-estadístico, IAM) y el estimador específico de la diferenciación de los microsatélites (*R*-estadístico, SMM) son frecuentemente reportados en estudios usando marcadores de microsatélites.

2.3.1.3. Factores que disminuyen la sensibilidad del marcador

A pesar de las grandes ventajas que poseen los microsatélites como marcadores, existen otros factores a considerar que pueden disminuir el poder y/o la sensibilidad de éstos como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error capaz de disminuir su utilidad en estudios genéticos. Afortunadamente muchos de estos factores comunes en los marcadores de microsatélites pueden ser evitados a través de una selección cautelosa de los loci. Estos factores son:

- *La evidencia empírica del mecanismo mutacional*
- *El fenómeno de homoplasia*
- *La existencia de alelos nulos*

- *La evidencia empírica del mecanismo mutacional*

Aunque el patrón de mutación de los microsatélites es aún completamente desconocido, se asume que ellos mutan bajo el modelo SMM (la adición o delección de una unidad de repetición) el cual es postulado en los *R-estadísticos* (Weber & Wrong, 1993; Di Rienzo *et al.*, 1994; Primmer *et al.*, 1998).

Existe fuerte evidencia acerca de la limitación del posible tamaño máximo de los alelos de microsatélite. Por ejemplo alelos formados por dinucleótidos raramente exceden las 30 repeticiones, conllevando a un limitado número de posibles estados alélicos los cuales permiten un aumento de la homoplasia (Balloux & Moulin, 2002).

Ambos modelos (IAM y SMM), consideran que hay un número infinito de posibles estados alélicos. Sin embargo, parece claro que el número de posibles estados alélicos es finito tomando en cuenta la restricción del tamaño de los alelos dentro de un rango dado. Una importante consecuencia de restringir el tamaño de los alelos sobre el estimador R_{ST} es que el tamaño de las diferencias entre alelos puede no ser usado para reflejar correctamente las distancias entre alelos. Por tanto, R_{ST} , que esta precisamente basado sobre la varianza del tamaño de los alelos, puede ser reducido (Nauta & Weissing, 1996). Ha sido recalcado que este efecto es mucho menos importante sobre los F_{ST} (Balloux *et al.*, 2000a).

Ninguno de los modelos extremos ni sus derivados (Anexo 2), se ajusta a la asimetría y restricción del tamaño de los alelos por el patrón mutacional de los microsatélites. Modelos de mutación más reales podrían ser desarrollados, aunque probablemente puedan ser analíticamente intratables (Balloux & Moulin, 2002).

- El fenómeno de homoplasia

Originalmente el término “homoplasia” fue utilizado por los evolucionistas para referirse al hecho de que un mismo carácter, presente en dos especies, no siempre ha derivado del mismo ancestro. A nivel genético la homoplasia se refiere al hecho de que dos alelos tengan el mismo tamaño (pb) pero no es debido a que sean idénticos. Se toma como idénticos por tener el mismo tamaño pero intrínsecamente existen claras diferencias en cuanto a su estructura, presencia de inserciones y/o deleciones, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante (Anexo 3) (Primmer & Ellergren, 1998).

La homoplasia es un polimorfismo que puede detectarse únicamente por secuenciación y puede pasar inadvertido en caso de analizar individuos mediante amplificación por PCR, y electroforesis para asignar tamaños. La homoplasia puede ser una fuente de error en estudios poblacionales o de evolución, porque la tasa de mutación de los microsatélites esta relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo. Por ejemplo, los alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia (Tautz & Schlotterer, 1994).

En modelos mutacionales del tipo IAM se supone la ausencia de este fenómeno, ya que una nueva mutación produce la creación de un nuevo alelo. Sin embargo, en marcadores del tipo microsatélite, se espera en teoría una cierta cantidad de homoplasia, ya que existe evidencia de que directa o indirectamente los microsatélites presentan un tipo de mutación del tipo SMM o TPM; (Anexo 2) además, el rango limitado de tamaño de los alelos presentes en los microsatélites, reduce los posibles estados alélicos, favoreciendo la cantidad de homoplasia (Estoup *et al.*, 1995; Nauta & Weissing, 1996).

- La existencia de alelos nulos

Se habla de alelos nulos cuando estos no pueden ser amplificados por PCR, debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del iniciador. Uno de los alelos no amplifica y por lo tanto el individuo es catalogado como homocigoto para el otro alelo (Dawson *et al.*, 1997). La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia en la población es baja y cuando no se dispone de información genealógica fiable. Su determinación sería posible si se presentara en homocigosis ya que no obtendríamos producto amplificado de un determinado individuo para ese locus.

Una forma de detección de alelos nulos en el estudio de la genética de poblaciones, es a partir del cálculo del déficit de heterocigotos para el equilibrio de Hardy-Weinberg (Neuman & Wetton, 1996).

Para solucionar el problema de los alelos nulos, se pueden diseñar cebadores alternativos fuera del punto de mutación y volver a analizar a los individuos clasificados como homocigotos. Asimismo, existen diferentes métodos para evaluar la frecuencia de los alelos nulos (Chakraborty *et al.*, 1992; Brookfield, 1996; Summers & Amos, 1997; Kallinowski & Taper, 2006).

El estimador de Kallinowski & Taper (2006) es capaz de incorporar datos ausentes no atribuidos a alelos nulos (DNA degradado, condiciones de PCR). Este estimador muestra mayor sensibilidad comparado con los otros métodos de estimación de las frecuencias alélicas (Chakraborty *et al.*, 1992; Brookfield *et al.*, 1996; Summers & Amos, 1997). La diferencia con estos métodos radica

en que, por un lado, este método no trata a todos los homocigotos como iguales, cuando un homocigoto por un alelo raro es evidencia más fuerte para un alelo nulo que un homocigoto por un alelo común, por otro lado, este método toma en cuenta el número de individuos para los cuales no hay datos, en el caso de una muestra grande, existe solo un individuo con dato ausente, esta observación es usada a la hora de estimar la frecuencia de un alelo nulo, porque ayuda a sentar un límite sobre cuan alta la frecuencia del alelo es probable a ser.

2.3.3. Análisis de datos

La descripción de los modelos utilizados en genética de poblaciones necesita una definición previa de cierta terminología específica (Anexo 4).

2.3.3.1. Análisis de la variabilidad genética

Existe una gran diversidad de estadísticos que permiten cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos más manejables. Los estadísticos como: la heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_0), el numero medio de alelos por locus, el porcentaje de loci polimórficos, frecuencias alélicas y genotípicas, y el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg, son los mas empleados y son la base de la genética de poblaciones.

- Heterocigosidad (H)

Representa el valor de la variación genética, ya que es precisa y no arbitraria. Se la puede estudiar como H_E y H_0 .

La H_0 se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci y se calcula por cómputo directo.

La H_E es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura, 1970).

- Numero medio de alelos por locus(A)

Indica el número medio de alelos que representa un locus en la población, dicha medida depende del número de individuos analizados, ya que si el número es grande, mayor es la probabilidad de detectar alelos suplementarios.

- Porcentaje de loci polimórficos

Un loci se considera polimórfico si se puede detectar más de un alelo en la población, un locus será polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 99% en la población bajo estudio.

- Modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W).

Es uno de los modelos mas simples que sirve de base a la genética de poblaciones. El mismo ha sido publicado simultánea e independientemente por G. H. Hardy y W. Weinberg en 1908, este modelo describe la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas en una población ideal. Una población ideal representa a una población grande de individuos diploides, con reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación y migración, donde las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. Así, una población con frecuencias génicas y genotípicas constantes, se dice que esta en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W).

En el modelo de H-W la relación matemática entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas esta dada por:

$$AA: p^2 \qquad Aa: 2pq \qquad aa: q^2$$

Donde, p^2 , $2pq$, y q^2 son las frecuencias de los genotipos AA , Aa , y aa ; p y q son las frecuencias alélicas de A y a en gametos de la generación previa y $p + q = 1$

Cuando la población se desvía significativamente de estas proporciones se habla de desequilibrio de H-W y se puede medir mediante el índice de fijación F_{IS} (Wright, 1965), el cuál se expresa para un locus cualquiera como:

$$F_{IS} = (H_E - H_0) / (H_E)$$

Siendo H_E y H_0 la heterocigosidad esperada y observada para ese locus respectivamente.

Cuando el índice de fijación F_{IS} es igual a cero se indica que la población esta en equilibrio, mientras que si F_{IS} es diferente de cero, ya sea en forma positiva o negativa, indicaría que existe un déficit o exceso de heterocigotos respectivamente. El déficit de heterocigotos es la dirección más común de desviación del equilibrio de H-W que puede ser atribuido a (i) que el locus este bajo selección (ii) al sistema de reproducción (autogamia, endogamia, homogamia, etc), una realidad biológica que viola el criterio de una población ideal. Alternativamente, (iii) al agrupamiento inadvertido de dos grupos genéticamente distintos, dentro una sola unidad de muestra, que tienen la posibilidad de actuar como una población panmíctica, pero raramente interfecundan, este fenómeno es llamado efecto Wahlund y puede ser una causa común de déficit de heterocigotos en estudios de genética de poblaciones (Johnson & Black, 1984; Nielsen *et al.*, 2003), otra causa común de déficit de heterocigotos, (iv) es el fracaso en la amplificación de ciertos alelos para un locus dado, “Alelos nulos” debido a condiciones de PCR o porque la región de unión del primer contiene mutaciones que inhiben la unión y como resultado algunos heterocigotos son genotipificados como homocigotos y algunos pocos individuos pueden fracasar al amplificar algún alelo.

2.3.3.2. Análisis de la estructuración genética

La estructura poblacional de los vectores de la malaria, así como de otros organismos refleja la acción combinada del flujo génico, deriva génica, selección y la historia demográfica. Sin embargo, similitudes ecológicas entre especies también permiten la inferencia de una superficial estructura poblacional. La homogeneidad de las poblaciones vectoriales es esperada cuando: i) un moderado a alto flujo de genes es revelado, a causa de la alta movilidad de estos insectos, ii) un elevado tamaño efectivo de la población (N_e) iii) y una diversidad común.

Antes de realizar el análisis de la estructura poblacional es esencial probar la variación genética encontrada mediante los microsatélites, con el objeto de que no se haya violado alguno de los supuestos básicos en un análisis poblacional. Estos supuestos son: i) selectiva neutralidad de cada locus, ii) la inexistencia de alelos nulos y iii) independencia de los loci (Murray, 1996).

Para los estudios de la estructura poblacional, las herramientas mas útiles para dilucidar los patrones, y extraer la variación genética presente entre y dentro de las poblaciones son:

- *Los F y R estadísticos*
- *Estimación del Flujo génico (N_m)*
- *Estimación del tamaño efectivo de la población (N_e)*

- *F y R-estadísticos*

Varias definiciones pueden ser dadas para F_{ST} . Originalmente, fue desarrollado un índice de fijación por Wright (1921), para explicar el efecto de consanguinidad dentro las muestras. El definió esta cantidad en términos de un coeficiente de correlación. Mas tarde, Wright (1951) expandió este concepto a una población subdividida dentro un set de subpoblaciones, definiendo a los F -estadísticos como F_{ST} , F_{IS} , F_{IT} (donde I es válido para individuos, S para subpoblaciones y T para la población total). Los estadísticos F_{IS} , F_{IT} , por una parte, explican las correlaciones entre dos unidades gaméticas tomadas al azar de una subpoblación y del total de la población como un todo respectivamente y por otra, nos indican el exceso o déficit de heterocigotos presentes, mientras que el F_{ST} es la correlación entre dos alelos escogidos al azar dentro las subpoblaciones, o relativo a alelos muestreados al azar del total de la población (Wright, 1951, 1965).

Por tanto, F_{ST} mide la consanguinidad debido a la correlación entre alelos dentro la misma subpoblación. Cuando consideramos dos subpoblaciones y a dos alelos de un locus, esta cantidad alcanzará el valor de 1, cuando las dos subpoblaciones sean totalmente homocigotas, y el alelo alternativo este fijado en cada subpoblación (así se explica el termino índice de fijación), mientras

que un valor de 0, se dará cuando las frecuencias en las dos subpoblaciones sean idénticas (bajo la definición original de correlación por Wright (1921), atribuye a F_{ST} valores negativos permitidos porque las correlaciones varían de -1 a +1). Por tanto, F_{ST} representa una medida del efecto Wahlund (Wahlund, 1928), que es una deficiencia de heterocigotos debido a una subdivisión poblacional. Así, F_{ST} mide el déficit de heterocigotos similar a su probabilidad bajo el equilibrio de H-W (Hartl & Clark, 1997).

El efecto Wahlund puede ser interpretado en términos de varianza en las frecuencias alélicas (Wright, 1943, 1951, 1965; Hartl & Clark, 1997):

$$F_{ST} = V_p / [p(1-p)]$$

Donde p y V_p son la media y la varianza de las frecuencias alélicas entre subpoblaciones, considerando a dos alelos de un locus. Esta cantidad positiva es la proporción de la varianza observada, dividida por la varianza máxima posible (cuando los alelos están mezclados en las subpoblaciones).

Más tarde Nei (1977) redefinió los índices de fijación para alelos múltiples como:

$$F_{ST} = (H_t - H_s) / H_t$$

Nota, que las cantidades varían de 0 a 1, puesto que $H_t = H_s$. Cockerham y Weir (1987) definen un F_{ST} vinculado a las probabilidades de identidad.

$$F_{ST} = (f_0 - f_1) / (1 - f_1)$$

Donde f_0 es la probabilidad de identidad, para pares de genes entre individuos dentro una subpoblación, y f_1 entre subpoblaciones. Bajo esta definición, F_{ST} puede ser negativo en situaciones particulares cuando $f_0 < f_1$.

Dado que los microsatélites parecen seguir un SMM. Slatkin definió un estadístico basado en este modelo mutacional. Slatkin (1995) mostró que R_{ST} puede ser definido como:

$$R_{ST} = (S - S_w) / S$$

Donde S es el promedio del cuadrado de las diferencias del tamaño de alelos entre todos los pares de alelos, y S_w , el promedio de la suma de los cuadrados de las diferencias del tamaño de alelos dentro cada subpoblación. A partir de estas dos cantidades (S y S_w); R_{ST} puede ser calculado de la varianza del tamaño de los alelos. Mientras que F_{ST} será típicamente derivado de las varianzas de las frecuencias alélicas. Slatkin (1995) muestra que la relación en esta ecuación, tiene las mismas propiedades, tanto para microsatélites que siguen un SMM generalizado, como para el estadístico F_{ST} en ausencia de mutación.

El principal problema que afecta al F -estadístico cuando se trabaja con microsatélites, es su sensibilidad a la tasa de mutación, cuando la migración es baja. Contrariamente, bajo un estricto SMM, R_{ST} es independiente de la tasa de mutación. Sin embargo, aun bajo la más estricta idea de SMM, R_{ST} puede ser menos confiable al reflejar la diferenciación poblacional que F_{ST} , debido a su asociación a una varianza alta. Por tanto bajo un SMM, R_{ST} beneficiará más que F_{ST} , reduciendo la varianza de la muestra, a través del incremento del número de poblaciones, el número de individuos por población o el número de loci.

La interpretación de los valores de F_{ST} y R_{ST} , puede ser un trabajo peligroso. La interpretación de los dos extremos teóricos para F_{ST} (0 y 1) es sin embargo fácil. Un valor de 0, significa que nosotros muestreamos en una unidad panmíctica. Y al otro extremo, un valor de 1 significa que no hay diversidad dentro las subpoblaciones y que al menos dos de las muestras subpoblaciones están fijadas para diferentes alelos. Valores entre estos dos extremos serán interpretados en varios niveles de estructuración. Sin embargo, puede ser dificultoso dar un significado biológico a estos valores.

Para la interpretación de F_{ST} , ha sido sugerido que un valor que esta en el rango de 0 - 0.05 indica poca diferenciación genética; un valor entre 0.05 y 0.15 moderada diferenciación; un valor entre 0.15 y 0.25 diferenciación grande; y valores por encima de los 0.25 una elevada diferenciación genética (Wright, 1978; Hartl & Clark 1997).

