

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Estudio piloto de la variación genética del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en el Ecuador, vector principal del virus del dengue y del virus del chikungunya**

**Proyecto de investigación**

**María Daniela Zúñiga Ballesteros**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de  
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 11 de diciembre de 2015

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE CALIFACION  
DE TRABAJO DE TITULACION**

**Estudio piloto de la variación genética del mosquito *Aedes aegypti* (Diptera:  
*Culicidae*) en el Ecuador, vector principal del virus del dengue y del virus del  
chikungunya**

**María Daniela Zúñiga Ballesteros**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Renato León, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 11 de diciembre de 2015

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: .....

Nombres y Apellidos: María Daniela Zúñiga Ballesteros

Código: 25222

Cédula de Identidad: 080247228-2

Lugar y Fecha: Quito, diciembre de 2015

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Jaime Rubio Hervás por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y amigos por ser un pilar en mi vida y darme fuerzas para superar cualquier obstáculo.

A Jaime Chaves, Venancio Arahana, Jhonnattan Valdes por la paciencia a lo largo del desarrollo de este trabajo y los conocimientos impartidos.

Finalmente, a Renato León por su apoyo incondicional y guía al inicio de mi vida profesional.

## RESUMEN

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de los virus del dengue y chikungunya que son la causa de alta morbilidad y mortalidad en los trópicos y subtrópicos a nivel mundial. En el Ecuador, el programa de control de vectores comienza en 1946, y en 1958, el país es declarado libre del *Aedes aegypti* por la Organización Panamericana de la Salud. Sin embargo, se reporta la re-introducción del vector en 1977 y seguidamente la re emergencia de la fiebre del dengue que es actualmente endémica en el país con circulación de los 4 serotipos. En el Ecuador, el chikungunya se reporta hacia finales del 2014 y ahora ambas enfermedades arbovirales son prioridades de salud pública.

En este estudio se analizó la variabilidad genética del *Aedes aegypti* de muestras de cinco localidades provenientes de 4 provincias del Ecuador: Esmeraldas, Guayas, El Oro y Galápagos (Santa Cruz y San Cristóbal) utilizando un fragmento del gen mitocondrial ND4. El objetivo fue determinar si existe estructura genética en las poblaciones de mosquitos estudiadas, y si esta variación está asociada a la distancia geográfica. La diversidad de nucleótidos encontrada en este reporte fue de 0.01141, sin embargo, solo se encontraron 2 haplotipos provenientes de dos linajes diferentes en el territorio ecuatoriano, y separados por 16 cambios mutacionales. La alta diversidad nucleotídica en conjunto con la baja cantidad de haplotipos encontrados sugiere una colonización reciente o introducción de mosquitos provenientes de distintos linajes. Por otro lado, la similitud génica entre las agrupaciones (Poblaciones continentales vs. Poblaciones insulares) sugieren múltiples introducciones de mosquitos, además de alto flujo génico poblacional.

## ABSTRACT

The *Aedes aegypti* mosquito is the primary vector of dengue and chikungunya viruses that cause high morbidity and mortality in the tropics and subtropics worldwide. In Ecuador, the vector control program begins in 1946, and in 1958, the country was declared free of *Aedes aegypti* by the Pan American Health Organization. However, the re-introduction of the vector is reported in 1977 with the subsequent re-emergence of dengue fever, which is currently endemic in the country with the circulation of all 4 serotypes. In Ecuador, Chikungunya is reported for the first time at the end of 2014 and now both arboviral diseases are priorities for public health.

In this study the genetic variability of *Aedes aegypti* was analyzed from five locations in 4 provinces of Ecuador: Esmeraldas, Guayas, El Oro and Galapagos (Santa Cruz and San Cristobal) using a fragment of the mitochondrial ND4 gene. The objective of the study was to determine the genetic structure of the mosquito populations sampled, and if variation is associated with geographic distance. The nucleotide diversity found in this report was 0.01141, however, only two haplotypes coming from two different lineages were found in the localities sampled. The two haplotypes are separated by 16 mutational changes. The high nucleotide diversity together with the low number of haplotypes found suggest recent colonization or the introduction of mosquitoes from different lineages. Furthermore, gene similarities between clusters (continental vs. island populations) suggest multiple introductions of the mosquito and also high gene flow.

## TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN .....	10
1.1.	Antecedentes y origen del <i>Aedes aegypti</i> .....	10
1.1.1	Biología y Ciclo de vida .....	11
1.2.	El <i>Aedes aegypti</i> como vector de arbovirus .....	12
1.2.1.	Fiebre del dengue .....	13
1.2.2.	Fiebre del Chikungunya .....	14
1.3.	Situación en el Ecuador .....	15
1.4.	Variación Genética del <i>Aedes aegypti</i> .....	17
2	JUSTIFICACIÓN .....	21
3	ÁREA DE ESTUDIO .....	22
4	OBJETIVOS .....	20
4.1	Objetivo General .....	20
4.2	Objetivos Específicos .....	20
5	MATERIALES .....	23
5.1	Colección y separación de especímenes .....	23
5.2	Identificación de especímenes .....	23
5.3	Extracción de ADN: .....	23
5.4	Amplificación de ADN: .....	24
5.5	Electroforesis en gel de agarosa: .....	24
5.6	Secuenciamiento .....	25
5.7	Análisis filogenético .....	25
6	MÉTODOS .....	26
6.1	Colección Entomológica .....	26
6.1.1	Aspiradores Entomológicos .....	26
6.1.2	Colectas de larvas .....	27
6.2	Identificación de especímenes .....	27
6.3	Análisis Molecular .....	27
6.3.1	Extracción de ADN .....	27
6.3.2	Amplificación de ADN .....	28
6.3.3	Electroforesis en gel de agarosa .....	29
6.3.4	Secuenciamiento .....	29

6.3.5	Análisis estadístico .....	30
7	RESULTADOS.....	32
7.1	Diversidad de haplotipos (H) y diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) de las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> .....	32
7.2	Pruebas de neutralidad .....	32
7.3	Análisis de AMOVA.....	33
7.4	Construcción de árbol filogenético por medio de inferencia Bayesiana .....	33
7.5	Red de haplotipos parsimónico.....	33
8	DISCUSIÓN.....	35
8.1	Diversidad de haplotipos ( $H \pm SD$ ) y diversidad de nucleótidos ( $\pi \pm SD$ ) de las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> .....	36
8.2	Pruebas de neutralidad .....	37
8.3	Análisis de AMOVA.....	38
8.4	Construcción de árbol por medio de inferencia Bayesiana y Red de haplotipos parsimónico 40	
9	CONCLUSIONES .....	42
10	RECOMENDACIONES .....	43
11	Referencias Bibliográficas .....	45
12	ANEXOS.....	55
	Anexo 1.- .....	55
13	TABLAS.....	58
14	GRAFICOS: .....	65

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes y origen del *Aedes aegypti*

El mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) es una especie ampliamente distribuida a nivel mundial especialmente en los trópicos y es vector principal de varias enfermedades prioritarias para la salud pública como el dengue, el chikungunya y el virus del zika.

Esta especie es altamente antropofílica, es decir, tiene predilección por alimentarse de sangre humana y habita casi exclusivamente en ambientes urbanos o periurbanos en la actualidad. Este mosquito pertenece a la familia *Culicidae*, a la tribu *Culicini*, al género *Aedes* y al subgénero *Stegomyia* (Christophers, 1961; Thirion Icaza, 2003). A este culícido se lo conoce vulgarmente como el “mosquito de la fiebre amarilla”, enfermedad que durante siglos ha causado una alta mortandad en los continentes: americano, africano y asiático (Thirion Icaza, 2003).

El *Ae. aegypti* se caracteriza por vivir cerca del hombre, sea dentro de los domicilios o en el peridomicilio, en donde son exclusivamente las hembras las que son hematófagas (se alimentan de sangre) y se constituyen como vectores para la transmisión de patógenos. Diversas evidencias sugieren que el proceso de acercamiento de esta especie a zonas urbanas se remonta a su origen en la región etiópica y del SubSahara en el África (Chadee, Ward & Novak, 1998; Powell & Tabachnick, 2013). En un principio, los hábitats naturales en zonas selváticas eran agujeros llenos de agua, bromelias, hendiduras en las rocas en donde se podía almacenar agua de lluvia y otros recipientes de agua naturales. Se cree que esta especie se propagó gradualmente desde estos hábitats selváticos a entornos urbanos en el norte de África o en el cercano Oriente (Urdaneta-Marquez & Failloux, 2011). Desde ahí,

probablemente invadió otros continentes al ser transportada, accidentalmente, a través del transporte fluvial que salía desde los puertos africanos. Las actividades comerciales, así como el comercio de esclavos africanos en los siglos 15-19, seguramente introdujeron al vector *Ae. aegypti* en zonas tropicales y subtropicales del Nuevo Mundo (Ballinger-Crabtree, Black IV & Miller, 1992). En la actualidad, el *Ae. aegypti*, salvo contadas excepciones, tiende a asociarse a habitats intra y peri-domiciliares, como por ejemplo: envases artificiales, canaletas, tinas, cubos, floreros, tanques y cisternas en donde se pueda almacenar el agua y quede desatendida (Chadee, Novak & Ward, 1998; Thirion Icaza, 2003).

### **1.1.1 Biología y Ciclo de vida**

El mosquito *Aedes aegypti* tiene metamorfosis completa, y su ciclo de vida incluye las siguientes fases de desarrollo: Huevo, 4 fases larvarias, la pupa y el adulto. (Balta León, 1997). Los huevos son pequeños y de color negruzco; éstos son colocados por la hembra individualmente durante la oviposición en la interfase agua-aire de depósitos con agua limpia, bajo tenor orgánico y sales disueltas (Salvatella, 1996). Los huevos pueden mantenerse viables con una supervivencia máxima de un año, y resistir la desecación y cambios de temperatura (Nelson, 1986; Salvatella, 1996). Una vez, que el huevo vuelve a tener contacto con el agua, se estimula la eclosión en aproximadamente 15 minutos, y gracias a la reducción de la tensión del oxígeno se liberan las larvas de primer estadio (Balta León, 1997; Nelson, 1986; Thirion Icaza, 2003).

Los cuatro estadios larvarios son acuáticos y se completan en aproximadamente 5 a 7 días; las larvas se alimentan de detrito y alcanzan una longitud final aproximada de 7 mm antes de empupar. El desarrollo de larva se completa en condiciones favorables de

nutrición (materia orgánica acumulado en las paredes y en el fondo del recipiente) y con temperaturas de 25°C a 29°C (Salvatella, 1996).

El estadio de pupa es la etapa de transición de las fases larvarias (que tienen su forma característica vermiforme y son acuáticas) a la fase de los adultos (con forma muy diferente y voladores) (Balta León, 1997). Las pupas son acuáticas, en forma de “coma” muy activas y móviles y no necesitan alimentarse. Normalmente, se desarrollan a temperaturas entre 28°C y 32°C. Éstas tienden a colgar de la superficie del agua manteniendo su cuerpo sumergido, a excepción de las trompetas respiratorias que le sirven para realizar el intercambio de gases. La eclosión de los adultos a partir de las pupas ocurre en 1 a 3 días; sin embargo, las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período (Salvatella, 1996).

