

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA SECUENCIA DEL GEN
MITOCONDRIAL CITOCROMO-OXIDASA 1 EN POBLACIONES DE *Aedes aegypti* DE EL
SALVADOR**

COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

JOSÉ LEONEL QUINTANILLA PALOMO

CIUDAD UNIVERSITARIA, 21 DE NOVIEMBRE DE 2022

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



DOCUMENTO FINAL

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA SECUENCIA DEL GEN MITOCONDRIAL
CITOCROMO-OXIDASA 1 EN 6 POBLACIONES DE *Aedes aegypti* DE EL SALVADOR

Para optar al grado de Licenciado en Biología

José Leonel Quintanilla Palomo

PhD. Andrea Lee Joyce

Asesor externo

MsC. Miguel Ángel Moreno Mendoza

Asesor interno

CIUDAD UNVERSITARIA, 21 DE NOVIEMBRE DE 2022

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



DOCUMENTO FINAL

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN LA SECUENCIA DEL GEN MITOCONDRIAL
CITOCROMO-OXIDASA 1 EN 6 POBLACIONES DE *Aedes aegypti* DE EL SALVADOR

TRIBUNAL EVALUADOR

F:

Licda. Ana Miriam González Pérez

Coordinadora del Laboratorio de Entomología de Vectores
Biología

CENSALUD-UES

F:

Lic. Jorge Armando Sayes

Docente de la escuela de

MsC. Miguel Ángel Moreno Mendoza

Docente de la Escuela de Biología

CIUDAD UNIVERSITARIA 21 DE NOVIEMBRE DE 2022

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSC. ROGER ARMANDO ARIAS

VICERRECTOR ACADEMICO

PHD.RAUL AZKUNAGA LOPEZ

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

ING. JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

MSC.FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FISCAL

LIC.RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARIN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA

DECANO:

MSC.MAURICIO HERNAN LOVO CORDOBA

VICEDECANA:

MSC.ZOILA VIRGINIA GUERRERO

SECRETARIO:

LIC.JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA

DIRECTORA INTERINA DE LA ESCUELA DE BIOLOGIA

MSC.ANA MARTHA ZETINO

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedico a mi familia de sangre, a mi madre Rina Caridad Palomo por su incondicional respaldo a lo largo de todo este recorrido académico, por sostenerme en los momentos más álgidos y por sus palabras de apoyo que fueron combustible en mi trajinar, a mi abuela Luz del Carmen Palomo, por su confianza que me tiene y por encender una vela cada día en mi nombre, a mi hermano Eduardo José Quintanilla Palomo por sus gestos de ánimo y a mi hermano Oscar Ovidio Saravia Palomo por su incondicional apoyo.

A mis asesores de proyecto de grado, MsC. Miguel Ángel Moreno Mendoza por su enseñanza magistral y su paciencia, por haber sido un excelente maestro y haberme encaminado en este maravilloso mundo de la ciencia, a la PhD. Andrea Lee Joyce, por su respaldo y apoyo, por sus palabras de ánimo y su paciencia.

A los buenos colegas de profesión quienes influyeron de gran manera en mi desarrollo, por su apoyo y sus palabras en los momentos álgidos, por su admiración y respeto, por su solidaridad y paciencia.

A los buenos amigos que con su afecto y colaboración sembraron fortalezas y seguridad en mi camino.

A las manos de los miles de obreros y campesinos de este pueblo, que con sus manos construyeron cada salón de clases, cada pupitre, cada lápiz y libreta, que con sus impuestos permiten el funcionamiento de esta universidad, para que los hijos de los obreros del campo y la ciudad podamos tener acceso a la formación universitaria, a ellos me debo y deseo con todo mi corazón poder retribuir con mi labor su encomiable esfuerzo, acompañar sus aspiraciones y sus luchas y para poner a su servicio las capacidades que voy desarrollando.

A los estudiantes e investigadores que en el trayecto de su carrera consulten este trabajo, para que puedan utilizar esta investigación como una herramienta que les permita generar nuevo conocimiento científico.

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad de El Salvador por alojarme durante estos años en su seno, por poner a mi servicio las herramientas materiales e intelectuales decisivas en mi formación profesional, por los momentos de alegría y llanto.

A mis asesores e instituciones que me apoyaron en la logística de muestreo de campo: Cruz Roja Internacional, Ministerio de Salud, Universidad de Merced, California, Escuela de Biología, Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Especial agradecimiento a las colegas Oneyda Robles, Isabel Turcios y Pedro Mata quienes me apoyaron en los muestreos de campo abriéndome las puertas de su casa y acompañándome al terreno.

Al equipo de Investigación en Genética y Biología Evolutiva por su apoyo y por ser inspiración para seguir adelante.

INDICE

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	OBJETIVOS.....	2
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
IV.	JUSTIFICACION.....	4
V.	MARCOTEORICO.....	5
5.1	¿QUE ES UN VECTOR?.....	5
5.2	TAXONOMIA DE <i>Aedes aegypti</i>	5
5.3	CICLO BIOLOGICO DE <i>Aedes aegypti</i>	5
5.4	ROL DE <i>Aedes aegypti</i> COMO VECTOR EN LAS AMERICAS.....	6
5.5	VARIABILIDAD GENETICA.....	7
5.6	ESTRUCTURA GENETICA DE LAS POBLACIONES.....	8
5.7	FACTORES QUE DETERMINAN LA ESTRUCTURA GENETICA.....	8
5.7.1	DERIVA GENETICA.....	8
5.7.2	SELECCIÓN NATURAL.....	9
5.7.3	MUTACION.....	9
5.7.4	FLUJO GENETICO.....	10
5.8	MARCADORES MOELCULARES.....	10
5.9	METODOS PARA EL ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENETICA.....	11
5.10	METODO DNA BARCODE O CODIGO DE BARRAS.....	12
5.11	VI ANTECEDENTES.....	14

5.12	VII METODOLOGIA.....	16
7.1	MUESTREO DE CAMPO.....	17
7.2	EXTRACCION Y CUANTIFICACION DEL ADN.....	19
7.3	AMPLIFICACION DEL ADN MITOCONDRIAL.....	19
7.4	VISUALIZACION DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR.....	19
7.5	SECUENCIACION DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR.....	20
7.6	EDICION Y ALINEAMIENTO.....	19
7.7	IDENTIFICACION TAXONOMICA.....	19
7.8	DIVERSIDAD GENETICA.....	19
7.9	HISTORIA DEMOGRAFICA.....	19
7.10	RED DE HAPLOTIPOS.....	19
7.11	ESTRUCTURA GENETICA.....	19
VIII	RESULTADOS.....	20
8.1	EDICION Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS.....	21
8.2	IDENTIFICACION TAXONOMICA.....	21
8.3	SITIOS POLIMORFICOS.....	21
8.4	DIVERSIDAD GENETICA.....	22
8.5	IDENTIFICACION Y FRECUENCIA DE LOS HAPLOTIPOS.....	23
8.6	DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS HAPLOTIPOS.....	24
8.7	RED DE HAPLOTIPOS.....	25
8.8	ARBOLES FILOGENETICOS.....	26
8.9	HISTORIA DEMOGRAFICA.....	27

8.10	ESTRUCTURA GENETICA MEDIANTE PRUEBA AMOVA.....	28
8.11	MATRIZ DE INTERACCIONES ENTRE LAS POBLACIONE.....	29
8.12	INDICE DE FIJACION FST.....	29
IX	DISCUSION.....	30
X	CONCLUSIONES.....	33
XI	RECOMENDACIONES.....	33
XII	BIBLIOGRAFIA.....	34
XIII	ANEXOS.....	39

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	BALANCE DE LOS CASOS DE DENGUE EM LOS ULTIMOS 8 AÑOS	4
FIGURA 2.	CICLO DE VIDA DE <i>Aedes aegypti</i>	7
FIGURA 3.	MAPA CON LOS DEPARTAMENTOS DE ESTUDIO.....	18
FIGURA 4.	DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS HAPLOTIPOS.....	24
FIGURA 5.	RED DE HAPLOTIPOS.....	25
FIGURA 6.	ARBOL FILOGENETICO Y DISTANCIAS GENETICAS ENTRE POBLACIONES.....	27
FIGURA 7.	MATRIZ DE LAS INTERACCIONES ENTRE POBLACIONES.....	29

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. DESCRIPCION DE LOS SITIOS DE COLECTA.....	17
TABLA 2. VALORES DE LA DIFERENCIA GENETICA.....	21
TABLA 3. INDICADORES DE LA DIVERSIDAD GENETICA.....	22
TABLA 4. FRECUENCIA DE LOS HAPLOTIPOS POR DEPARTAMENTO.....	23
TABLA 5. VALORES DE TAJIMA POR DEPARTAMENTO DE ESTUDIO.....	27
TABLA 6. VALORES DE LA VARIANZA POBLACIONAL.....	28
TABLA 7. TABLA DE VALORES FST.....	32

I. INTRODUCCION

Aedes aegypti es el artrópodo invasor que ha causado la mayor cantidad de muertes humanas a nivel global (Gloria-Soria et al 2016). Desde el inicio de su dispersión por todos los continentes su peligrosidad quedó en evidencia transmitiendo enfermedades como la fiebre amarilla y actualmente sigue afectando a los humanos como el vector primario de arbovirus (enfermedades transmitidas por artrópodos) que causan fiebre como: Zika, Chikungunya y 4 serotipos de dengue.

El impacto directo a la salud humana a nivel mundial, así como su fácil crianza en condiciones de laboratorio ha hecho que *Aedes aegypti* sea el insecto más estudiado en todos los aspectos de su biología (Clemens 1992, Tabachnik 1991, 1979), los complejos patrones de dispersión realizados principalmente mediante el vuelo y ovoposición de las hembras que puede desplazarse hasta medio kilómetro en busca de contenedores de agua (Edman et al 1998), así como la dispersión pasiva generada por la actividad humana que favorece el transporte de huevecillos y larvas de una región a otra en contenedores, además, la resistencia desarrollada a los insecticidas que complejiza el entramado dispersatorio del mosquito lo ha convertido en una especie modelo para la investigación en diferentes disciplinas científicas.

Los cambios observados a nivel de comportamiento están inducidos por cambios a nivel genético y en el ambiente, a nivel molecular se han respondido preguntas que aportan al entendimiento del comportamiento vectorial, la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, la historia demográfica y su procedencia migratoria.

El presente proyecto aporta elementos para la comprensión de la variabilidad genética y los procesos evolutivos involucrados en las colonizaciones de *Aedes aegypti* en El Salvador, las cuales poseen un interés biológico y sanitario intrínseco fundamental para predecir y mitigar epidemias futuras, la adaptabilidad del mosquito en entornos modificados por humanos sugiere la necesaria comprensión de los factores genéticos que inducen esta cualidad, para ello se empleó la caracterización genética en seis poblaciones de *Aedes aegypti* en El Salvador, con la técnica código de barras o 'barcode', usando para ello el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa1.

El estudio se realizó mediante diferentes fases, la fase de campo enfocada en la obtención de las muestras, la fase de laboratorio para la cría, la identificación taxonómica, los procedimientos de extracción de ADN mitocondrial y de amplificación por PCR, posteriormente se realizó la secuenciación de los fragmentos amplificados y el análisis de los datos mediante programas informáticos específicos

II. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la variabilidad genética de poblaciones de *Aedes aegypti* procedentes de diferentes zonas geográficas de El Salvador.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

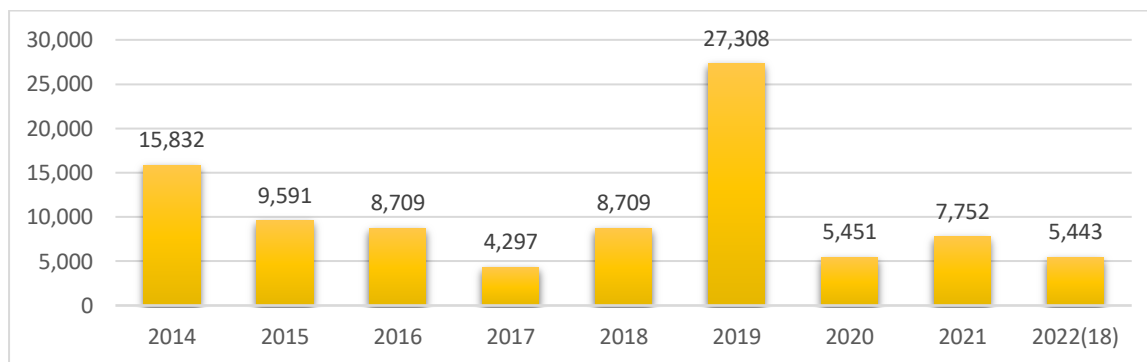
- Analizar la variabilidad genética mediante la estimación de sitios polimórficos, número de haplotipos, diversidad de haplotipos y diversidad de nucleótidos.
- Establecer la relación entre las poblaciones de *Aedes aegypti* empleando el análisis filogenético por el método de vecinos más cercanos.
- Determinar la historia demográfica de *Aedes aegypti*.
- Determinar las divergencias genéticas entre las poblaciones mediante índice de fijación FST.
- Conocer la procedencia migratoria de *Aedes aegypti* en El salvador a través de comparaciones genéticas con la base de datos GENBAK.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace muchas décadas se realizan grandes esfuerzos para el control vectorial de *Aedes aegypti*, el combate que se libra para la erradicación del mosquito logra algunos resultados pero los casos de arbovirosis frecuentemente aumentan y disminuyen descontroladamente, las tendencias a la baja se ven interrumpidas por brotes epidémicos que paralizan al sistema de salud pública en países como El Salvador con un sistema de salud precario, el control vectorial demanda la investigación permanente del mosquito desde todas los enfoques posibles.