Es necesario evaluar si las estimas de F_{ST}/R_{ST} calculadas para las poblaciones son significativas. Esto es, si los valores estimados difieren significativamente de cero. El uso de pruebas, no-paramétricas nos permite evaluar la significancia de los estimados de F_{ST}/R_{ST} . Un test exacto del estimador- F_{ST}/R_{ST} , estará basado sobre un procedimiento de permutaciones en los cuales

los genotipos son mezclados entre las subpoblaciones a gran número de veces (10.000 veces). De cada conjunto de estos datos es estimado F_{ST} o R_{ST} y la proporción de valores mas grande que o igual a la de un estimado del conjunto de datos reales, producirá el valor de la probabilidad P insesgado de la prueba.

Cuando estimamos F_{ST} o R_{ST} , dos aspectos distintos tienen que ser explicados i) el sesgo y ii) la varianza de los estimadores. De hecho aun con un ajuste perfecto de los estimados F_{ST} y R_{ST} a sus propios índices analíticos (o a su equivalente en términos de numero efectivo de migrantes), estas estimas pueden no ser fiables si su varianza es alta. Ejemplo cuando se trabaja con muestras pequeñas y con un limitado numero de loci.

- Estimación del Flujo génico (Nm)

Mientras que la estructuración poblacional puede proporcionar importante información, es a la vez de gran interés, estimar la diferenciación entre poblaciones bajo la idea de un modelo de migración o flujo génico, en este caso bajo un modelo de isla de migración (Ej. no mutación, mismo N_e en cada subpoblación; Wright, 1931), donde el grado de subdivisión poblacional esta relacionado al numero efectivo de migrantes a través de una simple relación, $F_{ST} = (1 + 4N_e m_e)^{-1}$ donde N_e es el tamaño efectivo poblacional y m_e es la tasa efectiva de migración, es importante notar que este no es el tamaño censado (N), ni la tasa de migración (m). El exceso de la varianza respecto al éxito reproductivo, por ejemplo debido a una proporción desigual de sexos, reducirá la proporción de N_e sobre N . m_e puede también desviarse de m dependiendo del éxito reproductivo de los inmigrantes. Por ejemplo, si hay una relación positiva entre heterocigosidad y eficacia biológica, se espera que la migración sea mas eficiente, porque teniendo la progenie un progenitor inmigrante es esperado ser mas heterocigoto (Ingvarsson & Whitlock, 2000).

- Estimación del tamaño efectivo de la población (N_e)

El tamaño efectivo de una población N_e , es uno de los más importantes factores para entender los procesos evolutivos (Wright, 1931) y la conservación de la diversidad de los recursos genéticos (Lande & Barrowclough, 1987; Hedrick & Miller, 1992).

El tamaño efectivo de la población (N_e) es una medida del efecto de la deriva genética sobre una población. N_e depende de factores demográficos, así como de la densidad poblacional, de patrones de movimiento y de sistemas de apareamiento. Deriva genética es un importante determinante de la estabilidad de las frecuencias alélicas, de la tasa de diferenciación entre poblaciones y de la magnitud de la diversidad dentro las poblaciones. Por tanto, el conocimiento de estos parámetros es fundamental para el entendimiento de la estructura poblacional.

Diferentes métodos han sido postulados para estimar el tamaño efectivo de las poblaciones, un primer método esta basado en una variación temporal de las frecuencias alélicas (Nei & Taniguchi, 1981; Pollack, 1983; Waples, 1989), un segundo método esta basado en el promedio del desequilibrio de ligamiento entre pares de loci segregantes (Hill, 1981) y un tercer método basado sobre el exceso de heterocigotos (Pudovkin *et al.*, 1996). Este ultimo muestra varias ventajas respecto a los 2 primeros. Primero, una estima basada sobre el exceso de heterocigotos requiere datos genotípicos para un solo corte, mientras que el método basado en cambios genéticos temporales, requiere datos de al menos 2 generaciones (separados por algún periodo de tiempo). Segundo, el método basado en el exceso de heterocigotos, requiere únicamente una simple base computacional de datos genotípicos de un solo locus, mientras el método basado sobre desequilibrio de ligamiento requiere de operaciones más dificultosas basadas en datos genotípicos multilocus. Tercero, mientras los cambios genéticos temporales y desequilibrio de ligamientos causados por un N_e pequeño pudo tener alguna señal (incremento o disminución de las frecuencias alélicas; valores positivos o negativos de desequilibrio de ligamiento), el cambio en la heterocigosidad, causado por un pequeño N_e es usualmente positivo, muy raras veces cero y nunca negativo.

Los 3 métodos son bastante independientes y pueden ser usados en conjunto para producir estimas más fiables del tamaño efectivo de la población.

2.3.3.3. Diferenciación genética

Para estudiar las diferencias entre poblaciones se van a comparar las frecuencias alélicas observadas de cada locus mediante una prueba adecuada y calcular las distancias genéticas entre ellas. En este sentido, la distancia genética mide el grado de diferenciación existente entre poblaciones de una misma especie, o entre especies, pudiéndose cuantificar esa diferencia mediante diferentes índices de distancias.

Las distancias genéticas ayudan a entender las relaciones evolutivas entre poblaciones y nos permiten obtener información para caracterización de razas (Nagamine & Higuchi, 2001). De las distancias genéticas es importante estudiar el tipo de distancia, el método de construcción del dendrograma o algoritmos, y el análisis de muestreo.

- *Distancias genéticas*

Las distancias genéticas son estimadores del tiempo de separación entre poblaciones y se basan en ciertas diferencias genéticas existentes dentro y entre poblaciones. Algunas de las distancias genéticas están enfocadas en los cambios de las frecuencias génicas (F_{ST}); mientras que otras incorporan además el proceso mutacional, y en el caso específico de los microsatélites éstas se denominan distancias por pasos o etapas (stepwise). Las matrices de las distancias genéticas entre poblaciones pueden ser convertidas en árboles evolutivos, utilizando métodos de agrupamiento (Goldstein & Schlotterer, 1999)

- *Métodos de agrupamiento*

En la construcción de los árboles filogenéticos existen diferentes métodos para dibujar la matriz de distancias. Sin embargo, los mas empleados son el Neighbour Joining (NJ) y el UPGMA, los cuales generalmente dan muy buenos resultados. A pesar de ello, el primero parece ser superior cuando se suponen en el modelo diferentes tasas de evolución (Eding & Laval, 1999, Takezaki & Nei, 1996).

El método de NJ (Saitou & Nei, 1987) construye árboles mediante sucesivos agrupamientos de alineaciones, tomando en cuenta las longitudes de rama para dichos agrupamientos. Una vez realizado el agrupamiento deriva la mejor aproximación para la máxima parsimonia, construyendo los grupos apareados sobre la base de la mínima longitud de rama. Las dos principales características de este método son que los resultados nos dan un árbol no rotado (sin raíz u origen evolutivo), y luego este no supone un reloj evolutivo.

Por otra parte, el método de UPGMA (Sokal & Michener, 1958) construye los árboles o dendrogramas mediante sucesivos agrupamientos bajo el criterio del promedio de la distancia de cada par. Se caracteriza porque supone una tasa constante de cambios evolutivos, es decir, supone la existencia de un reloj evolutivo y los árboles son rotados. Weir (1996) lo definió como una distancia entre grupos, producto del promedio de todas las distancias entre pares de cada una de las combinaciones.

Es así como los dendrogramas no son mas que la representación gráfica de una matriz de distancias y que bajo ciertas condiciones esta representación puede ser tomada como una estimación de la filogenia.

3. OBJETIVOS DE ESTUDIO

3.1. Objetivo general

Estudiar la diversidad, estructuración y diferenciación genética de 6 poblaciones de *Anopheles darlingi* de la amazonía boliviana. a partir de 5 loci de microsatélites.

3.2. Objetivos específicos

- Medir el grado de heterocigosidad esperada y número de alelos en las poblaciones de estudio.
- Determinar la composición y distribución de las frecuencias alélicas para cada loci de microsatélite en las distintas poblaciones de *Anopheles darlingi*. del norte de Bolivia.
- Calcular el test de equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento para las 6 poblaciones de estudio a partir de los 5 loci de microsatélites.
- Calcular las estimas de las frecuencias de alelos nulos.
- Estimar la estructuración genética y flujo génico (Nm) a través de los parámetros F_{ST} y R_{ST} para pares de poblaciones.
- Calcular estimas de F_{ST} y R_{ST} para grupos de poblaciones estrechamente cercanas de la amazonía boliviana.
- Realizar un AMOVA (análisis de varianza molecular) a partir de estimas de F_{ST} (IAM) y R_{ST} (SMM).
- Determinar el grado de diferenciación genética entre poblaciones a partir de distancias genéticas.

- Correlacionar efecto de aislamiento por distancia con diferenciación genética poblacional.
- Estimar el tamaño efectivo (N_e) de las poblaciones de *Anopheles darlingi*.
- Determinar si las poblaciones de estudio fueron sometidas a un efecto cuello de botella

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Poblaciones de *An. darlingi*

Se estudiaron 6 poblaciones de *An. darlingi*. Cada población representó un sitio de captura de mosquitos. Los sitios de captura se encuentran distribuidos en los departamentos de Beni y Pando, regiones consideradas con alta endemia para la Malaria ..

Cada población fue nombrada según la localidad Prado (PRA), Puerto Rico (PR), Guayaramerín (GUAYA), Rosario de Yata (RY), Cachuela Esperanza (CE) y San Miguel (SM) (Tabla 1). Estas localidades se encuentran separadas entre si por distancias de 10 a 240 km. (Figura 5, Tabla 2).

Tabla 1. Descripción de los sitios de estudio

Población	Dpto.	Provincia	Latitud Sur	Latitud Oeste	Número de mosquitos analizados	Periodo de colecta
Prado (PRA)	Beni	Vaca Diez	11°0'36"	66°0'7"	43	Sept.- 2003
Puerto Rico (PR)	Pando	Manuripí	11°06'30"	67°33'26"	44	Sept.- 2003
Guayaramerín (GUAYA)	Beni	Vaca Diez	10°49'39.36"	65°23'57.40"	41	Sept.- 2003
Cachuela Esperanza (CE)	Beni	Vaca Diez	10°33'00.86"	65°36'01.18"	43	Sept-2003
Rosario de Yata (RY)	Beni	Vaca Diez	10°51'05.32"	65°45'34.32"	40	Marzo-2004
San Miguel (SM)	Beni	Vaca Diez	10°50'54"	65°44'0.95"	40	Sept-2003

Tabla 2. Distancia de separación entre poblaciones en km.

	PRA	PR	GUAYA	CE	RY	SM
PRA		165	73	66	46	63
PR			240	220	213	230
GUAYA				40	31	10
CE					50	37
RY						22
SM						

Los mosquitos fueron colectados durante la noche, tanto del intra-domicilio como del peridomicilio, a través de un cebo humano con el uso de succionadores. Las muestras de las localidades del Prado, Puerto Rico, Guayaramerín, Cachuela Esperanza y San Miguel fueron colectadas en septiembre del 2003, mientras que las de la localidad de Rosario de Yata fue colectada en marzo del 2004 (Tabla 1).

Posteriormente los mosquitos fueron trasladados a laboratorio para ser identificados según los criterios morfológicos (Gorham *et al.*, 1973).

Un total de 251 individuos de *Anopheles darlingi* fueron analizados para 5 loci de microsatélites.

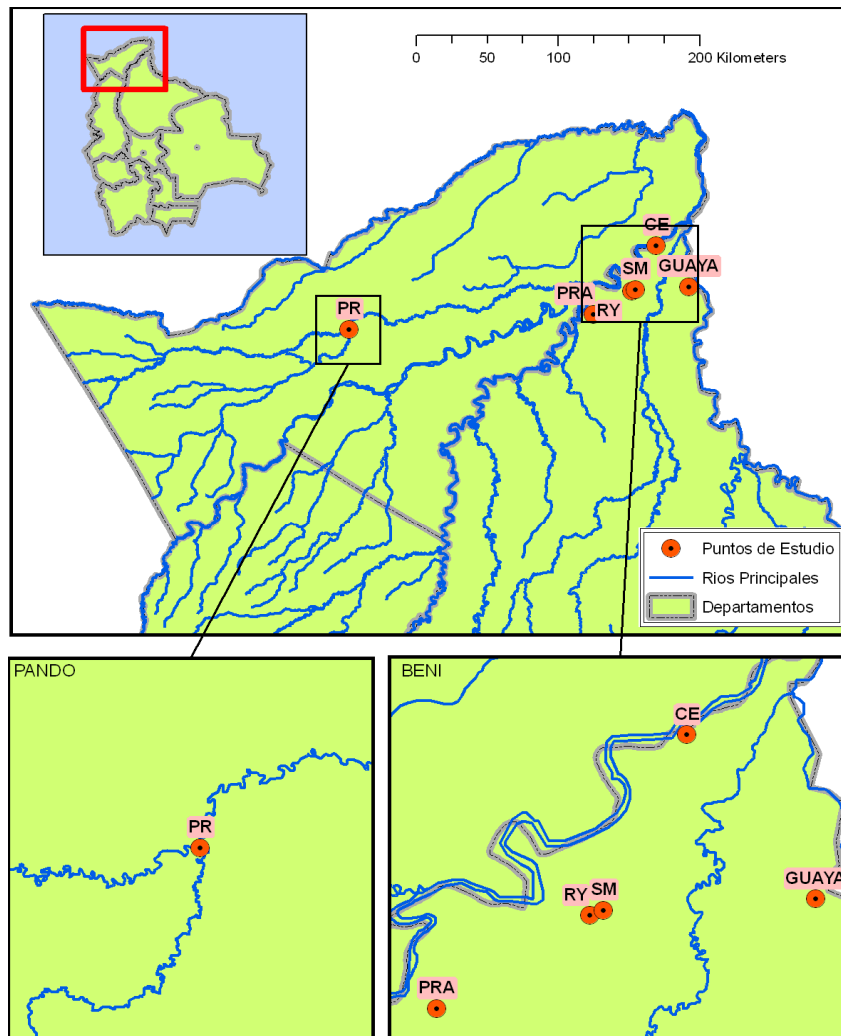


Figura 5. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Anopheles darlingi* estudiadas.

4.2. Análisis molecular

4.2.1. Extracción del DNA genómico

Se suspendió y homogeneizo cabeza, tórax y abdomen de *Anopheles darlingi* en 200 ul de CTAB al 2% (Tris-HCl pH = 8.0 100 mM; EDTA 10 mM; NaCl 1.4 M; CTAB 2%; Agua), la suspensión fue llevada a incubación a 65°C por 5 minutos, seguido de la adición de 200 ul de cloroformo. La fase acuosa fue separada por centrifugación (12000 g/5min.) a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado en otro tubo y llevado a precipitación con 200ul de isopropanol, seguido de centrifugación (12000 g/15min.).

Después de obtenido el pellet se realizo el lavado y secado con etanol al 70% a 37°C para luego ser resuspendido en 100 ul de agua libre de DNAsas y RNAsas.

4.2.2. Amplificación de microsatélites

La amplificación de los segmentos de DNA genómico de *Anopheles darlingi* se realizó a partir de 5 de los 8 loci de microsatélites aislados por Conn *et al.* (2001) (Tabla. 3) (Anexo 5).

Tabla 3. Características de los loci aislados de *Anopheles darlingi* de Capanema, Pará, Brasil, para el análisis de la variabilidad genética de este vector primario Neotropical.