El adulto es un mosquito de color negruzco, con franjas blancas distintivas en las patas, y sobre el tórax una estructura blanca con diseño de lira característica. El *Aedes aegypti* es un mosquito de hábitos alimenticios diurnos y solamente la hembra es hematófaga (Salvatella, 1996; Balta León, 1997). La fuente de sangre en las hembras ayuda a proveer de los nutrientes y proteínas necesarias para el desarrollo de los huevos en lo que se conoce como ciclo gonotrófico (Scott, *et al.*1993).

## **1.2. El *Aedes aegypti* como vector de arbovirus**

El *Aedes aegypti* es un importante vector de varios arbovirus causantes de significativa morbimortalidad en el hombre, brotes epidémicos y pandémicos. Los arbovirus son un grupo heterogéneo de virus principalmente de ARN que se transmiten por artrópodos, tanto insectos como garrapatas. Los arbovirus pueden transmitirse por los

vectores, principalmente, mediante una ruta biológica (Gray & Banerjee, 1999); entran junto con la alimentación de sangre al tubo digestivo medio posterior; desde ahí, infectan el epitelio del tubo digestivo, se reproducen en el mismo, lo atraviesan e invaden el hemocele del mosquito para terminar infectando las glándulas salivales y la saliva, haciendo a ese mosquito competente para transmitir el arbovirus en la próxima picadura (Gray & Banerjee, 1999; Kenney & Brault, 2014). A este período de tiempo se le conoce como período extrínseco de incubación del virus y puede depender de muchos factores que incluyen: la genética del mosquito vector, receptores virales en el mosquito, los genotipos del virus, cepas virales, la genética del virus y factores ambientales como humedad y temperatura. En el mosquito *Aedes aegypti* esta etapa usualmente dura entre 7 a 14 días (Xi, Ramirez, & Dimopoulos, 2008).

### **1.2.1. Fiebre del dengue**

La fiebre del dengue, también conocida como fiebre quebrantahuesos, es una enfermedad arboviral infecciosa, transmitida por el mosquito *Aedes aegypti* (Amarasinghe, Kuritsky, Letson & Margolis, 2011) y, en menor medida, *Aedes albopictus*, en zonas urbanas (World Health Organization, 2015). La infección vírica es causada por el virus del dengue; virus de ARN de sentido positivo, monocatenario que pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* (Guzman, *et al.*, 2010; Vasilakis, Cardoso, Hanley, Holmes & Weaver, 2011; Messina, *et al.*, 2014). Existen 4 serotipos del virus filogenéticamente y antigénicamente distintos (DENV1-4) (Messina, *et al.* 2014; Wang, *et al.* 2000) y la reciente aparición de un quinto serotipo (Mustafa, Rasotgi, Jain & Gupta, 2015).

La mayoría de las infecciones del virus del dengue (DENV) son subclínicas o resultan en patología y síntomas del dengue clásico que se presentan con fiebre, erupciones en la piel, dolor muscular, articular y retro orbital. Aproximadamente, el 0.5% de estas infecciones resultan en dengue hemorrágico que puede ser fatal en hasta el 5% de los casos, y está asociado a una segunda infección por un segundo serotipo (Vasilakis, Cardoso, Hanley, Holmes & Weaver, 2011). Se estima que unos 2.5 billones de personas están en riesgo de infección a nivel mundial, de los cuales aproximadamente 975 millones viven en áreas urbanas en países tropicales y subtropicales del Asia, África, el Pacífico y las Américas (Guzman *et al.*, 2010). Se reporta anualmente aproximadamente 390 millones infecciones de dengue; de esta cifra, 96 millones manifiestan gravedad clínica (Bhatt, *et al.*, 2013). El número promedio anual de casos de fiebre hemorrágica de dengue / dengue informado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha aumentado con el paso de los años. Antes de 1970, sólo 9 países habían sufrido brotes epidémicos. Sin embargo, en la actualidad la enfermedad ya es endémica en más de 100 países alrededor del mundo, y la enfermedad es ahora una pandemia (World Health Organization, 2015) . En el 2013, 2.35 millones de casos de dengue fueron registrados en las Américas, de los cuales 37687 fueron casos de dengue grave (World Health Organization, 2015).

### **1.2.2. Fiebre del Chikungunya**

La fiebre del chikungunya, es otra enfermedad arboviral de relevancia actual causada por el virus del chikungunya (CHIKV); un arbovirus de la familia *Togaviridae*, del género *Alfavirus*. El virus tiene un solo serotipo con tres genotipos con características antigénicas diferentes; y, al igual que el virus del dengue, es transmitido por mosquitos del género *Aedes* spp. en zonas urbanas (Moya, Pimentel & Puello, 2014).

El virus CHIKV fue detectado en la década de 1950 en África y desde su descubrimiento ha causado muchos brotes localizados en África y Asia (Sudeep & Parashar, 2008). El primer brote de CHIKV se documentó en la meseta de Makonde (Sudeep & Parashar, 2008). Después, durante el periodo de 1952-1953, el virus se difunde en África, y se expande hacia la India y los países del sudeste asiático, causando brotes epidémicos intermitentes durante 30 años. Desde el 2005, los países de India, Indonesia, Myanmar, Tailandia y las Malvinas han notificado más de 1.9 millones de casos. El primer caso reportado en Europa fue en el 2007; mientras que, desde su primera aparición en el 2013, en el continente americano se han registrado 1379788 casos sospechosos de chikungunya (World Health Organization, 2015).

### **1.3. Situación en el Ecuador**

En el Ecuador, el programa de erradicación del mosquito *Aedes aegypti* comienza en 1946. Años después, en 1958, el país es declarado libre del mosquito por la Organización Panamericana de la Salud (Eliason & Tonn, 1990). Sin embargo, debido a la ausencia de un sistema de vigilancia y control del vector, además de cambios en las regulaciones del uso de insecticidas, las poblaciones de mosquitos se recuperan en los años siguientes: así, en la provincia de Manabí, se reporta la re-emergencia de estos vectores desde 1977 hasta 1988. Por otro lado, en la parroquia Sucre en Guayaquil, en marzo del 1985, también se encontraron focos de *Aedes aegypti*, los cuales se extendieron a parroquias vecinas (Eliason & Tonn, 1990). El primer registro de la especie en las Islas Galápagos fue en el 2001, el

establecimiento de la misma y los primeros casos de enfermedad de dengue se registraron un año después (Fundación Charles Darwin, 2015).

El resurgimiento de casos de dengue es subsecuente a la aparición del vector, reportándose aproximadamente 80.000 casos en 1988 en Guayaquil (Brathwaite Dick, *et al*, 2012; Cifuentes, *et al.*, 2013). En el 2000, se reportaron 22.937 casos confirmados (Brathwaite Dick, *et al.*, 2012; Stewart Ibarra, *et al.*, 2013). El reporte de nuevos casos continua cada año en el país hasta que en el 2010, la costa sur del Ecuador experimenta la mayor epidemia de dengue (Stewart Ibarra, *et al.*, 2014). En la actualidad, el dengue es hiperendémico en las tierras bajas de la región costera en donde los cuatro serotipos co-circulan (Stewart Ibarra, *et al.*, 2013). En el Ecuador, hasta el 25 de noviembre del 2015, se han reportado 42.056 casos de dengue; las provincias con mayor incidencia de casos son: Manabí, Guayas, El Oro y Esmeraldas que acumula el 84.23% del total de casos reportados en territorio ecuatoriano. A su vez, del total de casos reportados a nivel nacional 96.26% corresponde a casos de dengue sin signos de alarma, 3.60% casos de dengue con signos de alarma y 0.13% casos de dengue grave (Ministerio de Salud Pública Ecuador, 2015). Finalmente, hasta la semana epidemiológica 47 en Galápagos se han reportado 190 casos de dengue (Ministerio de Salud Publica del Ecuador, 2015).

El aparecimiento del virus del chikungunya (CHIKV) ocurrió en 2004 y desde entonces se ha extendido al resto del mundo (Staples, Breiman & Powers, 2009). En diciembre del 2013, el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, emitió la alerta epidemiológica por el primer caso detectado a escala nacional en Loja, siendo este a su vez, el primer caso importado en el país (Organización Panamericana de la Salud, 2013). Por otro lado, el primer caso autóctono fue detectado en Montecristi, provincia de Manabí el 16 de

diciembre del 2014 (Ministerio de Salud Pública, 2014) hasta el 25 de noviembre de 2015 se ha reportado en territorio ecuatoriano 33.530 casos de chikungunya (Ministerio de Salud Pública Ecuador, 2015). La mayor notificación de casos confirmados de chikungunya se da en la provincia de Esmeraldas que acumula 31.16% del total de casos, seguida de Manabí que acumula el 30.54%; y, finalmente, Guayas que acumula el 24.95% (Ministerio de Salud Pública Ecuador, 2015).

#### **1.4. Variación Genética del *Aedes aegypti***

Estudios de la variabilidad genética del *Aedes aegypti* a nivel global han demostrado que las poblaciones de África Oriental, América del sur, Caribe y México se encuentran en un solo clado, lo que sugiere que las poblaciones del Nuevo Mundo se derivan posiblemente del África del este. Por otro lado, los especímenes colectados en Asia y sudeste de los Estados Unidos se agrupan en un segundo clado, cuyo origen se diferencia de las colecciones del sureste de los Estados Unidos. Finalmente, un tercer clado existente comprende las poblaciones de *Aedes aegypti formosus* del África oriental y occidental (Tabachnick, 1991; Powell & Tabachnick, 2013; Urdaneta-Marquez & Failloux, 2011).

Otros estudios filogenéticos reportan la presencia de dos linajes en el continente americano (Bracco, Capurro, Lourenço-de-Oliveira & Mureb Sallum, 2007) y se sugiere que la presencia de los linajes y su distribución estaría asociada a la migración (activa y pasiva), distribución geográfica, tasa de flujo de genes y los procesos de extinción y recolonización (Gorrochotegui-Escalante, Muñoz, Fernandez-Salas, Beaty & Black IV, 2000; Herrera, *et al.*, 2006; Urdaneta-Marquez & Failloux, 2011; Sukonthabhirom, *et al.*, 2009; Huber, *et al.*, 2002).

Un extenso estudio de las poblaciones de *Aedes aegypti*, usando SSCP para analizar un fragmento de 347 pb del gen ND4 en México, demostró que el flujo genético varía geográficamente. Por otro lado, en la región noreste del país se determinó la ausencia de relación entre las distancias geográficas y genéticas, además de diversidad genética baja (Gorrochotegui-Escalante, *et al.*, 2002).

Un estudio similar realizado en Tailandia mostró una diversidad genética más baja al ser comparada con el estudio en México. Los principales factores de diferenciación genética implicados en este estudio fueron la deriva genética y los esfuerzos para controlar la propagación del vector (Bosio, *et al.*, 2005).

