



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)  
MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)  
EN POBLACIONES CON ALTO ÍNDICE DE INFESTACIÓN EN  
PARAGUAY**

**SADY CAMILA BRITTEZ LÓPEZ**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Noviembre, 2021



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN**  
**CIENCIAS DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)  
MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)  
EN POBLACIONES CON ALTO ÍNDICE DE INFESTACIÓN EN  
PARAGUAY**

**SADY CAMILA BRITTEZ LÓPEZ**

**Tutor: PROF. NILSA ELIZABETH GONZÁLEZ PhD.**

**Co-tutor: PROF. ANA MARÍA AYALA PhD.**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Noviembre, 2021



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA PROF. DRA. NILSA ELIZABETH GONZÁLEZ BRÍTEZ DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN (IICS-UNA)

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Diversidad genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mediante el empleo de marcadores microsatélites (SSR) en poblaciones con alto índice de infestación en Paraguay”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante Sady Camila Britez López para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 29 días del mes de octubre de 2021.

Tutora: Prof. Dra. Nilsa Elizabeth Gonzalez Brítez



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA PROF. DRA. ANA MARÍA AYALA DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE DIVERSIDAD Y ECOLOGÍA ANIMAL [IDEA] - CENTRO CIENTIFICO TECNOLOGICO CONICET [CCT CÓRDOBA] DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA - ARGENTINA.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Diversidad genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mediante el empleo de marcadores microsatélites (SSR) en poblaciones con alto índice de infestación en Paraguay”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante Sady Camila Britez López para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección. Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 29 días del mes de octubre de 2021.

Co-Tutora: Prof. Dra. Ana María Ayala



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



LA B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Diversidad genética de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mediante el empleo de marcadores microsatélites (SSR) en poblaciones con alto índice de infestación en Paraguay”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante Sady Camila Britez López para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección del/la docente investigadora PROF. DRA. NILSA ELIZABETH GONZÁLEZ BRITZ considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los \_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de 2021.

---

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.

Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN  
CIENCIAS DE LA SALUD  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Aedes Aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)  
MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)  
EN POBLACIONES CON ALTO ÍNDICE DE INFESTACIÓN EN  
PARAGUAY**

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

**SADY CAMILA BRITTEZ LÓPEZ**

Aprobado el ---- de 2021

Tribunal examinador:

Evaluador 1: Ana Ayala PhD. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud,  
Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

Evaluador 2: Magaly Martínez PhD. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la  
Salud, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

Evaluador 3: Pastor Pérez PhD. Facultad Politécnica, Universidad Nacional de  
Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

Evaluador 4: Adolfo Borges PhD. Centro para el Desarrollo de la Científica.  
Asunción, Paraguay.

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por ser el impulso para cumplir mis metas, darme fuerzas para superar cualquier obstáculo y brindarme su apoyo incondicional.

A la Dra. Nilsa González, por confiar en mí, y permitirme el desarrollo de esta investigación, por brindarme su apoyo ante las dificultades y darme palabras de aliento y seguridad para seguir adelante, por ser un ejemplo de profesional y colega, por ser guía al inicio de mi carrera profesional.

A la Dra. Ana María Ayala por todos los conocimientos impartidos, por enseñarme que a pesar de las distancias es posible ser un excelente docente y asesor, por su paciencia, por ser mi maestra en el desarrollo de esta nueva línea de investigación en el país.

Al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud por permitirme desarrollar el trabajo en sus instalaciones. A los integrantes del equipo de genetistas del Instituto de Diversidad y Ecología Animal de la Universidad de Córdoba, por tan valiosa colaboración.

A mis compañeros de maestría que se convirtieron en verdaderos amigos, por siempre brindarme ánimos hasta llegar a la meta, también a amigos y colegas de la FaCEN que siempre estuvieron presentes a lo largo de estos años.

A la Lic. Leticia Rolón, por su valiosa colaboración durante el procesamiento de muestras. También a mis compañeras del Insectario por toda su paciencia, por hacer que mis días enteros en el laboratorio sean más divertidos.

Al Ing. Andrés Glade, por su aporte y el apoyo emocional hasta culminar esta etapa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apostar al crecimiento y desarrollo educativo de jóvenes paraguayos.

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)  
MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)  
EN POBLACIONES CON ALTO ÍNDICE DE INFESTACIÓN EN  
PARAGUAY**

**Sady Camila Britez López\*, Nilsa González Britez\*\***

\*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\*Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

**RESUMEN**

*Aedes aegypti* es el principal vector de varias arbovirosis, principalmente del virus del dengue. En Paraguay, el dengue es endémico, y se considera uno de los países con las tasas de incidencia más altas de la región. Los estudios de diferenciación de poblaciones de mosquitos permiten inferir caracteres de importancia epidemiológica como los procesos de transmisión de enfermedades debido al desplazamiento de sus vectores, además, el conocimiento de la variabilidad genética de estos vectores podría contribuir con el mejoramiento del diseño y desarrollo de los programas de manejo de control vectorial.

Teniendo en cuenta la problemática sanitaria que este vector genera en el país, este estudio consistió en determinar la diversidad y estructura génica de poblaciones de *Aedes aegypti* capturados en las ciudades de Luque y San Lorenzo por medio del análisis de loci microsatélites. Se evidenció un alto nivel de polimorfismo, superior a lo reportado en la región y déficit de heterocigotas ( $f$  media = 0,068). Por otra parte, la divergencia genética observada entre poblaciones fue baja ( $F_{ST}=0,037$  y  $R_{ST}=0,024$ ) sugiriendo la presencia de un alto nivel de flujo génico que conduciría a homogeneizar las poblaciones, y esto a su vez podría estar mediado por transporte pasivo. El análisis de agrupamiento bayesiano indicó la presencia de dos *clusters* genéticos distintos con ancestrías mixtas, evidenciando una leve estructuración poblacional en el área de estudio.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, microsatellites, genetic polymorphism, population genetic structure.

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Aedes aegypti* (DIPTERA: CULICIDAE)  
MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)  
EN POBLACIONES CON ALTO ÍNDICE DE INFESTACIÓN EN  
PARAGUAY**

**Sady Camila Britez López\*, Nilsa González Britez\*\***

\*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

\*\*Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

**ABSTRACT**

*Aedes aegypti* is the main vector of several arboviruses, mainly dengue virus. In Paraguay, dengue is endemic and is considered one of the countries with the highest incidence rates in the region. Studies on the differentiation of mosquito populations allow inferring epidemiologically important characters such as disease transmission processes due to the movement of their vectors. In addition, knowledge of the genetic variability of these vectors could contribute to the improvement of the design and development of vector control management programs.

Taking into account the sanitary problems generated by this vector in the country, this study consisted of determining the genetic diversity and structure of *Aedes aegypti* populations captured in the cities of Luque and San Lorenzo by means of microsatellite loci analysis. A high level of polymorphism was found, higher than that reported in the region, and a deficit of heterozygotes (mean  $f = 0.068$ ). On the other hand, the genetic divergence observed between populations was low ( $F_{ST}=0.037$  and  $R_{ST}=0.024$ ) suggesting the presence of a high level of gene flow that would lead to homogenization of the populations, which could be mediated by passive transport. Bayesian clustering analysis indicated the presence of two distinct genetic clusters with mixed ancestry, evidencing a slight population structuring in the study area. Bayesian clustering analysis indicated the presence of two distinct genetic clusters with mixed ancestries, evidencing a slight population structuring in the study area. Bayesian clustering analysis indicated the presence of two distinct genetic clusters with mixed ancestries, evidencing a slight population structuring in the study area.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, microsatellites, genetic diversity, population structure

## ÍNDICE

-	1. MARCO TEÓRICO .....	1
	- 1.1 Biología de <i>Aedes aegypti</i> : .....	2
	1.1.1 Ciclo de vida: .....	2
	1.1.2 <i>Aedes aegypti</i> como vector de los arbovirus y antecedentes epidemiológicos del Dengue: .....	4
	- 1.2 Genética de poblaciones naturales: .....	4
	1.2.1 Antecedentes de estudios poblacionales de <i>Aedes aegypti</i> : .....	7
	1.2.2 Implicancias epidemiológicas del estudio poblacional de <i>Aedes aegypti</i> : .....	7
	- 1.3 Estimadores para el análisis de diversidad genética: .....	9
	1.3.1 Riqueza alélica: .....	9
	1.3.2 Heterocigosidad: .....	9
	1.3.3 Frecuencia alélica: .....	9
	- 1.4 Estimadores para el análisis de la estructura genética: .....	9
	1.4.1 Estadísticos <i>F</i> de Wright: .....	9
	1.4.2 Estadístico <i>RST</i> ( $\rho$ - <i>ST</i> ) de Slatkin: .....	11
	1.4.3 Pruebas de asignación <i>a posteriori</i> : .....	11
	1.4.4 Distancias genéticas Aislamiento genético por distancia geográfica: .....	12
	- 1.5 Marcadores de diversidad: Microsatélites. ....	12
-	2. OBJETIVOS .....	15
	- 2.1 Objetivo principal: .....	16
	- 2.2 Objetivos específicos: .....	16
-	3. METODOLOGÍA .....	17
	- 3.1 Área de estudio: .....	18
	- 3.2 Estrategia de muestreo: .....	19
	- 3.3 Procedimiento de campo y de laboratorio: .....	21
	3.3.1 Obtención de muestras biológicas, colecta de huevos de mosquitos: .....	21
	3.3.2 Extracción de material genético (ADN): .....	23
	3.3.3 Cuantificación y dilución de ADN: .....	23
	3.3.4 Amplificación de Microsatélites: .....	23

- 3.4 Análisis de los resultados: .....	27
3.4.1 Puntuación y delimitación de tamaños alélicos: .....	27
3.4.2. Análisis de diversidad y estructura genética: .....	27
- 4. RESULTADOS.....	30
- 4.1 Estandarización de la amplificación por PCR de 10 loci microsatélites para la caracterización del perfil genético de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> : .....	31
4.1.1 Amplificación de microsatélites (SSR-PCR) de <i>Ae. aegypti</i> : .....	32
- 4.2 Estimación de parámetros de diversidad genética:.....	33
- 4.3 Determinación del grado de variabilidad y estructuración genética en diferentes poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> : .....	33
- 4.4 Estimación de niveles de diferenciación genética y estructura poblacional: .....	36
- 4.5 Determinación de <i>clusters</i> genéticos en base a las similitudes detectadas en las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> :.....	42
- 5. DISCUSIÓN .....	45
- 5.1 Diversidad genética de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> de Luque y San Lorenzo: .....	46
- 5.2 Estructura poblacional de <i>Ae. aegypti</i> : .....	49
- 5.3 Determinación de <i>clusters</i> genéticos: .....	52
- 6. CONCLUSIÓN .....	54
- 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
- 8. ANEXOS .....	63

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa de Paraguay (izquierda) y del Departamento Central (derecha).....21
- Figura 2. Perfil genético obtenido para 10 loci microsatélites.....32
- Figura 3. Prueba de Mantel.....38
- Figura 4. Porcentajes de varianza molecular (AMOVA) para *FST* en poblaciones de *Ae. aegypti*.....40
- Figura 5. Porcentajes de varianza molecular (AMOVA) para *RST* en poblaciones de *Ae. aegypti*.....42
- Figura 6. Agrupamiento genético poblacional.....43
- Figura 7. Agrupamiento bayesiano obtenido con Structure para  $k=2$ ...44

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Datos de identificación de cada punto de muestreo incluidos en el estudio.....	18
- Tabla 2. Secuencia de cebadores y sus modificaciones con fluoróforos utilizados en el estudio.....	24
- Tabla 3. Concentración final de mix de PCR para la amplificación de 10 loci Microsatélites.....	25
- Tabla 4. Condiciones de ciclado para cada cebador.....	26
- Tabla 5. Resumen de condiciones óptimas de amplificación por PCR de microsatélites específicos para <i>Ae. aegypti</i> .....	31
- Tabla 6. Rangos de tamaños alélicos (pb), cantidad de alelos y tamaños alélicos amplificados para cada locus.....	34
- Tabla 7. Parámetros de variabilidad genética estimados para los 8 loci microsatélites analizados en las poblaciones de estudio.....	35
- Tabla 8. Matriz pareada FST vs significancia estadística (P-value) de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> incluidas en el estudio.....	37
- Tabla 9. Matriz pareada RST vs significancia estadística (P-value) de las poblaciones de <i>Ae. aegypti</i> incluidas en el estudio.....	37
- Tabla 10. Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) e índices de diferenciación F (Weir y Cockerham, 1984) calculadas por el software GenalEx v0.6.5 para 8 loci microsatélites, en los municipios Luque y San Lorenzo. ....	39
- Tabla 11. Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) e índices de diferenciación R (Slatkin, 1995) calculadas por el software GenalEx v0.6.5 para 8 loci microsatélites, en los municipios Luque y San Lorenzo.....	41