Los repuntes de casos de arbovirus son publicados por el Ministerio de salud a través de sus boletines epidemiológicos semanales, tal como se observa en la siguiente gráfica:

FIGURA 1. BALANCE DE CASOS DE DENGUE EN LOS ÚLTIMOS 8 AÑOS



Los datos de cada año corresponden a la semana 52, para 2022 corresponden a las semanas 18 del mes de mayo para el corriente año los repuntes en los casos indican un brote epidémico iniciado época seca. Fuente (MINSAL)

Aedes aegypti ha sido incriminado en numerosos brotes epidémicos de Dengue, Zika y Chikungunya en El Salvador, sumado a esto en el año 2015 el país fue el tercero del continente en confirmar un incremento inusual en los casos de síndrome de Guillian Barre simultáneamente con el incremento en los casos de zika (OMS 2016). En estas enfermedades víricas de gran impacto en la salud humana, es *Aedes aegypti* el principal transmisor debido a que se encuentra presente en zonas urbanas, periurbanas y rurales, dada su predilección por depositar los huevecillos en aguas limpias que son utilizadas para el consumo humano.

La transmisión de los virus está determinada por factores endógenos inherentes a los elementos que constituyen el sistema virus-vector tales como la fisiología, la biología y genética del virus y la del propio insecto (Rodhan y Rosen 1997), pero también por elementos externos como los factores climáticos, geográficos y comerciales que favorecen la variabilidad genética entre poblaciones del género *Aedes*. (Campos et al 2012, Caldera et al 2013). La importancia del presente estudio radica en el entendimiento de como las variables planteadas influyen en la variabilidad genética del vector y por ende en sus procesos adaptativos y dispersatorio que están estrechamente relacionados con la vigilancia sanitaria y esfuerzo de control de brotes epidémicos que se ejecutan.

IV. JUSTIFICACION

Uno de los problemas más graves de salud pública que afecta a las Américas es sin duda la creciente participación de artrópodos hematófagos como *Aedes aegypti* en brotes epidémicos de los virus del Dengue, Zika, Chikungunya, lo cual se combina con dificultades serias para el control vectorial del mosquito.

La incidencia de enfermedades transmitidas por *Aedes aegypti* han aumentado de forma intermitente en las últimas décadas en la cual también se han realizado importantes estudios que han aportado elementos valiosos para la comprensión del vector, la variabilidad genética reportada en *Aedes aegypti* según diferencias en perfil climático de diferentes zonas geográficas señala que el conocimiento de la variabilidad genética contribuye con el diseño estratégico para el control del vector (Bracco et al 2007).

El uso de la técnica código de barras, emplea análisis muy importantes para determinar las diferencias genéticas entre poblaciones, lo cual es de suma importancia biológica, puesto que permite mejorar la comprensión de los patrones de transmisión de virus, adaptación, dispersión y desarrollo de resistencia por parte del mosquito *Aedes aegypti*.

El presente proyecto de grado genera una interacción entre la academia y el Ministerio de salud, poniendo a disposición información que hoy día resulta indispensable para el diseño integral de estrategias para el manejo y respuesta ante futuros brotes epidémicos de arbovirus, y al mismo tiempo demuestra la mejora de las capacidades locales para realizar investigaciones moleculares que brindan conocimiento fiable para aproximarse a la dinámica biológica propia de un vector tan complejo como *Aedes aegypti* y los diferentes virus que transmite.

V. MARCO TEORICO

5.1 ¿QUE ES UN VECTOR?

Los vectores son organismos vivos que pueden transmitir patógenos infecciosos entre personas o de animales a personas. Muchos de esos vectores son insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos junto a la sangre de un portador infectado (persona o animal) y posteriormente lo transmiten a un nuevo portador una vez replicado el patógeno (OMS2020).

5.2. TAXONOMÍA DE *Aedes aegypti*

Rivas y Zavaleta presentan la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: Animal

Phylum: *Artrópoda*

Clase: *Insecta*

Orden: *Díptera*

Familia: *Culicidae*

Género: *Aedes*

Especie: *aegypti*

5.3 CICLO BIOLÓGICO DE *Aedes aegypti*

Pueden identificarse dos fases en el ciclo de vida de *Aedes aegypti*, la primera fase es acuática y presenta tres formas de desarrollo: huevo, larva y pupa; la segunda fase es aérea, emerge el adulto alado con capacidad de reproducirse y es en este estadio cuando transmite enfermedades. Los cambios en su desarrollo se acompañan de una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento (Fernández 2009).

La adaptación a la vida urbana fue desarrollándose debido a las oportunidades de usar criaderos con agua estancada que genera la actividad humana y al ser fecundadas las hembras adultas tienen a disposición inmediata la proteína sanguínea que puede extraer de los humanos y/o mascotas, esto ha generado hábitos antropofágicos y domésticos en los mosquitos (Pratt et al 1976)

Aedes aegypti

Un huevo demora entre 7 y 10 días en convertirse en un mosquito adulto.

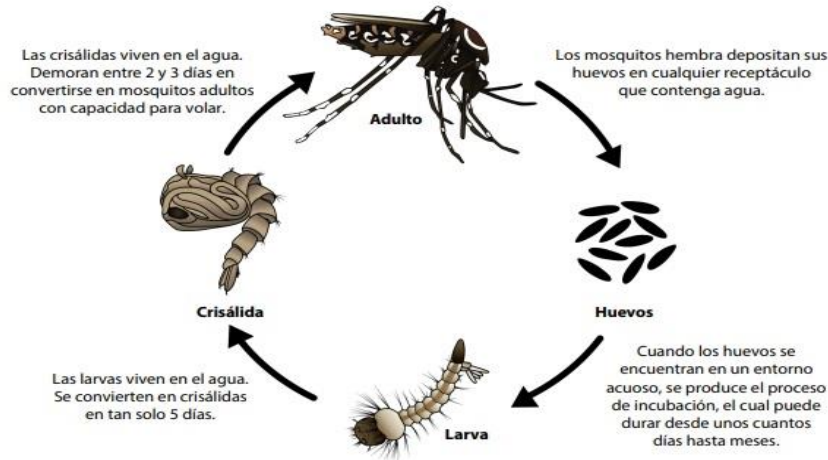


Figura 2. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*, fuente Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas

5.4 ROL DE *Aedes aegypti* COMO VECTOR EN LAS AMÉRICAS.

En los últimos años, en la región de las américas han aparecido nuevos arbovirus que presentan un reto para los sistemas de salud como el Zika y Chikungunya, sumados a los ya existentes como el dengue y fiebre amarilla que demandan la mejora del diagnóstico clínico de laboratorio, de la vigilancia epidemiológica y del control de las poblaciones de mosquitos para prevenir la transmisión de enfermedades y evitar consecuencias graves en la población.

Los brotes de arbovirus transmitidos por *Aedes aegypti* sobrecargan regularmente los sistemas de salud, con un escenario epidemiológico complejo de transmisión simultánea de COVID-19, la detección temprana y la pronta atención médica a los pacientes con dengue grave u otros arbovirus han ayudado a reducir drásticamente la tasa de letalidad de las enfermedades. Sin embargo, la realidad de la posible cocirculación del dengue y el COVID-19, impone nuevos desafíos (OPS 2019)

Aedes aegypti emigró primero desde África a América luego de América a Asia como producto de la actividad comercial y en el presente se encuentra extendido globalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Gloria-Soria2018, Brown et al 2014). Es un vector competente que fue introducido en américa durante no bien definidos tiempos de la colonización europea y ocasionando reiteradas epidemias de fiebre amarilla que ya se registraban previamente de forma local en la américa precolombina mediante otros mosquitos vectores autóctonos y en diversas áreas del continente (Salvatella 1996).

Desde hace más de dos siglos años se relatan casos de epidemias con cuadros diagnosticados como dengue en el continente, estos episodios epidémicos poseían una frecuencia de 10 o más años de

intervalo que posteriormente se han venido acortando, los esfuerzos por su erradicación han tenido éxitos temporales en los que se logró restringir a pequeñas áreas seguido de reinfestaciones en países con erradicación concluida (Salvatella 1996, Monteiro et al. 2014). La resistencia desarrollada por el mosquito frente a los insecticidas junto al agravamiento de la transmisión del dengue en sus cuatro serotipos y el apareamiento de otros virus de impacto global sumado a la precariedad económica a nivel regional, ocasiono que *Aedes aegypti* se constituyera en tema en la primera convención sanitaria internacional de las repúblicas americanas celebrada en Washington en 1902 y desde entonces se ha mantenido en la atención sanitaria internacional, la OPS en 1947 efectuó el lanzamiento de la campaña continental de erradicación de *Aedes aegypti*, basada en fumigaciones masivas, ejerciendo así una enorme presión sobre el vector cuya plasticidad genética y gran capacidad de adaptación y adaptabilidad lo han vuelto resistente, de tal manera que la situación se ha agravado y cada año se registran millones de casos de enfermedades transmitidas por el mosquito.

5.5 VARIABILIDAD GENETICA

Los individuos de una misma especie no son idénticos. Si bien, son reconocibles como pertenecientes a la misma especie, existen muchas diferencias en su forma, función y comportamiento, de modo que en cada una de las características que sea posible identificar de un organismo existirán variaciones dentro de la especie.

La variabilidad genética permite medir la tendencia de los genotipos de una población a diferenciarse, en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Piñero et al. 2008).

El conocimiento de la diversidad genética de una especie tan importante en el área sanitaria como *Aedes aegypti* contribuye al diseño de estrategias más efectivas para el control vectorial y fortalece la comprensión de la historia evolutiva de las poblaciones del mosquito, su adaptación ambiental, dispersión, la propagación de cepas resistentes a los insecticidas, los cambios en sus comportamientos ecológicos y la epidemiología de la enfermedad (Hiragi et al 2009).

Una de alternativas viables para el estudio de la variabilidad genética del *Aedes aegypti* se realiza a través del ADN mitocondrial el cual posee numerosas ventajas para el estudio de las relaciones evolutivas, ya que su longitud es mucho menor que el ADN hallado en los cromosomas del núcleo, es abundante, tiene una mayor tasa de evolución, posee una gran variación intraespecífica y es de herencia uniparenteral (Scarpassa et al 2008), la adaptabilidad del mosquito está ligada a genética y el estudio de la misma aporta herramientas valiosas para el entendimiento de la biología del vector.

La variabilidad genética puede emplearse con diferentes objetivos:

- Evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales naturales o provocados por las actividades humanas conscientes o inconscientes.
- Evaluar los riesgos de la pérdida de especies, poblaciones y recursos genéticos disminuyen nuestra capacidad de sobrevivir como sociedad y como especie.
- Conocer la riqueza genética de la nación y su distribución geográfica.
- Planear estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos
- Entender la forma, la velocidad, y las causas de la pérdida de la diversidad genética.
- Evaluar los riesgos de introducción de enfermedades, plagas, especies invasoras, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones, especies nativas y recursos genéticos de plantas y humanos.

5.6 ESTRUCTURA GENETICA DE LAS POBLACIONES

Las poblaciones naturales pueden estar definidas como un grupo de individuos que comparten los mismos genes, son los procesos asociados al nacimiento, muerte, reproducción y dispersión los que determinan la estructura genética de una población natural (Slatkin 1994), sin embargo existen los factores extrínsecos que componen la naturaleza biofísica del entorno, por ello en las poblaciones naturales se espera que exista una estructura genética debido a las barreras de dispersión que previenen los cruces aleatorios, así como también en las otras poblaciones no existe una estructura genética debido a un flujo continuo de genes.

5.7 FACTORES QUE DETERMINAN LA ESTRUCTURA GENETICA

5.7.1 DERIVA GENETICA

La deriva genética ocurre en poblaciones relativamente pequeñas donde algunos alelos pueden cambiar su frecuencia simplemente debido al azar. La mayoría de los organismos son diploides, debido a que tienen dos ejemplares de cada gen. Los gametos de estos organismos portan solo uno de los dos ejemplares (alelos) de cada gen. El que un gameto lleve un alelo u otro, es una cuestión de azar, por lo que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los cigotos de la siguiente generación solo puede describirse como un proceso probabilístico (Galtier et al. 2000).

En cada generación esperamos una fluctuación al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Si en algún momento durante esta conducta fluctuante uno de los alelos no llega a transmitirse a la siguiente generación, entonces este alelo se habrá perdido para siempre. El resultado de la Deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones. Es necesario mencionar que la deriva genética tiende a formar una población homocigótica, además se tiende a eliminar los genotipos heterocigóticos (Galtier et al. 2000).

5.7.2 SELECCIÓN NATURAL

Es la fuerza creativa que lleva al proceso de adaptación de los organismos al compaginar cambios en su entorno físico y biológico. La selección natural resulta en una “descendencia con modificación”, mientras el genotipo provee la parte heredable, la selección actúa sobre el fenotipo (forma visible), esto incluye el desarrollo, morfología y comportamiento. La idea de la selección natural como un proceso fundamental de los cambios evolutivos fue iniciada por Charles Darwin y Alfred Russel Wallace (Ayala y Kiger 1984) e implica que las poblaciones naturales estén constituidas por un pool genético con algunas variantes poco frecuentes (Futuyma 1986). El entorno es crucial para la selección natural, dado que sus límites son los que determinan que caracteres son los beneficiosos y dentro de ello, los cambios tanto en espacio y tiempo traen consigo modificaciones en los caracteres de los organismos.

5.7.3 MUTACION

Ocasionalmente pueden llegar a producirse errores en la replicación del ADN, estos cambios son denominados mutaciones. Una mutación es un cambio estable y heredable en el material genético dependiendo del tipo de mutación. Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de éstas variantes pueden ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de éstas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie (Aranguren et al. 2005).

La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética. Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al ambiente. A su vez, una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales o deletéreas de los individuos, haciéndolos menos adaptados, y aumentando la probabilidad de extinción de la especie. Las mutaciones no tienen ninguna dirección respecto a la adaptación, son como un cambio al azar.

Este cambio puede producir una falta de significado, y por eso la mayoría de las mutaciones son deletéreas. Pero a veces, ciertos cambios pueden introducir nuevos significados, permitiendo nuevas funciones (Aranguren et al. 2005).