Otro estudio de un fragmento del gen mitocondrial ND4 para examinar la variabilidad genética en tres poblaciones de *Aedes aegypti* en el Perú detectó la presencia de 3 haplotipos entre 55 muestras, además de bajos niveles de variabilidad genéticas en las poblaciones de mosquitos. El restringido flujo génico fue, según el reporte, responsable de la diferenciación de la población (da Costa-da-Silva, Capurro & Bracco, 2005). Por otro lado, un estudio realizado en años posteriores, identifica la presencia de cinco haplotipos de *Aedes aegypti* agrupados en dos linajes, además de la existencia de una distribución geográfica de cada uno de los haplotipos encontrados (Yáñez, *et al.*, 2013).

Para este estudio piloto pretendemos realizar una comparación filogenética mitocondrial de las poblaciones de *Aedes aegypti* de varias regiones del Ecuador, incluyendo las Islas Galapágos. Esta información puede contribuir al diseño de mejores estrategias de control, a estudios sobre resistencia del vector a insecticidas y a entender mejor la dinámica de introducción del *Aedes aegypti* en las Islas. Pretendemos utilizar el

marcador molecular ND4, ampliamente utilizado para estudios de la filogenia en esta especie y en otros grupos taxonómicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Estudiar la variación genética del mosquito *Aedes aegypti* mediante el análisis de un fragmento del gen mitocondrial *ND4*, de colecciones entomológicas en las provincias de Esmeraldas, El Oro, Guayas y Galápagos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar si existe una estructura genética en las poblaciones del mosquito *Aedes aegypti* en diferentes provincias del Ecuador.
- Analizar si la variación genética está relacionada a la distancia entre zonas geográficas en las muestras de *Aedes aegypti* analizadas.
- Concluir cuáles son los principales factores que pudieron influenciar en las diferencias intra-específicas e inter-específicas encontradas en esta especie.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El virus del dengue y el virus del chikungunya son causa de importantes brotes epidémicos en las Américas causando alerta y preocupación en las autoridades de salud a nivel nacional y local en los países afectados. La distribución del vector más importante, el mosquito *Aedes aegypti*, va en aumento y puede ser afectada por la globalización, procesos de urbanización y el cambio climático. La comprensión de los patrones de la estructura genética y el flujo genético entre poblaciones de *Ae. aegypti* es útil para la competencia de vectores, para evidenciar flujo genético y distribución geográfica, además de revelar posibles asociaciones con serotipos o genotipos de los patógenos que transmiten. A pesar de los estudios de su comportamiento y de su genética en otros países, poco o nada se conoce en el Ecuador de las poblaciones locales del *Ae. aegypti*, que es sin duda la especie de vector más importante en el Ecuador al momento, tanto por el número de casos de dengue y chikungunya como por su gran distribución geográfica y difícil control a nivel urbano. Por este motivo, este estudio piloto busca ser un aporte al conocimiento de la variabilidad genética de esta especie, con el objetivo de contribuir en el diseño de estrategias de control vectorial (Bracco, Capurro, Lourenço-de-Oliveira & Mureb Sallum, 2007).

## 4 ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de *Ae. aegypti* fueron obtenidas por medio del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM) del Ministerio de Salud Pública. Los especímenes fueron recolectados como parte de actividades de monitoreo rutinario o como parte de otros proyectos que se ejecutan en el Laboratorio de Entomología Médica & Medicina Tropical, LEMMT, de la USFQ.

Los especímenes analizados provienen de cuatro provincias del país, donde previamente se reportó tanto la presencia del mosquito así como casos de dengue: (1) En el barrio de la parroquia urbana Bartolomé Ruíz (Esmeraldas, Esmeraldas) en marzo de 2015. (2) En la provincia del Guayas, la recolección se la realizó en el sector Flor de Bastión, perteneciente a la parroquia Tarqui en octubre de 2014. (3) La recolección en Machala, provincia de El Oro se efectuó en el sector de la Florida ubicado al sur de Machala desde octubre del 2013 hasta mayo de 2014. (4) En las Islas Galápagos en Puerto Baquerizo y Puerto Ayora, perteneciente a los cantones de San Cristóbal y Santa Cruz, respectivamente durante los meses de agosto y septiembre de 2014 (Tabla 1) .

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Microbiología (análisis moleculares) y en el Laboratorio de Entomología y Medicina Tropical (Colección entomológica) de la Universidad San Francisco de Quito, en el campus de Cumbayá.

## 5 MATERIALES

### 5.1 Colección y separación de especímenes

- Aspiradores tipo mochila
- Frascos de colección
- Pipetas
- Etanol al 90%

### 5.2 Identificación de especímenes

- Portaobjetos y Cubreobjetos
- Pinzas entomológicas
- Pipetas desechables
- 2 Jeringas de 1ml y agujas (NIPRO 30G\*1/2)
- Etanol al 70%
- Estéreo microscopio (LEICA EZ4, Wetzlar, Alemania)

### 5.3 Extracción de ADN:

- PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH7)
- CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20 Mm pH 8, HCl 100 Mm pH 8)
- Proteinasa K (Promega)
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Acetato de Sodio 3M pH5
- Etanol al 100%, etanol al 70%
- Buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA)

- Microcentrifuga (Eppendorf)
- Vortex (SMENSMAURO LAB MIXER)
- Baño (María Shel LAB)
- Tubos eppendorf 1.5 ml
- Micropistilo plástico
- Micropipetas (Labnet)

#### **5.4 Amplificación de ADN:**

- H<sub>2</sub>O para PCR
- Buffer 5X (Promega)
- MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega)
- dNTPs 2mM (Promega)
- Primer
  - ND4F
  - ND4R
- GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (Promega)
- Muestras de DNA de *Ae. aegypti*
- Termociclador BIO-RAD
- Tubos eppendorf de 0.2 ml

#### **5.5 Electroforesis en gel de agarosa:**

- Cámara de electroforesis horizontal (C.B.S Scientific CO)
- TBE 1X
  - 54g de TRIS Base (Promega)

- 27.5 g de ácido bórico (Acros Organics)
- 20 mL de EDTA pH8 (0.5 M)
- 5000 mL agua destilada estéril
- Agarosa LE
- Bromuro de etidio (molecular SIGMA biology)
- Amplicones de *Ae. aegypti*
- Micropipetas (Labnet)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Balanza analítica (ae ADAM AQT-600)
- Microondas (Panasonic)
- Parafilm

## 5.6 Secuenciamiento

- Amplicones NDH4F-NDH4R

## 5.7 Análisis filogenético

- Software: ARLEQUIN, TextWrangler, GENEious, Mr Bayes 3.1.2, JModeltest 0.1.1.

## 6 MÉTODOS

### 6.1 Colección Entomológica

Las colectas entomológicas se realizaron por medio del personal del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos (SNEM), del Ministerio de Salud Pública, quienes monitorean las poblaciones del *Aedes aegypti* a nivel nacional como parte de su programa de control de vectores. Las colectas de *Aedes aegypti* se realizaron mediante el uso de aspiradores entomológicos y/o colectas de larvas.

Los especímenes adultos fueron identificados usando claves taxonómicas, principalmente *Pictorial Keys for the Identification of Mosquitoes (Diptera: Culicidae Associated with Dengue Virus Transmission* de Leopoldo Rueda, publicada en el 2004. Los especímenes fueron separados y colocados en viales con tapa rosca de 1.5 ml en etanol al 80% y transportados al Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical (LEMMT) de la USFQ.

#### 6.1.1 Aspiradores Entomológicos

La colecta entomológica de mosquitos adultos, que se encontraban reposando en paredes y otras superficies dentro o alrededor de las viviendas, se realizaron mediante el uso de aspiradores entomológicos.

Estos aspiradores también conocidos como aspiradores de boca constan básicamente de un tubo de cristal, de gomas tubulares, de tapones oradados y de una boquilla en el extremo de una de las gomas. Los mosquitos quedan atrapados en el interior del tubo cuando son aspirados mediante la boquilla del aspirador (Cifuentes Romo, 1989).

### **6.1.2 Colectas de larvas**

En casas seleccionadas al azar, se inspeccionó los contenedores de agua artificiales, con el objetivo de determinar la presencia de estados larvarios de mosquito. Las larvas fueron colectadas mediante el uso de pipetas y transferidas a un recipiente estéril; en el caso de envases grandes, se transfirió el agua en una tina para facilitar la captura de las mismas (Getachew, Tekie, Gebre-Michael, Balkew & Mesfin, 2015).

Todas las muestras fueron transferidas a los laboratorios del Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos (SNEM), en donde fueron colocadas en recipientes en el insectario hasta la eclosión para luego proceder a la identificación.

## **6.2 Identificación de especímenes**

Para la identificación de *Aedes aegypti* se utilizó el estéreo microscopio (Olympus SZ51), además de claves taxonómicas; posteriormente, las muestras reconocidas fueron almacenadas en tubos eppendorf de 1.5 ml con etanol al 95% a -20°C, para proceder a los análisis moleculares.

## **6.3 Análisis Molecular**

### **6.3.1 Extracción de ADN**

Se utilizó el tórax, las extremidades y el abdomen de los especímenes de *Ae. aegypti* previamente almacenados a -20°C; para realizar la extracción. Primero, se realizó un lavado de la muestra con 500 ul de la solución de PBS 1X. Luego, se eliminó el PBS y se agregó 700

ul de la solución CTAB. Se realizó una maceración mecánica del espécimen con un micropistilo plástico estéril y se agregó 0.7 ul de Proteinasa K. Se homogenizó el material biológico con un vórtex y se incubó por 2 horas a 65°C; agitando la muestra cada 15 minutos para facilitar la ruptura de las membranas celulares (Vela Chauvín, 2014).

Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente una vez terminado el período de incubación. Se agregó 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1); se mezcló el tubo invirtiéndolo de manera vigorosa hasta formar una emulsión. Posteriormente, se centrifugó las muestras durante 5 minutos a 12000 rpm, se obtuvo 2 fases: la inferior u orgánica (cloroformo /alcohol isoamílico), la superior o acuosa con el ADN en suspensión, y una interfase (blanca) que contiene las proteínas celulares. Sin tocar la interfase para evitar la contaminación con proteínas celulares en la muestra, se transfirió 500 ul de la fase superior a un tubo eppendorf rotulado. Por último, se agregó 1000 ul de etanol al 100% y se dejó las muestras a -20°C; toda la noche (Vela Chauvín, 2014).

Al siguiente día, se centrifugó la muestra a 13200 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente evitando que se desprenda el pellet. Se lavó el pellet de ADN adicionando 1000 ul de etanol al 70%. Después, se centrifugó nuevamente a 13200 rpm por 10 minutos. Se descargó el sobrenadante y se dejó secar el tubo eppendorf; boca abajo sobre papel absorbente durante 30 minutos. Finalmente, se resuspendió la muestra en 50 ul de buffer TE y se almacenó la muestra a -20°C (Vela Chauvín, 2014).