**ABREVIATURAS**

- DENV-1: serotipo 1 del virus del dengue
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido ribonucleico
- H-W: Hardy & Weinberg
- RA: Riqueza alélica
- AE: Alelos exclusivos
- Ho: Heterocigosis observada
- He: Heterocigosis esperada
- FIS: Coeficiente de endogamia
- FST: Coeficiente de fijación
- FIT: Coeficiente de endogamia de un individuo respecto a la población total
- RST: Distancia genética de Slatkin (1995)
- SB: *Stutter band*, bandas productos de *stuttering*
- LAD: *Large allele dropout*, amplificación diferencial del alelo corto
- NA: *Null alleles*, alelos nulos.
- AMOVA: Análisis de varianza molecular
- MCMC: Cadena de Markov Monte Carlo
- $\Delta K$ : Delta k
- k: *Clusters*, Número más probable de poblaciones.
- LnP(K): Logaritmo natural de la probabilidad de pertenencia
- F: *Forward*, directo
- R: *Reverse*, inverso
- Tm: *Annealing temperature*, temperatura de hibridación
- TBE: TRIS-Borato-EDTA, solución tampón
- dNTP's: *Desoxyribonucleotide triphosphate*, desoxirribonucleótido trifosfato
- pb: Pares de bases
- SENEPA: Secretaria Nacional de Erradicación del Paludismo
- IICS: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

- **1. MARCO TEÓRICO**

### - **1.1 Biología de *Aedes aegypti*:**

*Aedes aegypti* (Diptera – Culicidae), es el principal vector de varias arbovirosis (enfermedades virales transmitidas por artrópodos, en inglés arthropod borne virus), principalmente del virus del Dengue (1,2). En regiones tropicales y subtropicales, este mosquito ha sido el principal responsable de la transmisión predominante de uno de los serotipos del virus del dengue (DENV-1), sin embargo, durante los últimos años la co-circulación de los demás serotipos ha sido ampliamente reportada. Además, otras arbovirosis como el Chikungunya y Zika han cobrado relevancia epidemiológica, al tiempo que resurgió la transmisión de la fiebre amarilla (3).

Este mosquito tiene actividad diurna, se mantiene activo durante las primeras horas del amanecer y al atardecer, habitualmente reposa sobre superficies oscuras o zonas con alto porcentaje de humedad. Los hábitos antropofílicos hacen que su adaptación a las comunidades sea óptima, permitiéndoles completar su ciclo de vida dentro del domicilio humano, alimentarse *in situ* y colocar sus huevos en criaderos de agua artificial principalmente en depósitos de agua limpia, en recipientes de todo tipo, neumáticos, piletas, materiales de construcción, y ocasionalmente en sitios naturales como axilas de las bromeliáceas y bananeros, huecos de árboles y otros (4).

Al mismo tiempo, este proceso de adaptación, se ve fuertemente influenciado por el incremento continuo de la migración de las poblaciones humanas hacia zonas más boscosas, ya sea para el uso de la tierra, para la cría de ganado o el monocultivo de especies agrícolas o bien para construir asentamientos con nuevas poblaciones (5).

La dispersión de vuelo de este vector es limitada, según estudios realizados por lo general una hembra adulta no sobrepasa el rango de 50 a 100 m de distancia de vuelo, es decir, no se desplaza demasiado de su nicho ecológico no obstante, se observaron rangos de dispersión de hasta 840 m utilizando cepas marcadas genéticamente (6).

#### **1.1.1 Ciclo de vida:**

El desarrollo ontogénico de este insecto holometábolo (metamorfosis completa), está comprendido por estados acuáticos inmaduros del mosquito (larvas y pupas) y la fase adulta alada de vida aérea (4,7).

Después de que el mosquito hembra se haya alimentado con sangre, puede colocar entre 50 a 200 huevos que miden aproximadamente 1mm de longitud (7) son de forma alargada de coloración negro brillante, en condiciones ideales de humedad y temperatura, eclosionan en un lapso de 24 a 48 horas luego de la oviposición, sin embargo, este lapso puede prolongarse cuando las temperaturas son bajas (8). Los huevos se caracterizan por permanecer latentes, pueden sobrevivir durante muchos meses en climas adversos hasta que las condiciones ambientales favorezcan su eclosión, lo cual es un factor fundamental como éxito en la disseminación de este vector (4). Luego de la eclosión de estos huevos, se inicia la fase larval con cuatro estadios exclusivamente acuáticos. Estas larvas poseen respiración aérea y se alimentan por filtración de material en suspensión, este periodo es el de mayor alimentación y crecimiento (7,8).

Posteriormente, las larvas mudan al estado de pupa, en el cual presentan un estado de reposo y no son capaces de alimentarse. En esta fase se producen importantes modificaciones anatómico-fisiológicas hasta la aparición de los adultos, éstas se mantienen en la superficie del agua debido a su flotabilidad y como consecuencia facilitan la emergencia del insecto (4,7). El último estado es el adulto alado, al emerger de la pupa, permanece en reposo, permitiendo el endurecimiento del exoesqueleto y las alas. Las formas adultas se caracterizan por tener coloración oscura, con franjas plateadas en las patas y una estructura en forma de lira también plateada en el tórax por lo que es de fácil reconocimiento (9). Tienen dimorfismo sexual, son fitófagos ambos géneros, sin embargo, sólo la hembra es hematófaga (necesita de proteínas disponibles en la sangre para la producción de sus huevos); dentro de las 24 horas siguientes a la emergencia pueden aparearse, iniciándose la etapa reproductiva del insecto. El apareamiento en general se realiza durante el vuelo, pero en algunas ocasiones se lleva a cabo en una superficie horizontal o vertical (4,7,8).

La duración del ciclo completo depende de las condiciones ambientales, pero en condiciones óptimas puede variar entre 7 y 14 días aproximadamente. Las formas adultas tienen un promedio de vida de una semana en los machos y aproximadamente de un mes en las hembras (7).

### **1.1.2 *Aedes aegypti* como vector de los arbovirus y antecedentes epidemiológicos del Dengue:**

La transmisión de las arbovirosis ocurre fácilmente, debido a que el mosquito hembra se alimenta de sangre del huésped humano a través de la picadura. De este modo, si el huésped se encuentra infectado con algún virus, el mosquito puede transportarlo hasta un siguiente huésped, propagando de esta manera la infección (10).

Casi la mitad de la población mundial, alrededor de 4000 millones de personas, viven en zonas de riesgo con alta prevalencia de dengue, cada año aproximadamente 100 millones de ellas se enferman a causa de la infección y 40.000 mueren por dengue grave (11).

En Paraguay, el dengue es endémico, y se considera uno de los países con las tasas de incidencia más altas de la región, con 444,5 casos por cada 100.000 habitantes, según la Organización Mundial de la Salud (12).

A finales del 2019 e inicios del 2020, se reportó el último gran brote epidémico, el mayor de las dos últimas décadas, con un total de 177.104 casos y 53 fallecidos notificados como datos oficiales del Ministerio de Salud (13).

Debido a la problemática que este vector genera en salud pública, con episodios epidémicos muy elevados a lo largo del año, a nivel regional y local los entes públicos emplean programas de control vectorial y vigilancia entomológica. Estos programas tienen como objetivo principal disminuir la abundancia y distribución de este vector, con la finalidad de evitar altos índices de infestación y consiguientes brotes epidémicos. Para el cumplimiento de estos objetivos existen ciertas estrategias que utilizan datos basados en estudios de identificación, distribución y monitoreo de las poblaciones de mosquitos, así como de la diversidad y estructura genética de sus poblaciones (14).

#### **- 1.2 Genética de poblaciones naturales:**

Los individuos de una especie en general no viven aislados, sino que se agrupan en poblaciones, al menos en alguna parte de su ciclo de vida. La población mendeliana o demo se puede definir como un grupo espacio-temporal de individuos de la misma especie, que viven en un área geográfica determinada, donde cada miembro puede potencialmente aparearse con otro miembro de la misma población (15,16).

La genética de poblaciones es la disciplina que estudia los cambios de las frecuencias alélicas en el tiempo y el espacio, analizando las fuerzas evolutivas que los determinan de generación en generación. En los estudios poblacionales se obtienen datos que analizan las frecuencias alélicas, que posteriormente permiten estimar las distancias genéticas entre individuos o entre poblaciones, y pueden conducir a realizar inferencias sobre la estructuración y filogenia de una determinada población.

La diversidad o variabilidad genética se puede definir como variaciones heredables que ocurren en un organismo y entre los individuos de una especie que conforman una población, las cuales responden a variaciones ambientales, incluidos los efectos de la perturbación humana, por ende, es determinante de los procesos de adaptación (17). Estas variaciones se originan por medio de mutaciones (inserciones o deleciones) que se producen durante el proceso de recombinación en la meiosis, dando lugar a la variación en las frecuencias alélicas (18).

La variabilidad genética constituye la base del progreso genético (17) y puede ser medida a través de diversos estadísticos que son capaces de cuantificar la variabilidad genética y pueden resumir la información a términos más manejables. Cada uno de estos estadísticos representa diferentes aspectos acerca de la variabilidad en una población y su utilidad práctica estará en función al propósito del estudio. De esta forma, los más empleados son: porcentaje de loci polimórficos, número medio de alelos por locus, la heterocigosidad (puede ser esperada y observada), el coeficiente de endogamia, diferentes en las frecuencias génicas, entre otros (19).

Esta variación está determinada por múltiples factores que varían considerablemente entre las poblaciones. Para una población ideal (con ausencia de mutación, migración, selección y ocurrencia de apareamientos al azar entre individuos de reproducción sexual), el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) supone que las frecuencias alélicas se mantienen constantes e inalterables de una generación a otra; esto se debe a que el tamaño de la población se considera lo suficientemente grande para que no se produzcan desviaciones estocásticas de estas frecuencias en el proceso de formación de cigotos (16). Sin embargo, las poblaciones tienen un tamaño finito y las frecuencias alélicas pueden modificarse de una generación a la siguiente debido a fuerzas evolutivas que influyen en su estructura genética.

Una fuerza que puede generar cambios en las frecuencias alélicas de una población es la selección natural, que se define como la capacidad relativa de diferentes acervos genéticos de transmitir sus alelos a las generaciones futuras, como resultado de la interacción genotipo-ambiente (20).

El efecto que se genera por muestreo aleatorio de las gametas que formarán parte de las sucesivas generaciones se denomina deriva genética. Este proceso puede provocar la pérdida de alelos que por azar no se encuentren en la muestra de gametas que dará origen a la próxima generación, reduciendo la variabilidad genética y, además, puede conducir a la diferenciación de poblaciones. Dos casos extremos de deriva genética son el “efecto fundador” y el efecto “cuello de botella”. El primero ocurre cuando un grupo reducido de individuos se separa de una población original para dar origen a otra nueva población. La deriva genética en estos casos es el resultado del muestreo de la población de origen, sumado al de una cierta cantidad de generaciones durante las cuales el tamaño de la nueva población permanece reducido. El efecto “cuello de botella” se da en poblaciones que atraviesan una reducción drástica en su tamaño. La severidad del cuello de botella depende del tamaño de la población resultante y de la velocidad a la cual recupera su tamaño. Aun cuando las poblaciones pueden recuperar su tamaño original, el efecto genético de la deriva durante el cuello de botella puede tener impacto a largo plazo, ya que los alelos que se pierden durante este proceso solo se recobrarían por mutación recurrente o por migración. Una fuerza evolutiva opuesta a la deriva genética es el flujo génico, mediante el cual ocurre un intercambio de genes a través de individuos que migran de una a otra población, tendiendo a homogeneizarlas (20).