Locus	Motivo repetido	Secuencia de Primer (5'-3')	Alelos	Rango (pb)	Tamaño de Alelos	
					H_E	H_O
ADC02 AF322186	(GA) ₇₊₇	CAC ACT GGG GCA TCA TTC ATT TC CAG TGT CTA AGG ACG CAG TGT GA	23	155-245	0.823	0.474
ADC28 AF322187	(GA) ₉	CTC GTC GTC AGC GTC GTG C CCG TTA CGC AGT GGA TGG GCA	7	123-141	0.632	0.462
ADC107 AF322189	(AC) ₁₂	ATC GGT CCA CTC CCA GGC AC GCA TCG TAC GCT TCC ATC TCC TGC	22	183-277	0.785	0.527
ADC110 AF322190	(GT) ₁₆	CCG AAC AAC AGC CAA CAG CTG TG CGT GTG TAA CGA TTG TGT CGA ACG	18	150-212	0.864	0.769
ADC137 AF322191	(GT) ₁₁	TCT TAC GGC AAT GGT GCG ACG CTC TGG TCA ACA GCG TAT GGG TGG CTG	17	125-197	0.987	0.689

Tres de los 8 loci no fueron tomados en cuenta por los criterios siguientes: i) la diferencia elevada observada entre la H_O (0.368) y H_E (0.827) para el loci *ADC138* que podría involucrar un déficit de heterocigotos atribuido a alelos nulos, y ii) el alto polimorfismo observado en los loci *ADC01* y *ADC29* (44 alelos y 28 alelos respectivamente), que podría impedir una correcta designación de los alelos a partir de la identificación del tamaño de los mismos en corridas electroforéticas.

4.2.3. Visualización de microsatélites

Los amplicones de microsatélites fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 10% (acrilamida 30% y bis-acrilamida 0.8%) polimerizados con persulfato de amonio (PSA 0,05 % [p/vol]) y tetrametil-etilen-diamina (N,N,N,N' TEMED 0.01% [p/vol]) en buffer TBE 0.5X (Laemmeli, 1980). La corrida de los geles se llevo a cabo a 250 voltios, a temperatura ambiente durante 3 horas.

Finalizada la corrida, los geles fueron sumergidos en una solución fijadora al 5X (etanol 50%, ácido acético al 2,5 %) y al 1X durante 15 minutos cada vez. La tinción se realizo sumergiendo en solución de Nitrato de Plata al 0,011M durante 30 minutos, seguida del revelado en solución de NaOH al 0,75 M y formaldehído al 0,3%.

Una vez visualizados los geles, se prosiguió a la designación de alelos para el análisis genético (Anexo 6).

4. 3. Análisis de datos

Diversidad genética. Fue cuantificada en términos de heterocigosidad, numero de alelos por locus y frecuencias alélicas observadas en cada población. Las heterocigosidades H_o (observada) y H_e (esperada) fueron calculadas usando el programa TFPGA versión 1.3 (Miller, 1997). Las frecuencias alélicas y el número de alelos fueron obtenidas del análisis de datos genéticos con el programa F_{STAT} (Goudet, 2001).

Equilibrio de Hardy-Weinberg. El coeficiente de endogamia (F_{IS}) fue obtenido utilizando el programa GENEPOP. El test de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg fue llevado a cabo usando un test exacto por el método de las cadenas de Markov en el programa GENEPOP versión 3.4 (Raymond & Rousset, 1995) y esta basado en una hipótesis nula de unión al azar de gametos y una hipótesis alternativa de deficiencia de heterocigotos.

Desequilibrio de ligamiento. Fue testado usando tablas de contingencia entre pares de loci en una población bajo un test exacto, basado en la hipótesis nula que genotipos para un locus son independientes a los genotipos de otro locus. Cálculos fueron llevados a cabo en el programa ARLEQUÍN versión 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006).

Estimación de frecuencias de alelos nulos. El cálculo fue realizado a partir de un estimador de máxima probabilidad postulado por Kallinowski y Taper (2006), a diferencia de otros estimadores, este propone un parámetro que incorpora datos ausentes. Los datos fueron analizados en el software ML-NUL-ALLELES (Kallinowski & Taper, 2006)

Estimación de la estructura poblacional y flujo génico. La diferenciación genética poblacional fue estudiada por los índices de fijación F -estadísticos (Wright, 1978) y un estimador similar, R_{ST} (Slatkin, 1995). Estimaciones de F_{ST} fueron calculadas de acuerdo a Weir & Cockerham (1984), usando el programa F_{STAT} versión 2.9.3.2 (Goudet, 2001), mientras que estimaciones de R_{ST} fueron calculadas de acuerdo a Slatkin (1995), con el programa R_{ST} CALC (Goodman, 1997) con significancia determinada por un test de permutaciones ($P > 0.05$, indica que el valor no es significativo). Las estimaciones de diferenciación F_{ST} basadas en el modelo IAM y R_{ST} bajo el modelo SMM.

Las estimaciones del flujo génico fueron calculadas en base al número de migrantes por población (Nm). Este cálculo fue llevado a cabo a partir de estimaciones de F_{ST} , de acuerdo a la ecuación $Nm = (1 - F_{ST}) / 4 F_{ST}$, a la vez, se realizó cálculos de Nm a partir de estimaciones de R_{ST} , siguiendo el postulado de Slatkin (1995), $Nm = (d - 1)(1 - R_{ST}) / 4dR_{ST}$, donde d es el número de poblaciones de estudio. Estos cálculos asumen que la migración ocurre al azar entre todas las poblaciones (modelo de isla), donde el modelo de flujo génico es independiente de la distancia geográfica, y las poblaciones se encuentran en equilibrio migración-deriva.

Los valores umbrales tomados en cuenta para F_{ST} y R_{ST} fueron: de 0-0.05 indica poca diferenciación genética; un valor entre 0.05 y 0.15 moderada diferenciación; un valor entre 0.15 y 0.25 diferenciación grande; y valores por encima de los 0.25 una elevada diferenciación genética (Wright, 1978; Hartl & Clark, 1997).

Para un modelo de isla, valores de $Nm > 1$, indican que el flujo génico se impone a la deriva genética.

AMOVA (*Análisis de varianza molecular*) Este análisis fue realizado para estudiar la distribución de la variación genética entre individuos, entre poblaciones, el análisis fue llevado a cabo en el programa ARLEQUIN v. 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006) usando estimas de F_{ST} (IAM) y R_{ST} (SMM).

Distancias genéticas. Este análisis fue realizado para indicar la relación entre las poblaciones a partir de distancias genéticas. Fue llevado a cabo a través de un análisis de cluster (UPGMA) (Swofford & Olsen, 1990), el árbol fue construido en base a las distancias genéticas de Nei (1978) con corrección para un tamaño muestral pequeño, en el programa TFPGA version 1.3 (Miller, 1997).

Aislamiento por distancia. Se realizó el análisis del aislamiento por distancia como una posible respuesta a una diferenciación poblacional. Una correlación entre la distancia geográfica y genética fue testada por la regresión de $F_{ST} / 1 - F_{ST}$ o $R_{ST} / 1 - R_{ST}$ sobre el logaritmo natural de las distancias geográficas (Rousset, 1997) a 10.000 permutaciones, el análisis fue llevado a cabo a través de un test de mantel incorporado en el programa ARLEQUÍN.

Tamaño efectivo de la población (N_e) y Equilibrio-Mutación-Deriva (MDE). La estimación del tamaño efectivo de las poblaciones fueron calculadas en base al promedio del desequilibrio de ligamiento entre pares de loci segregantes (Hill, 1981) y a partir del exceso de heterocigotos (Pudovkin *et al.*, 1996). Estas estimas fueron obtenidas en el programa NeESTIMATOR versión 1.3 (Peel *et al.*, 2004).

Para estudiar el exceso de heterocigotos (HE) se uso un test de heterocigosidades en el programa BOTTLENECK (Cornuet & Luikart, 1996), el mismo compara dos estimas de la heterocigosidad esperada. Por un lado, He , basado en las frecuencias alélicas, y por otro, Heq basado en el número de alelos y tamaño de la muestra. Esta comparación es realizada bajo ambos modelos

de mutación (IAM, SMM). Diferencia significativa entre ambas estimas de heterocigosidad, bajo el modelo mutacional correcto, implicará que la población no esta a MDE, mientras que la igualdad entre las mismas bajo un loci neutral, indicará que las poblaciones están en MDE.

En todos los análisis, donde es utilizado un test múltiple es aplicado un procedimiento secuencial de Bonferroni (Holm, 1979).

5. RESULTADOS

5.1. Análisis de la variabilidad genética

5.1.1. Diversidad genética

La diversidad genética poblacional fue medida por el número de alelos y las heterocigosidades esperadas. Los 5 loci de microsatélites fueron polimórficos en las 6 poblaciones, y presentaron en promedio 10.5 alelos con un rango de 6-14 alelos por loci. Los loci *ADC02* y *ADC137* fueron los marcadores mas polimórficos (14.0 y 13.0 alelos) respectivamente.

Tabla 4. Tamaño de muestra (N), número de alelos (A), heterocigosidad esperada (H_E), heterocigosidad observada (H_0) y desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (F_{IS})

Locus		Prado (PRA) $N = 43$	Puerto Rico (PR) $N = 44$	Guayaramerín (GUAYA) $N = 41$	Cachuela Esperanza (CE) $N = 43$	Rosario de Yata (RY) $N = 40$	San Miguel (SM) $N = 40$	Todas las Poblaciones
ADC 107	N	38	38	36	40	37	33	
	A	7	7	7	6	8	8	8
	H_E	0.795	0.698	0.733	0.577	0.673	0.694	0.687
	H_0	0.316†	0.342†	0.500	0.175†	0.270†	0.303†	0.315†
	F_{IS}	0.594	0.509	0.311	0.698	0.597	0.552	
ADC 02	N	41	41	36	42	39	40	
	A	8	8	10	9	7	8	11
	H_E	0.798	0.717	0.846	0.848	0.757	0.829	0.795
	H_0	0.487†	0.536	0.472†	0.476†	0.307†	0.325†	0.435†
	F_{IS}	0.384	0.252	0.438	0.438	0.587	0.609	
ADC 137	N	36	40	39	38	40	40	
	A	10	11	10	11	9	10	
	H_E	0.856	0.833	0.848	0.846	0.857	0.859	0.849
	H_0	0.472†	0.538†	0.589	0.710			



Figura 6. Composición y distribución de las frecuencias alélicas para cada loci de microsatélites de las poblaciones de *Anopheles darlingi*.

La composición y distribución alélica para el locus *ADC107* es similar en las 6 poblaciones, registrándose al alelo 196 (pb) como el alelo común con la frecuencia más alta en todas las poblaciones de estudio, mientras que alelos con frecuencias bajas son registrados como los menos comunes. Similar patrón fue observado para los loci *ADC28*, *ADC110* y *ADC137*, los mismos no muestran un patrón de diferenciación entre las poblaciones, siendo los alelos comunes los que revelan las frecuencias más altas en las 6 poblaciones. A diferencia, el locus *ADC02* presenta un patrón de distribución de frecuencias alélicas menos uniforme entre las poblaciones, revelando, que todas las poblaciones son polimórficas para este loci (Figura 6).

5.1.3. Test de equilibrio de Hardy-Weinberg

Las hipótesis de predicción del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) en las 6 poblaciones de estudio fueron significativamente rechazadas, la desviación fue asociada a un déficit de heterocigotos (F_{IS} positivo y altamente significativo) en 22 de 30 test (5 loci x 6 poblaciones) después de un análisis de corrección secuencial de Bonferroni (Holm, 1979). Cada locus reveló de 1 a 4 poblaciones en equilibrio de H-W. A diferencia, el locus *ADC28* no presentó ninguna población en equilibrio de H-W (Tabla 4).

El déficit de heterocigotos observado, puede ser atribuido a la presencia de alelos nulos. De acuerdo al estimador de Kallinovski & Taper (2006), se estimaron las frecuencias de alelos nulos para cada loci. Los loci *ADC107* y *ADC28* presentaron las frecuencias más altas de 0.33 y 0.29 respectivamente, que correlacionan con el agrupamiento de déficit de heterocigotos para cada uno de estos locus (Tabla 5).

Asimismo, fue llevado a cabo un análisis de desequilibrio de ligamiento entre pares de loci para confirmar si la desviación del equilibrio de H-W dentro las poblaciones fue debido a un efecto Wahlund, endogamia o a ligamiento con genes bajo presión de selección. El análisis de desequilibrio de ligamiento en todas las poblaciones mostró por un lado, diferencias significativas en 23 de 60 tests a un nivel de significancia del 5% por otro lado, después de una corrección de Bonferroni ($P = 0.001$), reveló a 4 pares de loci en desequilibrio de ligamiento en las 6 poblaciones de estudio (Tabla 6). En cada caso donde se observó un significativo desequilibrio de ligamiento

Tabla 5. Estimaciones de frecuencia de alelos nulos, calculadas a partir de un parámetro de máxima probabilidad propuesto por Kallinowski & Taper (2006)

Locus	PRA N=43	PR N=44	GUAYA N=41	CE N=43	RY N=40	SM N=40	Todas las Poblaciones
ADC107	0.3677	0.3355	0.1660	0.3443	0.3219	0.3669	0.32
ADC02	0.2220	0.1517	0.2685	0.2219	0.2732	0.2710	0.23
ADC137	0.2840	0.2089	0.1898	0.0786	0.1177	0.1180	0.17
ADC110	0.2700	0.2726	0.3188	0.0468	0.2632	0.0783	0.21
ADC28	0.3053	0.3339	0.2973	0.2415	0.2939	0.2425	0.29

Tabla 6. Pares de loci en desequilibrio de ligamiento a un nivel de significancia de $P = 0.001$

Pares de loci	PRA	PR	GUAYA	CE	RY	SM
(ADC107, ADC02)						+
(ADC107, ADC137)	+			+		
(ADC02, ADC137)						
(ADC107, ADC110)						
(ADC02, ADC110)					+	
(ADC137, ADC110)						
(ADC107, ADC28)				+		
(ADC02, ADC28)						
(ADC137, ADC 28)						
(ADC110, ADC 28)						

(+) loci en desequilibrio de ligamiento después de una corrección secuencial de Bonferroni.

entre pares de locus para una población, fue también observado un significativo déficit de heterocigotos.