5.7.4 FLUJO GENETICO

El flujo genético se define como la transferencia de material genético entre poblaciones dado por el movimiento de individuos o de sus gametos (Avisé y Hamrick 1996). El impacto del flujo de genes está determinado por la capacidad de dispersión de la especie, así como por barreras geográficas y estructura poblacional (Orell et al. 1999). El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente.

Para (Slatkin 1994) si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo genético cada población evoluciona en forma casi independiente

5.8 MARCADORES MOLECULARES

Se denomina a los marcadores moleculares como secuencias o fragmentos de ADN que permiten identificar o diferenciar genotipos que pueden ser genes, segmentos de ADN cuya codificación no se conoce (López 2002), estos se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos.

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen o carácter cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (Nuez y Carrillo 2000), estos ofrecen la posibilidad de estudiar organismos que presenten rasgos de interés, pueden definirse, además, como porciones específicas de ADN formadas por secuencias cortas que se repiten, ya que el número de repeticiones en estos marcadores es altamente variable entre los individuos, son efectivos para fines de caracterización. Existen varias técnicas para identificar marcadores de ADN las cuales se pueden agrupar en tres categorías: marcadores por hibridación, marcadores por amplificación y los marcadores mixtos que combinan ambas técnicas (Pica et al 2002).

Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante, estas regiones del ADN que presentan variaciones en su secuencia nucleotídica, se consideran herramientas útiles que sirven de base al análisis de la diversidad biológica y la identificación de especies, cepas híbridas, recursos genéticos, identificación de paternidad, mapeo genético, biología evolutiva, ecología molecular, genética de la conservación etc.

5.9 METODOS PARA EL ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENETICA

En los estudios referentes a la variabilidad genética existen numerosos estadísticos que han sido propuestos a fin de cuantificar y comprenderla en términos más exactos, cada estadístico aprecia diferentes aspectos de la variabilidad genética, suelen utilizarse varios de forma complementaria, los más empleados son la riqueza alélica, el polimorfismo, la heterocigocidad observada y la heterocigocidad esperada (Gonzalez 2011).

Riqueza alélica: es el número promedio de alelos por locus cuantifica el número total de alelos por locus y cuantifica el número total de alelos diferentes detectados en cada uno de los locus de una población.

El polimorfismo o la proporción de loci polimórficos (P): es una medida del número de loci variable en una población y se calcula dividiendo el número de loci polimórficos de ésta entre el número total de loci analizados (Sosa et al 2002).

Heterocigocidad observada: se calculan dividiendo el número de heterocigotos en un locus entre el número total de individuos muestreados. Estima la probabilidad de organismos con cruzamientos al azar de que dos alelos escogidos en una población sean diferentes, sin embargo, no refleja bien la cantidad de variación genética en las poblaciones de organismos que se reproducen asexualmente o por fecundación (Franckham et al 2009).

Heterocigocidad esperada: se define como la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población. Cuando las poblaciones están en equilibrio Hardy-Wiemberg, la heterocigocidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica, por lo tanto, la heterocigocidad esperada cuantifica la igualdad o equitativa de las frecuencias alélicas en los Loci. La comparación entre la heterocigocidad observada y la heterocigocidad esperada permite evaluar la estructura genética de las poblaciones.

Neighbor-Joining (NJ) o método de vecinos más cercanos: El algoritmo NJ fue creado por Saitou & Nei 1987 y consiste en generar un único “árbol filogenético” final, el cual, según los autores, no necesariamente será el “árbol verdadero”. En el paso inicial, se unen los dos neighbors (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, este par inicial se considera como una sola entidad, y se busca el siguiente terminal que tenga la menor distancia genética con este. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al “árbol filogenético” (Saitou & Nei 1987). En el caso de secuencias de ADN, la distancia genética entre dos terminales se calcula en base al número total de sustituciones de bases nitrogenadas, es decir en el número de bases nitrogenadas que son diferentes en estas dos secuencias. Para seleccionar los terminales que tengan menor distancia genética, lo que en la práctica es escoger las secuencias más parecidas, es necesario construir una matriz estándar de distancias entre todas las posibles combinaciones de terminales. Entonces se construye el “árbol filogenético” agregando terminales tomando como información los valores de la matriz de distancias (Saitou & Nei 1987).

Prueba Tajima o valor D: Es una estadística de prueba poblacional creada y nombrada en honor al investigador japonés Fumio Tajima, el valor D se calcula como la diferencia entre dos medidas de diversidad genética: el número medio de diferencias por pares y el número de sitios segregantes, cada uno escalado de modo que se espera que sean iguales en una población de tamaño constante en evolución neutral (Tajima 1989).

Una D Tajima negativa significa un exceso de polimorfismos de baja frecuencia en relación con la expectativa, lo que indica una expansión del tamaño de la población (por ejemplo, después de un cuello de botella o un barrido selectivo). Una D positiva de Tajima significa niveles bajos de polimorfismos de baja y alta frecuencia lo que indica una disminución en el tamaño de la población y/o una selección equilibrada.

Los valores D pueden interpretarse de la siguiente manera:

$D=0$: la variación observada es igual a la variación esperada; la población evoluciona según el equilibrio de mutación-deriva, sin evidencia de selección.

$D < 0$: alelos raros abundantes (exceso de alelos raros); barrido selectivo reciente, expansión de la población después de un cuello de botella reciente, vinculación a un gen de barrido.

$D > 0$: Alelos raros escasos (falta de alelos raros); selección equilibrada y contracción repentina de la población.

Análisis Molecular de la Varianza: La diversidad genómica, expresada en las diferencias entre haplotipos moleculares de un conjunto de individuos, puede dividirse en componentes de variabilidad entre y dentro de algún factor de clasificación de los individuos. Para tal partición de varianzas, se usa análisis molecular de la varianza (AMOVA), el cual se construye a partir de las distancias multivariadas entre pares de haplotipos (Bruno et al 2019).

Sirve para estudiar la variación molecular dentro de una especie:

- Se basa en un modelo jerárquico anidado.
- Diferencias con el ANOVA: puede contener diferentes suposiciones evolutivas sin modificar la estructura básica del análisis: la hipótesis utiliza métodos de permutación que no requieren suposición de una distribución normal.
- Niveles jerárquicos de la diversidad genética estudiada por medio del AMOVA: continentes que contengan niveles jerárquicos menores, regiones geográficas dentro de un continente, zonas dentro de una región, poblaciones dentro de una región, individuos dentro de una población.

Índice de fijación F_{ST} : Índice de fijación. Reducción de la heterocigocidad en una subpoblación debido a los cruzamientos NO al azar, con respecto a la población total, al ser una correlación varía de -1 a +1 (Wright 1965).

5.10 METODO DNA BARCODE O CODIGO DE BARRAS

En 2003 los investigadores de la Universidad Guelph en Ontario, Canadá propusieron el código de barras genético o DNA Barcode, como una técnica para identificar especies, un barcode se puede considerar como una secuencia corta de DNA, de una localidad uniforme del genoma usada para identificar especies (Medina y Huete 2008).

La región del gen que está siendo utilizada como Barcode estándar para casi todos los grupos de animales es una región de 648 pares de bases del gen mitocondrial citocromo c oxidasa sub unidad 1 (CO1). Está probado que CO1 es altamente efectivo en la identificación de muchos grupos de

animales., uno de los principales objetivos de DNA Barcode es la estandarización, es decir, que esta técnica pueda ser utilizada para la identificación de especies por muchos investigadores , lo que permitirá acelerar la construcción de una biblioteca de secuencias de ADN que sea accesible y consistente, de esta manera cualquier investigador en cualquier parte del mundo será capaz de identificar rápidamente de una forma confiable a que especies pertenece un espécimen dado.

Se escogió un gen mitocondrial debido a algunas de sus características:

- Una célula posee más copias de ADN mitocondrial que de ADN nuclear, lo que permite recuperar el ADN con más éxito en muestras pequeñas o degradadas.
- Hay mayor diferencia en la secuencia de ADN entre especies diferentes.
- Hay poca diferencia en la secuencia de ADN de ejemplares de la misma especie. La variación intraespecífica en el ADN mitocondrial es baja en la mayoría de las especies animales.
- Hay ausencia de intrones, que son ADN no codificante. En animales, los genes mitocondriales raramente contienen intrones. El ADN mitocondrial es generalmente transcrito directamente, en cambio, la amplificación de las regiones codificantes de genes nucleares es limitada a menudo por los intrones, que pueden ser muy largos (Paiz y Huete 2008).

VI ANTECEDENTES

- La diversidad genética de *Aedes aegypti* ha sido estudiada a nivel global, se ha determinado su origen África donde coexiste con la variante selvática *Aedes formosus*, ambos presentan poblaciones muy estructuradas y las dos subespecies coexisten tanto en África Oriental (Kenia) como en África Occidental (Senegal). En entornos rurales/forestales (Distrito de Rabai de Kenia) las dos subespecies siguen siendo genéticamente distintas, mientras que en entornos urbanos se introgresan (Soria et al 2016).
- Los datos genéticos respaldan firmemente la hipótesis de que las rutas comerciales humanas movieron primero a *Ae. aegypti* fuera de África hacia América, seguido de una invasión posterior desde América hacia el Sudeste Asiático y el Pacífico. Estos patrones de domesticación e invasión son relevantes para muchas especies en todo el mundo, ya que las fuerzas antropogénicas impactan cada vez más en los procesos evolutivos (Brown et al 2014).
- La variante ancestral de *Ae. aegypti* dependían de los bosques, la historia de esta población es consistente con los efectos de la fragmentación y expansión de los bosques impulsada por el cambio climático del Pleistoceno, además, el movimiento humano histórico a través del continente puede haber facilitado su reciente expansión y mezcla. Al aumentar la diversidad genética y formar nuevas combinaciones alélicas, la divergencia y la mezcla histórica dentro de África podrían haber proporcionado el potencial de adaptación necesario para la propagación mundial exitosa de *Ae. Aegypti* (Bennet et al 2016).
- Siete haplotipos mitocondriales fueron detectados en el análisis y filogenético y se identificó dos clados bien respaldados en Monterrey, México (Gorochotegui et al 2000).
- Los patrones genéticos en las poblaciones actuales de *Ae. aegypti* en Brasil son más consistentes con una erradicación completa de la especie en el pasado reciente seguida de una recolonización, en lugar de la posibilidad alternativa de expansión a partir de focos residuales de refugio. Es probable que hayan tenido lugar al menos dos colonizaciones, una de los países del norte de América del Sur (por ejemplo, Venezuela) que fundó el grupo del noroeste y otra del Caribe que fundó el grupo del sureste (Monteiro et al 2014).
- Las poblaciones del este de Argentina mostraron un haplotipo prevalente, también predominante en Brasil y Paraguay. La red de haplotipos construida a partir de distancias genéticas mostró tres grupos bien diferenciados. Dos de ellos exhibieron una distribución espacial bien definida y las poblaciones de estos grupos presentaron un patrón de aislamiento por distancia (Dueñas 2009).
- El análisis de las secuencias de mtDNA reveló la existencia de dos linajes genéticos en Bolivia, un linaje dominante recuperado en todo el país y el segundo restringido a localidades rurales en el sur de Bolivia. El análisis filogenético indicó que este linaje minoritario estaba relacionado con *Ae. aegypti* especímenes de *aegypti*. (Paupy et al 2012)
- Perú tiene grandes diferencias ecológicas entre los lados este y oeste de los Andes, esto se correlaciona con la variabilidad genética de tres poblaciones y los resultados sugieren sugiere la introducción de al menos dos linajes de *Ae. aegypti* en Perú (Costa da Silva et al 2005).
En Lima circulan las dos variantes genéticas producto del elevado comercio que existe entre la ciudad y las regiones del Perú (Caceres y Leon 2007).
- Un estudio realizado en Colombia indica que las diferencias observadas en cuanto a la estructura y composición genética de las poblaciones de *Ae. aegypti* de Sincelejo y Guaranda sugieren divergencia genética entre ellas lo que podrían estar relacionadas con

las condiciones ambientales, la heterogeneidad del hábitat, la presión selectiva ejercida con insecticidas y la limitada migración humana (Caldera et al 2013).

- Se detectaron siete haplotipos en toda Venezuela y estos se clasificaron en dos clados (Herrera y Rojas 2006).
- En El Salvador se han identificado dos poblaciones genéticamente divergentes usando marcadores AFLP (Joyce et al 2018).

VII. METODOLOGIA.

La determinación de las diferencias genéticas entre las poblaciones de *Aedes aegypti* en este estudio se realizó por medio de la técnica código de barras según el siguiente esquema metodológico, mismo que se describe en los subcapítulos siguientes.

- Muestreos de campo.
- Extracción y cuantificación del ADN mitocondrial
- Amplificación del ADN por PCR con cebadores específicos CO1
- Secuenciación de los productos de PCR
- Análisis de los datos mediante softwares específicos.

7.1 MUESTREOS DE CAMPO

Las muestras de *Aedes aegypti* que se utilizaron en el presente estudio fueron adultos correspondientes a larvas colectadas en 5 localidades de los siguientes 4 departamentos: San Vicente, Cabañas, Santa Ana, La Unión (de este último departamento se muestrearon dos municipios) (ver figura 1). La captura de larvas se realizó con el apoyo técnico y logístico del personal de unidades Vectorizadas del Ministerio de Salud, cruz roja y contactos locales, se elaboró una base de datos con georreferencias (ver anexo 1); en cada municipio se realizaron colectas en al menos 3 puntos distintos de la zona de colecta (ver tabla 1) para las localidades de Jiquilisco y San Salvador se descargaron las secuencias previamente cargadas por (Joyce et al 2018) de la base de datos en ebold, siendo 14 y 10 secuencias respectivamente.