La estructura genética se refiere a cómo se organiza la variación genética en el espacio y el tiempo, lo cual está determinado por las características ambientales y del paisaje, por la distribución de las poblaciones en relación con dicho paisaje y por los procesos microevolutivos asociados. El primer paso para poder establecer la estructura genética es determinar la variación genética de los individuos de cada población, puede ser descrita mediante las frecuencias alélicas, la heterocigosidad y el número de alelos (18).

Una población en la que los individuos que la integran presentan una diferencia significativa entre las frecuencias de sus alelos, es considerada como una población con alta estructura genética, inversamente los individuos que conforman una población con diferencias casi nulas o idénticas en las frecuencias de sus alelos, nos indican una baja estructura genética en dicha población (21).

### **1.2.1 Antecedentes de estudios poblacionales de *Aedes aegypti*:**

En la región se han reportado estudios similares de genética poblacional utilizando marcadores microsatélites, sin embargo, estas investigaciones se realizaron con distintos loci SSR y a diferentes escalas geográficas, por lo que estos datos no serían comparables entre sí. En Brasil, uno de los primeros estudios de estructuración genética a micro-escala geográfica fue reportado por Costa-Ribeiro *et al.* en 2006 (23) donde para la ciudad de Río de Janeiro, los loci SSR revelaron marcada diferenciación entre las poblaciones de *Ae. aegypti* tanto en el centro de la ciudad como en las afueras ( $F_{ST}=0,33$ ). Posterior a ello, en la ciudad de San Pablo, Wilke *et al.* (2017) (24) evidenció la asociación entre los procesos de urbanización y la densidad de la población humana, respecto a los patrones de estructura poblacional de *Ae. aegypti* y expansión de sus poblaciones, los cuales probablemente pueden atribuirse a la adaptabilidad de la especie a las condiciones ambientales antropogénicas, en estas poblaciones se evidenció correlación entre la estructuración genética determinada y el nivel de urbanización, apoyada por la falta de correlación entre distancias genéticas y geográficas. Paupy *et al.* 2012 en Bolivia identificó una estructuración genética significativa entre las poblaciones geográficas ( $F_{IS}= 0,17$  y  $F_{ST}= 0,06$ ), lo cual relacionó con los procesos de expansión de las poblaciones del vector en el país. En Argentina, Ayala *et al.* (2020) (26) reportó una alta diferenciación genética y la ausencia de un patrón de aislamiento por distancia en la ciudad de Córdoba, sugiriendo fuertemente al transporte pasivo como un importante factor en la conformación del patrón de dispersión de *Ae. aegypti* en el país ( $F_{IS}=0,14$ ) y  $F_{ST}=0,081$ ).

### **1.2.2 Implicancias epidemiológicas del estudio poblacional de *Aedes aegypti*:**

La caracterización de la diversidad y estructura genética consiste en la identificación de subpoblaciones (demos), la estimación de distancias genéticas y el flujo génico existente entre ellas.

Los estudios de diferenciación de poblaciones naturales de mosquitos permiten inferir caracteres de importancia epidemiológica relevantes, tales como procesos de transmisión de enfermedades debido al desplazamiento de sus vectores, este carácter se ve influenciado por factores como las condiciones ecológicas, la dispersión, recombinación de genes y adaptación al medio por parte de las poblaciones de mosquitos (22,23). Otros aportes para el caso del mosquito vector, señalan que el conocimiento de la variabilidad genética podría contribuir con el mejoramiento del diseño y desarrollo de los programas de manejo de control vectorial. Por ejemplo, entre las modificaciones de las estrategias de control dentro de los programas, se podrían incluir la introducción de mosquitos adultos estériles a las poblaciones naturales, la introducción de mosquitos infectados con *Wolbachia sp.* o bien, el tratamiento de larvas con reguladores del crecimiento (24,25). No obstante, cada una de estas estrategias requiere un monitoreo de su efectividad en la reducción de las poblaciones de mosquitos.

A la hora de desarrollar cualquier programa de control, si se identificara un brote epidémico en un área con poblaciones de insectos con baja diversidad genética, se estima que un tratamiento vectorial focal en el entorno inmediato sería suficiente para controlar la propagación tanto del vector como de la enfermedad. Dado que una baja diversidad estaría denotando una estabilidad temporal debido a que las poblaciones se están reproduciendo continuamente *in situ* y sin ingreso de nuevos *stocks* genéticos, es de esperarse que una vez implementado un sistema de control, todos los individuos de la población respondan de manera similar. Contrario a ello, en caso de detectar el brote en una localidad con poblaciones vectoriales genéticamente heterogéneas, los esfuerzos para paliar la propagación de la enfermedad serían más complejos. Debido a que una alta diversidad podría representar presencia de individuos con diferentes competencias vectoriales frente a los patógenos infecciosos o distintas respuestas a compuestos químicos o insecticidas; como consecuencia podría ocurrir que las poblaciones respondan de maneras diferentes a las medidas de control aplicadas (26).

### - **1.3 Estimadores para el análisis de diversidad genética:**

#### **1.3.1 Riqueza alélica:**

Se refiere al número de alelos por locus en base a un tamaño poblacional rarefaccionado (18), es una medida fundamental de la estimación de la diversidad genética, debido a que proporciona información sobre la diversidad de una población, mediante la identificación de alelos exclusivos o compartidos entre los individuos que la componen (27).

#### **1.3.2 Heterocigosidad:**

Es la proporción de individuos heterocigotos en una población, valores de heterocigosis elevados, determinan una elevada diversidad alélica. Según el tipo de indicadores se puede clasificar de la siguiente manera:

##### **1.3.2.1 Heterocigosidad observada ( $H_o$ ):**

Es la proporción de individuos heterocigotos observados entre el total de individuos evaluados en un locus determinado (18).

##### **1.3.2.2 Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ):**

Es la probabilidad que cualquier par de alelos elegidos al azar, para un mismo locus sean diferentes entre sí. Se estima a partir de la sumatoria de las frecuencias obtenidas para cada uno de los alelos bajo la suposición de estar en equilibrio de H-W (18).

#### **1.3.3 Frecuencia alélica:**

Se define como la frecuencia de un alelo en una población determinada. Debido a las fuerzas evolutivas, estas frecuencias alélicas sufren variaciones a lo largo del tiempo y con ello, van configurando la estructura genética de una población (18).

### - **1.4 Estimadores para el análisis de la estructura genética:**

Antes de realizar los análisis de la estructura poblacional es esencial evaluar la variación genética con el objeto de determinar los supuestos básicos en un análisis poblacional. Estos supuestos son tres: a) neutralidad de cada locus b) la inexistencia de alelos nulos y c) independencia de cada locus (28).

#### **1.4.1 Estadísticos $F$ de Wright:**

Entre los estadísticos tradicionalmente más utilizados para estimar la diferenciación y la estructura de la población se destacan los índices  $F$ .

Wright (1951) definió tres F-estadísticas: *FIS*, *FIT* y *FST*, como coeficientes que miden el grado de correlación entre pares de alelos tomados al azar a diferentes niveles de organización (individuos, subpoblación y población) (29).

#### **1.4.1.1 FIS:**

Es el coeficiente que mide la desviación del equilibrio de H-W dentro de las subpoblaciones. Este estadístico estima la desviación entre la heterocigosis observada y esperada debida a apareamientos no al azar dentro de cada subpoblación. Cuando las subpoblaciones se encuentren en equilibrio H-W este coeficiente no difiere significativamente de 0; si existe endogamia, toma valores positivos significativos (deficiencia de heterocigotas), o puede ser negativo en el caso de exceso de heterocigotas (exogamia). Se expresa como:

$$FIS = (H_s - H_i) / H_s$$

#### **1.4.1.2 FST:**

Es una medida de la diferenciación genética entre las subpoblaciones, es decir, representa una estimación de la varianza estandarizada de las frecuencias alélicas entre subpoblaciones. Se puede definir también como una medida de la reducción de la heterocigosis comparado con una población ideal, debido a la subdivisión de las poblaciones (efecto Wahlund) Los valores de este parámetro pueden oscilar entre 0, cuando todas las subpoblaciones tienen las mismas frecuencias génicas y 1, cuando las subpoblaciones tienen fijados distintos alelos.

$$FST = (H_t - H_s) / H_t$$

#### **1.4.1.3 FIT:**

Mide la desviación del equilibrio de H-W para la población total. Estima la desviación entre la heterocigosis observada en cada subpoblación con respecto a la esperada, si la población total se comportara como una unidad panmíctica. Incluye la contribución debida a apareamientos no al azar dentro de las subpoblaciones (FIS) y la debida a la subdivisión en sí misma (FST):

$$FIT = (H_t - H_i) / H_t$$

$H_i$  = Heterocigosis observada de los individuos en cada subpoblación,  $H_s$  = Heterocigosis esperada en una subpoblación, suponiendo apareamientos al azar y  $H_t$  = Heterocigosis esperada en la población total suponiendo apareamientos al azar y ausencia de subdivisión (18).

#### 1.4.2 Estadístico $RST$ ( $\rho$ -ST) de Slatkin:

Los patrones de diferenciación genética entre poblaciones también pueden verse afectados por la tasa de mutación. El estimador de divergencia genética  $F_{ST}$  solo no es afectado por estas tasas cuando son mucho menores que las tasas de migración y si los tamaños poblacionales son considerablemente pequeños (30). En marcadores como microsatélites, las tasas de mutación pueden ser muy altas, lo que generalmente disminuye los valores detectados de  $F_{ST}$  (31). Para resolver este problema, Slatkin (1995) definió un  $F_{ST}$  en términos de tiempos de coalescencia entre alelos y desarrolló el índice  $RST$  (Rho-ST). Este índice asume que los loci siguen un modelo generalizado de mutación *stepwise* (mutación paso a paso), por lo que se encuentra definido en términos de la varianza de los tamaños alélicos en los diferentes componentes jerárquicos poblacionales (32). De este modo, cuando la varianza difiere bastante entre locus, aquellos locus con menor varianza han de contribuir poco a la varianza final, mientras que aquellos con mayor varianza contribuirán en mayor proporción.

De esta manera,  $RST$  será definido por:

$$RST = \frac{\bar{S} - S_w}{\bar{S}}$$

Donde  $S_w$  y  $S$  son las diferencias cuadradas en el tamaño de los alelos entre pares de genes dentro de las poblaciones y entre pares de genes tomados de un grupo de  $n$  poblaciones, respectivamente (33).

#### 1.4.3 Pruebas de asignación *a posteriori*:

La principal desventaja de los estadísticos  $F$  es que asumen *a priori* que los grupos que están siendo comparados son poblaciones mendelianas o demoes. Para lograr una delimitación más precisa de los individuos que constituyen esas poblaciones locales, se desarrollaron nuevas herramientas estadísticas que utilizan modelos Bayesianos para inferir estructuración genética poblacional, conocidas como “pruebas de asignación *a posteriori*”.

Éstas pruebas estiman la probabilidad de que un individuo pertenezca a un grupo o población en base a su genotipo multilocus, sin suponer poblaciones predefinidas comparando la frecuencia alélica de los loci analizados entre todos los individuos de las diferentes poblaciones geográficas. Estos métodos han sido ampliamente utilizados para estimar tasas de dispersión entre poblaciones, analizar la distribución de las muestras en el espacio y detectar barreras que afectan el flujo de genes a escala de paisaje (34).

#### **1.4.4 Distancias genéticas Aislamiento genético por distancia geográfica:**

Cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia, generalmente se espera que las poblaciones más cercanas geográficamente también resulten las más parecidas en sus frecuencias alélicas, ya que se supone que el flujo génico es más probable entre las poblaciones contiguas que entre las más lejanas. Este patrón se conoce como “aislamiento por distancia” asume equilibrio entre deriva y flujo génico (35). Uno de los métodos clásicos para evaluar este modelo es la prueba de Mantel, que estima la correlación entre matrices de distancias genética y geográfica. Si el coeficiente de correlación es positivo, indica que las poblaciones se distribuyen según dicho modelo (34).

Desde el punto de vista ecológico, la dispersión influye en la dinámica y persistencia de las poblaciones, la distribución y abundancia de las especies y la estructura de las comunidades. Por otra parte, evolutivamente, el nivel de flujo génico entre poblaciones afecta procesos como la adaptación local y la especiación (36). Por ello, el conocimiento del flujo génico resulta fundamental para comprender aspectos de ecología del paisaje, ecología evolutiva, epidemiología y conservación de vida silvestre (37).