5.2. Análisis de la estructura poblacional y flujo génico

5.2.1. Estimación de la estructuración genética

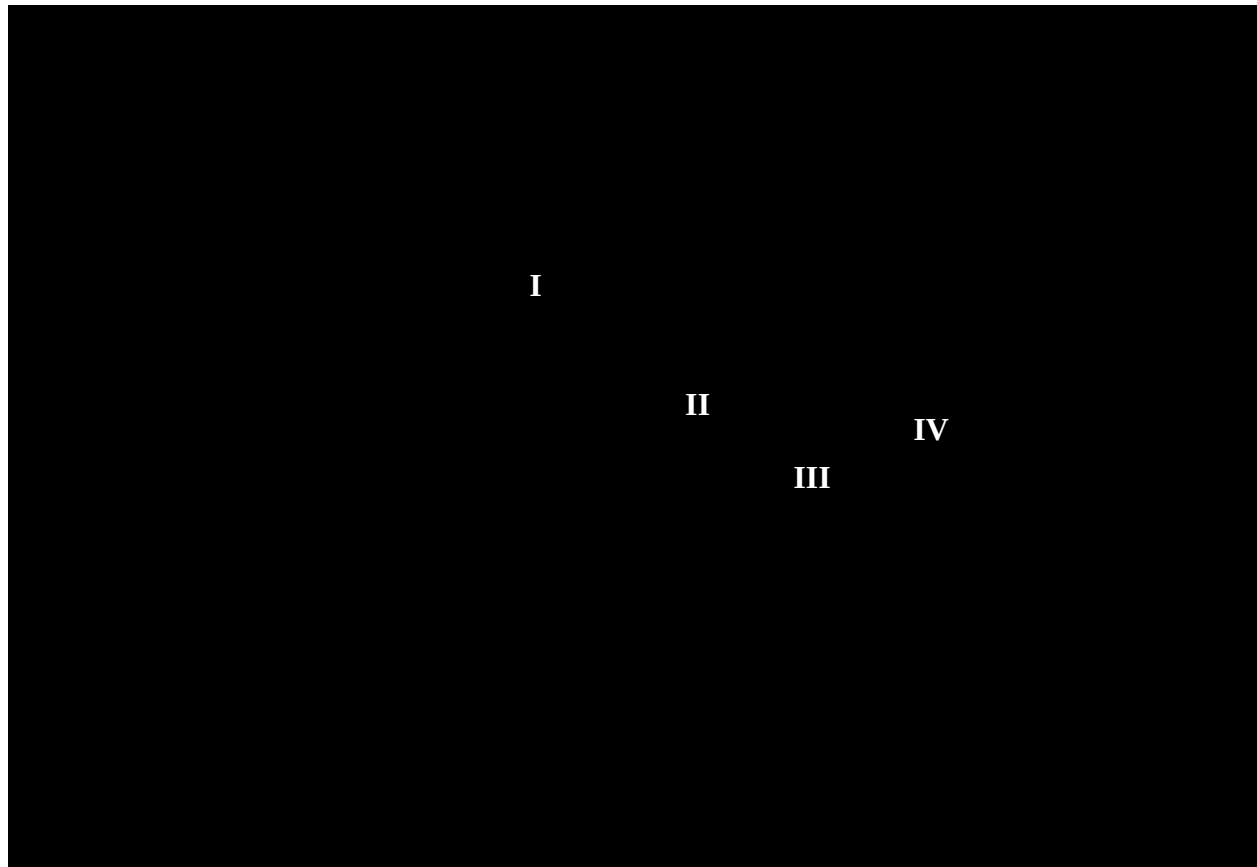
Se observó una mínima diferenciación genética estadísticamente significativa entre las 6 poblaciones de estudio, tanto para los loci *ADC02*, *ADC110* y *ADC137*, así como para el conjunto de loci, revelando un valor de F_{ST} promedio de 0.022 ($P < 0.01$), con estimas que van de 0.0058 para el locus *ADC28* a 0.0509 para el locus *ADC02*. El valor de R_{ST} fue ligeramente superior, $R_{ST} = 0.027$ ($P = 0.05$), con valores que van de 0.0007 para el locus *ADC28* a 0.0402 para el locus *ADC110*.

Valores de F_{ST} muestran a 2 de los 5 loci, significativamente diferentes de cero ($P < 0.01$), mientras que valores de R_{ST} muestran a 3 de los 5 loci ($P < 0.05$). Asimismo, estimas de F_{ST} y R_{ST} no revelaron correlación entre sus valores y mostraron heterogeneidad entre locus (Tabla 7).

Se agrupó a 5 poblaciones geográficamente cercanas de las 6 poblaciones de estudio, a su vez se formaron nuevos grupos discriminando en cada uno de ellos a las poblaciones mas alejadas. Así, se formaron grupos de 5, 4, 3, y 2 poblaciones (Tabla. 7; Figura 7). Los grupos II (GUAYA, PRA, CE, SM, y RY) y III (GUAYA, RY, CE, SM) mostraron en promedio estimas bajas de diferenciación, sin embargo, los grupos IV (GUAYA vs. SM y RY) y V (GUAYA vs. SM), revelaron los valores mas altos de diferenciación genética, indicando que la mínima diferenciación observada es superior entre las poblaciones de GUAYA, SM y RY respecto al resto de las poblaciones de estudio.

Tabla 7. Estimados de F_{ST} y R_{ST} para poblaciones de *Anopheles darlingi* de la Amazonía Boliviana

Locus	I Para las 6 poblaciones		II Para 5 poblaciones (GUAYA, PRA, CE, SM, RY)		III Para 4 poblaciones (GUAYA, RY, CE, SM)		IV Para 3 poblaciones GUAYA vs. RY vs. SM		V Para 2 poblaciones GUAYA vs.SM	
	F_{ST}	R_{ST}	F_{ST}	R_{ST}	F_{ST}	R_{ST}	F_{ST}	R_{ST}	F_{ST}	R_{ST}
<i>ADC107</i>	0.0158	0.0307	0.0131	0.0254	0.0095	-0.0148	0.0051	-0.0041	-0.0003	-0.0079
<i>ADC02</i>	0.0509***	0.0337*	0.0440 ***	0.0378*	0.0311**	0.0302	0.0420**	0.0433	0.0374*	-0.0111
<i>ADC137</i>	0.0094	0.0313*	0.0111	0.0417*	0.0146	0.0412*	0.0228**	0.0370	0.0409**	0.0729*
<i>ADC110</i>	0.0286**	0.0402**	0.0255*	0.0325*	0.0339**	0.0428*	0.0378*	0.0601*	0.0764**	0.1097**
<i>ADC28</i>	0.0058	0.0007	0.0032	0.0030	-0.0005	0.0096	0.0246	0.0215	0.0084	0.0439
Total	0.022***	0.027**	0.020***	0.028*	0.018***	0.021	0.026***	0.031	0.032***	0.046

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ **Figura 7.** Agrupamiento de poblaciones de *Anopheles darlingi* geográficamente cercanas en la Amazonía Boliviana

Las estimas de diferenciación genética entre pares de poblaciones para F_{ST} mostraron a 8 de 15 tests significativamente diferenciados después de una corrección de Bonferroni, con valores que van de 0.005 a 0.0313. Observándose, por un lado, los valores mas bajos entre las poblaciones de CE y RY (0.0055); RY y SM (-0.0016); CE y SM (-0.0002) que no reflejan diferenciación genética y por otro lado, valores más altos entre las poblaciones de PR y SM (0.0313); PR y CE (0.0312), que indican una mínima diferenciación estadísticamente significativa entre las mismas (Tabla 8).

Estimas de R_{ST} se presentaron en un rango de 0.0004 a 0.1102, donde únicamente 1 de los 15 tests fue estadísticamente significativo entre las poblaciones de RY y PRA ($R_{ST} = 0.1102$ $P < 0.001$), indicando una diferenciación genética estadísticamente significativa.

Asimismo, este análisis reveló que las poblaciones de SM, CE, RY muestran los valores más bajos y no significativos de diferenciación genética respecto al resto de las poblaciones, tanto para estimas de F_{ST} como R_{ST} . Valores negativos entre estas poblaciones (CE, RY y CE) indican que la mayor parte de la diferenciación genética esta dentro, más que entre las poblaciones. En otras palabras, estas poblaciones no presentan diferenciación y son esencialmente panmícticas (Tabla 8).

Tabla 8. Estimas de la diferenciación genética para cada par de poblaciones de *Anopheles darlingi* de la amazonía boliviana (R_{ST} debajo la diagonal y F_{ST} encima la diagonal).

	PRA	PR	GUAYA	CE	RY	SM
PRA		0.0144	0.0097	0.0121	0.0190 **	0.0246 **
PR	0.0677		0.0280 **	0.0312 **	0.0065 **	0.0313 **
GUAYA	0.0084	0.0532		0.02*	0.0248 **	0.0289 **
CE	0.0274	0.0263	0.030		0.0055	-0.0002
RY	0.1102 **	0.0004	0.0887	0.0478		-0.0016
SM	0.0314	0.0039	0.0158	-0.0067	0.0135	

*P = 0.05 por la corrección de Bonferroni (20000 permutaciones)

**P < 0.05.

Un análisis de varianza molecular (AMOVA) en base a estimas de R_{ST} y F_{ST} bajo ambos modelos mutacionales, indico por un lado, que el mayor porcentaje de variación (96%) proviene de la diferencia entre individuos dentro las poblaciones, y por otro, que la variación existente entre las poblaciones es mínima y significativa (3% y 4% respectivamente) (Tabla 9)

Tabla 9. Análisis de varianza molecular (AMOVA) con 5 loci de microsatélites, en base a valores de F_{ST} y R_{ST}

FUENTE DE VARIACIÓN	F_{ST} (IAM)			R_{ST} (SMM)	
	gl.	% de variación	P	% de variación	P
Variación entre poblaciones de la amazonía boliviana					
Entre poblaciones	5	4		3	
Entre individuos dentro las poblaciones	496	96		97	
Índice de fijación					
F_{ST}/R_{ST}		0.04	< 0.001	0.033	< 0.05

- Nivel de significancia basado sobre 20000 permutaciones.

5.2.2. Estimación del flujo génico

Las estimas del flujo génico (Nm) fueron calculadas a partir de los valores de F_{ST} y R_{ST} (Tabla 10).

A partir de valores de F_{ST} , las estimas del flujo de genes (Nm) fueron superiores a 8, lo que reveló que el flujo génico se impone a la deriva genética, además de sugerir la existencia de pocas barreras que impidan el flujo génico en un radio aproximado de 240 km.

A partir de valores de R_{ST} , las estimas del flujo de genes (Nm) fueron superiores a 2 (PRA y RY) (Tabla 10), que es un numero significativo para suponer que el flujo génico se impone sobre la deriva. A la vez, se observaron estimas altas y negativas, a partir de ambos estimadores (F_{ST} , R_{ST}) (CE, SM y RY), que indica flujos activos entre las poblaciones.

5.2.3. Tamaño efectivo de la población (N_e)

Estimas del tamaño efectivo de la población (N_e) difirieron considerablemente dependiendo del modelo usado (Tabla 11).

Tabla 10. Estimaciones de N_m (Número de migrantes por generación) a partir de estimaciones de F_{ST} por encima de la diagonal y R_{ST} por debajo de la diagonal. Entre paréntesis, distancias geográficas entre las poblaciones en Km.

	PRA	PR	GUAYA	CE	RY	SM
PRA		17 (165)	26 (73)	20 (66)	13 (46)	10 (63)
PR	3 (165)		9 (240)	8 (220)	38 (213)	8 (230)
GUAYA	30 (73)	4 (240)		12 (40)	10 (31)	8 (10)
CE	9 (66)	9 (220)	83 (40)		45 (50)	-1250 (37)
RY	2 (46)	625 (213)	3 (31)	5 (50)		-157 (22)
SM	8 (63)	64 (230)	16 (10)	-38 (37)	18 (22)	

Tabla 11. Estimaciones de N_e , calculadas bajo los modelos de Desequilibrio de Ligamiento (LD) y de Exceso de Heterocigotos (HE)

	LD	HE
Población	N_e (95% IC)	N_e (95% IC)
PRA	56 (31.2 – 163.8)	∞ (NA)
PR	620.2 (79.5 - ∞)	∞ (NA)
GUAYA	4658 (93.4 - ∞)	∞ (NA)
CE	124.2 (51.6 - ∞)	∞ (NA)
RY	93.8 (43.4 - 2696.6)	∞ (NA)
SM	131.8 (50.5 - ∞)	∞ (NA)
Total	71.0 (60.4 – 83.9)	∞ (NA)

IC = intervalo de confianza; NA = no asequible

Bajo un modelo de desequilibrio de ligamiento, se observó para las 6 poblaciones de estudio un $N_e = 71$ con 95% de intervalo de confianza (IC) de 60.4-83.9. Las poblaciones PR y GUAYA son las que presentaron los valores más altos de N_e , con 620 (95% IC. 79.5 - ∞) y 4658 (95% IC. 93.4 - ∞) individuos respectivamente y la población del PRA el valor mas bajo de $N_e = 56$ individuos (95% IC. 31.2 – 163.8)

Bajo un modelo de exceso de heterocigotos, las estimas de N_e fueron ∞ en todas las poblaciones.

5.2.4. Equilibrio-Mutación-Deriva (MDE)

Los análisis de heterocigosidades en las 6 poblaciones de estudio, bajo los dos modelos de mutación (IAM, SMM) fueron diferentes (Tabla 12).

Bajo el modelo SMM se observó un déficit de heterocigotos en 5 de las 6 poblaciones, siendo significativa ($P < 0.05$) únicamente en la población de GUAYA.

Bajo el modelo IAM se mostró, contrariamente, un exceso de heterocigotos en las 6 poblaciones, sin observarse en ninguna de las poblaciones un valor significativo.

Tabla 12. Numero de loci, exhibiendo el exceso de heterocigotos (He) y la heterocigosidad esperada (Heq) del numero de alelos observados bajo ambos modelos IAM y SMM

Población	Stepwise Mutation Model (SMM)			Infinite Alleles Model (IAM)		
	$He < Heq$	$He > Heq$	$P (He > Heq)$	$He < Heq$	$He > Heq$	$P (He > Heq)$
PRA	2	3	0.65	0	5	0.09
PR	3	2	0.34	1	4	0.35
GUAYA	5	0	0.01	0	5	0.07
CE	4	1	0.09	0	5	0.08
RY	3	2	0.35	0	5	0.08
SM	4	1	0.09	0	5	0.08

5.3. Análisis de la diferenciación genética

5.3.1. Distancias genéticas

Un análisis de cluster (UPGMA), basado en las distancias genéticas de Nei (1978), calculó la relación existente entre las poblaciones, agrupándolas como se muestra en la Figura 8. Este análisis indicó que la distancia de separación entre las 6 poblaciones es mínima (0.0212), y que a una distancia mínima de separación (0.0033), se observa un agrupamiento entre las poblaciones de RY y SM.

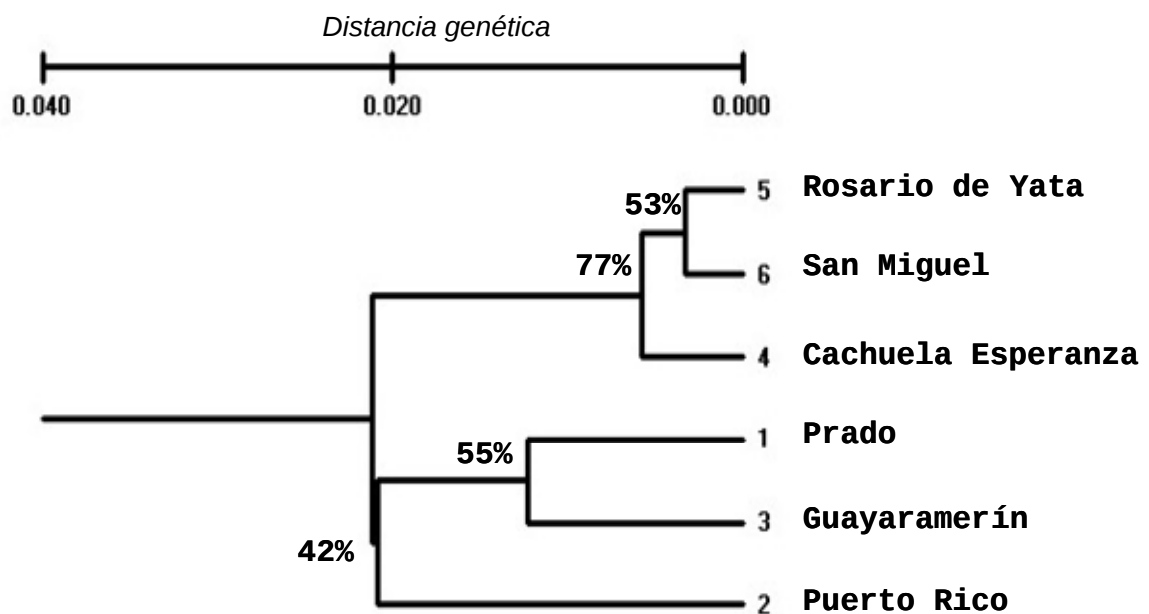


Figura 8. Un dendrograma UPGMA mostrando la relación entre las poblaciones muestreadas de *Anopheles darlingi* construido en base a distancias genéticas de Nei (1978). El bootstrap (1000 permutaciones) es indicado en porcentajes.

5.3.2. Aislamiento por distancia.

El aislamiento por distancia fue testado por medio del análisis de correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética (R_{ST} , F_{ST}), a través de un test de mantel. Este análisis mostró una correlación no-significativa usando estimas de R_{ST} bajo el SMM ($R^2 = 0.488637$ $P =$

0.07), asimismo, estimas de F_{ST} bajo el IAM, mostraron una correlación negativa, no significativa ($R^2 = 0.2359$ $P = 0.764$) (Figura 9).