TABLA 1. DESCRIPCION DE LOS SITIOS DE COLECTA

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	COLONIA/CANTON
Santa Ana	Santa Ana	Col. El Palmar Col. Altos de el palmar Cton. El ranchador
San Vicente	San Vicente	Cton. Rio frio Cton. Valle nuevo Crio. La galera Crio. El junquillal
Cabañas	Sensuntepeque	Col. Parque cabañas Col. Palestina Col. Quintero
La Unión	La Unión	Bo. Concepción Bo. San Antonio Col. Beltrán
	Santa rosa de lima	Bo. Las delicias Col. Altos del estadio
San Salvador	San Salvador	Col. La fosa Bo. San Jacinto
Usulután	Jiquilisco	Col. Las flores siembras Col. Las flores

Las larvas fueron colectadas en colonias de zonas urbanas y caseríos de zonas rurales.

Las larvas colectadas fueron transportadas hasta el Laboratorio de Entomología de Vectores en CENSALUD de la Universidad de El Salvador. Estas fueron colocadas en bandejas con agua y

alimentadas con comida comercial para gato. Los adultos fueron trasladados dentro de jaulas mosquitero donde quedaron confinados y posteriormente fueron congelados en refrigerador durante 3 minutos para inmovilizarlos e identificarlos taxonómicamente en el microscopio estereoscópico. Una vez identificados se colocaron en etanol reactivo dentro de tubos eppendorf debidamente rotulados con código distrital y almacenados en congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización en la extracción de ADN (ver anexo 2), se elaboró una base de datos en Excel con los detalles de las muestras a utilizar en el estudio.

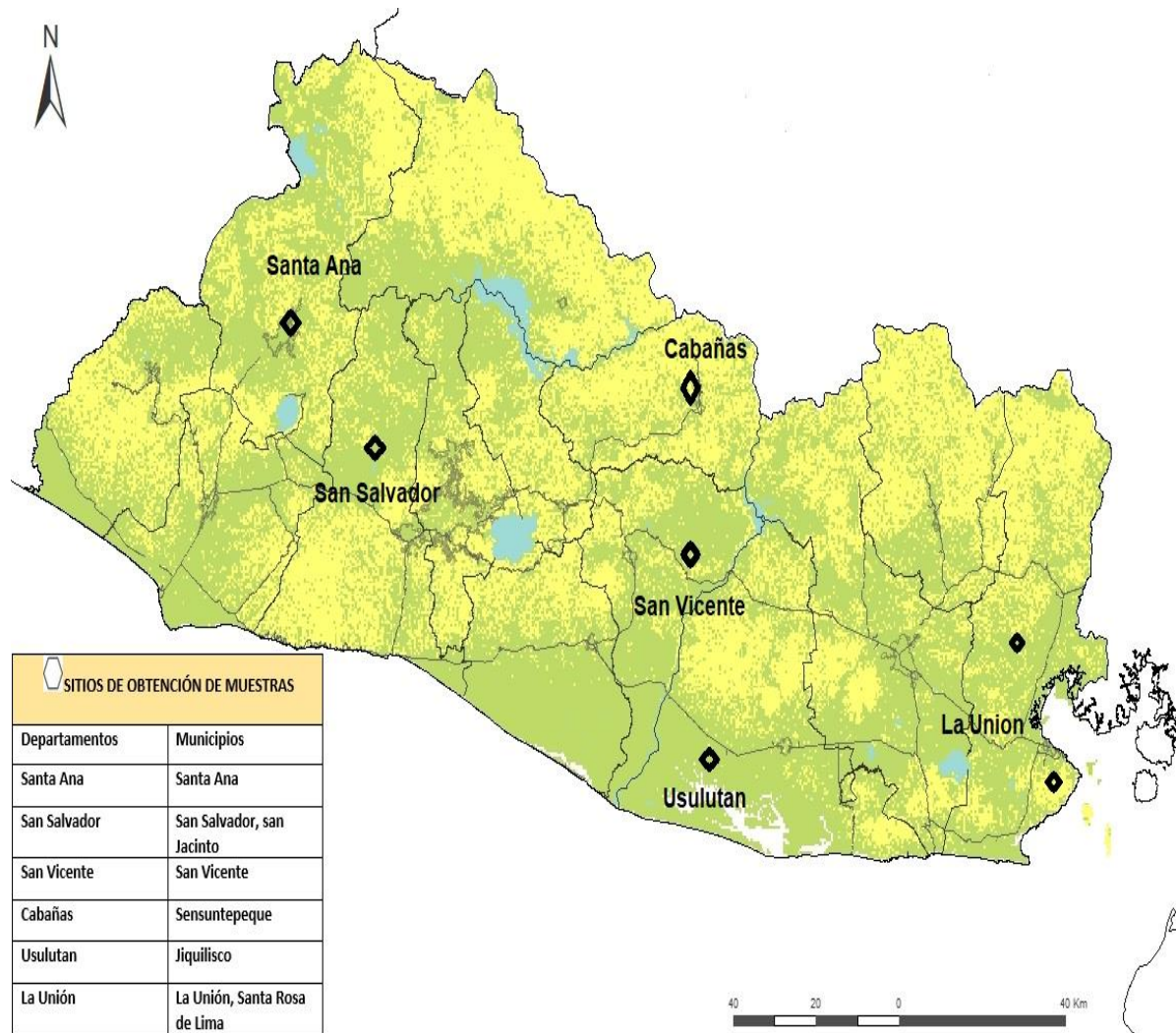


Figura 3. Mapa con los departamentos de estudio

7.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO.

La extracción de ADN mitocondrial se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática; a partir del cuerpo completo de cada individuo por medio del kit de Extracción PureLink™ Genomic DNA, luego de la extracción se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1% para evaluar la calidad de las bandas de ADN, finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C. (ver anexo 3, 4 y 5).

7.3 AMPLIFICACIÓN DE DNA MITOCONDRIAL.

La amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial de interés, se realizó por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en la Escuela de Biología de la Universidad de El Salvador y según metodología descrita por (Zamora-Delgado et al 2015) (anexo 6)

Se amplificó una región del DNA mitocondrial de aproximadamente 650 pares de bases denominado “barcode” o código de barra, correspondiente al gen mitocondrial Citocromo Oxidasa 1 (CO1) con los oligonucleótidos MTNF / MTNR.

La PCR se realizó por medio de un kit comercial Takara R001; en dos pasos; en un tubo eppendorf de 1.5, donde se adicionan secuencialmente los siguientes reactivos mezcla master para PCR: 13 ul más 7 ul de agua ultra pura, 1 ul de cebador “forward” 1 ul de cebador “reverse” y 3 ul de las muestras de DNA para un volumen de 25 ul por muestra, estas cantidades se multiplicaron por la cantidad reacciones a amplificar, se preparó una solución madre con volumen total, posteriormente se prepararon las alícuotas de mezcla en tubos eppendorf 0.5 ul y se adiciono el ADN.

El contenido se agito en vortex y se llevó al termociclador automático para realizar las reacciones de desnaturalización, hibridación y elongación según la programación siguiente: 1 min a 95°C y luego 35 ciclos consecutivos de 94°C (1 min), 55°C (1 min) y 72°C (1 min), seguido por 7 min a 72°C; para un total de 2 a 3 horas de duración (ver anexo 7).

7.4 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE ADN MITOCONDRIAL

Posterior a la PCR, fue necesario confirmar la amplificación de los fragmentos COI del ADN mitocondrial.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% preparado con un tampón de corrida TBE 0.5X, el gel se coloreó con reactivo fluorescente gel-red® Biotim, para evidenciar bandas, se corrieron diez carriles simultáneamente en un gel, en cada pocillo se sembró una mezcla que contenía 5 ul de ADN amplificado producto de la PCR y 1 ul de colorante de carga 6x (Fisher Scientific International, Inc., Hampton, Nueva Hampshire). El control negativo consistió en 5 ul de la mezcla master de PCR (sin ADN) y 1 ul del colorante de carga. El carril con la escalera de ADN de 1000 pb (New England Biolabs®, Inc., Ipswich, MA) contenía 1 ul de escalera de ADN, 4 ul H₂O ultra pura y 1 ul de colorante de carga (anexo 8).

La corrida tuvo una duración aproximada de 30 minutos a 102 voltios, ocho carriles contenían muestras del estudio, uno contenía el control negativo y el último corría una escalera de DNA 1000 pares de bases para la comparación, con el fin de visualizar y confirmar la amplificación del fragmento de aproximadamente 650 pares de bases, concluido el tiempo de corrida, el gel se visualizó con un transiluminador de geles marca MiniBIS modelo 16 mm para confirmar la amplificación del fragmento COI. Finalmente, las muestras positivas a los fragmentos COI de 650 pb, fueron almacenadas a -20°C para su posterior secuenciación (ver anexo 5 y 6).

7.5 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR.

Los fragmentos de aproximadamente 650 pb o código de barras del gen mitocondrial COI, producto de la amplificación en PCR y previamente almacenados a -20°C, fueron enviados vía FEDEX al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de California, Berkeley, para la secuenciación en un equipo Applied biosystems 3130 genetic analyzer según los principios descritos por Sanger 1967.

7.6 EDICION Y ALINEAMIENTO: Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software Geneius prime para editar y determinar las secuencias consenso, posteriormente fueron alineadas en el software MEGA.

7.7 IDENTIFICACION TAXONOMICA: Las secuencias fueron comparadas con el récord de secuencias Barcode de *Ae. aegypti* presentes en la base de datos Ebold y GenBank.

7.8 DIVERSIDAD GENETICA: Posteriormente se calculó la longitud de la secuencia, sitios conservados, sitios de parsimonia informativa, sitios polimórficos, cantidad de haplotipos, diversidad haplotípica, promedio del número de diferencias, diversidad nucleotídica estimada y la diferenciación genética entre haplotipos de las poblaciones utilizando el programa DNAsp.

7.9 HISTORIA DEMOGRÁFICA (D). de las localidades se obtuvo usando el software DNAsp.

7.10 RED DE HAPLOTIPOS: La red de haplotipos y su distribución geográfica se obtuvo con el programa Pop ART siguiendo el método propuesto por (Clement et al 2000).

7.11 ESTRUCTURA GENETICA: Con la prueba AMOVA se determinó el grado de diferenciación entre poblaciones, se obtuvo una matriz que representa las interacciones entre las poblaciones en una escala de distancias, se calcularon los porcentajes de variación de los componentes de varianza, utilizando los softwares Arlequín y R Studio, con el objetivo de determinar la interacción entre factores se ejecutó un análisis de diferenciación entre pares de localidades.

VIII. RESULTADOS

8.1 EDICION Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias complementarias individuales fueron verificadas base por base usando el software Geneius. una vez editadas y consolidadas las secuencias consenso individuales de cada localidad, fueron alineadas entre sí, posteriormente se eliminaron las bases de los extremos incompletos y se obtuvieron alineamientos múltiples.

8.2 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA: Se obtuvo la identificación taxonómica ingresando secuencia por secuencia en la base de datos global: BoldSystem, del total de 73 secuencias 71 fueron identificadas como *Aedes aegypti* y 2 *Aedes albopictus* que se usaron como secuencias control identificadas dentro de la localidad de cabañas.

8.3 SITIOS POLIMORFICOS

Una vez realizado el alineamiento múltiple en el software MEGA, la región genética de estudio presentó una longitud de 1-476 pares de bases, siendo estos 476 los sitios sometidos al análisis en el software DNAsp, los valores obtenidos en el análisis de la diferenciación genética se presentan en la siguiente tabla:

identificaron 408 sitios monomórficos o regiones conservadas y 68 sitios polimórficos donde se observó variabilidad (tabla 2). El análisis lanzo como resultado 70 mutaciones observadas y 66 sitios de parsimonia informativa en los cuales se observan al menos dos residuos que aparecen al menos dos veces cada uno de ellos

Tabla 2. VALORES DE DIFERENCIACION GENETICA

Longitud de la secuencia	Sitios conservados	Sitios variables	Sitios de parsimonia informativa
476	408	68	66

Los sitios variables señalan la cantidad de polimorfismos en el alineamiento y los sitios informativos son los que aportan información importante para la construcción de árboles filogenéticos bajo el modelo de máxima parsimonia.

8.4 DIVERSIDAD GENÉTICA

Se calculó la diversidad genética de las 6 poblaciones de estudio, por localidad y de forma global usando el software DNAsp, como se muestra en la Tabla.2, donde N SEQ es la cantidad de secuencias por localidad, así como el dato global (73), el número de sitios polimórficos (S),

de las 6 localidades el valor más alto se encontró en Cabañas con 64 sitios polimórficos y la menor en Jiquilisco con 10. La lista de haplotipos global fue de $h=13$, en cuanto a la cantidad de haplotipos por localidad se observaron 3 en Santa Ana (SA), 5 San Vicente (SV), 4 Cabañas (CB), 6 en la Unión (LU), 3 para Jiquilisco (JC) y 5 para San Salvador (SS). La diversidad haplotípica (hd) por localidad se observa con valores altos en La Unión $hd=0.88889$ y San salvador con $hd=0.86667$ (este valor representa la probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar sean diferentes).

En cuanto a diversidad nucleotídica (Pi) los valores más alto y el más bajo se encontraron en las localidades de Cabañas $Pi=0.05451$ y San Vicente con $Pi= 0.00719$ respectivamente, este índice estima la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos seleccionados al azar sean diferentes.

TABLA 3. INDICADORES DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

	N SEQ	S	h	Hd	K	Pi
SA	18	11	3	0.45098	4.35948	0.00916
SV	12	11	5	0.66667	3.42424	0.00719
CB	9	64	4	0.69444	25.94444	0.05451
LU	10	11	6	0.88889	5.48889	0.01153
JC	14	10	3	0.53846	4.45055	0.00935
SS	10	16	5	0.86667	7.17778	0.00935
GLOBAL	73	68	13	0.71005	8.27473	0.01738

Resumen de los valores que indican la diversidad genética, las columnas expresan los valores de: S=sitios polimórficos, h=haplotipos, Hd=diversidad haplotípica, K= promedio del número de diferencias, Pi= diversidad nucleotídica.