### **6.3.2 Amplificación de ADN**

Se amplificó un fragmento de 763 bp de la subunidad 4 mitocondrial del gen de la nicotidinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa (NADH) de *Aedes aegypti*

(Gorrochochotegui, N; et al.2000; Bosio, C, et al.2005; Herrera, F; et al.2006). Los primers utilizados para la amplificación fueron: ND4F (5'-GTTTAGATATARTTTCTTAYGG-3') y ND4R (5'-CTTCGDCTCCWADWCGTTC-3') (Tabla 3) (Hlaing, *et al.*, 2009).

### **6.3.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio para visualizar los resultados de las amplificaciones. Primero, se armó la cámara de electroforesis. Luego, se pesó 1.5 g de agarosa y se colocó en un Erlenmeyer. Se homogenizó en microondas mediante ebullición y se dejó enfriar el gel hasta temperatura tolerable al tacto. Posteriormente, se agregó 2 ul de bromuro de etidio, se agitó y se vertió la mezcla en el molde de solidificación de la cámara de electroforesis, a la cual se había colocado previamente el peine. Se dejó solidificar la agarosa. A continuación, se retiró el peine, se colocó TBE 1X en la cámara de electroforesis hasta que cubra completamente el gel. Se colocó 2 ul de blue juice o buffer de carga, con 6 ul de cada muestra de ADN amplificado. Finalmente, se colocó un ladder de 100 pb (Invitrogen) y se cargó las muestras. Se corrió la electroforesis a 75 V por 50 minutos (Vela Chauvín, 2014).

### **6.3.4 Secuenciamiento**

Cada producto de PCR fue secuenciado en ambas direcciones por la empresa Functional Biosciences, Inc., MGE Innovation Center, 505 South Rosa Road, Suite 238, Madison, WI 53719.

### 6.3.5 Análisis estadístico

Los productos del secuenciamiento fueron editados en TextWrangler para generar una secuencia consenso. Posteriormente, dichas secuencias fueron analizadas mediante la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), herramienta brindada por la página web del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI), para confirmar la identidad de las mismas. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas con el programa GENEious (Kearse, *et al.*, 2012).

Se utilizó el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) para calcular la diversidad genética de los grupos en el nivel de diversidad de haplotipos (H) y el nivel de diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) de los grupos de individuos analizados. Además de determinar la diferenciación genética en base a la variabilidad genética, utilizando valores comparativos  $F$  convencionales, se realizó un análisis estadístico de varianza (AMOVA). Los niveles de índices de fijación o  $F$  de Wright nos permiten estudiar tres niveles de estructuración.

- $F_{SC}$  toma la variabilidad interna de cada población dentro de un mismo grupo.
- $F_{ST}$  la variabilidad entre poblaciones en relación a la variación total.
- $F_{CT}$  Toma la variabilidad de cada grupo en relación a la variación total.

Para ello se corrieron dos particiones o estimaciones, una con todas las localidades (no jerárquico), y otra entre las poblaciones de la costa (Grupo 1) y Galápagos (Grupo 2) por ser dos regiones muy distintas.

Las pruebas de neutralidad Tajima  $D$  (Tajima, 1989),  $F_u$  &  $L_i$ 's  $F$  y  $F_u$  &  $L_i$ 's  $D$  (Fu & Li, 1993) que se utilizaron permiten evaluar si el patrón de polimorfismo observado en las

secuencias corresponde con lo esperado según la teoría neutral de la evolución molecular (Caldera, Jaramillo, Cochero, Pérez-Doria & Bejarano, 2013; de Brito, Manfrin & Sene, 2002). Estas pruebas se llevaron a cabo utilizando el programa DNAsp; usando una distribución de 10000 poblaciones simuladas generadas por un proceso coalescente neutro (Librado & Rozas, 2009).

Se utilizó el programa Mr Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) para construir un árbol por el método de inferencia Bayesiana. Previo a este análisis estimamos el mejor modelo de evolución para los datos por medio de JModeltest 0.1.1 (Posada , 2008). Finalmente, se generó una red de haplotipos parsimónico usando el programa TCS (Clement, Posada & Crandall, 2009). El límite de diferencias mutacionales asociadas con una probabilidad máxima de 95%; basadas en el criterio de parsimonia, no funcionó con nuestras secuencias. Por lo que se usó un cut-off de 90%: ya que los haplotipos difieren por más del 5% (Clement, Posada & Crandall, 2009).

## 7 RESULTADOS

Se analizaron un total de 59 especímenes del mosquito *Aedes aegypti*; provenientes de 5 localidades de 4 provincias en estudio: Esmeraldas (n=16), Guayas (n=15), El Oro (n=13) y Galápagos (n=15). Como marcador molecular para análisis filogenéticos, se utilizó el gen mitocondrial ND4 que amplifica un segmento de 763 pb.

### 7.1 Diversidad de haplotipos (H) y diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) de las poblaciones de *Aedes aegypti*.

El análisis de diversidad de haplotipos (H) y diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) de las poblaciones no agrupadas reveló valores de 0.497 y 0.01141, respectivamente. De las 16 muestras provenientes de Esmeraldas se determinó una diversidad de haplotipos de 0.458; mientras que la diversidad de nucleótidos fue de 0.01049. Por otro lado, en la provincia del Oro (n=13) se registró una diversidad haplotípica de 0.385; y diversidad nucleotídica de 0.00880. Los valores más altos de diversidad nucleotídica se encontraron en las poblaciones de San Cristóbal (n=11), y Guayas (n=15) con valores de 0.01162, y 0.01088; respectivamente. Finalmente, los valores más bajos de diversidad de genética se reportó en la población de Santa Cruz (4 especímenes) con valores de H de 0 y  $\pi$  de 0 (Tabla 4).

### 7.2 Pruebas de neutralidad

En general para la población total los resultados de las pruebas fueron positivas y significativas. Las pruebas de Tajima's D, Fu & Li's F y Fu & Li's D; fueron positivas y significativas para las poblaciones de *Ae. Aegypti*; de Esmeraldas, Guayas y San Cristóbal. Por otro lado, para la población de mosquitos provenientes de Machala, las pruebas de Tajima's D y Fu & Li's D

fueron positivas pero no significativas. Por último, en las pruebas de neutralidad no se obtuvo un índice para la población de Santa Cruz debido a la presencia de un haplotipo único (Tabla 5).

### **7.3 Análisis de AMOVA**

Se realizó un AMOVA en base a la frecuencia de haplotipos para comparar la relación entre la frecuencia y composición de nucleótidos con la situación geográfica de los sitios de estudio. Este análisis determinó un valor de  $F_{ST}$  de 0.08541; ( $p$  significativo) y una de variación dentro de las poblaciones del 91.45% (Tabla 6).

En la segunda estimación, se realizó una separación de las poblaciones en dos grupos: poblaciones continentales (Esmeraldas, Guayaquil y Machala) y poblaciones insulares (San Cristóbal y Santa Cruz) (Tabla 7). Los resultados del análisis, al igual que en la primera estimación mostraron un porcentaje de variación de 90.38% dentro de las poblaciones, y el valor del índice de fijación  $F_{CT}$  que mide la diferenciación de los grupos no fue significativo.

### **7.4 Construcción de árbol filogenético por medio de inferencia Bayesiana**

El árbol filogenético resultante mediante la Inferencia Bayesiana demuestra la presencia de dos haplotipos bien establecidos. En el primero se encontraron individuos de las poblaciones de Esmeraldas, Guayas, Manabí, San Cristóbal y Santa Cruz; mientras que, en el segundo se encontraron especímenes de todas las poblaciones, con excepción de Santa Cruz (Gráfico 2).

### **7.5 Red de haplotipos parsimónico**

En los 59 individuos de *Aedes aegypti*; analizados se evidenció la presencia de dos haplotipos claramente diferenciados. El primer haplotipo se encontró en 34 especímenes provenientes de las provincias de Esmeraldas (11), El Oro (10), Guayas (5),

San Cristóbal (4), Santa Cruz (4); mientras que, en el segundo se encontró en 25 individuos de Esmeraldas (5), Guayas (9), El Oro (3), San Cristóbal (7) (Gráfico 1;

Tabla 8).

## 8 DISCUSIÓN

Los estudios de la genética del *Aedes aegypti*; son relevantes ya que pueden aportar valiosa información sobre los patrones de flujo génico y de eventos de colonización, parámetros a considerar para desarrollar nuevas estrategias para el control local y regional del vector. Además, contribuyen con información útil para otros futuros estudios en la competencia de vectores y en temas de trascendental importancia para la salud pública como la resistencia del *Ae. Aegypti*; a insecticidas (Scarpassa, Bacry Cardoza & Cardoso Junior, 2008; Bosio, *et al.*, 2005).

El Ecuador al ser un país diverso tanto en su variedad de hábitats geográficos como en su diversidad biológica se esperaría que posea condiciones adecuadas para la estructuración genética del *Aedes aegypti*; que se encuentra ampliamente distribuido en las regiones subtropicales del país y en las Islas Galápagos. De la misma manera, la región de la costa Pacífica hacia el norte en la provincia de Esmeraldas y al sur en Guayas y el Oro, también presentan diversidad de ecosistemas y condiciones climáticas, afectadas por las corrientes marítimas y otros factores ecológicos, diferentes patrones de urbanización, socioeconómicos, de monitoreo y control vectorial particulares dentro de las ciudades.

El *Aedes aegypti* es, al momento, la especie de vector más importante en el Ecuador y posiblemente en las Américas por ser el principal transmisor del virus del dengue, del Chikungunya y del Sika; este último no ha sido reportado aún en el país. Sin embargo, esta importante especie de vector ha sido poco estudiada en el Ecuador tanto en su comportamiento como en su genética. Hasta lo que podemos conocer, este estudio es uno

de los primeros que analiza la estructura genética de esta especie en el país y que incluye especímenes de las Islas Galápagos.

### **8.1 Diversidad de haplotipos ( $H \pm SD$ ) y diversidad de nucleótidos ( $\pi \pm SD$ ) de las poblaciones de *Aedes aegypti*.**

Los resultados del análisis de secuenciación de un fragmento del ADN mitocondrial, ND4, evidencian, a nivel general, valores altos tanto de diversidad de haplotipos;  $H=0.497$ , y de diversidad de nucleótidos,  $\pi =0.01141$ . Esto se debe a la diversidad de ambientes y características ecológicas en las zonas de donde se obtuvieron los especímenes, procesos de migración e introducciones múltiples de los mosquitos considerando la amplia red de carreteras que comunican el norte con el sur del país, además, del continuo flujo marítimo y aéreo desde la costa hacia las Islas Galápagos, la intensa urbanización de los lugares de estudio y la abundancia de fuentes alimenticias de *Ae. aegypti* (Bosio, *et al.*, 2005). También, puede implicar que a pesar del uso constante de insecticida para controlar el vector, éste tiene un tamaño poblacional efectivo (Lima Júnior & Scarpassa, 2009).