#### **- 1.5 Marcadores de diversidad: Microsatélites.**

Una alternativa para el análisis genético de poblaciones vectoriales de interés se basa en la amplificación selectiva de secuencias nucleares mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR (*Polymerase chain reaction*). Esta metodología ha permitido disponer de marcadores genéticos que denotan variabilidad en regiones no codificantes del genoma, y que por lo tanto no estarían sujetos a presiones selectivas.

En poblaciones de *Ae. aegypti*, se han utilizado numerosos marcadores moleculares para el estudio de su diversidad y estructura génica, entre ellos: RAPD, (*Random Amplified Polymorphic DNA*), Isoenzimas, AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), ISSR (*Inter simple sequence repeats*) o SSR (*Simple sequence repeat*) (38–40).

Los SSR también conocidos como “microsatélites”, son abundantes en organismos eucariotas, se encuentran distribuidos en todo el genoma, preferentemente en regiones no codificantes, por lo que no se transcriben a ARN. Entre sus funciones se les atribuye algunos procesos de regulación génica, organización de la cromatina y procesos metabólicos como la replicación del ADN, también son regiones con alta frecuencia de recombinación (*hot spots*) (41–43). Son de carácter evolutivo neutral, con herencia mendeliana codominante, lo cual permite la distinción de genotipos homocigotos y heterocigotos (19,44).

Un locus microsatélite está constituido por secuencias simples de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem, (mono, di, tri, tetra, penta y hexa-nucleotídicas) (45). Weber (1990) (46) clasificó a los microsatélites según el patrón de las repeticiones, donde “n” es el número de veces que se repite el motivo:

Simple perfecto: el mismo motivo de repetición “n” veces. Ej: [ACC]<sub>n</sub>.

Simple imperfecto: el motivo repetido es interrumpido por diferentes nucleótidos que no se repiten. Ej: [ACC]<sub>n</sub>[ACT][ACC]<sub>n+10</sub>.

Compuestos perfectos: dos o más motivos que se repiten en tándem. Ej: [ACC]<sub>n</sub>[ACG]<sub>n+1</sub>.

Compuestos imperfectos: los motivos repetidos en tándem son interrumpidos por diferentes nucleótidos. Ej: [ATCG]<sub>n</sub>[GGA][GTAC]<sub>n+1</sub>.

Las regiones que flanquean un locus están comprendidas por secuencias altamente conservadas, lo que permite el acoplamiento exacto de los cebadores y la consiguiente amplificación específica del mismo en una única especie o especies emparentadas (18,47). Generalmente, esta región tiene una menor tasa de mutación, no obstante, cuando se presenta, es posible que los cebadores no puedan alinearse en un proceso de amplificación por PCR, como resultado se daría una ausencia de producto de la amplificación de un alelo, que se interpretaría como un falso homocigoto, este alelo no amplificado se denomina “alelo nulo” (48).

Por otra parte, debido a que los alelos de un locus poseen diferente cantidad de repeticiones del motivo básico, es posible definir genotipos multilocus que resultan muy útiles para caracterizar individuos, ya que es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de marcadores, compartan todos sus alelos (19).

Los microsatélites se caracterizan por presentar un elevado nivel de polimorfismo debido a su alta tasa de mutación, la cual va desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-2}$  mutaciones por sitio, por generación (45,49). Estas mutaciones se atribuyen a dos mecanismos: el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (*slippage misspairing*) y el entrecruzamiento desigual (*unequal crossing over*) (50).

Cuando el deslizamiento en el apareamiento ocurre en la hebra nueva hay un incremento en el número de repeticiones del microsatélite (inserción), mientras que cuando el alineamiento erróneo ocurre en la hebra parental hay una reducción en el número de repeticiones (delección) (50). Por otra parte, cuando ocurre entrecruzamiento desigual durante la recombinación surge como resultado la pérdida de repeticiones en una cromátida y el incremento en la otra (43).

- **2. OBJETIVOS**

- **2.1 Objetivo principal:**

Determinar la diversidad genética de *Aedes aegypti* mediante la utilización de marcadores microsatélites (SSR) en poblaciones urbanas de dos ciudades con alto índice de infestación (Luque y San Lorenzo).

- **2.2 Objetivos específicos:**

- Caracterizar el perfil genético de las poblaciones de *Aedes aegypti* mediante la estandarización del procedimiento de amplificación por PCR de loci microsatélites.
- Determinar el grado de variabilidad y estructuración genética en las distintas poblaciones de *Aedes aegypti*, estableciendo índices de polimorfismo inter e intra-poblacionales.
- Identificar posibles *clusters* génicos en poblaciones de *Aedes aegypti* en base a las frecuencias alélicas detectadas.

### - 3. METODOLOGÍA

### - 3.1 Área de estudio:

La investigación se llevó a cabo con mosquitos *Aedes aegypti* provenientes de los municipios de Luque y San Lorenzo, ambos pertenecen al Departamento Central, de la Región Oriental del Paraguay. Se seleccionaron ambas ciudades como sitios de muestreo, debido a los altos índices de infestación larvaria e infección por Dengue reportados en la zona metropolitana por el Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo (SENEPA) y el Ministerio de Salud Pública y bienestar Social (51). Los datos de colecta se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Datos de identificación de cada punto de muestreo incluidos en el estudio.**

Municipio	Barrio	Codificación del barrio	Codificación del sitio de muestreo	Latitud	Longitud
Luque	Km2	LUA	LA-A	-25,265208	-57,520237
Luque	Km2	LUA	LA-B	-25,265619	-57,520004
Luque	Km2	LUA	LA-C	-25,26588	-57,519116
Luque	Km2	LUA	LA-D	-25,266966	-57,519033
Luque	Isla Zárate	LUB	LB-A	-25,261159	-57,502882
Luque	Isla Zárate	LUB	LB-B	-25,23692	-57,504625
Luque	Isla Zárate	LUB	LB-C	-25,236763	-57,503626
Luque	Isla Zárate	LUB	LB-D	-25,236962	-57,502808
Luque	Maramburé	LUC	LC-A	-25,272051	-57,458758
Luque	Maramburé	LUC	LC-B	-25,271989	-57,458044
Luque	Maramburé	LUC	LC-C	-25,271445	-57,458864
Luque	Maramburé	LUC	LC-D	-25,271509	-57,457982
San Lorenzo	Espíritu Santo	SLA	SA-A	-25,365197	-57,542771
San Lorenzo	Espíritu Santo	SLA	SA-B	-25,364844	-57,54395
San Lorenzo	Espíritu Santo	SLA	SA-C	-25,363869	-57,542994
San Lorenzo	Espíritu Santo	SLA	SA-D	-25,364268	-57,542155
San Lorenzo	Santa Ana	SLB	SB-A	-25,332003	-57,525884
San Lorenzo	Santa Ana	SLB	SB-B	-25,331004	-57,526321
San Lorenzo	Santa Ana	SLB	SB-C	-25,331331	-57,526714
San Lorenzo	Santa Ana	SLB	SB-D	-25,333034	-57,526335
San Lorenzo	Reducto	SLC	SC-A	-25,383129	-57,493208
San Lorenzo	Reducto	SLC	SC-B	-25,383509	-57,492703
San Lorenzo	Reducto	SLC	SC-C	-25,383816	-57,493422
San Lorenzo	Reducto	SLC	SC-D	-25,383223	-57,494857

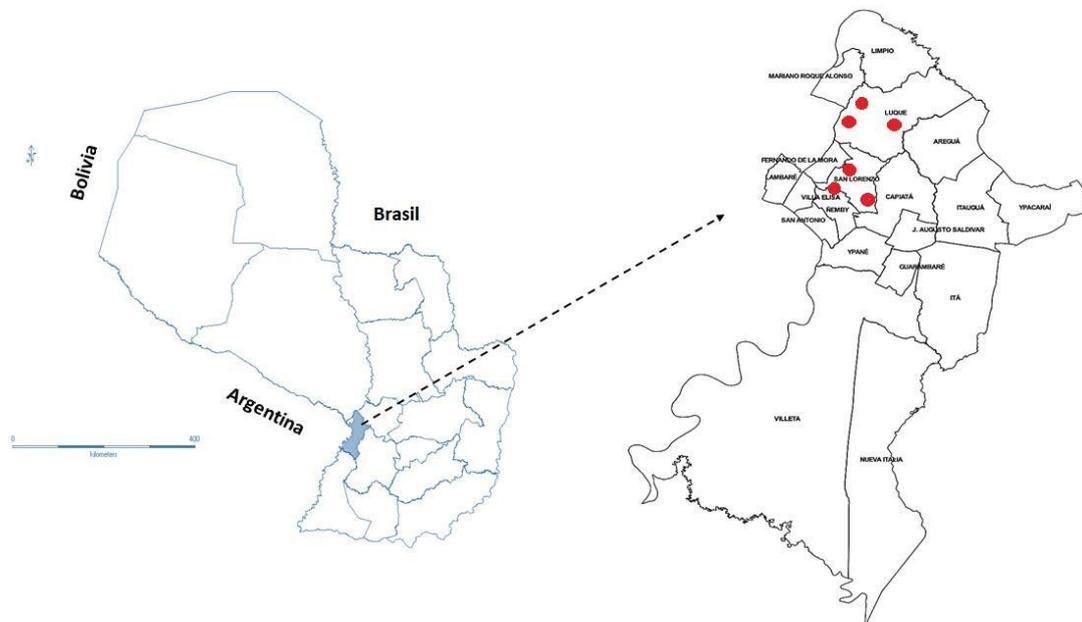
El Departamento Central, cuenta con una extensión territorial de 2.465 km<sup>2</sup> y se destaca por su alta densidad de población humana, siendo el único departamento que posee más de 500 habitantes por km<sup>2</sup>. Está ubicado en el área centro-occidental del país y presenta un clima subtropical húmedo, donde la temperatura media anual registrada es de aproximadamente 24,3°C y la precipitación media anual de 1.488 mm (52). Cuenta con una amplia cobertura de servicios básicos, posee a nivel departamental el mayor porcentaje de viviendas con luz eléctrica y los sistemas de desagüe cloacal y agua de red alcanzan al 90% y 77% de la población, respectivamente. Sin embargo, aunque los sistemas de recolección de basura abarcan cada vez más zonas, cubren sólo a la mitad de las viviendas (53).

Las ciudades de Luque y San Lorenzo se encuentran en el área metropolitana del Departamento Central, y ambas son colindantes, por lo que comparten características climáticas y socio-ambientales similares. Tanto la temperatura promedio de 30°C que presentan, como los altos índices demográfico y de hacinamiento poblacional y comercial que poseen, constituyen factores que propician la presencia de fuentes o focos de infestación de larvas y a su vez de contagios de dengue en la región.

### - **3.2 Estrategia de muestreo:**

El tipo de muestreo empleado acorde a los requerimientos del estudio, fue consecutivo, por conveniencia, teniendo en cuenta el rango de dispersión de *Ae. aegypti*, cuya capacidad de vuelo es de aproximadamente 100 a 840 mts de distancia (6).

Para el muestreo se dispuso un par de ovitrampas en cada vivienda seleccionada, para lo cual se solicitó el permiso para ingresar mediante un consentimiento informado, impreso en papel. Con este documento, se informó a cada propietario: los objetivos y beneficios de este estudio, se mencionó acerca de la confidencialidad de los datos obtenidos y detalles de la colecta de material biológico (huevos de mosquitos). Se indicó además que este trabajo no representó ningún riesgo para la comunidad local (Anexos A-B). En cada ciudad incluida como localidad de muestreo se seleccionaron tres barrios, en cada una se eligió cuatro viviendas, para la elección de las mismas se seleccionó al azar una única vivienda que fue considerada como punto central, a partir de la cual, se escogieron otras tres separadas de ésta por aproximadamente 150 mts cada una. Los criterios que se tuvieron en cuenta para la selección de la vivienda considerada como punto central consistieron en la determinación observacional de parámetros favorables para la cría del vector, tales como presencia de jardines, planteras, patios con mucha vegetación, pilas de residuos, maderas, ladrillos, etc., en cada una de las viviendas las ovitrampas se distribuyeron en dos lugares diferentes del peri-domicilio. Los barrios incluidos en el estudio fueron: Bo. Kilómetro 2, Bo. Isla Zárate y Bo. Maramburé correspondientes al municipio de Luque. Por otra parte, se incluyeron los barrios Espíritu Santo, Bo. Santa Ana y Bo. Reducto, los cuales corresponden al municipio de San Lorenzo. Todas las viviendas fueron georreferenciadas con un equipo de GPS (marca Garmin). En la Figura 1, se muestra el mapa de distribución de los sitios de muestreo incluidos en el estudio.