La regresión de ambas estimas $F_{ST}/1-F_{ST}$ y $R_{ST}/1-R_{ST}$ para todos los locus, sobre el ln de las distancias geográficas, no fueron estadísticamente significativas. Indicando que la distancia geográfica entre las poblaciones no es una barrera geográfica para la diferenciación genética entre las mismas.

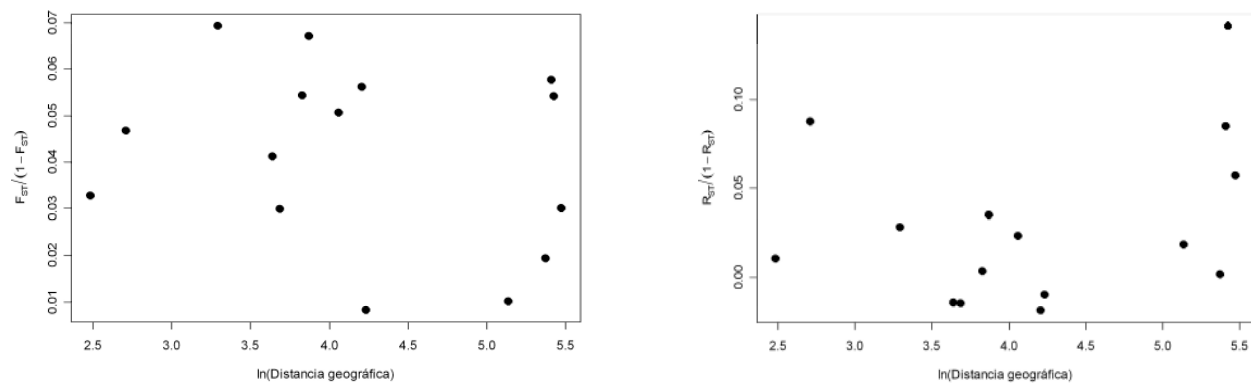


Figura 9. Correlación entre $F_{ST}/1-F_{ST}$; $R_{ST}/1-R_{ST}$ y logaritmo de la distancia en km., calculados sobre 5 loci de microsatélites para 6 poblaciones de *Anopheles darlingi* de la amazonía boliviana.

6. DISCUSIÓN

6.1. Variabilidad genética

Las poblaciones de estudio revelaron un nivel moderado de variabilidad genética. El número medio de alelos y promedio de las heterocigosidades, encontradas a partir de los 5 loci de microsatélites ($A = 10.5$; $H_E = 0.885$) son similares a los encontrados en poblaciones de *Anopheles darlingi* del este de la amazonia brasilera, a partir de los mismos loci de microsatélites ($A = 13.5$ y $H_E = 0.834$) (Conn *et al.*, 2006), a la vez, son similares al encontrado para *Anopheles albimanus* ($A = 10.8$; $H_E = 0.78$) otro vector Neotropical importante, estudiado con marcadores de microsatélites (Molina-Cruz *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en este estudio, sobre la variabilidad genética de *Anopheles darlingi* tienen congruencia con otros resultados, obtenidos a partir de otros marcadores (cromosomas politenos, aloenzimas, ADNmt, RFLPs y secuencias ITS₂) que revelan un moderado a alto polimorfismo (Kreutzer *et al.*, 1972; Tadei *et al.*, 1982).

Este estudio mostró que los loci más polimórficos a nivel de las 6 poblaciones fueron, *ADC02* y *ADC137* ($H_E = 0.795$; $H_E = 0.849$) con 11 y 14 alelos respectivamente, mientras que el menos polimórfico fue el locus *ADC28* ($H_E = 0.68$) con 6 alelos. Resultados similares, fueron observados en el estudio de Conn *et al.* (2006) para 7 poblaciones del este de Brasil, donde los loci más polimórficos fueron *ADC02*, *ADC137* y *ADC107* con 14, 13 y 12 alelos respectivamente y el menos polimórfico *ADC28* con 5 alelos. Asimismo, se observó que la población de GUAYA revela un valor de $A = 8$, ligeramente superior al resto de las poblaciones de estudio, el mismo es comparado con el estudio realizado en 5 poblaciones de *Anopheles darlingi* de Bolivia, Venezuela y Brasil, a partir de marcadores de DNAm, donde revelan que las poblaciones de Guayaramerín y San Ramón provenientes de Bolivia, muestran la más alta diversidad haplotípica comparada al resto de las poblaciones (Conn *et al.*, 1999).

La composición y distribución alélica para 4 (*ADC137*, *ADC110*, *ADC28*, *ADC107*) de los 5 loci analizados fue similar en las 6 poblaciones registrándose a los alelos más comunes como los más frecuentes. A diferencia, el locus *ADC02* presentó un patrón de distribución de frecuencias alélicas menos uniforme entre las poblaciones. El hecho de que el alelo mayoritario sea el mismo en el seno

de cada una de las poblaciones para 4 de los 5 loci utilizados, es a favor de una fuerza preponderante de la deriva genética que impide que las poblaciones posean muy pocos o no posean alelos privados. Este análisis de distribución de las frecuencias alélicas, ha permitido demostrar que la panmixia esta presente entre poblaciones geográficamente distribuidas, donde los genes circulan libremente entre ellas.

Varios estudios sobre poblaciones naturales de *Anopheles darlingi* a través del uso de isoenzimas, han mostrado un significativo equilibrio de H-W para la mayoría de los loci analizados (Rosa Freitas *et al.*, 1992; Dos Santos *et al.*, 1999; Manguin *et al.*, 1999). Sin embargo, un estudio reciente sobre este vector primario a través del uso de microsatélites reveló una significativa desviación del H-W en 7 de 8 loci (Conn *et al.*, 2006). Asimismo, estudios realizados en *Anopheles dirus* (Walton *et al.*, 2001), *Anopheles gambiae* (Donnelly *et al.*, 1999; Onyabe & Conn, 2000; Lehnmann *et al.*, 2003), *Anopheles funestus* (Cohuet *et al.*, 2004; Temu *et al.*, 2004), *Anopheles arabiensis* (Nyanjom *et al.*, 2003) y *Anopheles albimanus* (Molina-Cruz *et al.*, 2004), a partir del uso de microsatélites, revelaron una deficiencia de heterocigotos relacionada a un desequilibrio de H-W. Por tanto, se observa que la desviación del equilibrio de H-W es un descubrimiento común en estudios donde se utiliza microsatélites (Donnelly *et al.*, 1999).

Este déficit es usualmente atribuido a alelos nulos (Callen *et al.*, 1993; Lehmann *et al.*, 1996a; García de León *et al.*, 1997), a selección (García de León *et al.*, 1997), o al agrupamiento de subpoblaciones o grupos de diferentes pools genéticos (Efecto Wahlund) (Gibbs *et al.*, 1997).

En este estudio se reveló un déficit de heterocigotos en los 5 loci analizados, donde los loci *ADC28*, *ADC107*, *ADC02* mostraron la mayor proporción de poblaciones en desequilibrio de H-W (16 de 22 test en desequilibrio de H-W). Un análisis de desequilibrio de ligamiento mostró a 4 pares de loci en desequilibrio de ligamiento los mismos se encuentran asociados a un significativo desequilibrio de H-W. Significante desviación del equilibrio de H-W asociada a un desequilibrio de ligamiento podría sugerir endogamia, un efecto Wahlund, selección o que los loci se encuentren ubicados sobre un mismo cromosoma.

Para atribuir el déficit de heterocigotos a endogamia, todos los loci deberían ser afectados de igual forma por este fenómeno, con un déficit de heterocigotos uniforme. Asimismo, se considera que el fenómeno de endogamia entre anophelinos se da en forma parcial, debido al tipo de

apareamiento de estos mosquitos (Conn *et al.*, 2006). Por tanto, es poco probable que el déficit de heterocigotos observado en el estudio sea atribuido a esta causa.

La selección es otra posibilidad, es decir, si los loci de microsatélites utilizados se encuentran bajo selección, ubicados dentro o fuera de inversiones cromosomales, por esto, es necesario el estudio de la neutralidad de los mismos. Estudios de efectos posicionales (dentro o fuera de inversiones) de marcadores moleculares sobre valores de F_{ST} , son bien conocidos en *Anopheles gambiae* (Onyabe *et al.*, 2001; Lehmann *et al.*, 2003), *Anopheles funestus* (Cohuet *et al.*, 2004), los mismos muestran que estimas de F_{ST} no varían al ser estudiadas con loci ubicados dentro o fuera de inversiones cromosomales. Para *Anopheles darlingi* han sido identificadas 14 inversiones, y actualmente, estos loci están siendo mapeados en cromosomas politenos, a través de técnicas de hibridización in situ (Conn JE, datos no publicados). Solo estudios posteriores revelaran si los loci de microsatélites aislados para *Anopheles darlingi*, están asociados a loci bajo selección, y si los mismos tienen alguna influencia sobre estimas de diferenciación poblacional.

Alelos nulos, son otra causa a la que se le atribuye el déficit de heterocigotos. De acuerdo a las frecuencias de alelos nulos obtenidas en el estudio, se observó que los loci *ADC107* y *ADC28* son los que revelaron las frecuencias más altas. Estas frecuencias correlacionan con el mayor número de poblaciones con déficit de heterocigotos observada para cada loci., donde probablemente la presencia de alelos nulos en estos loci sea otra posible causa del déficit de heterocigotos en estas poblaciones. A diferencia, el estudio de Conn *et al.* (2006) a partir de los mismos loci de microsatélites, descarta la posibilidad de atribuir el déficit de heterocigotos a esta causa, debido al considerable desequilibrio de ligamiento registrado para varios loci (64 de 156 test), que no sería un resultado esperado cuando el déficit de heterocigotos es atribuido a alelos nulos, debido a que todos los individuos tienen la misma posibilidad de portar un alelo nulo (Lehmann *et al.*, 2003) además, el mismo, no revela déficit de heterocigotos agrupados en un solo locus. A diferencia, en este estudio se observó que los loci *ADC28*, *ADC107* y *ADC02* agrupan a 5 y 6 poblaciones en desequilibrio de H-W.

En un estudio de Braginets *et al.* (2003), observaron que la probable presencia de alelos nulos en el loci *AFUB12* para poblaciones de *Anopheles funestus* de Kenia, no tuvo un efecto importante sobre la estimación de la estructura genética de esas poblaciones al excluir a este locus y recalculando el

F_{ST} . Similar procedimiento se llevo a cabo en nuestro estudio, se excluyo al locus *ADC107* y recalculó el F_{ST} y R_{ST} , se observo un $F_{ST} = 0,0236$ y un $R_{ST} = 0.0263$, los mismos comparados con las estimas originales (para los 5 loci), 0,022 y 0.027 respectivamente, muestran que los alelos nulos del locus *ADC107* no tienen un efecto importante en la estimación de la estructura genética.

6.2. Estructura poblacional

El polimorfismo de los microsatélites utilizados en este estudio reveló una reducida diferenciación genética y aparente panmixia entre poblaciones de *Anopheles darlingi* de la amazonía boliviana. Estos resultados concuerdan con varios estudios realizados en poblaciones de *Anopheles darlingi* a partir de distintos marcadores moleculares (RAPD-PCR, ITS₂), que indican que poblaciones de *Anopheles darlingi* tanto de la amazonía brasilera como de la amazonía peruana, no revelan una fuerte estructura poblacional (Malafronte *et al.*, 1999; Manguin *et al.*, 1999; Pinedo *et al.*, 2006).

Dos hipótesis podrían explicar la baja diferenciación genética observada en este estudio, la primera, es la ausencia de barreras físicas que impidan el flujo génico entre las poblaciones ampliamente distribuidas en la amazonía boliviana. La segunda, es que poblaciones de *Anopheles darlingi* sean resultado de una reciente expansión poblacional, a partir de una población con un tamaño efectivo elevado.

El análisis de estructuración genética llevado a cabo entre poblaciones geográficamente cercanas, reveló que el valor mas alto de diferenciación se registró al comparar las poblaciones de GUAYA vs. SM, poblaciones separadas por 10 km. de distancia. Esta comparación indica que las poblaciones de GUAYA y SM presentan una ligera diferenciación que podría ser atribuido, por un lado, a la presencia entre ambas localidades, de extensas llanuras con ausencia de bosques y criaderos naturales que impiden la dispersión y sobrevivencia de este vector, por otro lado, se podría atribuir a la diferencia registrada en ambas poblaciones en cuanto al número efectivo de mosquitos, siendo alto el valor de N_e en la población de GUAYA y bajo en la población de SM, indicando la posibilidad de que la deriva génica se impuso al flujo génico en la población que presenta el valor bajo de N_e , lo que impide un elevado flujo génico entre las mismas.

Estimas de estructura poblacional entre pares de poblaciones reveló que los valores mas bajos de diferenciación se registran entre las poblaciones de RY y SM ($F_{ST} = -0.0016$, $R_{ST} = 0.0135$); CE y SM ($F_{ST} = -0.0002$; $R_{ST} = 0.0067$), RY y CE ($F_{ST} = 0.055$; $R_{ST} = 0.0478$). El elevado intercambio genético observado entre RY y CE podría estar facilitado por la presencia del río Yata, cuyo cause conecta a estas poblaciones y donde a lo largo del mismo existen muchos asentamientos humanos que permitirían el intercambio genético entre estos vectores. Esto confirma a la vez la habilidad de dispersión de *An. darlingi* a grandes distancias.

Estos estudios sugieren que la existencia de bastante flujo génico, es una razón para que las poblaciones se mantengan tan homogéneas a lo largo de toda el área. Indicando que el área ocupada por un demo de *Anopheles darlingi* en la amazonía boliviana podría ser superior a los 40 Km.

Tanto estimas de F_{ST} , como de R_{ST} señalan una mínima estructuración genética y un elevado flujo génico entre las poblaciones. Sin embargo, para estimas de R_{ST} , se revela a un único valor estadísticamente significativo, que muestra un nivel elevado de estructuración entre las poblaciones de PRA y RY. La comparación de estimas de F_{ST} y R_{ST} es relevante, particularmente cuando un importante nivel de diferenciación es observado para R_{ST} y no así para F_{ST} .

Cuando se estima F_{ST} o R_{ST} dos aspectos tienen que ser tomados en cuenta, (i) el sesgo y la (ii) varianza de los estimadores. De hecho aun con un ajuste perfecto de los estimadores F_{ST} y R_{ST} a sus propias expectativas analíticas (o a su equivalente en términos de número efectivo de migrantes) estas estimas pueden no ser fiables si su varianza es alta, es el caso, cuando se trabaja con poblaciones pequeñas y con un número limitado de loci. El principal problema que afecta a los F estadísticos cuando se trabaja con microsatélites, es su sensibilidad a la tasa de mutación cuando la migración es baja. Contrariamente, bajo un estricto SMM, R_{ST} es independiente de la tasa de mutación, sin embargo, aún bajo una estricta suposición de un SMM, R_{ST} puede ser menos fiable que F_{ST} al momento de reflejar la diferenciación poblacional, debido a su alta varianza de asociación (Gaggiotti *et al.*, 1999; Balloux & Goudet, 2001). La tendencia ha sido observada en varios estudios empíricos, donde, por un lado, R_{ST} parece reflejar mejor la verdadera diferenciación en poblaciones altamente estructuradas (Lugon-Moulin *et al.*, 1996) y por otro F_{ST} es un estimador mas sensible a diferencias entre poblaciones alopátricas (Forbes *et al.*, 1995).

El flujo génico observado en este estudio fue alto, reveló *un Nm* superior a 1 en todas las poblaciones, sin embargo, se observó que en algunos casos poblaciones geográficamente aisladas presentaron estimas de *Nm* mas altas que en poblaciones estrechamente cercanas, tanto para F_{ST} como R_{ST} . Similar resultado es observado en un estudio (Possso *et al.*, 2003), donde se evaluó el grado de diferenciación genética en poblaciones de *Anopheles nuneztovari* de Colombia a través de marcadores RAPDs, el mismo reveló que poblaciones separadas por 325 km. muestran estimas mas altas de flujo génico que poblaciones distantes a 250 km.