Los valores obtenidos en el presente estudio son similares respecto a otros estudios en las Américas. Por ejemplo en Brazil,  $\pi=0.01997$  (Bracco, Capurro, Lourenço-de-Oliveira & Mureb Sallum, 2007); Venezuela,  $\pi=0.01877$  (Herrera, *et al.*, 2006); México,  $\pi=0.0143$  (Gorrochotegui-Escalante, *et al.*, 2002). En Ecuador, al igual que en Venezuela se ha reportado un valor alto de diversidad nucleotídica, sin embargo, el número de haplotipos encontrados ha sido menor -7 haplotipos en Venezuela y 2 haplotipos en Ecuador- en comparación a otros estudios en el continente americano. Esto podría indicar: 1) que las poblaciones de *Aedes aegypti* estudiadas son más viejas 2) Otra explicación sería que la

divergencia entre los haplotipos es la consecuencia de la pérdida de linajes intermedios. 3) Finalmente, este resultado podría ser explicado por la presencia de haplotipos genéticamente distantes en simpatria (Herrera, *et al.*, 2006; Lima Júnior & Scarpassa, 2009; Scarpassa, Bacry Cardoza & Cardoso Junior, 2008).

No obstante, dentro de esta alta diversidad encontrada en las poblaciones estudiadas, se encontró que en la población proveniente de Santa Cruz no existe variación nucleotídica; ni haplotípica. Estos resultados son consistentes con las siguientes hipótesis por: 1) la ausencia de variación se debe al bajo número de muestras analizado; (2) la población fundada por pocos individuos (efecto fundador) y 3) por una reducción del tamaño poblacional del mosquito por un cuello de botella (ej. El uso constante de insectidas). (Scarpassa, Bacry Cardoza & Cardoso Junior, 2008; Bosio, *et al.*, 2005).

## **8.2 Pruebas de neutralidad**

Las pruebas de neutralidad realizadas evidencian resultados positivos y significativos en todas las muestras; sugiriendo que las poblaciones no se encuentran en equilibrio y se encuentran bajo una subdivisión poblacional (efecto Wahlund) (Scarpassa, Bacry Cardoza & Cardoso Junior, 2008; Fu & Li, 1993; Lima Júnior & Scarpassa, 2009). Este efecto se puede ejemplificar de la siguiente manera, durante los brotes de dengue, las poblaciones son sometidas a un tratamiento insecticida que causa una alta mortalidad de la población, en caso de recolonización, existe la posibilidad que se de por poblaciones que son menos tratadas (Huber, *et al.*, 2002). En nuestro caso, la presencia de haplotipos: provenientes de dos linajes en los sitios de muestreo podrían explicar este resultado.

### 8.3 Análisis de AMOVA

El análisis de AMOVA (Tabla 5) sin una agrupación particular de ninguna población mostró que la variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones estudiadas (91.45%). Debido a que el mayor porcentaje de variabilidad encontrada se encuentra en el nivel intrapoblacional, es posible que las poblaciones puedan estar subestructuradas lo que tendría que estudiarse en más detalle con un mayor número de muestras de cada provincia en el futuro. En una segunda estimación (Tabla 6), se compara la región continental con la región insular, y al igual que la primera estimación, la variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones (90.38%). Esto, también, implica la inexistencia de diferenciación entre las agrupaciones – continental vs. Insular- ( $F_{CT} = 0.14914$ ,  $p > 0.05$ ); lo que puede ser atribuido, a una alta densidad poblacional de *Ae. Aegypti*; además de flujo génico continuo. (Paupy, Chantha, Reynes & Failloux, 2005).

Las estimaciones de AMOVA, también, determinan que no existe una estructuración de la población basada en la jerarquía geográfica (Tabla 6). Resultados en donde no se muestra una relación entre estructuración poblacional y distancia geográfica se han reportado en otras publicaciones. Por ejemplo, en un estudio en el Perú donde se comparó las poblaciones del oeste de los Andes (Lima y Piura) con la del este (Iquitos). Se determinó que Piura al poseer dos haplotipos (II & III), a pesar de estar al mismo lado de la cordillera de los Andes que la ciudad de Lima, está más separado de los otras localidades de estudio (Lima y Piura) que sólo presentan el haplotipo I, lo que demuestra que su estructuración no depende de un componente geográfico (da Costa-da-Silva, Capurro & Bracco, 2005). Otro ejemplo se encontró en 3 poblaciones genéticamente cercanas de *Ae. aegypti* en Argentina. Sin embargo, la mayor distancia genética se observó en muestras provenientes de las ciudades

de Buenos Aires y Zárate que son geográficamente más cercanas, demostrando que la estructuración genética se muestra independiente de la distancia geográfica (de Souza, Avilés & Gardenal, 2000).

La ausencia de estructuración poblacional en relación a la distancia geográfica podría darse por varias explicaciones, entre estas están: (1) el transporte pasivo de mosquito, (2) eventos como la deriva génica. El transporte pasivo de mosquitos puede darse por actividades humanas, como la migración y el comercio, que pueden promover la propagación de especies invasoras a nuevas locaciones e introducir alelos nuevos en otras poblaciones, cambiando la frecuencia de los mismos. Si este proceso continúa en el tiempo luego de varias generaciones, este flujo génico podrá provocar una homogenización de estas poblaciones. (Huber, Le Loan, Chantha & Failloux, 2004; Powell & Tabachnick, 2013). Por otro lado, la deriva génica es un proceso al azar que podría cambiar la composición del reservorio génico haciendo a las poblaciones genéticamente más independientemente de su relación geográfica. (Bosio, *et al.*, 2005). Puede darse por fenómenos como una reducción poblacional drástica por un evento catastrófico o al azar (cuello de botella), o por la separación de poblaciones pequeñas a partir de una población mayor (efecto fundador). Por ejemplo, actividades humanas como el control vectorial, y factores ambientales como la ausencia de lluvia pueden provocar cuellos de botella comunes en varias poblaciones que se reflejen en una estructura genética independiente de la distancia geográfica en estas poblaciones (Bosio, *et al.*, 2005; Lima Júnior & Scarpassa, 2009).

## 8.4 Construcción de árbol filogenético por medio de inferencia Bayesiana y Red de haplotipos parsimónico

El árbol obtenido, mediante inferencia bayesiana, determinó un dos agrupaciones o linajes fuertemente apoyadas por probabilidades posteriores (ie.>95); esto se traduce en la probabilidad de que el clado sea monofilético dado el modelo y los datos obtenidos de las secuencias analizadas (Huelsenbeck & Rannala, 2004; Larget & Simon, 1999). La presencia de linajes mitocondriales diferentes refleja la existencia de linajes históricos distintos a partir de una línea matriarcal común, además de introducciones múltiples de poblaciones de *Ae.aegypti* (Gorrochotegui-Escalante, Muñoz, Fernandez-Salas, Beaty & Black IV, 2000).

Por otra parte, los subgrupos encontrados no mostraron una significancia basado en las probabilidades posteriores (ie <0.002), por lo que no se puede inferir que la distribución dentro de estos nodos sea correcta; tampoco, se puede deducir si las longitudes de las ramas internas de las subagrupaciones refleja tiempos de divergencia entre las mismas (Zhang, Rannala & Yang , 2014) (Gráfico 2). La agrupación encontrada, se corrobora con los resultados obtenidos en la red de haplotipos en donde, se determinó la presencia de dos haplotipos, provenientes de dos linajes, bien diferenciados en las poblaciones de *Aedes aegypti* estudiadas, y separados por 16 cambios mutacionales (Gráfico 1). Es importante recalcar que los individuos de Santa Cruz están distribuidos únicamente en el haplotipo 1. Dentro del primer haplotipo se encuentran: 11 especímenes procedentes de Esmeraldas, 10 del Oro, 5 del Guayas, 4 de San Cristóbal y 4 de Santa Cruz. Por otro lado, en el haplotipo 2 están 5 individuos de Esmeraldas, 9 del Guayas, 3 de El Oro, y finalmente, 7 de San Cristóbal (Tabla 8).

El número de haplotipos encontrados en el presente estudio es menor en comparación con otros reportes en América Latina. Por ejemplo, da Costa, et al. 2005 reportó la presencia de 3 haplotipos, dentro de dos linajes diferentes en los *Ae. aegypti* provenientes de Piura, Lima e Iquitos. Otro estudio realizado en las localidades rurales del Sur de Bolivia ,usando un fragmento de gen mitocondrial ND4, reportó 4 haplotipos dentro de 2 grupos linajes (Paupy, et al., 2012). Por último, en un estudio en donde se analizaron 9 colecciones provenientes de 6 localidades en Oxaca, México, se encontró 3 haplotipos (Muñoz, Mercado-Curiel, Díaz-Badillo, Pérez Ramirez & Black IV, 2013). Estos resultados sugieren la posibilidad de extinción local de variantes de haplotipos, las cuales difieren de uno o algunos nucleótidos del clado (Bosio, et al., 2005).

## 9 CONCLUSIONES

- En el presente estudio, se evidenció una distribución de dos haplotipos, provenientes de dos linajes diferente del vector *Aedes aegypti* en la región costera así como insular del Ecuador. A pesar, de la presencia de sólo dos haplotipos, la variabilidad nucleotídica encontrada fue alta, lo que propone una extinción de linajes intermedios que llevo a la la divergencia entre los haplotipos o la presencia de haplotipos de genéticamente distantes en simpatría (Bosio, *et al.*, 2005)
- La alta similaridad entre las poblaciones del vector sugiere altos niveles de flujos génico entre estas. Considerando que la hembra del mosquito en busca lugares de oviposición no exceden el vuelo más hasta 800 m (da Costa-da-Silva, Capurro & Bracco, 2005); la migración pasiva o forzada por las actividades del ser humano como son: el comercio y el transporte (terrestre, marítimo y aéreo) explicaría el patrón de similitud entre poblaciones, además, explicaría la propagación de especies invasoras a lugares más distantes, ej. Regiones insulares (Paupy, *et al.*, 2012; Brown, Obas, Morley, & Powell, 2013).
- La distribución geográfica no es siempre un buen indicador para determinar las distancias génicas entre las poblaciones (Huber, *et al.*, 2002).

## 10 RECOMENDACIONES

- Este estudio demuestra la presencia de al 2 haplotipos en la especie *Aedes aegypti* en el Ecuador. Por el número de muestras analizadas que es limitado se recomienda ampliar el análisis a más individuos para corroborar los resultados obtenidos en el estudio piloto.
- Se deberían hacer colecciones entomológicas en diferentes periodos del año para ver si la presencia de haplotipos así como la diversidad genética y la estructura genética de la población del vector está relacionada con el cambio climático para lo cual se plantea analizar una muestra más grande de *Aedes aegypti* y tratar de incorporar la región amazónica del país.
- Se deberían implementar el uso de marcadores nucleares en el estudio de variabilidad genética en *Aedes aegypti* ya que debido al reciente descubrimiento pseudocopias nucleares (NUMT) en la especie *Ae. Aegypti*, se cree que éstas podrían inferir en los resultados.
- La presencia de dos linajes en Ecuador puede inferir en la competencia vectorial así como en la resistencia a insecticidas. Sería interesante comparar la competencia del vector y la resistencia a insecticidas en los haplotipos encontrados. La importancia de esto radica en que si insecticidas con activos residuales son usados con frecuencia, éstos pueden impactar el flujo génico de la población hasta que la actividad residual acabe, consecuentemente, se creará resistencia en ciertos miembros poblacionales,

los cuales pueden migrar fuera del área tratada, llegando consigo genes que confieren resistencia.