**Figura 1. Mapa del Paraguay (izquierda) y del Departamento Central (derecha):** Se indican los sitios de muestreo de las poblaciones de *Aedes aegypti*. Los seis puntos rojos corresponden a los barrios seleccionados en el municipio de Luque y San Lorenzo.

### - 3.3 Procedimiento de campo y de laboratorio:

A continuación, se detallan los procedimientos llevados a cabo desde la colecta del material biológico hasta su amplificación y análisis genético poblacional.

#### 3.3.1 Obtención de muestras biológicas, colecta de huevos de mosquitos:

La colecta de huevos se realizó entre los meses de noviembre de 2019 a febrero del 2020, durante la estación de verano. se utilizaron ovitrampas caseras, consistentes en recipientes de plásticos de color negro, con capacidad para 500 ml aproximadamente, a las que se agregó cuatro paletas de eucatex de (3 x 15 cm) sujeta por los bordes de las planteras, para la adherencia de los huevos. Un tercio de cada paleta permaneció inmersa en agua (54).

Las ovitrampas fueron ubicadas en el peri-domicilio de las viviendas, en un lugar sombreado, a una altura no mayor de 1,5 m entre plantas ornamentales o materiales de construcción, permaneciendo en las viviendas durante siete días.

No se consideraron sectores cercanos a otros posibles criaderos que representen competencia (llantas, planteras con agua, botellas, comederos de animales, etc). Mediante una segunda visita a cada vivienda, se retiraron las ovitrampas y las paletas a fin de evitar la eclosión de huevos. Las paletas fueron transportadas adecuadamente (separadas y envueltas en papel absorbente) hasta las instalaciones del laboratorio del insectario del Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) para su posterior procesamiento.

Los huevos colectados con apariencia de viabilidad en su textura (huevos sin eclosionar adheridos a las paletas), fueron sumergidos en 2 lts. de agua declorada, a temperatura ambiente, en un recipiente de plástico de 121,5 cm<sup>2</sup>, donde se colocó un máximo de 100 huevos para su eclosión y desarrollo larval hasta llegar a la fase de pupa. Este procedimiento de cría se realizó considerando las indicaciones de la OMS (55).

Para la obtención de colonias de mosquitos adultos, se transfirieron las pupas a una jaula de cría, generando así un *pool* entre los individuos colectados entre las viviendas de cada barrio o sitios de muestreos, de modo tal que se generaron tres colonias de mosquitos por localidad. Una vez que se obtuvieron los mosquitos adultos, por cada colonia se seleccionaron de manera aleatoria 15 ejemplares, sin discriminación de sexo, de este modo se incluyó a 90 ejemplares en el estudio, los cuales fueron mantenidos a 4°C en refrigerador con el objeto de mantener la integridad del material genético hasta su utilización.

Se procedió a la identificación de los ejemplares, clasificados como *Ae. aegypti* mediante observación de su morfología, identificación de las patas con anillos blancos y el mesonoto con escamas blancas, dispuestas en forma de lira con dos franjas centrales, comprobada de acuerdo a la clave taxonómica de Darsie (1985) (56). A cada ejemplar se le asignó una codificación, de acuerdo a la localidad de colecta.

### **3.3.2 Extracción de material genético (ADN):**

Para la extracción de material genético, se siguió el protocolo de extracción de ADN, utilizando resina Chelex 100 Bio-Rad al 5%. Esta resina actúa como un agente quelante de iones metálicos polivalentes, que previene la ruptura del ADN a altas temperaturas (57).

La extracción se inició con la adición de 240  $\mu$ l de resina Chelex al 5% y 40  $\mu$ l de solución salina NaCl 0,1M a los tubos de microcentrífuga de 1,5 ml que contenían los mosquitos completos, los cuales fueron macerados gentilmente con un biovortex metálico (Kimble®, USA) y maceradores de poliprolileno. El contenido fue incubado y centrifugado para posteriormente realizar la separación del sobrenadante. El contenido fue separado en alícuotas de 50  $\mu$ l y preservados a -20° C hasta su uso.

### **3.3.3 Cuantificación y dilución de ADN:**

La concentración y purificación de ADN, se realizó en un espectrofotómetro tipo NanoDrop (modelo ONE UV; Thermo Scientific), para lo cual se agregó 1  $\mu$ l de muestra. La concentración y pureza del ADN obtenido fue determinada midiendo la longitud de onda a 260 nm y estimando la relación absorbancia a 260/280 nm  $\geq$  1.8 como criterio de pureza. Los valores menores fueron indicadores de contaminación de la muestra con proteínas (58). De acuerdo a la concentración de ADN en cada muestra se realizaron las estimaciones en cálculo para llevar a una concentración final de 10 ng/  $\mu$ l.

La integridad del ADN se verificó mediante corrida de electroforesis en gel de agarosa pure 0,8% con solución amortiguadora TAE 1X a 80 voltios durante 40 minutos.

### **3.3.4 Amplificación de Microsatélites:**

Mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificaron diez loci de microsatélites específicos para *Ae. aegypti* (59,60). Las PCR se realizaron según el protocolo reportado por Ayala *et al.* (2020) (26) con algunas mínimas modificaciones, utilizando cebadores marcados con los fluoróforos: 6'FAM, 5'HEX, 5'TAMRA y 5'ROX (Tabla 2).

Para cada amplificación se utilizó un volumen final de reacción de 10 µl que contenía 1X de tampón de reacción, 1,25 a 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, el cual varió dependiendo del par de cebador de inserción utilizado, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de cebadores, directo e inverso (F y R), 3M de Betaína, 1,0 U de enzima ADN *Taq* Polimerasa (*Taq* DNA Polymerase, Qiagen) y 10 ng de ADN molde (Tabla 3). El control negativo de la reacción incluyó todos los componentes con excepción del ADN patrón que fue sustituido por agua miliQ estéril.

**Tabla 2. Secuencia de cebadores y sus modificaciones con fluoróforos utilizados en el estudio.**

Locus	Motivo de repetición	Secuencia de cebador (5' - 3')*	Modificación	Rango de tamaño aprox.	Identificación de locus
B07	GA	**F-CAAACAACGAACTGCTCACG	5-HEX	157-183	Chambers <i>et al.</i> 2007
		**R-TCGCAATTTCAACAGGTAGG	-		
B19	CAT	**F-ATTGGCGTGAGAACATTTTG	5-FAM	156-186	Chambers <i>et al.</i> 2007
		**R-GAGGAGTGAGCAGATAGGAGTG	-		
AC7	CA	**F-TCGGCAAATTACCACAAACA	5-ROX	129-143	Slotman <i>et al.</i> 2007
		**R-CATTGGACTCGCTATAACACACA	-		
AG1	GA	**F-AATCCCCACACAAACACACC	5-HEX	113-129	Slotman <i>et al.</i> 2007
		**R-GGCCGTGGTGTTACTCTCTC	-		
AG2	AG	**F-TCCCCTTCAAACCTAATGG	5-TAMRA	115-178	Slotman <i>et al.</i> 2007
		**R-TTTGCCCTCGTATGCTCTCT	-		
AG3	AG	**F-CGCCAAAACCTGAAAACCTGAA	5-ROX	164-178	Slotman <i>et al.</i> 2007
		**R-AAGGGCGGTGATGACTTTCT	-		
AG4	GA	**F-AAAACCTGCGCAACAATCAT	5-HEX	147-169	Slotman <i>et al.</i> 2007
		**R-AAGGACTCCGTATAATCGCAAC	-		
AG5	AG	**F-TGATCTTGAGAAGGCATCCA	5-FAM	170-180	Slotman <i>et al.</i> 2007
		**R-CGTTATCCTTTCATCACTTGTTG	-		
AG7	GA	**F-CGTGCGAGTGAATGAGAGAC	5-TAMRA	153-185	Slotman <i>et al.</i> 2007
		**R-CATCCTCTCATCAGCTTCTAATAAA	-		
AT1	AT	**F-CGTCGACGTTATCTCCTTGTT	5-TAMRA	156-174	Slotman <i>et al.</i> 2007
		**R-GGACCGGAAAGACACAGACA	-		

\* Dirección de la secuencia, \*\* F/R: Forward (directo)/ Reverse (inverso)

El procedimiento de amplificación se realizó utilizando un termociclador SimpliAmp™ (Thermo Fisher SCIENTIFIC), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 92°C por 5 minutos, seguido de 28 a 32 ciclos con: desnaturalización a 92°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. La cantidad de ciclos varió de acuerdo a cada par de cebadores cuyo detalle se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 3. Concentración final de mix de PCR para la amplificación de 10 loci microsatélites.**

Cebadores	Reactivos						
	Buffer	MgCl <sub>2</sub>	dNTP's	Cebador directo	Cebador inverso	Betaina	Taq Polimerasa
AG1 - AG2 - AG3 - AG5 - AT1 - B19	1X	1,5 mM	0,2 mM	0,4 μM	0,4 μM	3M	1U
AG4 - AG7 - AC7 - B07	1X	1,25 mM	0,2 mM	0,4 μM	0,4 μM	3M	1U

**Tabla 4. Condiciones de ciclado para cada cebador.**

Cebador	Ciclado	T <sub>m</sub> *
AG2	30	56
AC7	28	56
AG4	28	57
AG5	30	56
AG1	34	55
AG3	30	56
B19	32	56
B07	30	56
AG7	32	56
AT1	30	56

\*: Temperatura de *Annealing* - Hibridación (°C).

Luego de obtener los productos iniciales de PCR, se procedió a la optimización del proceso mediante la eliminación de bandas inespecíficas y *stutters*, las cuales se forman como un artefacto producto de amplificaciones inespecíficas de los loci de microsatélites. Dicho procedimiento se realizó mediante modificaciones en la concentración de  $MgCl_2$ , la temperatura de *annealing* y la cantidad de ciclados para cada par de cebadores. Para verificar estas modificaciones, se realizó la visualización de bandas por separación en gel de poliacrilamida al 12%, con solución amortiguadora TBE 1X a 140 voltios por 1 hora. Las bandas fueron visualizadas utilizando un marcador de tamaño molecular de 50 pares de bases (pb) (DNA Ladder de Promega) y tinción con Nitrato de Plata, cuyo protocolo se muestra en el anexo (Anexo C). Este procedimiento fue fundamental para lograr la estandarización correcta de los loci de microsatélites.

La amplificación de los loci para cada espécimen, fue corroborada mediante la visualización del perfil genético, generado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, a 140 voltios por 30 minutos. Posteriormente se procedió a la tinción con Bromuro de Etidio.

El tamaño molecular de los productos de PCR se determinó mediante genotipado por electroforesis capilar, en un secuenciador modelo ABI3730XL de marca Applied Biosystems™ (Thermo Fisher SCIENTIFIC) realizado a través de la empresa Macrogen (Corea). En detalle, la determinación de los genotipos multilocus se realizó mediante el envío de dos “tubos de reacción” por individuo, conteniendo un *mix* de productos de PCR de 5 loci diferentes (AG1-ATI-AC7-AG3-AG5 o B19-B07-AG2-AG4-AG7). Cada tubo contenía 4  $\mu$ l de cada producto de PCR.

### - 3.4 Análisis de los resultados:

#### 3.4.1 Puntuación y delimitación de tamaños alélicos:

Para la genotipificación de los SSR, se realizó la puntuación de cada tamaño alélico mediante el uso del software Peak Scanner v.1.0 (Applied Biosystems), este programa permite visualizar cada tamaño alélico, en forma de picos de un electroferograma. Posteriormente, se analizó la distribución de los tamaños de fragmentos registrados mediante el software MsatAllele (61) para clasificarlos según clases de tamaño correspondientes a los diferentes alelos. Además, se evaluó la presencia de desequilibrio por ligamiento entre loci utilizando el software FSTAT v.2.9.3 (62). Finalmente, los datos fueron exportados a un documento Excel, y en base a éste se realizó la matriz de genotipos multilocus requerida para cada análisis estadístico.