La sobrestimación de los valores de *Nm*. puede ser atribuida a un fenómeno de homoplasia, que en la mayoría de los estudios es detectado al secuenciar alelos que revelan tamaños similares. A diferencia, en este estudio el método utilizado para la designación de alelos, fue a partir de la identificación del tamaño de los alelos en corridas electroforéticas, que si bien revelan mayores ventajas en cuanto al tiempo y costo empleado en la genotipificación de los microsatélites comparada con la secuenciación de cada alelo en cada individuo, sin embargo, esta forma de identificación de alelos no toma en cuenta el fenómeno denominado “homoplasia”. Un fenómeno de homoplasia modifica la diversidad de alelos visibles en las poblaciones y tiende a aumentar las estimas de flujo génico cuando el rango de mutación es alto (Garza & Freimer, 1996; Rousset, 1996; Virad *et al.*, 1998; Blankenship *et al.*, 2002; Epperson, 2005).

Un análisis de varianza molecular (AMOVA) fue utilizado para cuantificar la proporción de variación entre estas poblaciones de *Anopheles darlingi*, el mismo reveló entre un 3 a 4 % de diferenciación entre las 6 poblaciones, y un 96% entre individuos dentro las poblaciones. Estos resultados son similares a los observados en poblaciones de *Anopheles darlingi* del este de Brasil (Conn *et al.*, 2006) que revelan entre un 3.4 a 3.7% de variación entre poblaciones panmícticas ubicadas dentro los estados de Amapá y Pará.

6.3. Diferenciación genética

Según Donnelly *et al.* (2002), la estructuración genética poblacional de vectores primarios de la malaria es superficial, con un efecto débil de la distancia sobre la diferenciación, esto ha sido observado en poblaciones de *Anopheles gambiae* (Lehmann *et al.*, 1996), así como en poblaciones de

Anopheles arabiensis (Donnelly & Townson, 2000). En este estudio no se detectó un aislamiento por distancia en un radio aproximado de 200 km., por tanto, poblaciones de *Anopheles darlingi* del norte de Bolivia no revelan una considerable estructura poblacional. Un patrón similar fue observado en poblaciones de *Anopheles albimanus*, otro vector Neotropical importante, donde poblaciones de Centroamérica, separadas por 665 km. revelan una considerable panmixia (Molina-Cruz *et al.*, 2004). Contrariamente, otros estudios sobre poblaciones de *Anopheles darlingi* en Sudamérica, a través del uso de marcadores de ADNmt y microsatélites, revelan una considerable estructura poblacional y aislamiento por distancia (Conn *et al.*, 1999; Conn *et al.*, 2006).

El número efectivo (N_e), es una medida del efecto de la deriva genética sobre una población, N_e depende de factores demográficos, de la densidad poblacional, de patrones de movimiento y de apareamiento. Este estudio reveló. Por un lado, un N_e de 71 individuos (95% IC 60.4 – 83.9) en el total de las poblaciones bajo un modelo de desequilibrio de ligamiento, valor que es ligeramente menor, comparado al registrado en poblaciones de *An. darlingi* del este de la amazonía brasilera ($N_e = 92.4$; 95% IC 87.8 – 97.4) (Conn *et al.*, 2006), o al registrado en poblaciones de *Anopheles albimanus* ($N_e = 96$) (Molina-Cruz *et al.*, 2004). La diferencia podría ser atribuida al manejo de estrategias de control vectorial en las 6 poblaciones de estudio desde hace más de 40 años. Por otro lado, se observó bajo un modelo de exceso de heterocigotos un $N_e = \infty$. Si se considera a ambos modelos para obtener un rango de N_e , se obtendría como límite superior a un número ∞ , superior al N_e observado en poblaciones de *Anopheles gambiae* (Conn *et al.*, 2006). El $N_e = \infty$, bajo el modelo de exceso de heterocigotos podría estar sobrestimado, ya que el cálculo de N_e es a partir de las heterocigosidades esperadas asumiendo un equilibrio de H-W en las poblaciones, contrariamente se sabe que este estudio revela poblaciones en desequilibrio de H-W.

El valor más bajo de N_e se registró en la población del PRA ($N_e = 56$). Estimaciones bajas de N_e en poblaciones de *Anopheles*, normalmente pueden ser atribuidas al resultado de un efecto cuello de botella ocasionado por el uso de insecticidas, o debido a marcadas fluctuaciones estacionales (Molina-Cruz *et al.*, 2004). El uso de estrategias de control vectorial como el uso de insecticidas en la población del PRA pudo disminuir la densidad y someter a la población a un reciente cuello de botella. Sin embargo, otra posible explicación para esta población amazónica, son las marcadas fluctuaciones estacionales, con precipitaciones pluviales durante los meses de Diciembre, Enero y Febrero, y una época seca durante los meses de Julio, Agosto y Septiembre que contribuyen en la

reducción del tamaño de los criaderos, correlacionando los meses de colecta de nuestras poblaciones con estos últimos meses, con menor precipitación pluvial. Sin embargo, no es el caso en las poblaciones de Guayaramerin y Puerto Rico en las cuales se han registrado los valores mas altos de N_e , revelando 4658 y 620 individuos respectivamente. Posibles explicaciones, podrían atribuirse a la extensión demográfica de las poblaciones, y condiciones ecológicas favorables para la sobrevivencia de este vector, sobre todo Guayaramerin es una de las poblaciones más extensas y pobladas de las amazonía con microclimas adecuados para mantener criaderos de *Anopheles darlingi* de gran tamaño.

A partir del análisis de heterocigosidades bajo el modelo SMM se observó un déficit de heterocigosidades esperadas ($He < Heq$) en 5 de las 6 poblaciones, siendo significativa ($P < 0.05$) en la población de GUAYA. Bajo un modelo de IAM, se observo un exceso de heterocigotos ($He > Heq$) en las 6 poblaciones, ninguna de las mismas presentó un valor estadísticamente significativo. Cornuet & Luikart (1996), revelan que tests bajo el IAM pueden detectar erróneamente un exceso de heterocigotos en poblaciones que no han sido sometidas a un cuello de botella, en estos casos es recomendado tomar en cuenta los tests calculados bajo el modelo SMM.

Nuestros resultados indican, por un lado, bajo un SMM, un exceso de heterocigotos en la población del PRA, estadísticamente no significativo que indica la no existencia de un efecto cuello de botella en esa población, por otro, el número de microsatélites utilizado en este estudio ($n = 5$) no se encuentra en el rango donde un cuello de botella pueda ser probablemente detectado (entre 8 y 10 loci). Por tanto, la reducción del tamaño poblacional de *Anopheles darlingi* en el PRA, no es bastante extrema para ser detectada por un test de cuello de botella.

Para que se de un equilibrio mutación-deriva (MDE) ambas estimas en la población deben ser iguales ($He = Heq$), mientras que MDE será rechazado cuando se registre un efecto cuello de botella ($He > Heq$) o lo opuesto ($He < Heq$) que es señal de una reciente expansión.

El análisis de las heterocigosidades sobre las poblaciones de *Anopheles darlingi* del norte de Bolivia, permitió a la vez, rechazar el MDE en la población de GUAYA, como resultado de una reciente expansión poblacional ($He < Heq$), que es consistente con los bajos niveles de diferenciación poblacional registrado en esta población. Varios estudios de análisis de estructuración poblacional, a través de marcadores de DNA-mitocondrial y microsatélites, sobre vectores de la malaria como, *An. arabiensis* y *An. gambiae* (Donnelly *et al.*, 2001), *Anopheles dirus* (Walton *et al.*,

2001), *An. marajoara* (Lehr M., 2003), y *An. darlingi* (Mirabello & Conn, 2006), revelan un rechazo al MDE. Contrariamente, poblaciones de *An. darlingi* del este de la amazonía Brasileira asumen un MDE (Conn, *et al.*, 2006).

El desequilibrio relacionado a una reciente expansión poblacional implica que las estimas de flujo génico a partir de los índices de fijación estén sobrestimadas (Donnelly *et al.*, 2001).

7. CONCLUSIONES

Esta investigación permitió revelar la diversidad, estructuración y diferenciación genética de poblaciones de *Anopheles darlingi* en la amazonía boliviana, mostrando a 6 poblaciones polimórficas, con una mínima estructuración genética, y aparentemente panmícticas, donde los flujos de genes entre si revelan un importante intercambio genético. Asimismo, este estudio reveló la ausencia de barreras físicas que impidan un flujo de genes entre poblaciones de la región amazónica de Bolivia, indicando que la presencia de ríos y selvas continuas, considerados sitios reservorios de criaderos de larvas, permiten al mosquito colonizar fácilmente la zona entera. Así, poblaciones distantes por más de 200 km. muestran un flujo génico elevado.

Estos resultados son de vital importancia para el control vectorial a nivel de la amazonía boliviana, al proporcionar información acerca del nivel de intercambio genético y patrones de dispersión entre las poblaciones. Esta información permitirá predecir cuan lejos y cuan rápido pueden dispersarse genes de interés, como genes responsables de la resistencia a insecticidas, o transgenes (genes responsables para refractar la infección del mosquito por el parásito de la malaria), este ultimo, forma parte de una estrategia de control vectorial a largo plazo.

Adicionalmente, se estimó el tamaño efectivo de las poblaciones (N_e), mostrando una marcada diferenciación del N_e entre las poblaciones del Prado y Guayaramerín, esta última reveló el valor más alto de N_e , mientras que la población del Prado el valor mas bajo. Variaciones climáticas como sequías extremas, chequeos, rociamientos periódicos con insecticidas, tamaño de los criaderos, son considerados posibles causas que contribuyeron a la reducción del N_e en la población del Prado.

Por tanto, el cálculo de estimas de N_e revela información necesaria para ser aprovechada por los programas de control vectorial, en el sentido de, priorizar esfuerzos de control en áreas de poca influencia de la deriva genética sobre la densidad vectorial, el caso de la población de Guayaramerín en la Amazonía Boliviana.

PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

- Para subsiguientes estudios se sugiere estudiar a poblaciones distantes entre si por mas de 300 km., con el fin de observar un flujo génico a distancias superiores a los 250 km. y definir exactamente la zona de panmíxia en el norte de Bolivia.
- El polimorfismo de los 5 loci de microsatélites revelo al locus *ADC28* como el menos polimórfico, se sugeriría realizar un próximo estudio excluyendo a este locus e incluyendo a 2 nuevos microsatélites polimórficos, que permita comparar el polimorfismo de estos loci con nuestros resultados. Asimismo, el uso de un mayor número de microsatélites aumentará la probabilidad de rango para detectar un cuello de botella en las poblaciones a ser estudiadas.
- Un estudio cronológico de los datos ecológicos, climatológicos, y epidemiológicos en cada población de estudio, permitirá correlacionar con los datos genéticos obtenidos. Sobre todo para determinar posibles causas de deriva genética sobre la densidad poblacional.
- Asimismo, recabar datos sobre el historial de fumigación de cada población permitirá correlacionar con las estimas de N_e encontradas en cada población.
- Es importante considerar que para la selección y estudio de las nuevas poblaciones, se tome en cuenta el criterio de relevancia epidemiológica, población considerada altamente endémica de malaria en el último año.
- De acuerdo a datos epidemiológicos del Ministerio de Salud y Deportes (2007), se indica que Guayaramerín es una de las poblaciones que presenta el mayor numero de casos de malaria en la Amazonía Boliviana, y curiosamente la mayoría de estos casos se registran en el área urbana, se podría sugerir realizar estudios de estructuración genética entre subpoblaciones urbanas y rurales de *Anopheles darlingi* de Guayaramerín, simultáneamente respaldar con estudios de resistencia a insecticidas en estas 2 áreas de presencia masiva del mosquito.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Balloux, F., H. Brüner, N. Lugon-Moulin, J. Hausser, and J. Goudet. 2000a.** Microsatellites can be misleading: an empirical and simulation study. *Evol* 54: 1414-1422.
- Balloux, F., and J. Goudet. 2002.** Statistical properties of differentiation estimators under stepwise mutations in a finite island model *Mol. Ecol.* 11(4): 771-783.
- Balloux, F., and N. Lugon-Moulin. 2002.** The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 11: 155-165.
- Blankenship, S. M., B. May, and D. Hedgecock. 2002.** Evolution of a perfect simple sequence repeat locus in the context of its flanking sequence. *Mol Biol Evol* 19: 1943-1951.
- Blanquer-Maumont, A., and B. Crouau-Roy. 1995.** Polymorphism, monomorphism and sequences in conserved microsatellites in primate species *J. Mol. Evol.* 41: 492-497.
- Bowcock, A. M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minc, J. R. Kidd, and L. L. Cavalli-Sforza. 1994.** High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites *Nature* 368: 455-457.
- Braginets, O. P., N. Minakawa, C. M. Mbogo, and G. Yan. 2003.** Population genetic structure of the African malaria mosquito *Anopheles funestus* in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69(3): 303-308.
- Brookfield, J. F. Y. 1996.** A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol. Ecol.* 5: 4534-4555.
- Callen, D. F., A. D. Thompson, Y. Shen, H. A. Phillips, R. I. Richards, J. C. Mulley, and G. R. Sutherland. 1993.** Incidence and origin of "Null alleles in the (AC)_n microsatellite markers *Am. J. Hum. Gen.* 22: 1-10.
- Chakraborty, R., M. Andrade, S. P. Daiger, and B. Budowle. 1992.** Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications *Ann. Hum. Genet.* 56: 455-457.

- Charlwood, J. D., and W. A. Alecrim. 1989.** Capture-recapture studies with the South America malaria vector *Anopheles darlingi*, Root. Ann Trop Med Parasitol 83: 569-576.
- Charlwood, J. D. 1996.** Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem Inst Oswaldo Cruz 91(4): 391-398.
- Cockerham, C. C., and B. S. Weir. 1987.** Correlation, descent measures: Drift with migration and mutation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 8512-8514.
- Cohuet, A., I. Dia, F. Simard, M. Raymond, and D. Fontenille. 2004.** Population structure of the malaria vector *Anopheles funestus* in Senegal based on microsatellite and cytogenetic data. Insect Molecular Biology 13(3): 251-258.
- Collins, F. H., L. Kamau, H. A. Ranson, and J. M. Vulule. 2000.** Molecular entomology and prospects for malaria control. Bolletin of the World Health Organization 78: 1412-1423.
- Conn, J. E. 1998.** Systematics and population level analysis of *Anopheles darlingi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 93(5): 647-650.
- Conn, J. E., M. G. Rosa-Freitas, S. L. B. Luz, and H. Momen. 1999.** Molecular population genetics of the primary neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using mtDNA. J. Am. Mosq. Assoc. 15: 468-474.
- Conn, J. E., J. P. Bollback, D. Y. Onyabe, T. N. Robinson, R. C. Wilkerson, and M. M. Póvoa. 2001.** Isolation of polymorphic microsatellite markers from the malaria vector *Anopheles darlingi* Molecular Ecology 1: 223-225.
- Conn, J. E., J. H. Vineis, J. P. Bollback, D. Y. Onyabe, R. C. Wilkerson, and M. M. Póvoa. 2006.** Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria endemic region of eastern amazonian Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 74 (5): 798-806.
- Cornuet, J. M., and G. Luikart. 1996.** Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014.
- Crow, J. F., and M. Kimura. 1970.** An introduction to population genetics theory Harper and Row Publishers, New York. Evanston and London

- Dawson, R. J. G., H. L. Gibbs, K. A. Jobson, and S. M. Yezerinac. 1997.** Isolation of microsatellite of DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* the yellow warbler, and their use in population studies. *Heredity* 79: 506-514.
- Deka, R., M. D. Shriver, L. M. Yu, C. E. Aston, R. Chakraborty, and R. E. Ferrel. 1994.** Conservation of human chromosome 13 polymorphic human (CA)_n repeats in chimpanzees *Genomics* 143: 1307-1311.
- Di Rienzo, A., A. C. Peterson, C. J. Garza, A. M. Valdès, M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1994.** Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 3166-3170.
- Donnelly, M. J., N. Cuamba, J. D. Charlwoods, F. H. Collins, and H. Townson. 1999.** Population structure in the malaria vector, *Anopheles arabiensis* Patton, in East Africa. *Heredity* 83: 408-417.
- Donneely, M. J., and H. Townson. 2000.** Evidence for extensive genetic differentiation among populations of the malaria vector, *Anopheles arabiensis*, in East África. *Mol Biol* 9: 357-367.
- Donneely, M. J., M. C. Licht, and T. Lehmann. 2001.** Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Mol Biol Evol* 18: 1353-1364.
- Donnelly, M. J., F. Simard, and T. Lehmann. 2002.** Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends Parasitol* 18: 75-80.
- Dos Santos, J. M. M., W. P. Tadei, and I. B. Rodrigues. 2003.** Isoenzymatic variability among five *Anopheles* species belonging to the Nyssorhynchus and *Anopheles* subgenera of the Amazon region, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 247-253.
- Dos-Santos, J. M. M., J. A. Lobo, W. P. Tadei, and E. P. B. Contel. 1999.** Intrapopulational genetic differentiation in *Anopheles (N.) darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) in the Amazon region *Genetics and Molecular Biology* 22(3): 325-331.
- Eding, H., and G. Laval. 1999.** Measuring genetic uniquenesses in livestock. In: Oldenbroc, K. (Ed). *Genebanks and the management of farm animal genetic resources*. IDO-DL press. The Netherlands.