## 11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarasinghe, A., Kuritsky, J., Letson, W., & Margolis, H. (August de 2011). Dengue Virus Infection in Africa. *Emerging Infection Diseases*, 17(8), 1349-1354.
- Audersirk, T., & Audersirk, G. (2008). *Biología: la vida en la tierra*. Pearson Education.
- Ballinger-Crabtree, M., Black IV, W., & Miller, B. (December de 1992). Use of Genetic Polymorphisms Detected by the Random-Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) for Differentiation and Identification of *Aedes aegypti* Subspecies and Populations. *The American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene*, 47(6), 893-901.
- Balta León, R. (1997). *Guía Práctica para la Identificación de Aedes aegypti*. Guías Entomológicas, Ministerio de Salud Perú, Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, Lima.
- Barreiro, L., & Quintana-Murci, L. (2010). *Statistical methods for detecting selection*. Obtenido de Nature Reviews. GENETICS.: [http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n1/box/nrg2698\\_BX3.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n1/box/nrg2698_BX3.html)
- Bataille, A., Cunningham, A., Cedeño, V., Cruz, M., Eastwood, G., Fonseca, D., . . . Goodman, S. (2009). Evidence of regular ongoing introductions of mosquito disease vectors into the Galápagos Islands. *Proceedings Of the Royal Society*, 276, 3769-3775.
- Beltrán, E. (2014). Caracterización de una epidemia de dengue en la localidad rural Ecuatoriana de Palmales ubicada en la frontera con el Perú: Periodo de Enero-Julio 2014. En R. León, & S. Figueroa (Ed.), *III Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical*. Quito: Universidad Católica del Ecuador.
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C., . . . Hay, S. (April de 2013). The global distribution and burden of dengue. *NATURE*, 496, 504-507.
- Bosio, C., Harrington, L., Jones, J., Sithiprasasna, R., Norris, D., & Scott, T. (2005). Genetic Structure of *Aedes aegypti* Populations in Thailand using mitochondrial DNA. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 434-442.
- Bracco, J. E., Capurro, M. L., Lourenço-de-Oliveira, R., & Mureb Sallum, M. A. (2007). Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102(5), 573-580.

- Brathwaite Dick, O., San Martín, J., Montoya, R., del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. (October de 2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 584-93.
- Brown, J., Obas, V., Morley, V., & Powell, J. (March de 2013). Phylogeography and Spatio-Temporal Genetic Variation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations in Florida Keys. *J Med Entomol*, 50(2), 294-299.
- Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., Cochero, S., Pérez-Doria, A., & Bejarano, E. E. (September de 2013). Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Revista del Instituto Nacional de Salud Biomédica*, 33.
- Campbell, N., Mitchell, L., & Reece, J. (2001). *Biología: Conceptos y relaciones* (Vol. 3ra. edición). México: Pearson Educación.
- Castro, J., & Picornell, A. (1998). Mitochondrial DNA: a tool for population genetic studies. *Internatl Microbiol*, 1, 327-332.
- Causton, C., Peck, S., Sinclair, B., Roque-Albelo, L., Hodgson, C., & Landry, B. (2006). Alien Insects: Threats and Implications of Conservation of Galápagos Islands. *Ann. Entomol. Soc*, 99(1), 121-143.
- Chadee, D., Novak, R., & Ward, R. (1998). Natural habitats of *Aedes aegypti* in the Caribbean- A review. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(1), 5-11.
- Christophers, R. (1961). *Aedes Aegypti* (L.), the Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics, and strcuture. *Science Magazine*, 133(3463), 1473-1474.
- Cifuentes Romo, D. (1989). *Prácticas de entomología agrícola*. Universidad de Murcia. Secretariado de Publicaciones.
- Cifuentes, S., Trostle, J., Trueba, G., Milbrath, M., Baldeón, M., & Eisenberg, J. (October de 2013). Transition in the Cause of Fever from Malaria to Dengue, Northwestern Ecuador, 1990-2011. *Emerging Infectious Diseases*, 19(10).
- Clark, G. G., Seda, H., & Gubler, D. J. (1994). Use of the "CDC Backpack aspiartor" for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(1), 119-124.

- Clark, G., Seda, H., & Gubler, D. (1994). Use of the "CDC Backpack aspirator" for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan, Puerto Rico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10(1), 119-124.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 1657-1660.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. (2009). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 1657-1659.
- Cruz Martinez, J., & Causton, C. (2007). *Análisis del riesgo asociado a las operaciones y rutas aéreas al Archipiélago de Galápagos*. Puerto Ayora, Islas Galápagos, Ecuador: Charles Darwin Foundation.
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Flores, G. (2006). *Invitación a la Biología*. Buenos Aires: Panamericana.
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Biología* (Vol. 7 edición). Madrid: Editorial Panamericana.
- da Costa-da-Silva, A. L., Capurro, M. L., & Bracco, J. E. (October de 2005). Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(6).
- de Brito, R., Manfrin, M., & Sene, F. (2002). Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatti*. *Genetics and Molecular Biology*, 25(2), 161-171.
- de Souza, G., Avilés, G., & Gardenal, C. (2000). Allozymic polymorphism in *Aedes aegypti* populations from Argentina. *J Am Mosq Assoc*, 16, 206-209.
- Eisenberg, J., Cevallos, W., Ponce, K., Levy, K., Bates, S., Scott, J., . . . Trostle, J. (December de 2006). Environmental change and infectious disease: How new roads affect the transmission of diarrheal pathogens in rural Ecuador. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19460-19465.
- Eliason, D., & Tonn, R. (1990). *Aedes/Dengue control in Guayaquil and other urban areas of the Pacific coast of Ecuador, September-October 1990*. En *Vector Biology and Control Project*. Washington, DC.

- Excoffier, L., & Lischer, H. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Fu, Y., & Li, W. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 3, 693-709.
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetic Society of America*, 915-925.
- Fundación Charles Darwin. (2015). *Aedes aegypti*. Recuperado el 2009 de noviembre de 2015, de Lista de Especies de Galápagos: <http://www.darwinfoundation.org/datazone/checklists/11720/>
- Getachew, D., Tekie, H., Gebre-Michael, T., Balkew, M., & Mesfin, A. (2015). Breeding Sites of *Aedes aegypti*: Potential Dengue Vectors in Dire Dawa, East Ethiopia. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.
- Gorrochotegui-Escalante, N., Gomez-Machorro, C., Lozano-Fuentes, S., Fernandez-Salas, I., Muñoz, M., Farfan-Ale, J., . . . Black IV, W. (2002). Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(2), 213-222.
- Gorrochotegui-Escalante, N., Muñoz, M., Fernandez-Salas, I., Beaty, B., & Black IV, W. (2000). Genetic Isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2), 200-209.
- Gray, S., & Banerjee, N. (1999). Mechanisms of Arthropod Transmission and Plant and Animal Viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 128-148.
- Gubler, D. (1998). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 480-496.
- Gubler, D. J. (1988). *Epidemiology of arthropod-borne viral diseases*. (T. Monath, Ed.) Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.
- Guzman, M., Halstead, S., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D., . . . Peeling, R. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews*, S7-S16.

- Hardy, J., Houk, E., Kramer, L., & Reeves, W. (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology*, *28*, 229-262.
- Harrington, L., Scott, T., Lerdthusnee, K., Coleman, R., Costero, A., Clark, G., . . . Edman, J. (February de 2005). Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *72*(2), 209-220.
- Herrera, F., Urdaneta, L., Rivero, J., Zoghbi, N., Ruiz, J., Carrasquel, G., . . . Rojas, E. (September de 2006). Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, *101*(6), 625-633.
- Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, S., Seta, T., Min, S., . . . Walton, C. (March de 2009). Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics*, *10*(11).
- Huber, K., Le Loan, L., Chantha, N., & Failloux, B. (March de 2004). Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Acta Tropica*, *90*, 23-29.
- Huber, K., Loan, L., Hoang, T., Ravel, S., Rodhain, F., & Failloux, B. (2002). Genetic differentiation of the dengue vector, *Aedes aegypti* (Ho Chi Minh City, Vietnam) using microsatellite markers. *Molecular ecology*, *11*(9), 1629-1635.
- Huelsenbeck, J., & Rannala, B. (2004). Frequentist Properties of Bayesian Posterior Probabilities of Phylogenetic Trees Under Simple and Complex Substitution Models. *Syst. Biol.*, *53*(6), 904-913.
- Huelsenbeck, J., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, *17*, 754-755.
- Ingraham, J., & Ingraham, C. (1998). *Introducción a la Microbiología* (Vol. 2). Barcelona: Reverté, S.A.
- Jansen, C., & Beebe, N. (April de 2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infection*, *12*(4), 272-279.
- Kearse, M., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., . . . Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*(12), 1647-1649.

- Kenney, J., & Brault, A. (2014). The Role of Environmental, Virological and Vector Interactions in Dictating Biological Transmission of Arthropod-Borne Viruses by Mosquitoes. En K. Maramorosch, & F. Murphy (Edits.), *Advances in Virus Research* (Vol. 89, págs. 2-284).
- Larget, B., & Simon, D. (1999). Markov Chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.*, 750-759.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Lima Júnior, R. S., & Scarpassa, V. M. (2009). Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 32(2), 414-422.
- Mattingly, P. (1957). Taxonomy of *Aedes aegypti* and Related Species. *Bulletin of the World Health Organization*, 36, 552-554.
- Messina, J., Brady, O., Scott, T., Zou, C., Pigott, D., Duda, K., . . . Hay, S. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends in Microbiology*, 22(3), 138-146.
- Ministerio de Salud Pública. (16 de Diciembre de 2014). *Se confirma primer caso autóctono de chikungunya en Ecuador*. Recuperado el 17 de octubre de 2015, de Ministerio de Salud Pública Ecuador: <http://www.salud.gob.ec/se-confirma-primer-caso-autoctono-de-chikungunya-en-ecuador/>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2015). *Semana Epidemiologica 47 Galápagos*. Ministerio de Salud Pública del Ecuador, Coordinación Zonal de Salud-5.
- Ministerio de Salud Pública Ecuador. (11 de noviembre de 2015). *Dengue y Chikungunya*. Recuperado el 14 de noviembre de 2015, de Ministerio de Salud Pública Ecuador: <http://www.salud.gob.ec/dengue-y-chikungunya/>
- Moya, J., Pimentel, R., & Puello, J. (2014). Chikungunya: un reto para los servicios de salud de la República Dominicana. *Revista Panamericana Salud Pública*, 36(5), 331-335.
- Muñoz, M., Mercado-Curiel, R., Díaz-Badillo, A., Pérez Ramirez, G., & Black IV, W. (2013). Gene Flow Pattern Among *Aedes Aegypti* Populations in Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29(1), 1-18.