8.5 IDENTIFICACIÓN Y FRECUENCIA RELATIVA DE HAPLOTIPOS

De todas las localidades se obtuvieron un total de 13 haplotipos para el gen CO1, se observaron tanto, haplotipos predominantes para todas las localidades, como haplotipos privados que aparecen restringidos en poblaciones específicas.

Se identificaron 13 haplotipos para las 7 localidades, observándose 2 haplotipos dominantes (tabla 4). Los haplotipos 1 y 3 aparecen fijados en las 6 poblaciones seguido del haplotipos 2 fijado en 4 poblaciones.

También se observan haplotipos privados, que aparecen fijados exclusivamente en poblaciones específicas, tal fue el caso de los haplotipos 5, 6 y 7 que se encontraron en la localidad de La Unión, haplotipos 8 en Santa Ana, haplotipos 9,10,11 en la localidad de San Salvador, haplotipos 12 y 13 en San Vicente (tabla 4). Los dos haplotipos con mayor frecuencia los señalan como ancestros (figura 3). La identificación de haplotipos y su confirmación taxonómica en la base de datos GenBank indica que el haplotipos 4 corresponde a secuencias identificadas en ebold y genbank como *Aedes albopictus* una especie muy cercana a *Aedes aegypti*.

TABLA 4. FRECUENCIA DE LOS HAPLOTIPOS POR DEPARTAMENTOS

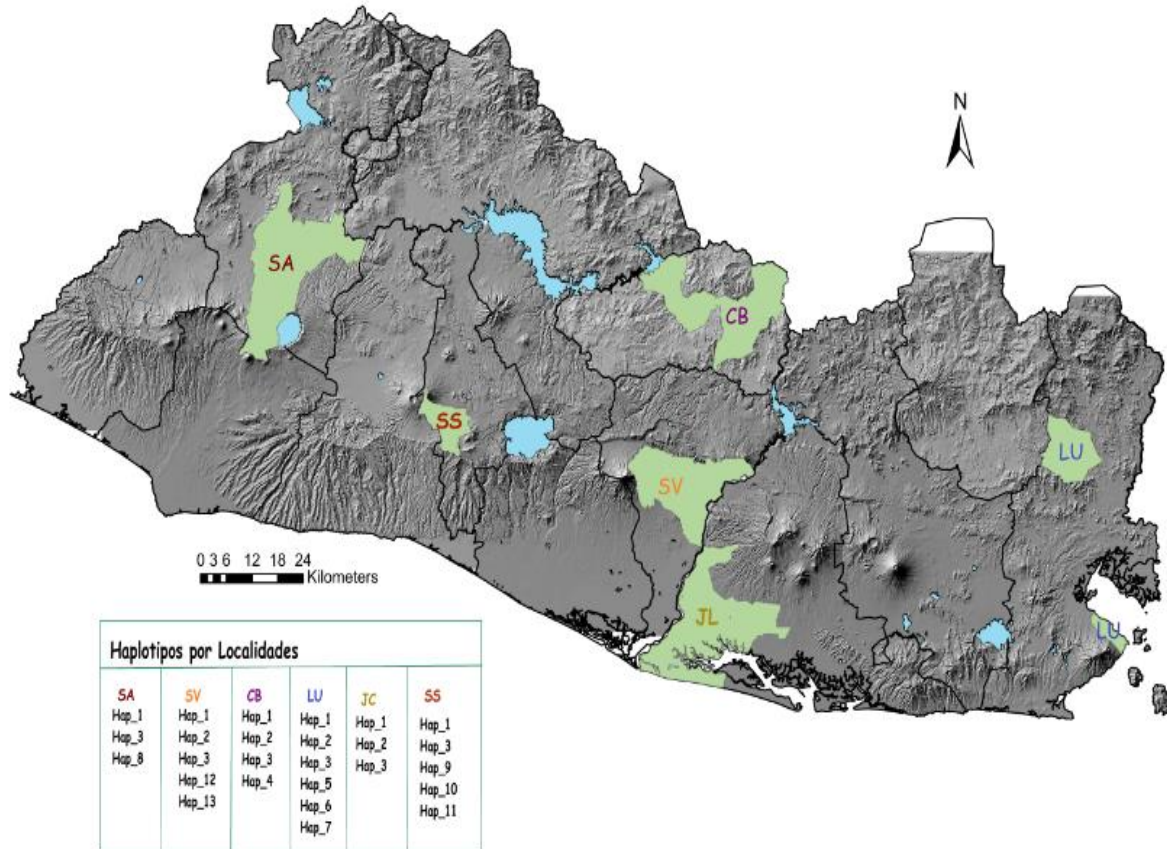
HAPLOTIPOS	SA	SV	CB	LU	JC	SS	#DE SECUENCIAS
1	13	7	5	3	4	2	34
2		1	1	1	1		4
3	4	1	1	2	9	3	20
4			2				2
5				2			2
6				1			1
7				1			1
8	1						1
9						2	2
10						2	2
11						1	1
12		2					2
13		1					1
TOTAL							73

Los haplotipos 1 y 3 presentan elevada frecuencia, seguidos del haplotipo 2 que aparece con una secuencia en 4 poblaciones y el resto de haplotipos son predominantemente privados.

8.6 DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS HAPLOTIPOS

Mapa elaborado en ArcGis con la división departamental donde también se señalan los sitios de estudio y los haplotipos reportados para cada departamento.

Figura 4.

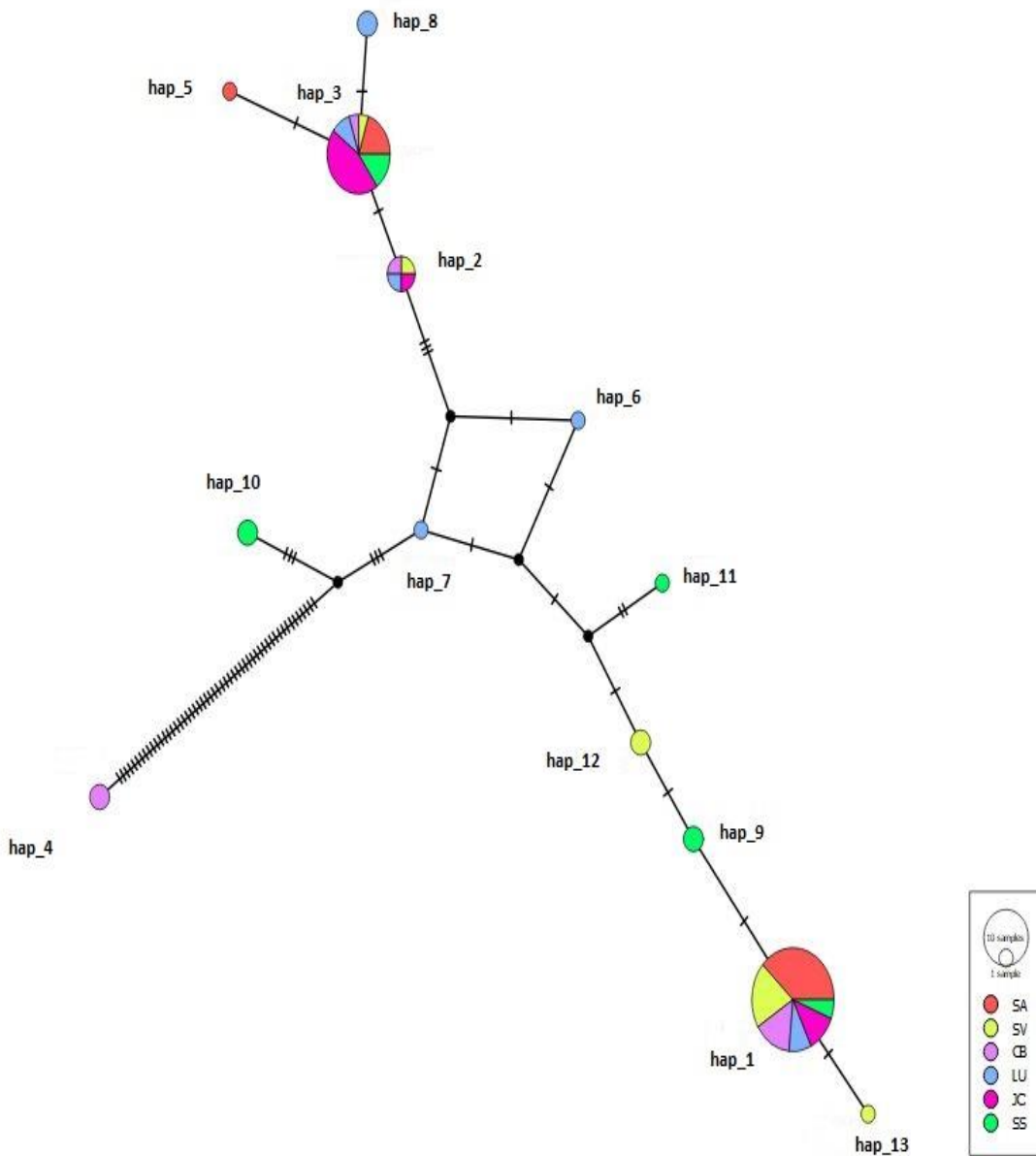


Los haplotipos 1 y 3 permanece fijos en las 7 localidades, 1 haplotipo fijo en 4 localidades, pero con menor número de secuencias y los 10 restantes que son privados

8.7 RED DE HAPLOTIPOS

Mapa elaborado en el programa Pop Art, donde se observan los haplotipos 1 y 3 que presentan la mayor frecuencia relativa y se consideran como ancestros evolutivos, el haplotipo 4 perteneciente a *Aedes albopictus* que fue usado como control indica la enorme distancia existente entre las dos especies.

Figura 5.



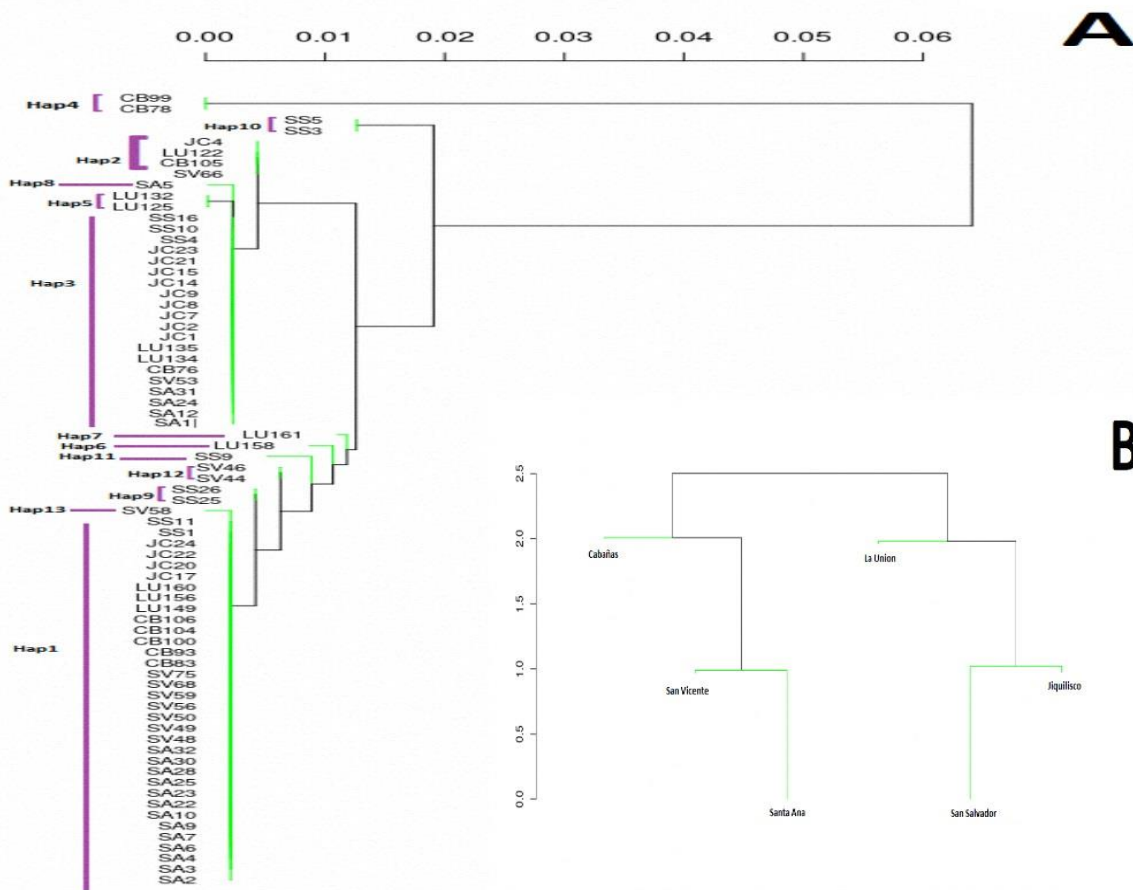
Los círculos más pequeños indica aquellos haplotipos que presentan menor frecuencia y aparecen privados en localidades específicas, la línea entre uno y otro señala los eventos mutacionales que les han ido distanciando genéticamente.

8.8 ARBOLES FILOGENETICOS

Mediante árboles filogenéticos se evaluaron las coincidencias y diferencias entre las poblaciones de organismos. Los árboles indican que cuantos más caracteres muestran en común dos organismos y están más cercanos dentro del árbol, presumiblemente están más unidos evolutivamente.

El árbol filogenético que se muestra en la figura 4, se obtuvo usando el software Archaeopterix de la suite Mafft. Pueden observarse, las secuencias control identificadas como *Aedes albopictus* y concuerda con el haplotipo 4 referenciado a esta misma especie en la figura 3. En las secuencias identificadas como *Aedes aegypti* se observan dos grupos genéticamente distintos.

Figura 6. ARBOL FILOGENETICO Y DISTANCIAS GENETICAS ENTRE POBLACIONES



3A. Árbol filogenético de secuencias basado el método de Neighbour Joining con sus relaciones haplotípicas y la dominancia de los haplotipos 1 y 3.