- Epperson, B. K. 2005.** Mutation at high rates reduces spatial structure within populations *Mol Ecol* 14: 703-710.
- Estoup, A., C. Tailliez, J. M. Cornuet, and M. Solignac. 1995.** Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae) *Mol Biol and Evol.* 12: 1074-1084.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2006.** Arlequin: Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). University of Berne, Switzerland.
- Forattini, O. P. 1962.** Entomologia Medica Faculdade de Higiene e Saúde Publica, Vol. I. São Paulo.
- Forbes, S. H., J. T. Hogg, F. C. Buchanan, A. M. Crawford, and F. W. Allendorf. 1995.** Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. *Mol Biol and Evol.* 12: 1106-1113.
- Fritz-Simmons, N. N., C. Moritz, and S. S. Moore. 1995.** Conservation and dynamics of microsatellites loci over 300 million years of marine turtle evolution *Mol. Biol. Evol.* 12: 432-440.
- Gaggiotti, O. E., O. Lange, K. Rassman, and C. Gliddon. 1999.** A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Mol. Ecol.* 8: 1513-1520.
- Garcia de Leon, F., D. Chuchi, and F. Bonhomme. 1997.** Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European Sea Bass *Dicentrarchus labrax* *Mol. Ecol.* 6: 51-62.
- Garza, J. C., M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1995.** Microsatellite allele sequences in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size *Mol. Biol. Evol.* 12(4): 594-603.
- Garza, J. C., and N. B. Freimer. 1996.** Homoplasy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Res* 6: 211-217.
- Gibbs, H. L., K. A. Prior, P. J. Weatherhead, and G. Jhonson. 1997.** Genetic structure of the threatened eastern massauga rattlesnake *Sistrurus c.catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.* 6: 1123-1132.
- Goldstein, B. D., and C. Schlotterer. 1999.** Microsatellites evolution and applications. Oxford University press, Oxford, UK.

- Goodman, S. 1997.** Rst Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Mol. Ecol.* 6: 881-885.
- Gorham, J. R., J. C. Stojanovich, and H. G. Scott. 1967.** Illustrated Keys to the Anopheline Mosquitoes of Eastern South America Atlanta,GA: Centers for Disease Control, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service.
- Goudet, J. 2001.** FSTAT, a program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/zea/software/fstat.html>.
- Guimarães, A. E., R. P. Mello, C. M. Lopes, J. Alencar, and C. Gentile. 1997.** Prevalência dse anofelinos (Diptera: Culicidae) no crepúsculo vespertino em áreas da Usina Hidrelétrica de Itaipu, no Município de Guairá, Estado do Paraná, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.
- Guimarães, A. E., C. Gentile, J. Alencar, M. C., and R. Pinto de Mello. 2004.** Ecology of Anopheline (Diptera: Culicidae), malaria vectors around the Serra da Mesa Reservoir, State of Goiás, Brazil. 1- Frequency and climatic factors. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 20(1): 291-302.
- Harris, A. F., A. Matias-Arnéz, and N. Hill. 2006.** Biting time of *Anopheles darlingi* in the Bolivian amazon and implications for control of malaria. *Transactions of the Royal Society of Trop. Med. Hyg.* 100: 45-47.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1997.** Principles of Population Genetics 3nd, edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Hedrick, P. W., and P. S. Miller. 1992.** Conservation genetics: techniques and fundamentals *Ecol. Appl.* 3: 30-46.
- Hill, W. C. 1981.** Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium *Genet. Res.* 38: 209-216.
- Holm, S. 1979.** A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6: 65-70.
- Ingvarsson, P. K., and M. C. Whitlock. 2000.** Heterosis increases the effective migration rate. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 1321-1326.

- Johnson, M. S., and R. Black. 1984.** The Wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria* sp. *Mar. Biol.* 79: 295-302.
- Kallinowski, S. T., and M. L. Taper. 2006.** Maximun likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*: 9134-9139.
- Kimura, M., and J. F. Crow. 1964.** The number of alleles that can be maintained in a finite populations. *Genetics* 49: 725-738.
- Kimura, M., and T. Otha. 1978.** Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations *Procedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75: 2868-2872.
- Kreutzer, R. D., J. B. Kitzmiller, and E. Ferreira. 1972.** Inversion polymorphism in the salivary gland chromosomes of *Anopheles darlingi*. *Mosq. News* 32: 555-565.
- Lande, R., and G. F. Barrowclough. 1987.** Effective population size, genetic variation, and their use in population management edited by SOUI. É. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Lehmann, T., W. A. Hawley, and F. H. Collins. 1996.** An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics* 144: 1155-1163.
- Lehmann, T., W. A. Hawley, L. Kamau, D. Fontenille, F. Simard, and F. H. Collins. 1996a.** Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity* 77: 192-200.
- Lehmann, T., W. A. Hawley, H. Grebert, and F. H. Collins. 1998.** The effective population size of *Anopheles gambiae* in Kenya: Implications for population structure. *Mol. Biol. Evol.* 15(3): 264-276.
- Lehmann, T., M. Liecht, N. Elissa, B. T. Maega, J. M. Chimumbwa, F. T. Watsenga, C. S. Wondji, F. Simard, and W. A. Hawley. 2003.** Population structure of *Anopheles gambiae* in Africa *J Hered* 94: 133-147.
- Lehr, M. 2003.** Phylogenetics and Phylogeography of an Anopheline Cryptic Species Complex Burlington, V.T. University of Vermont
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, and E. Nevo. 2002.** Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review *Mol. Ecol.* 11: 2453-2465.

- Linthicum, K. J. 1988.** A revision of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* 20: 98-271.
- Litt, M., and J. A. Luty. 1989.** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Gen.* 44: 397-401.
- Lougon-Moulin, N., H. Brünner, A. Wyttenbach, J. Hausser, and J. Goudet. 1999b.** Hierarchical analysis of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora, Soricidae). *Mol. Ecol.* 8: 419-431.
- Lounibos, L. P., and J. E. Conn. 2000.** Malaria vector heterogeneity in South America. *Am. Entomol.* 46: 238-249.
- Lourenço-de-Oliveira, R., A. E. Da Gama Guimarães, M. Arlé, D. S. T. F., M. G. Castro, M. A. Motta, and L. M. Deane. 1989.** Anopheline species, some of their habits and relation to malaria in endemic areas of Rondonia State, Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 501-514.
- Malafronte, R. S., M. T. Marrelli, and O. Marinotti. 1999.** Analysis of ITS2 DNA sequences from Brazilian *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol* 36: 631-634.
- Manguin, S., R. C. Wilkerson, J. E. Conn, Y. Rubio-Palis, J. A. Danoff-Burg, and D. R. Roberts. 1999.** Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, Random Amplified Polymorphic DNA; Integral Transcribed Sapcer 2, and Morphologic markers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(3): 364-376.
- Marques, A. C., and H. Cardenas. 1994.** Combate a malária no Brasil: evolução, situação atual e perespectivas. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 91-108.
- Miller, M. 1997.** Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author
- Mirabello, L., and J.E.Conn. 2006.** Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America *Heredity* 96: 1-11.
- Molina-Cruz, A., A. M. P. D. Merida, K. Mills, F. Rodriguez, C. Schoua, M. M. Yurrita, E. Molina, M. Palmeri, and W. C. B. IV. 2004.** Gene flow among

- Anopheles Albimanus* populations in Central America, South America, and the Caribbean assessed by microsatellites and mitochondrial DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71(3): 350-359.
- Murray, B. W. 1996.** The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data
[Http://www.helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html](http://www.helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html).
- Nagamine , Y., and M. Higuchi. 2001.** Genetic distance and classification of domestics animals using genetic markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 118: 101-109.
- Nauta, M. J., and F. J. Weissing. 1996.** Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation *Genetics* 143: 1021-1032.
- Nei, M. 1977.** *F-statistics* and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41: 225-233.
- Nei, M., and F. Tajima. 1981.** Genetic drift and estimation of effective population size *Genetics* 98: 625-640.
- Neuman, K., and J. H. Wetton. 1996.** Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow, *Passer domesticus*. *Mol Ecol.* 5: 307-309.
- Nielsen, E. E., M. M. Hansen, D. E. Ruzzante, D. Meldrup, and P. Gronkjaer. 2003.** Evidence of a hybrid zone in Atlantic cod (*Gadus Morhua*) in the Baltic and the Danish Belt Sea revealed by individual admixture analysis. *Mol. Ecol.* 12: 1497-1508.
- Nyanjom, S. R. G., H. Chen, T. Gebre-Michael, E. Bekele, J. Shililu, J. Githure, J. C. Beier, and G. Yan. 2003.** Population genetic structure of *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Ethiopia and Eritrea. *Heredity* 94(6): 457-463.
- Onyabe, D. Y., and J. E. Conn. 2001.** Genetic differentiation of the malaria vector *Anopheles gambiae* across Nigeria suggests that selection limits gene flow. *Heredity* 87: 647-658.
- Organización Panamericana de la Salud, O. P. S., and M. S. D. Ministerio de Salud y Deportes. 2004.** Análisis del Sector Salud - Bolivia Documento de Trabajo. La Paz, Bolivia.

- Peel, D., J. Ovenden, and S. Peel. 2004.** NeEstimator: software for Estimating Effective Population Size. Brisbane. Queensland. Australia: Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries
- Pinedo-Cancino, V., P. Sheen, E. Tarazona-Santos, W. E. Oswald, C. Jeri, A. YomikoVittor, J. A. Patz, and R. H. Gilman. 2006.** Limited diversity of *Anopheles darlingi* in the peruvian amazon region of Iquitos Am. J. Trop. Med. Hyg. 75(2): 238-245.
- Pollak, E. 1983.** A new method for estimating the effective population size from allele frequency changes Genetics 104: 531-548.
- Posso, C., R. Gonzales, H. Cardenas, J. Gallego, M. Duque, and M. Suarez. 2003.** Random amplified polymorphisc DNA analysis of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Western and Northeastern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 469-476.
- Primmer, C. R., A. P. Moller, and H. Ellegren. 1996a.** A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds Mol. Biol. Evol. 5: 365-378.
- Primmer, C. R., and H. Ellegren. 1998.** Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. Mol Biol and Evol. 15: 997-1008.
- Primmer, C. R., N. Saino, A. P. Moller, and H. Ellegren. 1998.** Unravelling the processes of microsatellite evolution through analysis of germ line mutations in barn swallows *Hirundo rustica*. Mol Biol and Evol. 15: 1047-1058.
- Pudovkin, A. I., D. V. Zaykin, and D. Hedgecock. 1996.** On the potential for estimating the effective number of breeders from Heterozygote-excess in progeny. Genetics 144: 383-387.
- Quintero, L. O., B. D. Thatcher, and W. P. Tadei. 1996.** Biología de anofelinos amazônicos. XXI ocorrência de espécies de *Anopheles* e outros culicídeos na área de influência de Hidrelétrica de Balbina - cinco anos após o enchimento do reservatório. Acta Amaz. 26: 281-296.
- Raymound, M., and F. Rousset. 1995.** GENEPOP (version 3.4): population genetics software. Institut des Sciences de l'Evolution. Université de Montpellier, France.
- Rosa-Freitas, M. G., G. Broomfield, A. Priestman, P. J. Milligan, H. Momen, and D. H. Molyneux. 1992.** Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behavior of three

- populations of *Anopheles darlingi* from Brazil J Am Mosq Control Assoc 8: 357-366.
- Rousset, F. 1977.** Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F-statistics* under isolation by distance Genetics 145: 1219-1228.
- Rousset, F. 1996.** Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes Genetics 142: 1357-1362.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees from microsatellite. Biol. and Evol. 4: 406-425.
- Schötterer, C., B. Amos, and D. Tautz. 1991.** Conservation of polymorphic simple sequences loci in cetacean species Nature 354: 63-65.
- Shriver, M. D., L. Jin, R. Chakraborty, and E. Boerwinkle. 1993.** VNTR allele frequency distribution under the Stepwise Mutation Model: a computer simulation approach Genetics 134: 983-993.
- Slatkin, M. 1995.** A measure of population subdivision based microsatellite allele frequencies. Genetics society of America 139: 457-462.
- Sokal, R. R., and C. D. Michener. 1958.** A statistical method for evaluating systematic relationships Univ. Kansas Sci. Bull 38: 1409-1438.
- Stallings, R. L. 1995.** Conservation and evolution of (CT)_n-(GA)_n microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. Genomics 25: 107-113.
- Summers, K., and W. Amos. 1997.** Behavioral, ecological, and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. Behav. Ecol. 86: 260-267.
- Swofford, D. L., and G. J. Olsen. 1990.** Phylogeny Reconstruction. In: Hillis, D.M. and C. Moritz (eds). Molecular Systematics. Sinaur Associates Inc., Sunderland.
- Taberlet, P., L. P. Waits, and G. Luikart. 1999.** Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends Ecol. Evol. 14: 323-327.
- Tadei, W. P., J. M. M. dos Santos, and M. G. Rabbani. 1982.** Biología de Anofelinos amazônicos. V. Polimorfismo Cromosômico de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). Acta Amaz. 12: 353-369.

- Tadei, W. P. 1987.** Biologia de anofelinos Amazônicos.XI. Estudos em populações de *Anopheles* e controle da malária em Ariquemes (Rondônia). Acta Amaz. 16/17: 151-167.
- Tadei, W. P., J. M. M. d. Santos, S. M. Scarpassa, and I. B. Rodrigues. 1993.** Incidência, distribuição e aspectos ecológicos de espécies de *Anopheles* (Diptera: Culicidae), em regiões naturais e sob impacto ambiental da Amazônia brasileira pp. 167-196. In: Ferreira EJG, Santos GM, Leão ELM, Oliveira LA, organizadores. Bases científicas para Estratégias de Preservação e desenvolvimento da Amazônia. Manaus. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Tadei, W. P. 1993.** Biologia de anophelinos Amazônicos. XVIII Considerações sobre as espécies de *Anopheles* (Culicidae), transmissão e controle da malária na Amazônia Rev Univ Amaz 2: 1-34.
- Takezaki, N., and M. Nei. 1996.** Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. Genetics 144: 389-399.
- Tautz, D. 1989.** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers Nucleic acids Research 12: 4127-4138.
- Tautz, D., and C. Schlotterer. 1994.** Simple sequences Current Opinion in Genetics and Development 4: 832-837.
- Temu, E. A., R. H. Hunt, and N. Coetzee. 2004.** Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity in the malaria vector mosquito *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in East and Southern Africa. Acta Tropica 90: 39-49.
- UDAPE. 2005** Progreso de los Objetivos de Desarrollo del milenio Documento deTrabajo del CIMDM, La Paz - Bolivia.
- Valdès, A. M., M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1993.** Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited Genetics 133: 737-749.
- Walton, C., J. M. Handley, F. H. Collins, V. Baimai, R. E. Harbach, V. Deesin, and R. K. Butlin. 2001.** Genetic population structure and introgression in *Anopheles dirus* mosquitoes in South-east Asia Mol. Ecol. 10: 569-580.
- Waples, R. S. 1989.** A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. Genetics 121: 379-391.