#### 3.4.2. Análisis de diversidad y estructura genética:

La matriz de genotipos multilocus utilizada para los análisis de diversidad y estructura genética, se realizó en base a los resultados de genotipificación obtenidos para ocho loci microsatélites: B07, AC7, AG1, AG2, AG3, AG4, AG5 y AT1. Esto se debió a que al genotipar automáticamente los loci B19 y AG7, los fluorofóros seleccionados para estos cebadores interfirieron entre sí, dando como resultado electroferogramas con réplicas exactas del tamaño alélico de los demás loci contenidos en el “tubo de reacción” enviado inicialmente a Macrogen. Por ello, no se logró definir el tamaño alélico de los dichos loci.

Mediante el software Microchecker se identificó la desviación de las proporciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) y se analizó cada loci teniendo en cuenta posibles errores de lectura debido a presencia de alelos nulos, dominio del alelo corto o *stuttering* (63). La riqueza alélica (*RA*) se evaluó utilizando FSTAT aplicando el método de rarefacción de El Mousadik y Petit (1996) (64), este método se emplea cuando no se tienen todos los datos genéticos o cuando los tamaños de las poblaciones comparadas son distintas. La heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada (*Ho* y *He*) se calcularon utilizando Genalex v.0.6.5 (65).

Para el análisis de estructura de las poblaciones se utilizó FSTAT para estimar los estadísticos  $F$  utilizando el método corregido de Weir y Cockerham (1984) (66). Se calcularon los coeficientes de endogamia entre individuos de una población local ( $FIS$ ) y de diferenciación genética entre poblaciones ( $FST$ ) considerando el grado de significancia estadística para  $p \leq 0,05$ . Se aplicaron correcciones secuenciales de Bonferroni para todas las pruebas múltiples. Además, utilizando GenalEx v0.6.5, se realizó el cálculo del índice  $RST$  (32,67), el cual es análogo al coeficiente  $FST$ , pero refleja con mayor precisión el patrón mutacional de los microsatélites, considerando su definición en términos de tiempos de coalescencia entre alelos (68). Se evaluó la significancia estadística de este índice mediante un análisis de remuestreo con 1000 permutaciones aleatorias.

El aislamiento genético por distancia geográfica se analizó mediante pruebas de Mantel entre la distancia genética linealizada (calculada como  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  según (67) y las distancias geográficas (Km) entre pares de sitios de muestreo, esto se realizó con el programa GenalEx v0.6.5 (65).

Por otra parte, con el mismo programa GenalEx v.0.6.5 se realizó el análisis de la varianza molecular (AMOVA) a partir de los coeficientes  $FST$  y  $RST$  entre pares de poblaciones, bajo el modelo mutacional de alelos infinitos y considerando a cada municipio como una región diferente. De este modo, el porcentaje que los componentes de la covarianza tienen sobre la estructura y varianza genética total de las muestras, se estimó entre y dentro de cada sitio de muestreo, entre y dentro de cada región, y entre el total de los individuos.

Utilizando el programa Dendro UPGMA (69) se realizó un análisis de UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean*), el cual es un método de agrupación jerárquica aglomerante no ponderado, en el que todas las distancias genéticas contribuyen igualmente a cada promedio calculado. El dendrograma obtenido con este algoritmo refleja la estructura presente en una matriz de semejanzas entre pares, donde cada uno de los pares más cercanos se combina en un *cluster* de nivel superior. Para el agrupamiento poblacional fueron utilizadas las matrices de distancias genéticas del índice  $FST$  calculado anteriormente.

Por último, utilizando el programa Structure v.2.3.4 (70) se realizó un agrupamiento genético Bayesiano para determinar el número más probable de *clusters* genéticos (k) y la composición genética general de cada uno. Este programa asigna en *clusters* a qué población pertenece un individuo sin suponer poblaciones predefinidas, en base a su genotipo multilocus. El análisis se ejecutó bajo el modelo de “admixture” (asume la existencia de flujo génico entre poblaciones) y frecuencias alélicas correlacionadas, para cada k (1-6 *clusters*) se realizaron 5 iteraciones con un período de *burn-in* de 500.000 y 4.500.000 generaciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Luego del análisis se calculó el valor óptimo de k utilizando el método  $\Delta K$  descrito por Evanno *et al.* (2005) (71), mediante el programa Structure Harvester (72). Los datos obtenidos se analizaron con el programa Clumpp 1.1.2 (73) para maximizar la correspondencia entre individuos y *clusters* procesados con el programa Distruct 1.1 (74) para obtener la representación gráfica final.

- **4. RESULTADOS**

**“Caracterización del perfil genético de las poblaciones de *Ae. aegypti* mediante la estandarización del procedimiento de amplificación por PCR de loci microsatélites”.**

**- 4.1 Estandarización de la amplificación por PCR de 10 loci microsatélites para la caracterización del perfil genético de las poblaciones de *Ae. aegypti*:**

La estandarización de los cebadores para la amplificación de los 10 loci microsatélites permitió determinar la temperatura de *annealing*, cantidad de ciclados y la concentración de MgCl<sub>2</sub> óptimas para la obtención de bandas reproducibles, en base al tamaño alélico esperado para cada locus. Para lograr dicha estandarización se realizaron en total 256 reacciones de PCR. En la Tabla 5 se muestra el resumen de las condiciones obtenidas para la amplificación.

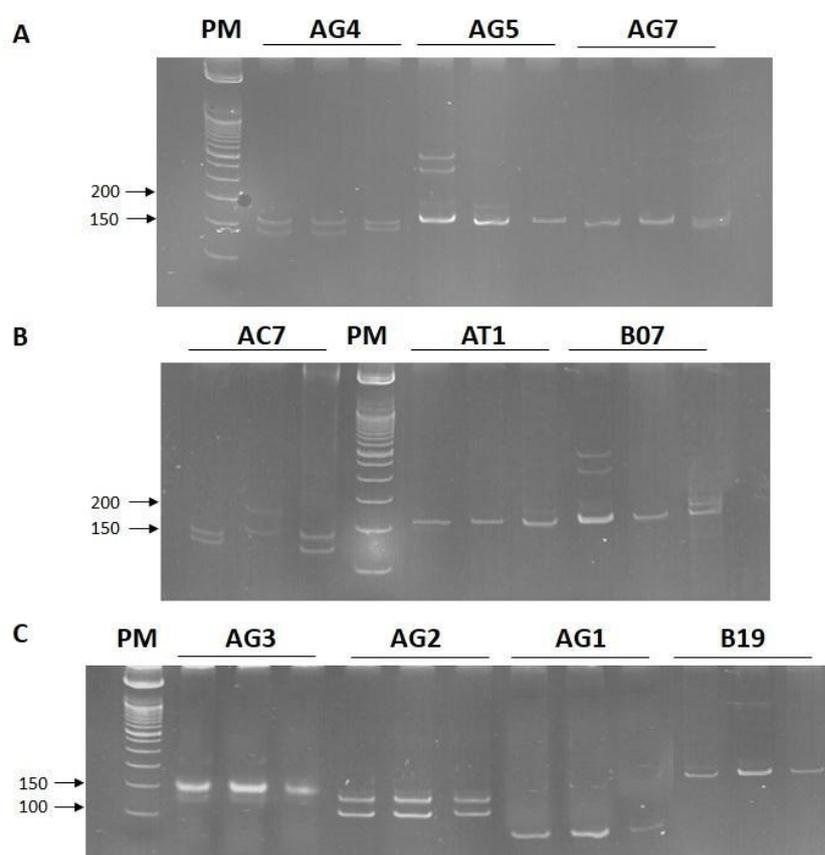
**Tabla 5. Resumen de condiciones óptimas de amplificación por PCR de microsatélites específicos para *Aedes aegypti*.**

<b>Cebador</b>	<b>Ciclado</b>	<b>Tm*</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>
<b>AG2</b>	30	56	1,5
<b>AC7</b>	28	56	1,25
<b>AG4</b>	28	57	1,25
<b>AG5</b>	30	56	1,5
<b>AG1</b>	34	55	1,5
<b>AG3</b>	30	56	1,5
<b>B19</b>	32	56	1,5
<b>B07</b>	30	56	1,25
<b>AG7</b>	32	56	1,25
<b>AT1</b>	30	56	1,5

\*: Temperatura de *Annealing* - Hibridación (°C).

#### 4.1.1 Amplificación de microsatélites (SSR-PCR) de *Ae. aegypti*:

Utilizando los cebadores seleccionados para el estudio se obtuvo el perfil de bandas para cada locus microsatélite. En la Figura 2 se muestran ejemplos de genotipos homocigotas o heterocigotas para cada locus, en el apartado A, se visualizan tres individuos con alelos heterocigotas en el locus AG4 (carriles 2 al 4), en el apartado B, individuos con alelos heterocigotas en el locus AG4 (carriles 2 al 4), en el apartado B, individuos con alelos homocigotas para el locus ATI (carriles 5 al 7).



**Figura 2. Perfil genético obtenido para 10 loci microsatélites:** 2A: Carriles 2 al 4 (locus AG4). Carriles 5 al 7 (locus AG5). Carriles 8 al 10 (locus AG7). 2B: Carriles 1 al 3 (locus AC7). carriles 5 al 7 (locus AT1). Carriles 8 al 10 (locus B07). 2C: Carriles 2 al 4 (locus AG3). Carriles 5 al 7 (locus AG2). Carriles 8 al 10 (locus AG1). Carriles 11 al 13 (locus B19). PM: Marcador de peso molecular de 50 pb (DNA Ladder de Promega).

**“Determinación del grado de variabilidad y estructuración genética en las distintas poblaciones de *Ae. aegypti* establecidos con índices de polimorfismo inter e intra-poblacionales”.**

**- 4.2 Estimación de parámetros de diversidad genética:**

Para la determinación de los parámetros poblacionales se incluyeron a ocho de los diez loci microsatélites, como se mencionó anteriormente.

El análisis con Microchecker usado para detectar errores en la amplificación y genotipado, sugirió la presencia de alelos nulos o de *stuttering* en los loci AG1, AG2, AG3, AT1 y B07 para algunas poblaciones (Anexo D). En cada uno de los casos, se realizó la posterior revisión/corrección de los tamaños alélicos. La probabilidad general de ligamiento entre pares de loci fue baja (1,19%,  $p = 0,00003$ ) sin observación de pares sistemáticamente correlacionados entre sí, por lo que se descartó el ligamiento físico entre loci (Anexo E).

**- 4.3 Determinación del grado de variabilidad y estructuración genética en diferentes poblaciones de *Ae. aegypti*:**

Como resultado de la genotipificación automática de los productos de PCR se observó que los loci B07 y AG1 presentaron los mayores y menores tamaños alélicos amplificados, respectivamente. La cantidad de alelos y sus tamaños (pb) para cada locus se muestra en la Tabla 6. Se detectó un total de 63 alelos, con un promedio de 7,87 alelos por locus y un rango de diferencia entre alelos de 2 a 32 pb. Los loci que resultaron más polimórficos fueron B07 con 12 alelos, AC7 y AG2 con 9 alelos cada uno; mientras que el locus AG5 fue el menos variable con 5 alelos. Además, fueron detectados 12 alelos exclusivos en el total de las poblaciones (Tabla 7). En los Anexos F y G se muestran la riqueza alélica de cada locus por población y la matriz de genotipos multilocus generada, respectivamente.

**Tabla 6. Rangos de tamaños alélicos (pb), cantidad de alelos y tamaños alélicos amplificados para cada locus.**

<b>Locus</b>	<b>Rango alélico</b>	<b>Cantidad de alelos</b>	<b>Tamaños alélicos</b>
<b>AG1</b>	99 - 109	6	99-101-103-105-107-109
<b>AT1</b>	141 - 157	8	141-143-145-147-149-151-155-157
<b>AG3</b>	151 - 161	6	151-153-155-157-159-161
<b>AG5</b>	154 - 164	5	154-158-160-162-164
<b>AC7</b>	117 - 137	9	117-119-121-123-127-131-133-135-137
<b>AG4</b>	130 - 152	8	130-140-142-144-146-148-150-152
<b>AG2</b>	102 - 134	9	102-104-106-108-112-128-130-132-134
<b>B07</b>	160 - 188	12	160-166-168-170-172-174 -176-178-182-184-186-188

En cuanto a los valores asociados a cada población, se visualizó que las poblaciones c (SLB) y (LUB) fueron las que presentaron mayor y menor riqueza alélica (RA) respectivamente. Se identificó la mayor presencia de alelos exclusivos (6) para tres loci diferentes en la población (SLB), mientras que las poblaciones (LUB) y (SLA) no presentaron alelos exclusivos. Además, se detectaron diferencias en la cantidad de alelos exclusivos para las poblaciones de los sitios de muestreo pertenecientes a una misma ciudad, así las poblaciones muestreadas en el municipio de San Lorenzo, fueron las que presentaron mayor cantidad de alelos exclusivos en diferentes loci.