3B Árbol filogenético con las distancias poblacionales por localidades

7.9 HISTORIA DEMOGRAFICA

La Prueba genética poblacional Tajima o valor D se calculó en el software DNAsp, los valores obtenidos se especifican en la tabla 5.

Tabla 5. VALORES DE TAJIMA POR DEPARTAMENTO DE ESTUDIO

POBLACIONES	D
Santa Ana	1.32559
San Vicente	-0.24935
Cabañas	0.43494
La Unión	1.84318
Jiquilisco	1.61718
San Salvador	1.24574
Global	-1.42611

Los resultados negativos para la población de San Vicente contrastan con los de los otros 5 departamentos que fueron mayoritariamente positivos, el valor D global negativo representa el comportamiento global de las poblaciones que indica una tendencia a la expansión.

7.10 ESTRUCTURA GENETICA MEDIANTE PRUEBA AMOVA.

Con la prueba AMOVA se pudo determinar la variación molecular dentro de las poblaciones e identificar cuales se encuentran más diferenciadas, tal como se muestra en la tabla 6, los porcentajes de variación de los componentes de varianza indican mayor variabilidad dentro de las poblaciones que entre ellas.

Para determinar la interacción entre factores se ejecutó un análisis de diferenciación entre pares de localidades.

VALORES DE VARIANZA POBLACIONAL

Tabla 6.

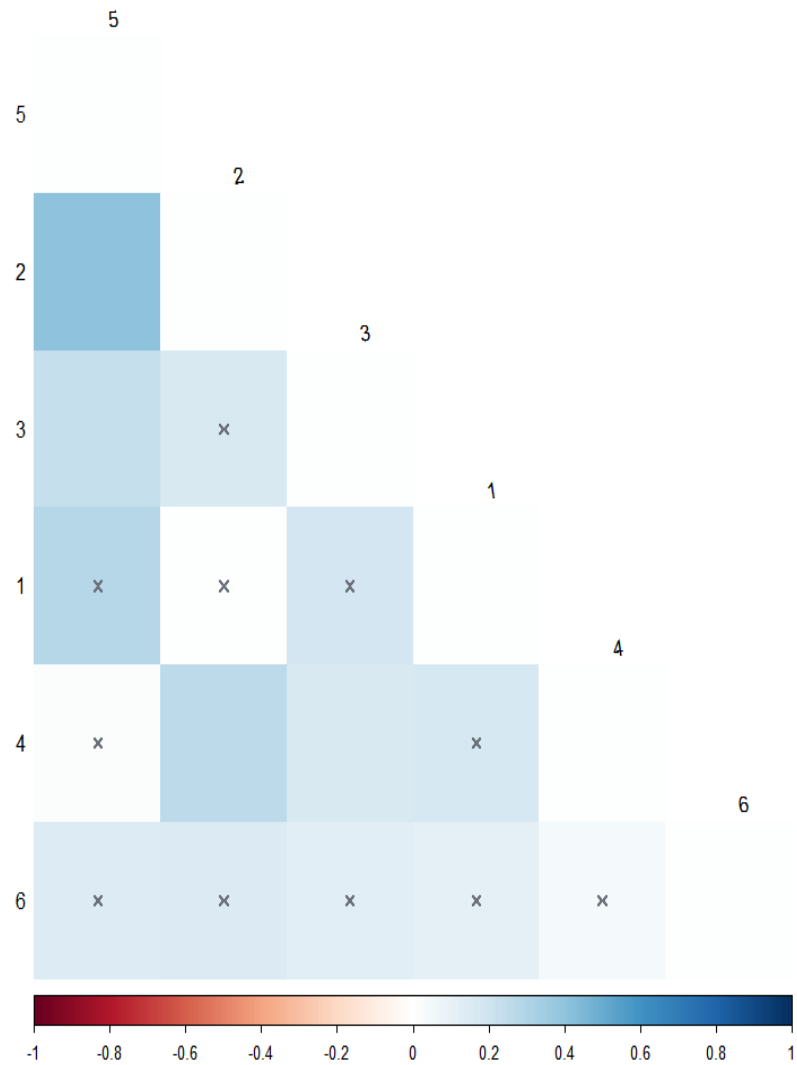
fuelle de variación	de Grados de libertad	de suma de cuadrados	de componentes de la varianza	de Porcentaje de la variación
entre poblaciones	140	104.590	0.72474	17.12014
dentro de las poblaciones	5	491.190	3.50850	82.87986
Total	145	595.781	4.23324	100

El porcentaje de la variación indica mayor porcentaje de diferenciación dentro de las poblaciones y menor porcentaje entre ellas.

7.11 MATRIZ DE LAS INTERACCIONES ENTRE POBLACIONES

Matriz de las interacciones entre poblaciones generada en el software R conformados por la partición de la matriz de distancia usados para calcular el Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA). En el eje X se define la escala de distancias y en el eje Y las 6 poblaciones en estudio (Figura 6). La letra *x* sobre las cuadrículas indican ausencia de significancia estadística y los colores más vivos señalan los valores *F_{ST}* más altos.

Figura 7.



*En la escala de distancias genéticas se muestran en color rojo los valores bajos de *F_{ST}* y en azul los valores altos de *F_{ST}* con una probabilidad: $p > 0.05$*

7.12 ÍNDICE DE FIJACIÓN FST

El índice de fijación F_{st} permite cuantificar la reducción de la heterocigocidad en una subpoblación debido a los cruzamientos NO al azar, con respecto a la población total, el rango es de 0 a 1, donde los valores de 0 a 0.05 indican una diferenciación pequeña, de 0.05 a 0.15 moderada, de 0.15 a 0.25 grande y >0.25 muy grande.

Las relaciones con mayor significancia estadística fueron entre las localidades de: Jiquilisco-San Vicente, Cabañas -Jiquilisco, La Unión -San Vicente, Cabañas-La Unión, con p valores menores a 0.05 (tabla 7).

Tabla 7. TABLA DE VALORES FST

FST	SA	SV	CB	LU	JC	SS
SA	0	0.09009	0.36937	0.1982	0.10811	0.17117
SV	0.00171	0	0.41441	0.03604*	0.01802*	0.05405
CB	0.18043	0.16559	0	0.04505*	0.01802*	0.08108
LU	0.17181	0.26618	0.16459	0	0.09009	0.08108
JC	0.28730	0.40135	0.23246	0.01350	0	0.47748
SS	0.11831	0.15997	0.12517	0.04762	0.14711	0

En esta tabla se correlaciona el índice de fijación F_{ST} y el valor de significancia .

IX DISCUSION

Se usó el ADN mitocondrial para determinar la variabilidad genética de *Aedes aegypti* en El Salvador, los resultados obtenidos reportan una baja variabilidad interpoblacional lo cual puede interpretarse como un elevado flujo de genes, cabe destacar que este vector se declaró erradicado de El Salvador en 1960 pero fue reintroducido en 1965 (Soper 1967) y en 1982 ocasiono una fuerte epidemia de Dengue (OPS 1989).

La presión por selección con insecticidas y el desarrollo de resistencia, son factores que interviene en la variabilidad genética del mosquito, puesto que, la presión por selección desencadena cambios genotípicos en las poblaciones (Ayala y Moreno, 2011). En este sentido, (Ocampo & Wesson 2004) señalan que, las campañas de control de vectores podrían constituir una de las principales causas de heterogeneidad en las poblaciones del mosquito, lo que no concuerda con la baja variabilidad genética encontrada en este estudio.

El alto flujo genético podría verse influenciado por la dispersión activa del vector, dado que las hembras grávidas de *Aedes aegypti* distribuyen sus huevos en varios sitios de oviposición y se han registrado distancias de 580 (45) y 840 metros (46), e incluso se ha demostrado que una hembra grávida puede volar hasta 3 km para encontrar un lugar adecuado donde depositar sus huevos (OPS1995, Montero 2009), de manera que tanto variables antropogénicas como ambientales y la propia dinámica ecológica del vector podrían favorecer el intercambio estable de genes entre poblaciones, puesto que, está demostrado que la migración de este vector en el mundo ha sido pasiva y estrechamente dependiente de la migración humana, lo cual exacerba el intercambio de genes entre poblaciones del mosquito (Nelson 1986), además, la intervención antropogénica en la ecología del vector, se manifiesta desde los criaderos, las operaciones comerciales entre territorios y de los medios de transporte empleados (Scarpassa et al 2008).

El flujo de genes se evidencia en los resultados de los valores F_{ST} cercanos a 0 que indican que las poblaciones son bastante homogéneas genéticamente, lo que concuerda con los resultados del valor P interpoblacional (tabla 7), y la topología de los arboles filogenéticos generados, donde se evidencia un intercambio de genes de forma estable. Sin embargo, se detectó una población con datos particulares. Los sitios polimórficos observados en la población de Cabañas están muy por encima de los valores de las otras 5 poblaciones (tabla 3), esto debido a que las dos secuencias control identificadas como *Aedes albopictus* se colectaron y se incluyeron en el clúster de dicha localidad, al ser una especie diferente a la del estudio los valores de sitios polimórficos se vieron sensiblemente afectados.

En este estudio se identificaron 13 haplotipos, un número mayor a los 10 haplotipos reportados en un estudio previo en El Salvador por (Joyce et al 2018), en Colombia se identificaron 10 haplotipos (Caldera et al 2013) y en Washington DC 8 haplotipos por (Gloria-Soria et al 2018), la frecuencia relativa de los haplotipos y la red de haplotipos generada, indica alta dominancia de los haplotipos 1 y 3 (figura 3), es posible que estos se reintrodujeran al país en la década de los años 60 y podrían considerarse como ancestros desde los cuales se han ido originando nuevos haplotipos que aparecen privados para otras poblaciones. En el caso de los departamentos de La Unión y San Salvador son las poblaciones que presentaron las cantidades más altas de haplotipos, 6 y 5

respectivamente, siendo haplotipos privados en su mayoría, esto se correlaciona con valores de diversidad genética altos observados en dichas poblaciones (tabla 3).

Llama la atención los valores para el departamento de La Unión, la localidad que mayor haplotipos presenta, los datos de diversidad particularmente altos, y los valores F_{ST} como significancia estadística en relación a otras poblaciones, los cuales podrían explicarse por la colecta de muestras que se realizó en dos ciudades del departamento, Santa Rosa de Lima y La Unión, así como las condiciones particulares de departamento fronterizo con alto flujo comercial, la presencia de un puerto y un ferrocarril que fue construido hace más de cien años, la actividad pesquera propia de esta zona costera son factores que podrían haber propiciado el transporte pasivo de huevecillos desde distintas regiones y por ende incorporar genes distintos al país

Los resultados de la prueba AMOVA, indican un bajo porcentaje de variación entre las poblaciones del 17.12% y un porcentaje alto de variación observada dentro de las poblaciones con 82.87% y los porcentajes son sensibles a la alta frecuencia de los haplotipos H1, H2 y H3; esto se ve reforzado por los valores de F_{ST} cercanos 0 que indican niveles bajos de diferenciación genética y sugieren la ausencia de linajes definidos en El Salvador, estos resultados contrastan con otros estudios realizados con ADNmt, puesto que la variabilidad genética de *Aedes aegypti* ha sido reportada en diferentes estudios para el continente americano, hay dos linajes mitocondriales de *Aedes aegypti* en las Américas, uno relacionado con haplotipos del oeste africano en Senegal y el otro con haplotipos de África oriental en Uganda y asiáticos (Bracco et al 2007), dichos linajes están en proceso evolutivo de diferenciación genética que se ve influenciado por factores climáticos, poblacionales, presión selectiva y patrones migratorios de las poblaciones (Caldera et al 2013). En Bolivia (Paupy et al 2012) identificaron dos linajes, uno dominante recuperado en todo el país y el segundo restringido a localidades rurales en el sur, mientras que (Costa da Silva et al 2005) correlacionaron la variabilidad genética de tres poblaciones de Perú y los resultados sugieren la introducción de al menos dos linajes de *Aedes Aegypti*. En las poblaciones del este de Argentina se obtuvo un haplotipo prevalente, también predominante en Brasil y Paraguay. La red de haplotipos construida a partir de distancias genéticas mostró tres grupos bien diferenciados. Dos de ellos exhibieron una distribución espacial bien definida y las poblaciones de estos grupos presentaron un patrón de aislamiento por distancia (Dueñas 2009), también esto pudo evidenciarse en Monterrey, México donde siete haplotipos mitocondriales fueron detectados en el análisis y filogenético y se identificó dos clados bien respaldados (Gorochotegui et al 2000).

Los valores mencionados para el caso salvadoreño son indicadores del elevado flujo genético el cual actúa como una fuerza que mantiene la cohesión entre las poblaciones de una especie (Piñero et al 2008), por ende, mientras más alto el flujo genético la variabilidad entre poblaciones disminuirá. Los resultados obtenidos, podrían considerarse como una estrategia adaptativa a la presión selectiva con insecticidas, donde las poblaciones tienden a la homogeneidad frente a un mismo estímulo de presión en un territorio geográfico reducido y bien interconectado, lo que estaría en concordancia con el valor de $Tajima$ global negativo (-1.42) que indica que la población de *Aedes aegypti* en El Salvador se encuentra en franca expansión debido a un reciente cuello de botella posiblemente vinculado a la presión por selección, esto además, podría explicar el elevado número de haplotipos privados (tabla 3) como un posible indicador de una abundancia alélica rara, lo que está directamente vinculado con la pérdida de genes y un D de $Tajima$ negativo, indicando a una disminución de la variabilidad genética entre las poblaciones.

Los valores obtenidos para prueba de $Tajima$ permiten detectar procesos que afectaron a la muestra en el pasado; por ejemplo, cambios en el tamaño de la población, estructuración poblacional,

selección natural y recombinación de genes (Piñero 2008). En este sentido, el valor negativo de Tajima encontrado y los bajos valores de F_{ST} también confirman la presencia de flujo genético entre las poblaciones, donde todos los individuos tienen altas probabilidades de cruzarse de forma aleatoria y por ende sus genes pueden migrar de una población a otra. Estos resultados explican la baja variabilidad encontrada y sugieren que para la población de *Aedes. aegypti* en El Salvador no se generan islas genéticas.