- Weber, J. L., and P. E. May. 1989.** Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Gen.* 44: 388-396.
- Weber, J. L., and C. Wong. 1993.** Mutation of human short tandem repeats. *Human Mol. Gen.* 2: 1123-1128.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham. 1984.** Estimating *F-statistics* for the analysis of population structure. *Evol.* 38: 1358-1370.
- Weir, B. S. 1996.** Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data Sinauer Associates, INC. Publishers Sunderland , Massachusetts.
- World Health Organization, W. H. O. 2000** Malaria diagnosis-new perspectives. Report of a joint WHO/USAID informal consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- World Health Organization, W. H. O. 2003.** The world health report 2003: shaping the future. . World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization, W. H. O. 2005.** World Malaria Report 2005. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wright, S. 1931.** Evolution in Mendelian populations *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S. 1943.** Isolation by distance *Genetics* 28: 114-138.
- Wright, S. 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Wright, S. 1965.** The interpretation of population structure by *F-statistics* with special regard to system of mating *Evol.* 19: 395-420.
- Wright, S. 1978.** Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago.
- Zhang, D. X., and G. M. Hewitt. 2003.** Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.* 12: 563-584.

ANEXOS

Anexo 1. Marcadores de microsatelites

Anexo 2. Modelos de mutación

Anexo 3. Ejemplo de la puesta en evidencia del fenómeno de homoplasia

Anexo 4. Conceptos de genética de poblaciones

Anexo 5. Amplificación de loci de microsatélites.

Anexo 6. Interpretación de geles

ANEXO 1. MARCADORES DE MICROSATÉLITES

Definición:

Secuencias de DNA, repetidas en tandem de un motivo de 2 a 5 pares de bases, también conocidas como SSR (simple secuencias de repetición).

Mononucleótido SSR (A) ₁₁	AAAAAAAAAAAA
Dinucleótido SSR (GT) ₆	GTGTGTGTGTGT
Trinucleótido SSR (CTG) ₄	CTGCTGCTGCTG
Tetranucleótido SSR (ACTC) ₄	ACTCACTCACTCACTC

Estructura:

Los marcadores de microsatélites pueden ser clasificados en tres familias según su estructura interna.

Puros	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
Compuestos	GTGTGTGTGT CACACACACA
Interrumpidos	GTGTGT TTT GTGT TTT GT TTT GT

Base de la variabilidad:

Las secuencias de los microsatélites presentan un polimorfismo de longitud variable de acuerdo al número de repeticiones. Cada alelo corresponde a un número de repeticiones (en teoría) o a un tamaño de amplificado (en práctica).

A continuación se observa el ejemplo, donde las frecuencias flanqueantes hacen 80 pares de bases y el motivo se repite en un dinucleótido (2 pb):

Número de repeticiones	Fragmento amplificado	Tamaño del fragmento
12	↑(RRRRRRRRRRRR)↑	$12 \times 2 + 80 = 104 \text{ pb}$
11	↑(RRRRRRRRRRR)↑	$11 \times 2 + 80 = 102 \text{ pb}$
10	↑(RRRRRRRRRR)↑	$10 \times 2 + 80 = 100 \text{ pb}$
9	↑(RRRRRRRRR)↑	$9 \times 2 + 80 = 98 \text{ pb}$

↑ = secuencia flanqueante

® = motivo repetido (2 pb)

ANEXO 2. MODELOS DE MUTACIÓN

El conocimiento de un modelo mutacional que resalte la evolución de los microsatélites es de gran importancia para el desarrollo de estadísticos que reflejen correctamente la estructuración genética.

Dos modelos extremos de mutación han sido desarrollados por genetistas de poblaciones: Infinite Alleles Model (IAM; Kimura & Crow, 1964) y Stepwise Mutation Model (SMM; Kimura & Ohta, 1978).

En el **IAM**, se supone que la mayoría de nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos distinguibles, es decir, los nuevos alelos mutantes son siempre diferentes a los que ya existían en la población original, por lo que en este caso la homoplasia no existe o es despreciable. Alelos idénticos comparten el mismo ancestro y son idénticos por descendencia (IPD). En un modelo KAM el número de posibles alelos es K . La probabilidad para que algún alelo mute a algún otro estado alélico ($K-1$) es idéntica. Así, un alelo dado mutará a algunos de los alelos presentes a un rango $u / (K-1)$. En este caso la homoplasia existe, donde los alelos son idénticos en estado, pero no por descendencia (IPD). Notar que el IAM es un caso especial del KAM, con $K = \infty$ (carente de homoplasia).

El segundo modelo extremo es el **SMM** (Kimura & Ohta, 1978), bajo este modelo cada mutación crea un nuevo alelo, por adición o delección de una sola unidad de repetición del microsatélite con una igual probabilidad de mutación $u/2$ en ambas direcciones. Consecuentemente alelos de diferente tamaño estarán más distantemente relacionados que aquellos de similar tamaño. Entonces diferente a los dos modelos descritos anteriormente el SMM tiene una memoria en cuanto al tamaño de los alelos. El modelo de 2 fases (TPM; Valdés *et al.*, 1993; Di Rienzo *et al.*, 1994) es un derivado del SMM, desarrollado para explicar una proporción de eventos mutacionales más grandes (adición o delección de varias unidades). En este modelo las mutaciones aumentan o disminuyen el tamaño de los alelos, por una repetición con probabilidad p , y aumentan o disminuyen el tamaño de los alelos por K repeticiones con probabilidad $(1 - P)$, k siguiendo alguna probabilidad de repetición (Di Rienzo *et al.*, 1994).

ANEXO 3. EJEMPLO DE LA PUESTA EN EVIDENCIA DEL FENÓMENO DE HOMOPLASIA

Variaciones en la naturaleza y el lugar de interrupción (Estoup *et al.*, 1995b)

Alelos observados para el locus *A113* en diferentes subespecies de *Apis mellifera* (*A.m.*)

Especie	Secuencia del alelo	Tamaño (Pb)
<i>A.m. mellifera</i>	(TC) ₂ C(TC) ₂ TT(TC) ₄ TT (TC) ₂ TT(TC) ₉ GTTTCG(TC) ₂	214
<i>A.m. ligustica</i>	(TC) ₂ C(TC) ₂ TT(TC) ₄ TT (TC) ₂ TT(TC) ₉ GTTTCG(TC) ₂	214
<i>A.m. scutellata</i>	(TC) ₂ C(TC) ₂ TT(TC) ₅ TT(TC) ₁₁ GTTTCG(TC) ₂	214
<i>A.m. capensis</i>	(TC) ₂ C(TC) ₂ TT(TC) ₅ TTCTT (TC) ₃ TT(TC) ₁₀ GTTTCG(TC) ₂	214

Todos los alelos son idénticos en cuanto al tamaño de fragmento amplificado, sin embargo, el análisis de su composición muestra diferencias que indican que no son idénticos por descendencia. La posición y la naturaleza de las interrupciones pueden ser muy informativos en ese caso.

Variación en cuanto al número de repeticiones a nivel de un locus (Garza & Freimer, 1996)

Alelos observados para el locus *Mfd79* en chimpancé *Pan troglodytes*:

	Secuencia alélica (5' → 3')	Tamaño
Alelo 1	(CA) ₁ (TA) ₂₀ (CA) ₁₂	172 pb
Alelo 2	(CA) ₁ (TA) ₂₁ (CA) ₁₁	172 pb

El número de repeticiones de los diferentes motivos que constituyen ese locus son variables.

Variación en la secuencia flanqueante (Grimaldi & Crouau-Roy, 1997)

Alelos observados para el locus *M1B* en el hombre:

	Secuencia alélica (5' → 3')	Tamaño
Alelo 1	...GTTATCC(CA) ₂₃ TAAA - - - - - CATAAG...	172 pb
Alelo 2	...GTTATCC(CA) ₂₀ TAAACATAAACATAAG...	172 pb

Las deleciones e inserciones en las secuencias flanqueantes pueden permitir igualmente la puesta en evidencia del fenómenos de homoplasia.

ANEXO 4. DEFINICIONES DE CONCEPTOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES

Gene: Un gene es una secuencia de bases sobre el DNA, destinada a ser traducida y transcrita en una secuencia de aminoácidos que forman una proteína. En genética de poblaciones, este término designa a un fragmento de ADN no recombinante, que puede ser codificante o no.

Alelo: Es el estado de un gene sobre un cromosoma. En los organismos diploides un gene posee dos alelos cada uno sobre uno de los 2 cromosomas homólogos. Si las 2 copias son idénticas, se dice que el individuo es **homocigoto**; si las copias son diferentes el individuo es **heterocigoto**. La proporción de individuos heterocigotos, define la heterocigosidad en una población por el marcador molecular considerado.

Locus: Es la ubicación de un gene sobre el cromosoma

Población: Conjunto de individuos de la misma especie, entre los cuales existe apareamientos al azar (panmixia).

Subpoblación: (sinónimo = demo) subdivisión poblacional.

Deriva genética: Cambios al azar en la frecuencias alélicas o génicas en poblaciones que ocurren a través del tiempo como un resultado del numero finito de gametos de la generación parental que forma la subsiguiente generación. Este proceso no involucra selección.

Flujo de genes (Nm): Es la expansión de alelos o genes como resultado del apareamiento entre individuos de diferentes poblaciones. Esta fuerza se opone ala deriva genética y favorece a la homogeneización de las poblaciones.

Alopátricas: Grupo de especies relacionadas filogenéticamente que viven en diferentes áreas geográficas.

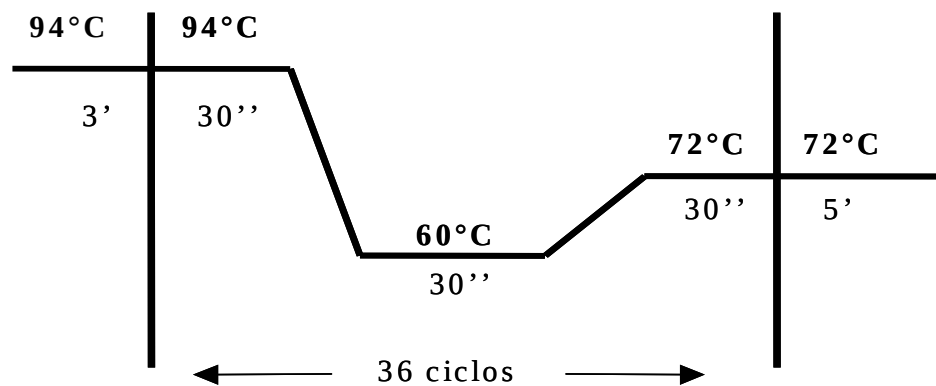
Simpátricas: Grupo de especies que ocupan parcial o totalmente el mismo hábitat.

ANEXO 5. AMPLIFICACIÓN DE LOCI DE MICROSATÉLITES

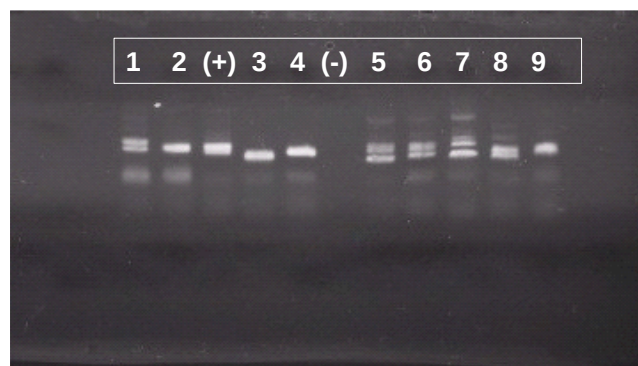
- La amplificación de los loci de microsatélites fue realizada en un volumen total de 25 ul. a partir del siguiente cálculo:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen Inicial
Tampón de Taq, (Buffer, MgCl ₂)	Buffer 10X MgCl ₂ 15 mM.	Buffer 1X MgCl ₂ 0.2 mM.	2.5 ul.
dNTPs	5 mM.	0.2 mM.	1.0 ul.
Primer 1	10 uM.	10 pmoles.	1.0 ul.
Primer 2	10 uM.	10 pmoles.	1.0 ul.
Taq. Polimerasa	5 U/ ul.	0.5 U	0.2 ul
H ₂ O para PCR			16.3 ul
DNA blanco			3ul.
			25ul

- Condiciones de PCR:



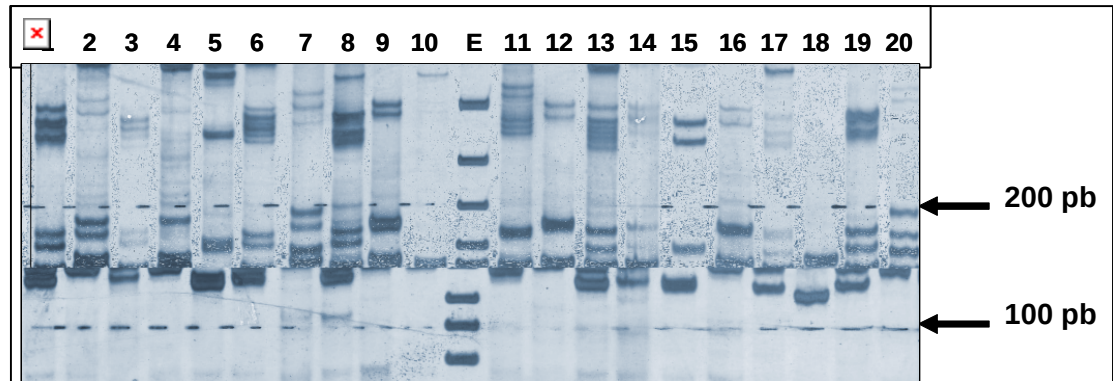
- Visualización de amplicones de microsatélites en geles de agarosa (1,5 %) y buffer TBE (0,5 X), con tinción de Bromuro de Etidio (0,5 ug/ul):



1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 amplicones de microsatélites para el locus ADC137, (+) control positivo, (-) control negativo.

ANEXO 6. INTERPRETACIÓN DE GELES

- Ejemplo de un perfil de migración, obtenido después de la amplificación de DNA para el locus *ADC137*. Migración en condiciones no desnaturizantes sobre un gel vertical de poliacrilamida (10%), con tinción de nitrato de plata.



- Designación de alelos:

E:= marcador de peso molecular, que va desde 100, 118, 140, 151, 200, etc

Muestra:

Nº1 : Heterocigoto 134138
 Nº2 : Heterocigoto 140144
 Nº3 : Heterocigoto 136140
 Nº4 : Heterocigoto 140144
 Nº5 : Heterocigoto 132134
 Nº6 : Heterocigoto 134138
 Nº7 : Heterocigoto 142148
 Nº8 : Heterocigoto 136140
 Nº9 : Homocigoto 142142
 Nº10.:Heterocigoto 140142

Nº11 : Heterocigoto 138140
 Nº12 : Homocigoto 142142
 Nº13 : Heterocigoto 134140
 Nº14 : Heterocigoto 136140
 Nº15 : Homocigoto 134134
 Nº16 : Heterocigoto 140140
 Nº17 : Heterocigoto 132138
 Nº18 : Homocigoto 130130
 Nº19 : Homocigoto 134140
 Nº20 : Heterocigoto 140150

La designación del peso molecular a cada alelo fue realizado con el Software de análisis de geles LabIMAGE