- Mustafa, L., Rasotgi, C., Jain, C., & Gupta, L. (2015). Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical Journal Armed Forces India*, 67-70.
- Nelson, M. (1986). *Aedes aegypti: Biología y Ecología*. Organización Panamericana de la Salud.
- Oliva, R., Ballesta, F., Oriola, J., & Clària, J. (2004). *Genética médica*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Organización Panamericana de la Salud. (2013). *Se presenta caso importado de chikungunya en Ecuador*. Recuperado el 10 de octubre de 2015, de Organización Panamericana de la Salud: [http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1339:se-presenta-caso-importado-de-chikungunya-en-ecuador&Itemid=360](http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=1339:se-presenta-caso-importado-de-chikungunya-en-ecuador&Itemid=360)
- PAHO. (1994). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control*. Washington,DC: PAHO Scientific Publication.
- Paupy, C., Chantha, N., Reynes, J.-M., & Failloux, A.-B. (2005). Factors influencing the population structure of *Aedes aegypti* from the main cities in Cambodia. *Heredity*, 144-147.
- Paupy, C., Le Goff, G., Brengues, C., Guerra, M., Revollo, J., Barja Simon, Z., . . . Fontenille, D. (2012). Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1260-1269.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Powell, J., & Tabachnick, W. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 18(1), 11-17.
- Rand, D., Dorfsman, M., & Kann, L. (1994). Neutral and Non-Neutral Evolution of *Drosophila* Mitochondrial DNA. *Genetics Society of America*.
- Reiter, P. (2001). Climate change and mosquito-borne disease. *Environmental Health Perspectives*, 109(1), 141-161.
- Salvatella, R. (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. La situación de Uruguay. *Revista Médica Uruguay*, 12, 28-38.

- Scarpassa, V., Bacry Cardoza, T., & Cardoso Junior, R. (2008). Population Genetics and Phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 78, 895-903.
- Schiessman, D., & Calbeiro, L. (1974). Review of status of yellow fever and *Aedes aegypti* eradication programs in America. *Mosquito News*, 34, 1-9.
- Scott, T., Clark, G., Lorenz, L., Amerasinghe, P., Reiter, P., & Edman, J. (January de 1993). Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. *Journal of Medical Entomology*, 30(1), 94-99.
- Staples, E., Breiman, R., & Powers, A. (2009). Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 942-948.
- Staples, E., Hills, S., & Powers, A. (2015). *Centers for Disease Control and Prevention*. Recuperado el 10 de October de 2015, de Chikungunya: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/chikungunya>
- Stewart Ibarra, A. M., Muñoz, A. G., Ryan, S. J., Beltrán Ayala, E., Borbor-Cordova, M. J., Finkelstein, J. L., . . . Rivero, K. (2014). Spatiotemporal clustering, climate periodicity, and social-ecological risk factors for dengue during an outbreak in Machala, Ecuador, in 2010. *BMC Infectious Diseases*, 14(610).
- Stewart Ibarra, A., Luzadis, V., Borbor Cordova, M., Silva, M., Ordoñez, T., Beltrán Ayala, E., & Ryan, S. (2014). A social-ecological analysis of community perceptions of dengue fever and *Aedes aegypti* in Machala, Ecuador. *BMC Public Health*, 14(1135).
- Stewart Ibarra, A., Ryan, S., Beltrán, E., Mejía, R., Silva, M., & Muñoz, A. (2013). Dengue Vector Dynamics (*Aedes aegypti*) Influenced by Climate and Social Factors in Ecuador: Implications for Targeted Control. *PLoS ONE*, 8(11).
- Sudeep, A., & Parashar, D. (November de 2008). Chikungunya: an overview. *The Journal of Biosciences*, 33(4), 443-449.
- Sukonthabhirom, S., Saengtharapip, S., Jirakanchanakit, N., Rongnoparut, P., Yoksan, S., Daorai, A., & Chareonviriyaphap, T. (2009). Genetic Structure Among Thai Populations of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, 34(1), 43-49.

- Tabachnick, W. (1991). Evolutionary genetics and arthropod borne disease: the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. En K. Kim, & B. McPherson (Edits.), *Evolution of insects pests* (págs. 413-422). New York: John Wiley & Sons.
- Tajima, F. (1989). Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics Society of America*, 585-595.
- Thirion Icaza, J. (2003). *El mosquito Aedes aegypti y el dengue en México*. México: Bayer Environmental Science.
- Urdaneta-Marquez, L., & Failloux, A.-B. (March de 2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(2), 253-261.
- Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K., Holmes, E., & Weaver, S. (2011). Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(7), 532-541.
- Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., & Lourenco-de-Oliveira, R. (June de 2014). High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *Journal of Virology*, 88(11), 6294-6306.
- Vela Chauvín, M. (2014). *Variación genética de Nyssomia trapidoi (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador*. Tesis de pregrado, Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Quito.
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A., Watowich, S., Gubler, D., & Weaver, S. (April de 2000). Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *Journal of Virology*, 74(7), 3227-3234.
- Weaver, S., & Reisen, W. (february de 2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328-345.
- World Health Organization. (1986). *Prevention and Control of Yellow Fever In Africa*. Geneva.
- World Health Organization. (May de 2015). *Chikungunya*. Recuperado el 10 de October de 2015, de World Health Organization: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>

- World Health Organization. (May de 2015). *Dengue and severe dengue*. Recuperado el 10 de October de 2015, de World Health Organization:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- Wright, S. (1978). *Evolution and the Genetics of Populations* (Vol. 3). Chicago: University of Chicago Press.
- Xi, Z., Ramirez, J., & Dimopoulos, G. (July de 2008). The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection . *PLoS Pathogens*, 4(7).
- Yan, G., Romero-Severson, J., Walton, M., Chadee, D., & Severson, D. (June de 1999). Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Mol Ecol*, 8(6), 951-963.
- Yáñez, P., Mamani, E., Valle, J., García, M., León, W., Villaseca, P., . . . Cabezas, C. (2013). Variabilidad genética del *Aedes aegypti* determinada mediante el análisis del gen mitocondrial Nd4 en once áreas endémicas para dengue en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(2), 246-250.
- Zeng, K., Fu, Y.-X., Shi, S., & Wu, C.-I. (November de 2006). Statistical tests for detecting positive selection by utilizing high-frequency variants. *Genetics*, 174(3), 1431-1439.
- Zhang, C., Rannala, B., & Yang, Z. (2014). Bayesian Species Delimitation Can Be Robust to Guide-Tree Inference Errors. *Systemic Biology*, 1-12.

## 12 ANEXOS

**Anexo 1.-** Clave para adultos del género *Aedes*. Adaptado de Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Transmission de Leopoldo M. Rueda

### Clave para adultos del género *Aedes* y algunos de sus subgéneros

1. Head. Vertex with broad erect forked scaled numerous, not restricted to occiput (Fig. 1); proboscis with a white band (Fig.2).....2

Head. Vertex with erect forked scaled not numerous, restricted to occiput (Fig.3); proboscis without a white band (Fig.4).....3

2(1). Abdomen. Speckled dorsally (Fig.5).....*Aedes (Diceromyia furcifer)*<sup>a</sup>

Abdomen. Not speckled dorsally (Fig.6).....*Aedes (Diceromyia) taylori*<sup>b</sup>

3(1). Leg.Femora with knee-spot (Fig.7); midfemur without 3 large white patches on anterior surface (Fig.8); hindtarsomere 5 entirely White (Fig.9).....4

Leg. Femora without White knee-spot (Fig.10); midfemur with 3 large white patches on anterior surface (Fig.11); hindtarsomere 5 entirely dark (Fig.12).....5

4(3). Thorax. Scutum black or Brown with a pair of submedian-longitudinal white stripes, but without median-longitudinal white stripe, or with white lyre-shaped markings (Fig.13); mesepimeron with two well separated with scale patches (Fig.14). Leg. Anterior portion of

midfemur with a longitudinal white stripe (Fig.15). Head. Clypeus with white scale patches (Fig.16).....***Aedes (Stegomyia) aegypti***

Thorax. Scutum with a narrow median-longitudinal white stripe (Fig.17); mesepimeron with white scale patches no separated, forming V-shaped with patch (Fig.18). Leg. Anterior portion of midfemur without a longitudinal white stripe (Fig.19). Head. Clypeus without scale patches (Fig.20)..... *Aedes (Stegomyia) albopictus*

5(3). Leg. Hindfemur anteriorly with a large pale band at base and with 2 large, white patches on median and apical areas (Fig.21); hindtarsomere 4 entirely dark (Fig.22)

..... *Aedes (Stegomyia) luteocephalus*<sup>c</sup>

Leg. Hindfemur anteriorly without such a pale band at base, or hindfemur anteriorly with 3 large, white patches on subbasal, median and apical areas (Fig.23) hindtarsomere 4 not entirely dark, usually with short subbasal white band (Fig.24)...6

6(5). Thorax. Fossal white patch narrow at base along scutal margin (Fig.25<sup>a</sup>); prescutellar line of narrow yellow scales absent or sometimes with a few narrow yellow scales (Fig.25<sup>B</sup>).