En el caso particular de San Vicente puede observarse en los resultados de la prueba Tajima, con valores negativos, indicando que esta población está en una reciente expansión poblacional (Tajima, 1989) (Fu, 1997) (de Brito et al 2002) indicando un proceso de fijación de nuevos alelos. Esta población pudo haber atravesado un cuello de botella recientemente viéndose afectada debido a fumigaciones o abatizaciones, o bien por cambios en la disposición de criaderos, de temperatura y pluviosidad en la zona.

X CONCLUSIONES

- El marcador molecular CO1 fue útil para la identificación taxonómica de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.
- Los indicadores de diversidad genética arrojan dos poblaciones con valores considerables, siendo San Salvador con 16 sitios polimórficos, 5 haplotipos y una diversidad haplotípica de 0.86667 y La Unión con 11 sitios polimórficos 6 haplotipos y diversidad haplotípica de 0.88889 las localidades que mayor riqueza génica presentan.
- La red de haplotipos generada usando indica la predominancia de dos haplotipos (1 y 2) que adoptan posiciones como haplotipos ancestros.
- Los análisis filogenéticos indican la presencia de flujo genético entre las poblaciones y dos grupos genéticamente distintos entre las localidades estudiadas.
- Los valores obtenidos para el análisis de historia demográfica indican que las poblaciones pasaron recientemente por un cuello de botella y se encuentran en un proceso de expansión demográfica.
- Los análisis moleculares de la varianza (AMOVA) arrojan valores que indican mayor variabilidad dentro de las poblaciones (17.12%) que entre ellas (82.87%).
- Los valores de FST que resultaron con significancia estadística señalan a La Unión como una localidad genéticamente distinta, esto se ve reforzada por la cantidad de haplotipos privados, así como su diversidad haplotípica refuerzan.
- La baja variabilidad genética en el fragmento co1 de las poblaciones evaluadas no sugieren un obstáculo para las estrategias de control vectorial de *Aedes aegypti*, por lo que las diferencias en los resultados de estrategias de control vectorial no deberían verse afectadas por la variabilidad genética

XI RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer estudios de variabilidad genética con otros marcadores moleculares.
- Realizar estudios genéticos con colectas de temporada seca y temporada lluviosa para determinar la variabilidad genética de acuerdo al clima.
- Desarrollar estudios genéticos tomando en cuenta sitios con altos índices epidemiológicos y bajos índices epidemiológicos que permitan correlacionar la transmisión vectorial con la variabilidad genética.
- Realizar estudios donde se incluyan marcadores moleculares y marcadores fisiológicos para correlacionar la diversidad genética con la resistencia a tratamientos químicos.
- Realizar estudios morfométrico y correlacionar los resultados con la variación genética.

XII BIBLIOGRAFIA

- Ayala, F. J., y Kiger, J. A. (1984). *Genética moderna*. Omega. Barcelona.
- Ayala, R., y Moreno, M. (2011). Resistencia al temefos por presión de selección en una población de *Aedes aegypti* de El Salvador. 2(1): 1-9.
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review).
- Avise, J. C., y Hamrick, J. L. (1996). *Conservation genetics: case histories from nature*. Chapman & Hal.
- Boletín Epidemiológico Semanal, Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud, disponible en: <https://www.salud.gob.sv/boletines-epidemiologicos/>
- Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-De-Oliveira R and Mureb MA. (2007). Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Oswaldo Cruz*.102 (5):573-80.
- Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, Zhao H, Caccone A, Powell JR. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*. 2014;68:514–525. doi: 10.1111/evo.12281.
- Bruno c., Videla m.e., Balzarini m. 2019. test of interaction in the analysis of molecular variance. *bag. journal of basic and applied genetics xxx* (1): 17-23.
- Bennett KL, Shida F, Linton YM, Misinzo G, Kaddumukasa M, Djouaka R, et al 2016. Historical environmental change in Africa drives divergence and admixture of *Aedes aegypti* mosquitoes: a precursor to successful worldwide colonization? *Mol Ecol.*; 25:4337–5.
- Caldera SM, Jaramillo MC, Cochero S, Pérez-Doria A, Bejarano EE, 2013. Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica.*;33:8.
- Campos, M., Spenassatto, C., Lourdes da Graça Macoris, M., Paduan, K. D. S., Pinto, J., y Ribolla, P. E. M. (2012). Seasonal population dynamics and the genetic structure of the mosquito vector *Aedes aegypti* in Sao Paulo, Brazil. *Ecology and evolution*, 2(11), 2794-2802.

- Cáceres y León 2007; Variantes genéticas de *Aedes aegypti* y su asociación con el serotipo del virus dengue en un área endémica del Perú, Ministerio de Salud instituto nacional de salud centro de información y documentación científica.
- Clemens, AN. *The Biology of Mosquitoes. Vol. 1: Development, Nutrition and Reproduction.* Chapman and Hall; London: 1992.
- da Costa da Silva AL, Capurro ML, Bracco JE. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:539–44.
- Dueñas J.C., G. Albrieu Llinás, G. M. Panzetta-Dutari, 2009, and C. N. Gardenal Source: *Journal of Medical Entomology*, 46(6):1344-1354.. Published By: Entomological Society Two Different Routes of Colonization of *Aedes aegypti* in Argentina from Neighboring Countries of America DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0613> URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1603/033.046.0613>
- de Brito, R. A., Manfrin, M. H., & Sene, F. M. (2002). Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. www.sbg.org.
- Edman JD, Scott TW, Costero A, Morrison AC, Harrington LC, Clark GG, 1998. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. *J Med Entomol* 35: 578–583.
- Fernández, I.S. (2009). *Biología y Control de Aedes aegypti: Manual de Operaciones.* Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Futuyma, D. (1986). *Evolutionary Biology.* Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 223-231 pp.
- Franckham, R., Ballou, J.D., y Briscoe, D.A. (2009). *Introduction to Conservation Genetics.* Cambridge University Press. Cambridge, UK
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. <https://academic.oup.com/genetics/article/147/2/915/6054139>.
- Galtier, N., Depaulis, F., & Barton, N. H. (2000). Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. *Genetics*, 155(2), 981-987.
- Gloria-Soria A, Ayala D, Bheecarry A, Calderon-Arguedas O, Chadee DD, Chiappero M, et al. Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Mol Ecol.* 2016; 25:5377–95.

- Gloria-Soria A, Lima A, Lovin DD, Cunningham JM, Severson DW, Powell JR. Origin of a high-latitude population of *Aedes aegypti* in Washington DC. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98:445–52.
- Gonzalez, E.A. (2011). Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *ilex perado ssp. Lopezlilloi* (aquifoliaceae), *silene nocteolens* (caryophyllaceae) y *sorbus aria* (rosaceae). Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas De Gran Canaria.
- Gorrochotegui-Escalante N, Munoz MDL, Fernandez-Salas I, Beaty BJ, Black WC. 2000, Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeast coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* ;62:200–9.
Medina
- Herrera F, Urdaneta L, Rivero J, Zoghbi J, Ruiz J, Carrasquel G, et al. Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:625–33.
- López - Zavala, Rigoberto Marcadores Genéticos, su detección y utilización como herramienta de selección en el ganado bovino ¿Qué es lo que se está haciendo en Tamaulipas? *CienciaUAT*, vol. 4, núm. 4, abril-junio, 2010, pp. 44-49 Universidad Autónoma de Tamaulipas Ciudad Victoria, México.
- Monteiro FA, Shama R, Martins A, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following and eradication program. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(9):e3167. [PubMed: 25233218].
- Montero 2009. Biología de *Aedes aegypti* Blog FCA, UNR, 11.09. www.produccion-animal.com.ar.
- Nelson, Michael. Biology and ecology of *aedes aegypti*, Pan American Health Organization 1986
- Nuez, F. y Carrillo, J.M. (2000). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Ocampo, C. B.; Wesson, D. M. (2004). Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(4), 506–513. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.506>.
- OMS 2016, Preparación y respuesta integrada en El Salvador para la prevención y control de la epidemia de Zika, Dengue y Chikungunya entre noviembre de 2015 a julio de 2016, Boletín Informativo OPS/OMS El Salvador, No. 1, Agosto de 2016.
- OMS 2020, Enfermedades transmitidas por vectores, pagina consultada el 1 de mayo de 2022: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases#:~:text=Los%20vectores%20son%20organismos%20vivos,o%20de%20animales%20a%20personas>.
- OPS 1989, dengue en las Americas 1980-1987, Boletín epidemiológico, organización Panamericana de la Salud, ISSN 0255-6669 Vol. 10, No. 1, 198.
- OPS 2019, Prevención y control del dengue durante la pandemia de COVID-19, Organización Panamericana de la Salud.

- Orell, M., Lahti, K., Koivula, K., & WELLING, P. (1999). Immigration and gene flow in a northern willow tit (*Parus montanus*) population. *J. Evol. Biol.*, 1(2), 283-295.
- Paupy 2012, Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revolla J, Barja Simon Z, et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infect Genet Evol.* 2012;12:1260–9.
- Picca, A., Helguera, M., Solomón, N., y Carrera, A. (2002). Marcadores Moleculares. En: Echenique, V.; Rubinstein, C. y L. Mroginski (eds.). *Biocnología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina, pp. 61-68.
- Paiz y Huete 2008, DNA Barcode, una alternativa para identificar especies del Complejo Midas Cichlidae en Nicaragua, Centro de Biología Molecular, Universidad Centroamericana <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i81.3630>.
- Piñero, D., et al. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 437-494.
- Pratt, H.D., R.F. Darsie.: & Litting. (1976). Mosquitoes of public health importance and their control. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta Georgia. p 1.
- Sanger, F.; Nikelen, S. y A.R. Coulson 1977 DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467
- Salvatella 1996, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Scarpassa, V. M., Cardoza, T. B., & Cardoso Junior, R. P. (2008). Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6), 895–903.
- Soper FL. *Aedes aegypti* and yellow fever. *Bull World Health Organ.* 1967;36:521–7.
- Sosa, P.A. 2008 Genetic Diversity and Differentiation of Both Natural Populations of *Bencomia exstipulata* and *B. caudata* (Rosaceae): a Comparative Analysis of Species with Different Conservation Status. *Conservation Genetics* .
- Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure, en L.A. Real (ed.), *Ecological genetics*, Princeton University Press, Princeton, pp. 3-18.
- Rodhain, F., y Rosen, L. (1997). Mosquito vector and dengue virus-vector relationships. *Unité d'Ecologie des Systèmes Vectoriel*, Institut Pasteur. France. 45-60 pp.
- Tabachnick WJ, Powell JR, 1979. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genet Res* 34: 215–229.
- Tabachnick WJ, 1991. The yellow fever mosquito: evolutionary genetics and arthropod-borne disease. *Am Entomol* 37: 14– 24.

- Tajima, F. (1989). *Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism*.
- Wright S., 1965, The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating Source: *Evolution*, Vol. 19, No. 3 pp. 395-420 Published by: Society for the Study of Evolution Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2406450>

XIII ANEXOS

ANEXO 1: Base de datos georreferenciados de los individuos utilizados en este estudio.