En la mayoría de las poblaciones geográficas, los valores medios de  $f$  ( $FIS$ ) fueron estadísticamente significativos posterior a la corrección de Bonferroni, a excepción de la población (SLC) ( $f$  media = 0,068;  $p= 0,00104$ ). Este coeficiente denotó déficit de heterocigotas cuando la población fue analizada de forma general (endogamia), sin embargo, se evidenció un exceso de heterocigotas en la población (LUA), lo que se corresponde con una  $H_o$  mayor a la  $H_e$  en esta población. De forma general, se obtuvo un promedio de  $H_o = 0,666$  (ES=0,020) y  $H_e = 0,692$  (ES=0,013); evidenciando una diferencia mínima, lo que respalda los datos obtenidos para el coeficiente de endogamia, por lo que se podría definir teóricamente que existe un déficit de heterocigotas en la mayoría de las poblaciones de estudio; estos datos son visualizados en la Tabla 7.

**Tabla 7. Parámetros de variabilidad genética estimados para los 8 loci microsatélites analizados en las poblaciones de estudio.**

Población	Coeficiente					
	n	RA	AE	$f$	$H_o$ (ES)	$H_e$ (ES)
LUA	15	5,18	3	-0,027	0,751 (0,024)	0,707 (0,023)
LUB	15	4,08	0	0,003	0,667 (0,045)	0,646 (0,031)
LUC	15	5,2	1	0,144	0,616 (0,059)	0,691 (0,036)
SLA	15	5,55	0	0,06	0,676 (0,064)	0,693 (0,034)
SLB	15	5,76	6	0,08	0,656 (0,036)	0,687 (0,038)
SLC	15	5,55	2	0,166	0,631 (0,060)	0,727 (0,032)
<b>Total</b>	90	6,63	12	0,068	0,666 (0,020)	0,692 (0,013)

(n): cantidad de ind. Incluidos para el análisis, (RA): riqueza alélica calculada en base a  $n=14$ , (AE): alelos exclusivos, ( $f$ ): coeficiente de endogamia, ( $H_o$ ): la heterocigosis observada, ( $H_e$ ): la heterocigosis esperada, ES: error estándar.

- **4.4 Estimación de niveles de diferenciación genética y estructura poblacional:**

El análisis de comparación entre pares de poblaciones demostró de forma general, bajo nivel de diferenciación genética interpoblacional, ( $F_{ST} = 0,037$ ;  $ES = 0,095$ ). Los valores de  $\theta$  oscilaron entre 0,004 a 0,090; los cuales fueron estadísticamente significativos en 60% de las comparaciones, después de la corrección de Bonferroni. Se evidenció una moderada diferenciación entre todas las poblaciones, siendo (LUB) y (SLB) los que más significativamente difirieron entre sí. Al mismo tiempo, (LUB) divergió de las demás poblaciones con valores estadísticamente significativos en todos los casos. Además, la diferenciación observada dentro del municipio San Lorenzo (entre SLA, SLB y SLC) fue mucho menor que la de Luque (entre LUA, LUB y LUC) (Tabla 8).

Los valores obtenidos por el estadístico de diferenciación poblacional  $R_{ST}$  oscilaron entre -0,038 a 0,032; ( $R_{ST} = 0,024$ ,  $ES = 0,027$ ), con el 46,66% de las comparaciones estadísticamente significativas luego del remuestreo, señalando una menor divergencia genética entre barrios que la estimada con  $F_{ST}$ . La población (LUB) también presentó diferenciación genética respecto a los demás sitios, aunque la mayoría de las comparaciones no fueron estadísticamente significativas. Además, la mayor divergencia también se observó (LUB) y (SLB). Finalmente, aunque dentro de ambos municipios los valores fueron mínimos, se observó mayor diferenciación entre los barrios pertenecientes a San Lorenzo en comparación con Luque (Tabla 9).

**Tabla 8. Matriz pareada FST vs significancia estadística (P-value) de las poblaciones de *Ae. aegypti* incluidas en el estudio.**

Población	LUA	LUB	LUC	SLA	SLB	SLC
LUA	0	0,068	0,019	0,018	0,017	0,031
LUB	**	0	0,073	0,061	0,090	0,052
LUC	NS	***	0	0,024	0,013	0,035
SLA	*	***	NS	0	0,004	0,011
SLB	NS	***	NS	NS	0	0,033
SLC	*	***	**	NS	*	0

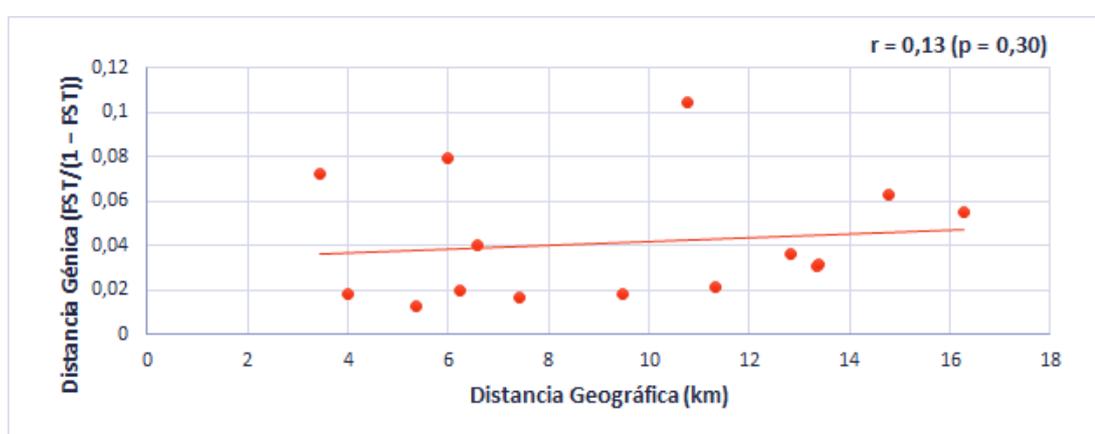
Por encima de la diagonal se muestran los valores de diferenciación genética (valores  $\Theta$ ) entre pares de sitios de muestreo; por debajo la significancia estadística de  $\Theta$ , con una  $p = 0.003333$  posterior a la corrección de Bonferroni. NS (no significativo), \*( $p \leq 0,05$ ), \*\*( $p \leq 0,01$ ), \*\*\*( $p \leq 0,001$ ).

**Tabla 9. Matriz pareada RST vs significancia estadística (P-value) de las poblaciones de *Ae. aegypti* incluidas en el estudio.**

Población	LUA	LUB	LUC	SLA	SLB	SLC
LUA	0	-0,014	-0,025	-0,002	0,002	0,018
LUB	NS	0	0,016	0,026	0,032	0,022
LUC	*	NS	0	-0,009	0,007	0,025
SLA	NS	NS	NS	0	0,005	-0,038
SLB	NS	***	*	NS	0	0,017
SLC	**	NS	***	*	**	0

Por encima de la diagonal se muestran los valores de diferenciación genética (valores  $\rho$ ) entre pares de sitios de muestreo; por debajo la significancia estadística de  $\rho$ , con un  $P = 0.0255$  posterior a un *bootstrapping* de 1000 permutaciones. NS (no significativo), \*( $p \leq 0,05$ ), \*\*( $p \leq 0,01$ ), \*\*\*( $p \leq 0,001$ ).

El test de Mantel para evaluar presencia de un patrón de aislamiento por distancia entre sitios reveló una correlación positiva no significativa ( $r = 0,13$ ;  $P = 0,30$ ) entre las distancias genéticas normalizadas y las distancias geográficas entre pares de poblaciones (Figura 3).

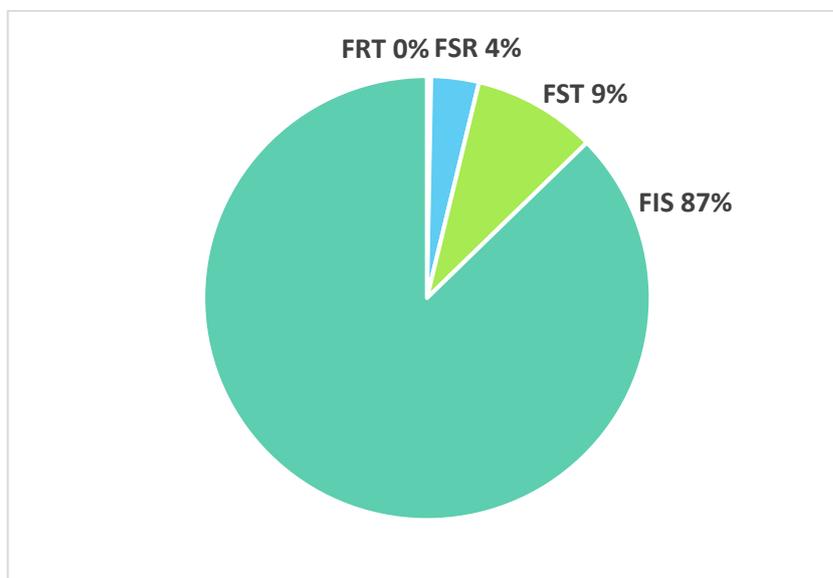


**Figura 3. Prueba de Mantel:** Diagrama de dispersión linealizada entre la distancia genética normalizada ( $FST / (1 - FST)$ ) y distancia geográfica (km) entre pares de sitios de muestreo.

En el cálculo de AMOVA utilizando el estadístico  $FST$ , las pruebas de diferenciación para los diferentes niveles jerárquicos fueron en su mayoría estadísticamente significativas. Se evidenció ausencia de diferenciación entre municipios y baja divergencia entre barrios. A su vez, la mayor parte de la varianza estimada fue determinada por la diferenciación existente entre los individuos dentro de cada barrio (87%,  $FIS = 0,093$ ;  $P = 0,001$ ). Se muestran los datos del análisis en la Tabla 10 y la Figura 4.

**Tabla 10. Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) e índices de diferenciación  $F$  (Weir y Cockerham, 1984) calculadas por el software GenAlEx v0.6.5 para 8 loci microsatélites, en los municipios Luque y San Lorenzo.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Varianza estimada</b>	<b>% de variación</b>	<b>Valor F</b>	<b>P-valor</b>
<b>Entre municipios (FRT)</b>	1	7,089	0,009	0%	0,003	0,174
<b>Entre pob. dentro de cada municipio (FSR)</b>	4	25,156	0,104	3%	0,035	0,001
<b>Entre pob. dentro del total (FST)</b>	84	266,400	0,269	9%	0,037	0,001
<b>Entre ind. dentro de cada población (FIS)</b>	90	237,000	2,633	87%	0,093	0,001
<b>Entre ind. dentro del total (FIT)</b>	179	535,644	3,015	100%	0,127	0,001

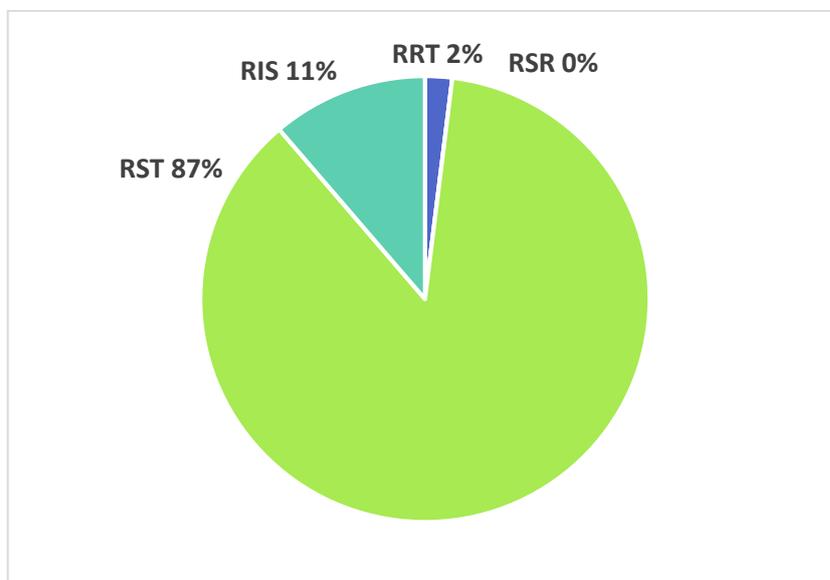


**Figura 4. Porcentajes de varianza molecular (AMOVA) para *FST* en poblaciones de *Ae. aegypti*:** Diferenciación genética a distintos niveles jerárquicos: (*FRT*): entre municipios, (*FSR*): entre poblaciones dentro de cada municipio, (*FST*): entre poblaciones dentro del total, (*FIS*): entre individuos dentro de cada población.