Leg. Hindtibia anteriorly dark with a white stripe on posterior surface in basal 0.20 or more (Fig.26).....***Aedes (Stegomyia) africanus***<sup>d</sup>

Thorax. Fossal white patch broad at base along scutal margin (Fig.27 A); prescutellar line of narrow yellow scales well developed and with some broad, flat metallic white scales posteriorly (Fig. 27 B). Leg. Hindtibia anteriorly dark with a white stripe on posterior surface in basal 0.10 or less (Fig. 28)... *Aedes (Stegomyia) opok*<sup>e</sup>

## Anexo 2. Haplotipos encontrados en las muestras de *Ae. aegypti* en el Ecuador

- Haplotipo 1

TTTATTAAGTTTTGAATTTGTGGTTTAATATTAATAGCTAGAGAAGGGGTAGTTCGTTATAATAATTA  
 TGTTAATTTATTTTTATTATAAATTGTTTTTTACTTTTAATATTAATTTTTACTTTTAGTTCATAAGTAT  
 ATTTATATTTTATTTATTTTTGAAAGAAGTCTAATCCAACCTTATTTTTAATTTTAGGTTGAGGATAT  
 CAACCTGAACGTTTACAGGCGGGGATTTATTTATTTTATACTTTACTGGCTTCGTTGCCGTTATTA  
 ATTGGTATTTTTATATTA AAAATGATAATTATACAATGAATTTTATTATATTAAGTTATAAAAATTTAT  
 ATAATTTAGATTTTTTATATTTATGTATAATTTTTGCTTTTTAGTAAAAATGCCAATATTTTTAGTTCAT  
 TTATGACTACCAAAGGCTCATGTAGAAGCCCCTGTCTCAGGGTCTATAATTTGGCAGGTGTTTTATT  
 AAAATTAGGAGGGTATGGCTTATTACGGGTATTTCTTTAATGCAAGTTTLAGGTATAAAAATTTAATT  
 ATATTTGAATTAGTATTAGCTTAATTGGGGGAGTTTTAGTTAGTTAATTTGTTTATGACAAATAGACT  
 TAAAGGCTTTAATTGCTTATTCTTCGGTTGCTCATATAGGGATCGTATTAAGAGGATTAATAACAATA  
 ACTTATTGGGGATTAATGGGTCTATACTTTAATAATTGCTCATGGGTTA

- Haplotipo 2

TTTATTAAGTTTTGAATTTGTGGTTTAATATTAATAGCTAGAGAAGGGGTAGTTCGTTATAATAATTA  
 TGTTAATTTATTTTTATTATAAATTGCTTTTTACTTTTAATATTAATTTTTACTTTTAGTTCATAAGTAT  
 ATTTATATTTTATTTATTTTTGAAAGAAGTTAATCCAACCTTATTTTTAATTTTAGGTTGAGGGTAT  
 CAACCTGAACGTTTACAGGCGGGGATTTATTTATTTTATACTTTACTGGCTTCGTTGCCGTTATTA  
 ATTGGTATTTTTATATTA AAAATGATAATTATACAATAAATTTTGTTATATTAAGTTATAAAAATTTAT  
 ATAATTTAGATTTTTTATATTTATGTATAATTTTTGCTTTTTAGTAAAAATACCAATATTTTTAGTTCAT  
 TTATGACTACCAAAGGCTCATGTAGAAGCTCCCGTTTLAGGGTCTATAATTTGGCAGGTGTTTTATT  
 AAAATTAGGAGGGTATGGTTTATTACGGGTATTTCTTTAATGCAAGTTTLAGGTATAAAAATTTAATT  
 ATATTTGAATCAGTATTAGTTAATTGGAGGAGTTTTAGTTAGTTAATTTGTTTATGACAAATAGATT  
 TAAAGGCTTTAATTGCTTATTCTTCGGTTGCTCATATAGGGATTGTATTAAGAGGATTAATAACAATA  
 ACTTATTGAGGATTAATGGGTCTATACTTTAATAATTGCTCATGGGTTA

## 13 TABLAS

**Tabla 1.** Lugares y fechas de recolección de los especímenes de *Aedes aegypti*

Provincia	Lugar de recolección	Fecha de recolección	Número de especímenes
Esmeraldas	Parroquia Bartolomé Ruíz	Agosto-septiembre 2014	16
Guayas	Flor de Bastión	Octubre 2014	15
El Oro	Sector la Florida	Mayo 2014	13
Galápagos	San Cristóbal	Agosto-septiembre 2014	11
Galápagos	Santa Cruz	Agosto-septiembre 2014	4

**Tabla 2.** Reacción de PCR para el segmento del gen mitocondrial NDH4

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H <sub>2</sub> O de PCR		10.8
Buffer	5X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTPs	2mM	2.5
ND4F	10 uM	1.25
ND4R	10 uM	1.25
Taq	5U	0.2
ADN		2

**Tabla 3.** Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación del segmento gen mitocondrial NDH4.

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización cíclica	92°C	30 seg	38
Annealing	50°C	1 min	
Extensión	72°C	40 seg	
Extensión final	72°C	5 min	1

**Tabla 4.** Número de haplotipos, diversidad de haplotipos (Hd) y nucleótidos ( $\pi$ ) identificadas en las poblaciones de *Aedes aegypti*

Lugar de monitoreo	Muestras	Número de haplotipos	Hd	$\pi$
Esmeraldas	16	2	0.458	0.01049
Guayaquil	15	2	0.476	0.01088
Machala	13	2	0.385	0.00880
San Cristóbal	11	2	0.509	0.01162
Santa Cruz	4	1	0	0
Todos (No agrupado)	59	2	0.497	0.01141

H $\pm$ SD: Diversidad de Haplotipos.  $\pi \pm$  SD: Diversidad de nucleótidos.

**Tabla 5.** Pruebas de neutralidad de las poblaciones de *Ae. aegypti* del Ecuador

Poblaciones de <i>Aedes egypti</i>	Tajima's D	Fu & Li's F*	Fu & Lis D *
Esmeraldas	2.06562 <sup>b</sup>	1.53348 <sup>b</sup>	1.93819 <sup>b</sup>
Guayaquil	2.21544 <sup>b</sup>	1.53072 <sup>b</sup>	1.97565 <sup>b</sup>
Machala	0.81741 <sup>a</sup>	1.52756 <sup>b</sup>	1.52927 <sup>a</sup>
San Cristóbal	2.19941 <sup>b</sup>	1.53081 <sup>b</sup>	11.182 <sup>b</sup>
Santa Cruz	-	-	-
Todos	3.98017 <sup>b</sup>	1.63289 <sup>b</sup>	2.91116 <sup>b</sup>

a: P >0.10 no significativo; b <0.05 significativo

**Tabla 6.** Análisis de AMOVA para las muestras de *Aedes aegypti* de Ecuador. La estructura poblacional analizada es sin jerarquía.

<b>Tipo de variación</b>	<b>Suma de cuadrados observada</b>	<b>Varianza estimada</b>	<b>Porcentaje de variación (%)</b>
Entre poblaciones	73.407	0.82953	8.54116
Dentro de las poblaciones	479.660	8.88260	91.45884
<b>Total</b>	553.068	9.71213	

FST: 0.08541 ( $p < 0.05$ )

**Tabla 7.** Análisis de AMOVA para las muestras de *Aedes aegypti* de Ecuador. La estructura evaluada es grupo 1 (Poblaciones continentales) y grupo 2 (Poblaciones insulares).

<b>Tipo de variación</b>	<b>Suma de cuadrados observada</b>	<b>Varianza estimada</b>	<b>Porcentaje de variación (%)</b>
Entre grupos	0.659	-0.61805	-14.91419
Entre poblaciones dentro de los grupos	46.909	1.0648	24.52879
Dentro de las poblaciones	202.262	3.74560	90.38540
<b>Total</b>	<b>249.831</b>	<b>4.14403</b>	

FSC: 0.21345 ( $p < 0.05$ )

FST: 0.09615 ( $p < 0.05$ )

FCT: -0.14914 ( $p > 0.05$ )

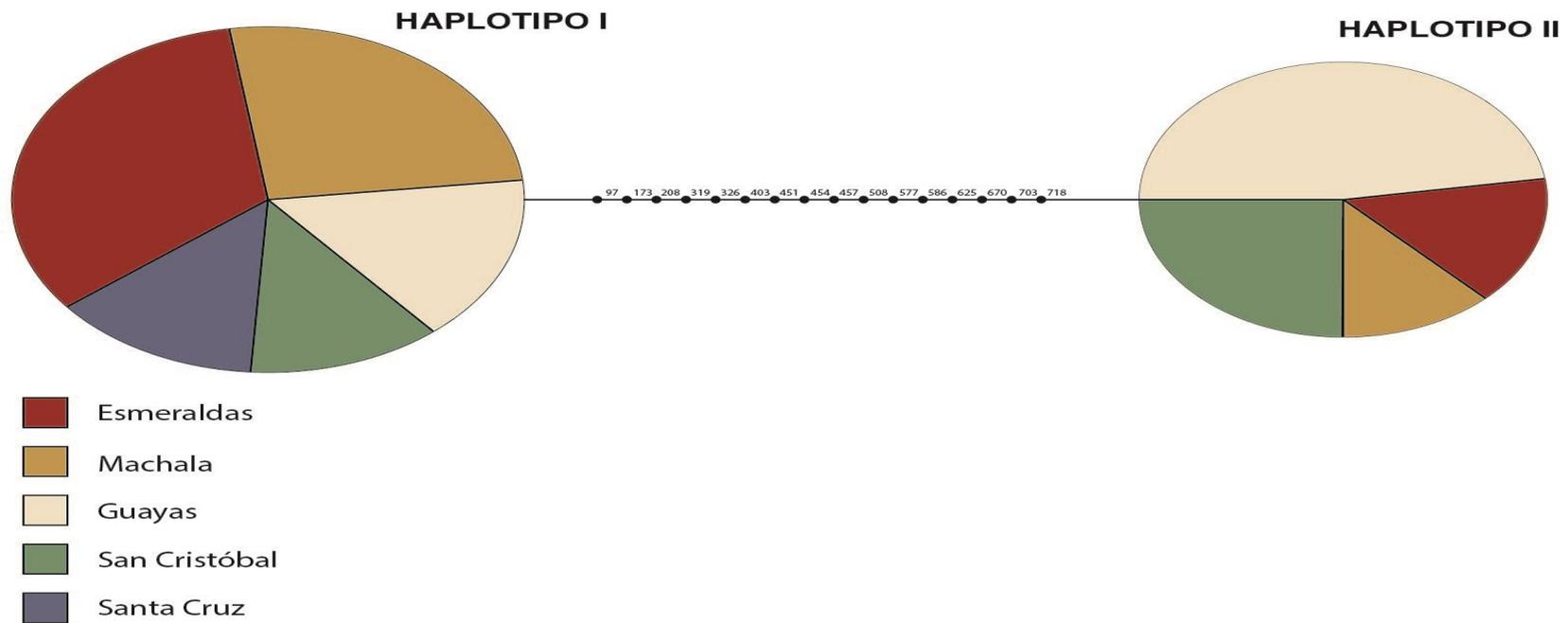
**Tabla 8.** Lista de individuos dentro de los grupos de Haplotipos – Grupo 1 y Grupo 2- en el Ecuador.

<b>Grupo</b>	<b>Haplotipo</b>
1	MA001
	MA002
	MA011
	MA017
	MA018
	MA020
	MA030
	MA047
	MA046
	MA048
	ES001
	ES002
	ES003
	ES004
	ES015
	ES016
	ES020
	ES021
	ES022
	ES024
	ES026
	GU021
	GU024
	GU026
	GU028
	GU029
	STAC1
	STAC2
	STAC3
	STAC4
	GAL005
	GAL005_2
	GAL028
	GAL043_2

II	MA005
	MA021
	MA036
	ES013
	ES017
	ES025
	ES027
	ES005
	GU007
	GU009
	GU012
	GU011
	GU013
	GU014
	GU015
	GU016
	GU022
	GU027
	GU027_2
	GAL008
	GAL010
	GAL006_2
	GAL023
	GAL032
GAL043	

## 14 GRAFICOS:

**Gráfico 1:** Red de haplotipos de la poblaciones de *Aedes aegypti* en Ecuador.



**Gráfico 2.** Árbol filogenético por medio de inferencia Bayesiana que muestra las relaciones filogenéticas entre 59 haplotipos individuales.