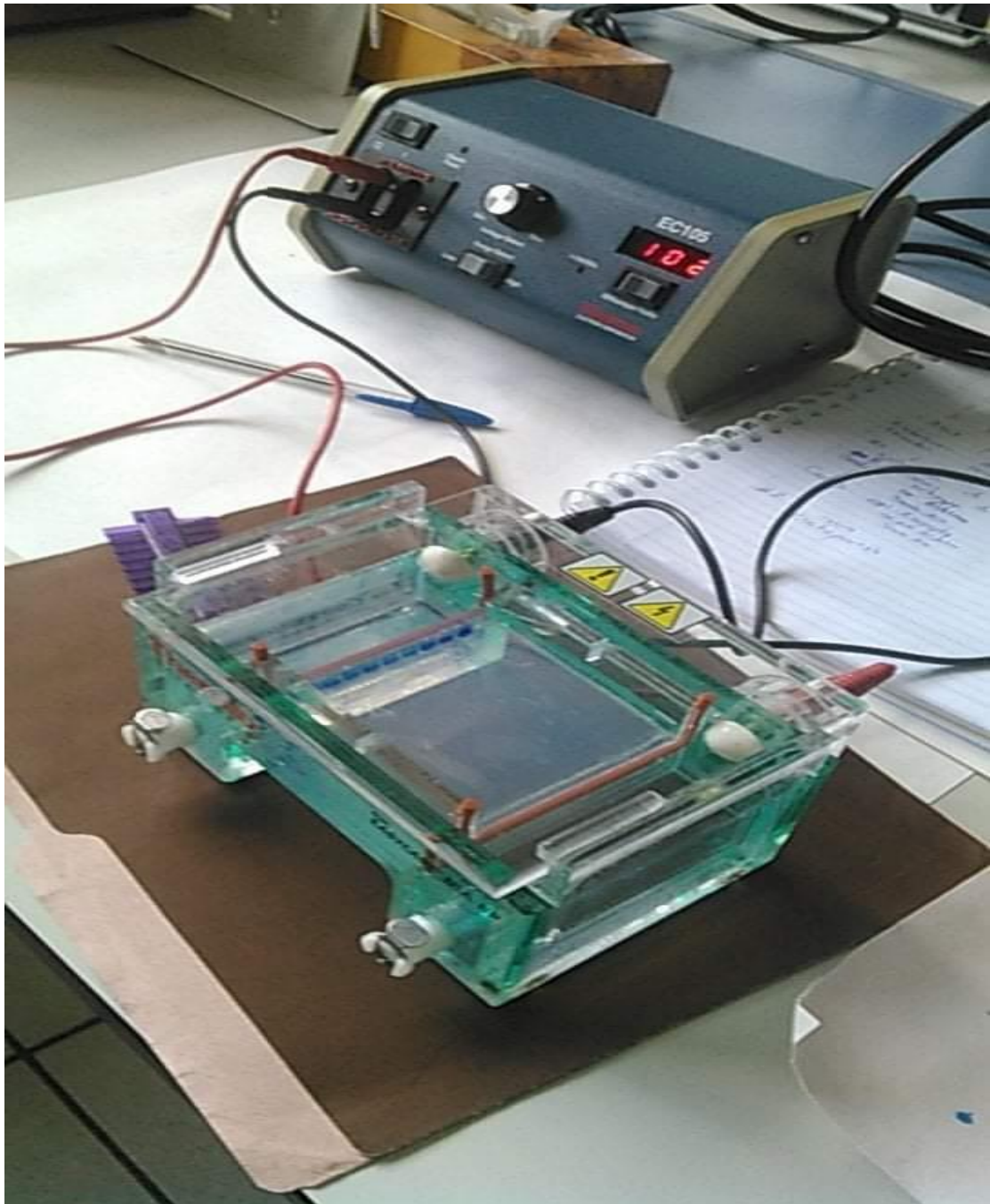
MUNICIPIO	COL./CTON	CASERIO	FECHA DE CC	CODIGO	NO.EPPEND	SECUENCIA	latitud N	longitud W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.1		1 SA 1	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.2		2 SA 2	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.3		3 SA 3	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.4		4 SA 4	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.5		5 SA 5	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.6		6 SA 6	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.7		7 SA 7	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.9		9 SA 9	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.10		10 SA 10	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.Altos del palmar		5-12-2018	2.02.10.00.12		12 SA 12	13°58'06" N	89°3'27" W
Santa Ana	Col.El Palma Pje.Bolivia		12-12-2018	2.02.10.00.22		22 SA 22	13°58'42" N	89°34'00" W
Santa Ana	Col.El Palma Pje.Bolivia		12-12-2018	2.02.10.00.23		23 SA 23	13°58'42" N	89°34'00" W
Santa Ana	Col.El Palma Pje.Bolivia		12-12-2018	2.02.10.00.24		24 SA 24	13°58'42" N	89°34'00" W
Santa Ana	Col.El Palma Pje.Bolivia		12-12-2018	2.02.10.00.25		25 SA 25	13°58'42" N	89°34'00" W
Santa Ana	Col.El Palma Pje.Bolivia		12-12-2018	2.02.10.00.28		28 SA 28	13°58'42" N	89°34'00" W
Santa Ana	Col.El Palma Calle.37		12-12-2018	2.02.10.00.30		30 SA 30	13°58'42" N	89°34'00" W
Santa Ana	Cton.El Ranchador		5-12-2018	2.02.10.00.31		31 SA 31	14°00'54" N	89°36'27" W
Santa Ana	Cton.El Ranchador		5-12-2018	2.02.10.00.32		32 SA 32	14°00'54" N	89°36'27" W
San Vicente	Cton.Rio Frio		19-3-2019	2.10.10.22.44		44 SV 44	13°36'12" W	88°36'12" W
San Vicente	Cton.Rio Frio		20/03/19	2.10.10.22.46		46 SV 46	13°36'12" W	88°36'12" W
San Vicente	Cton.Rio Frio		20/03/19	2.10.10.22.48		48 SV 48	13°36'12" W	88°36'12" W
San Vicente	Cton.Rio Frio		20/03/19	2.10.10.22.49		49 SV 49	13°36'12" W	88°36'12" W
San Vicente	Cton.Rio Frio		20/03/19	2.10.10.22.50		50 SV 50	13°36'12" W	88°36'12" W
San Vicente	Crio.Valle Nuevo, san Fra		21-3-2019	2.10.10.02.53		53 SV 53	13°36'12" W	88°39'33" W
San Vicente	Crio.Valle Nuevo, san Fra		21-3-2019	2.10.10.02.56		56 SV 56	13°36'12" W	88°39'33" W
San Vicente	Crio.Valle Nuevo, san Fra		21-3-2019	2.10.10.02.58		58 SV 58	13°36'12" W	88°39'33" W
San Vicente	Crio.Junquillal,San Francis		21-3-2019	2.10.10.02.59		59 SV 59	13°36'11" W	88°38'06" W
San Vicente	Crio.Junquillal,San Francis		22-3-2019	2.10.10.02.66		66 SV 66	13°36'11" W	88°38'06" W
San Vicente	Crio.La Galera,San Francis		22-3-2019	2.10.10.02.68		68 SV 68	13°36'11" W	88°38'06" W
San Vicente	Crio.La Galera,San Francis		22-3-2019	2.10.10.02.75		75 SV 75	13°36'11" W	88°38'06" W
Sensuntepeque	parque Cabañas		19/3/2019	2.09.6.00.76		76 CB 76	13°52'48" N	88°37'46" W
Sensuntepeque	parque Cabañas		19/03/19	2.09.6.00.78		78 CB 78	13°52'48" N	88°37'46" W
Sensuntepeque	Parque Cabañas		19-3-2019	2.09.6.00.83		83 CB 83	13°52'48" N	88°37'46" W
Sensuntepeque	Col.Palestina		22-3-2019	2.09.6.00.93		93 CB 93	13°52'27" N	88°37'36" W
Sensuntepeque	Col.Quintero		22-3-2019	2.09.6.00.99		99 CB 99	13°53'06" N	88°37'50" W
Sensuntepeque	Col.Quintero		22-3-2019	2.09.6.00.100		100 CB 100	13°53'06" N	88°37'50" W
Sensuntepeque	Col.Quintero		26-3-2019	2.09.6.00.104		104 CB 104	13°53'06" N	88°37'50" W
Sensuntepeque	Col.Quintero		26-3-2019	2.09.6.00.105		105 CB 105	13°53'06" N	88°37'50" W
Sensuntepeque	Col.Quintero		26/3/2019	2.09.6.00.106		106 CB 106	13°53'06" N	88°37'50" W
La Unión	B.San Antonio		8-3-2019	2.14.08.00.122		122 LU 122	13°20'08" N	87°50'58" W
La Unión	B.Concepcion		8-3-2019	2.14.08.00.125		125 LU 125	13°20'08" N	87°50'58" W
La Unión	B.Concepcion		8-3-2019	2.14.08.00.132		132 LU 132	13°20'08" N	87°50'58" W
La Unión	Col. Beltran		13-3-2019	2.14.08.00.134		134 LU 134	13°20'00" N	87°50'52" W
La Unión	Col. Beltran		13-3-2019	2.14.08.00.135		135 LU 135	13°20'00" N	87°50'52" W
La Unión	SRL,C.altos del estadio		15-3-2019	2.14.08.00.149		149 LU 149	13°38'01" N	87°53'26" W
La Unión	SRL,C.altos del estadio		13-3-2019	2.14.08.00.156		156 LU 156	13°38'01" N	87°53'26" W
La Unión	SRL,B.Las Delicias		14-32019	2.14.08.00.158		158 LU 158	13°37'53" N	87°53'03" W
La Unión	SRL,B.Las Delicias		14-32019	2.14.08.00.160		160 LU 160	13°37'53" N	87°53'03" W
La Unión	SRL,B.Las Delicias		14-32019	2.14.08.00.161		161 LU 161	13°37'53" N	87°53'03" W
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC1	13°19'33.88" N	-88°34'18.50" W
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC2	13°19'32.11" N	-88°34'16.48" W
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC4	13°19'32.11" N	-88°34'16.48" W
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC7	13°20'8.87" N	-88°34'21.86" W
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC8	13°20'8.87" N	-88°34'21.86" W
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC9	13°20'8.87" N	-88°34'21.86" W
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC14	13°19'37.89" N	88°34'12.80" E
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC15	13°19'37.89" N	88°34'12.80" E
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC17	13°19'37.89" N	88°34'12.80" E
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC20	13°19'37.51" N	88°34'6.99" E
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC21	13°19'37.54" N	88°34'6.96" E
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC22	13°19'37.54" N	88°34'6.96" E
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC23	13°19'37.54" N	88°34'6.96" E
Jiquilisco	Las flores		5/6/2014			JC24	13°19'37.54" N	88°34'6.96" E
San Salvador	La fosa		9/5/2014			SS1	13°43'14.42" N	89°11'55.67" E
San Salvador	La fosa		9/5/2014			SS3	13°43'14.42" N	89°11'55.67" E
San Salvador	La fosa		9/5/2014			SS4	13°43'14.70" N	89°11'56.97" E
San Salvador	La fosa		9/5/2014			SS5	13°43'14.70" N	89°11'56.97" E
San Salvador	La fosa		9/5/2014			SS9	13°43'14.87" N	89°11'55.42" E
San Salvador	La fosa		9/5/2014			SS10	13°43'13.69" N	89°11'56.24" E
San Salvador	La fosa		9/5/2014			SS11	13°43'13.69" N	89°11'56.24" E
San Salvador	La fosa		9/5/2014			SS16	13°43'14.03" N	89°11'52.76" E
San Salvador	San Jacinto		16/5/2014			SS25	13°41'3.32" N	89°10'48.41" E
San Salvador	San Jacinto		16/5/2014			SS26	13°41'3.32" N	89°10'48.41" E



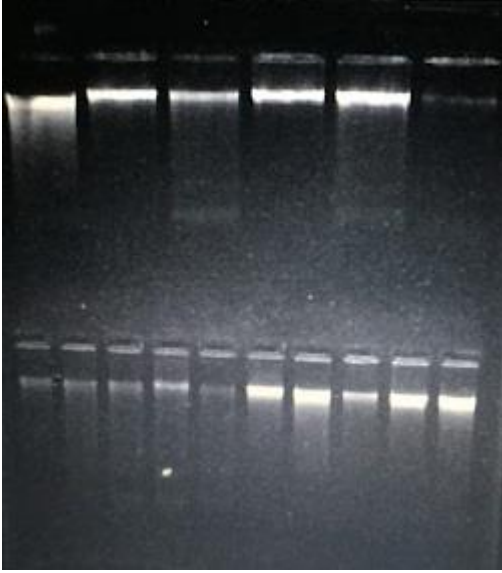
Anexo 2: Colecta de larvas de *Aedes aegypti* en Col. Beltran, La Union.



Anexo 3:Extracción de ADN mitocondrial en el laboratorio de biología celular y molecular de la escuela de biología.



Anexo 4: Cuantificación del ADN extraído mediante electroforesis.



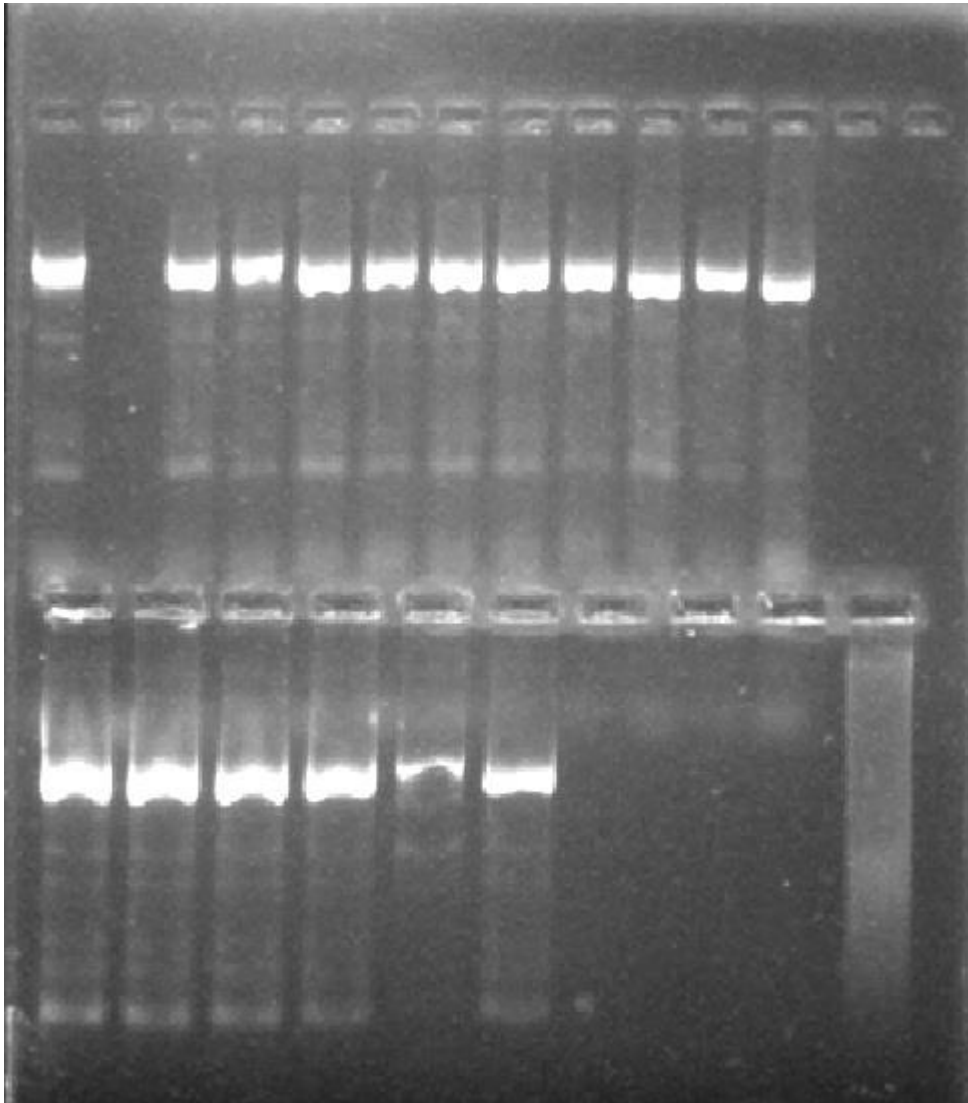
anexo 5: bandas de ADN vistas al transiluminador ultravioleta



Anexo 6: Amplificación del fragmento CO1 en el laboratorio de biología celular y molecular de la escuela de biología.



Anexo 7: Termociclador durante la amplificación del fragmento CO1.



Anexo 8: Visualización de los fragmentos CO1 amplificados en un transiluminador ultravioleta.