Los valores de AMOVA determinados en base al estadístico *RST* demostraron la existencia de una baja diferenciación genética entre municipios, correspondiente al 2% de lo estimado a distintos niveles jerárquicos. A su vez, la mayor variación se atribuyó a la diferenciación encontrada entre todos los barrios (87%,  $RST = 0,024$ ;  $p = 0,26$ ), no obstante, este valor no fue estadísticamente significativo. Los resultados obtenidos son presentados en la Tabla 11 y la Figura 5.

**Tabla 11. Análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) e índices de diferenciación  $R$  (Slatkin, 1995) calculadas por el software GenalEx v0.6.5 para 8 loci microsatélites, en los municipios Luque y San Lorenzo.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Varianza estimada</b>	<b>% de variación</b>	<b>Valor F</b>	<b>P-valor</b>
<b>Entre municipios (RRT)</b>	1	7988,756	49,300	2%	0,010	0,001
<b>Entre pob. dentro de cada municipio (RSR)</b>	4	14206,933	0,000	0%	-0,01	0,978
<b>Entre pob. dentro del total (RST)</b>	84	392866,400	2196,313	87%	0,024	0,262
<b>Entre ind. dentro de cada población (RIS)</b>	90	25592,000	284,356	11%	0,012	0,001
<b>Entre ind. dentro del total (RIT)</b>	179	440654,089	2529,969	100%	0,869	0,001

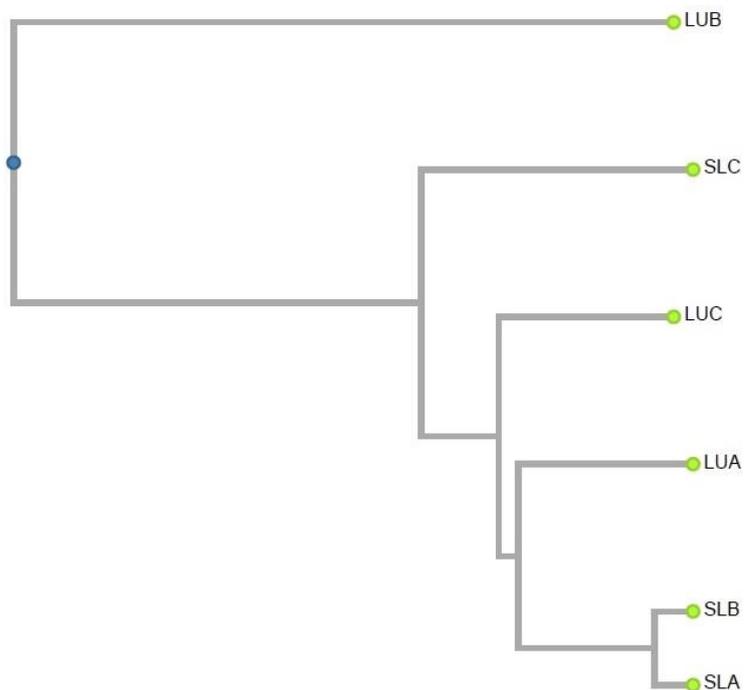


**Figura 5. Porcentajes de varianza molecular (AMOVA) para *RST* en poblaciones de *Ae. aegypti*:** Diferenciación genética a distintos niveles jerárquicos: (*RRT*): entre municipios, (*RSR*): Entre poblaciones dentro de cada municipio, (*RST*): entre poblaciones dentro del total, (*RIS*): entre individuos dentro de cada población.

**“Identificación de *clusters* génicos en poblaciones de *Ae. aegypti* en base a las frecuencias alélicas detectadas”.**

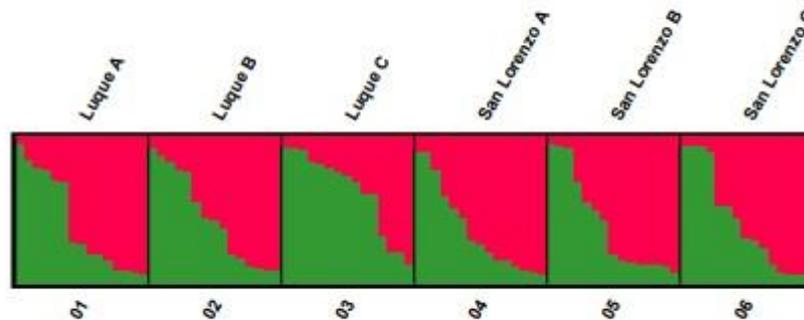
**- 4.5 Determinación de *clusters* genéticos en base a las similitudes detectadas en las poblaciones de *Ae. aegypti*:**

El dendograma obtenido a partir del índice *FST* arrojó un coeficiente de correlación cofenética de 0,931. Consta de dos *clusters* principales, uno comprendido por el sitio LUB y otro agrupando todos los demás sitios, donde SLA y SLB presentaron la menor distancia genética (Figura 6).



**Figura 6. Agrupamiento genético poblacional:** dendrograma obtenido por UPGMA en base al índice  $F_{ST}$  (coeficiente de correlación cofenética de 0,931).

El agrupamiento bayesiano obtenido con Structure determinó la presencia de 2 *clusters* genéticos diferentes  $\ln P(K) = -2230,58 \pm 5,20$  ( $\Delta K = 5,44$ ), datos presentados en el (Anexo H). Por otra parte, de acuerdo a similitudes genéticas, los sitios LUA, LUB, SLA, SLB y SLC fueron agrupados en un mismo cluster, al tiempo que LUC fue identificado como un cluster distinto. Sin embargo, todos los sitios presentaron ancestrías mixtas muy marcadas (Figura 7).



**Figura 7: Agrupamiento Bayesiano obtenido con Structure para  $k=2$ :** Determinación basada en los genotipos multilocus individuales de cada sitio. La composición genética de cada uno de los individuos ( $N=90$ ) se representa por una barra vertical particionada en colores que representan la probabilidad posterior de ancestría ( $q_i$ ) a cada uno de los clusters genéticos estimados ( $k=2$ ). Los individuos se agruparon por sitio de muestreo.

- **5. DISCUSIÓN**

En Paraguay no se han reportado hasta el momento datos sobre la genética poblacional de este vector, así como de sus patrones de distribución espacial y los diversos fenómenos que los estarían determinando. Por este motivo y hasta donde se puede conocer, este estudio es el primero en el país en analizar la estructura genética poblacional de *Ae. aegypti* a una escala micro-geográfica mediante el uso de loci de microsatélites.

- **5.1 Diversidad genética de las poblaciones de *Ae. aegypti* de Luque y San Lorenzo:**

Los loci de microsatélites seleccionados en este trabajo resultaron altamente polimórficos en todos los sitios muestreados, confirmando su utilidad como “marcadores” para este tipo de estudio. Uno de los principales objetivos de este análisis consistió en detectar si las frecuencias genéticas siguen un patrón predecible de acuerdo con la hipótesis de apareamiento aleatorio bajo un supuesto de equilibrio de H-W. Aunque algunas de las poblaciones geográficas incluidas en el estudio se encontraron muy próximas al equilibrio, la mayoría de ellas presentaron exceso de homocigotos (LUB, LUC, SLA, SLB y SLC) (Tabla 9).

La deficiencia de heterocigotos puede observarse cuando se analizan dos o más demos con diferentes frecuencias alélicas como si se tratara de una sola población (subestructura de una población denominada efecto Wahlund). En el caso de este trabajo, dado que los individuos de cada sitio provienen de ovitrampas colocadas en una misma vivienda durante una semana, aunque no se puede descartar la posibilidad de que los mosquitos analizados representen la descendencia de hembras procedentes de diferentes subpoblaciones, resulta poco probable que esta causa explique completamente el exceso de homocigotos observado.

Finalmente, un déficit de heterocigotos también puede observarse por el apareamiento entre individuos emparentados (endogamia). Considerando que esta especie se caracteriza por sus hábitos antropofílicos, al disponer de sitios de reproducción y alimentos cercanos a los vecindarios, mantienen un rango estrecho de dispersión activa, que por lo general no sobrepasa los 150 mts. de vuelo (54). Estas características, ya sean dadas naturalmente de manera independiente en la población o en forma conjunta, podrían aumentar las probabilidades de que los individuos que conforman las poblaciones se reproduzcan in situ (6). Por otra parte, el flujo genético podría contribuir a homogeneizar las poblaciones y reducir las diferencias genéticas entre ellas (39).

De manera contraria a lo ya expuesto, la población (LUA), presentó un exceso de heterocigotos, y una elevada diversidad genética. Esto podría deberse a que esta zona de muestreo se encuentra en la periferia del aeropuerto internacional, por lo que podría inferirse la existencia del transporte pasivo mediante la introducción de individuos con múltiples contribuciones de conjuntos genéticos, provenientes de diferentes orígenes geográficos. Esta explicación se ve ampliamente sugerida en estudios en los que las variaciones en el acervo genético encontradas en las poblaciones, se ven influenciadas por el transporte pasivo de *Ae. aegypti*, dónde el comercio, la migración de personas y la conectividad entre rutas, cumplen un papel preponderante en la diversidad encontrada entre las poblaciones (1,22,75,76).

La variabilidad genética observada (polimorfismo genético) en las poblaciones estudiadas fue elevada en comparación con otros trabajos que han utilizado los mismos marcadores microsatélites. Los valores medios obtenidos para la riqueza alélica ( $RA=6,63$ ) y la heterocigosis esperada ( $He=0,666$ ) fueron mayores a los observados en diferentes países tales como: Tailandia (60), Brasil (77,78) EEUU (1) y Argentina (26). Al mismo tiempo, estos valores han sido también mayores que los observados en otros trabajos que han utilizado otros marcadores moleculares, tales como el de Paupy *et al.* (2012) (79) en Bolivia, y Calvez *et al.* (2016) en islas del Pacífico (76). Esta observación podría deberse a la constante introducción de acervos genéticos en las poblaciones, la cual estaría mediada por el transporte pasivo propiciado por la elevada actividad comercial de la región analizada.

Por otra parte, los alelos exclusivos son distintivos de una población y pueden estar en frecuencias bajas o altas, convirtiéndose en una medida relativa de la identidad genética de la misma. Esta medida puede reflejar la historia evolutiva reciente de una población, ya que depende de la acción de la deriva génica, tasas mutacionales elevadas y/o un flujo génico restringido. Cualquiera sea la causa de origen, se requerirá en todos los casos, un cierto tiempo de divergencia para que muchos alelos exclusivos se acumulen en una población (27).

En este trabajo, en el total de las poblaciones analizadas se identificaron 12 alelos exclusivos para los diferentes loci, la mayoría de ellos presentes en bajas frecuencias (alelos raros). Esta observación no sería concordante con el supuesto de que existe un elevado intercambio génico entre poblaciones, sugerido por nuestros resultados. Sin embargo, considerando la tendencia de la especie de reproducirse dentro de pequeños demos frente a condiciones ambientales favorables, la existencia de flujo génico (como ya se sugirió, probablemente mediado por transporte pasivo) no sería suficiente para contrarrestar los efectos de la endogamia, la deriva génica y la tasa de mutación elevada.

Además, se ha sugerido que la abundancia de alelos exclusivos en una población podría ser un indicativo indirecto de la antigüedad de la misma, debido al requerimiento de tiempo para la fijación de los alelos raros (27). En cuanto a la cantidad de alelos exclusivos detectados en los dos municipios analizados, se observó una diferencia significativa entre ambos (4 en Luque y 8 en San Lorenzo) lo que podría interpretarse como indicio de que las poblaciones de San Lorenzo se encuentran establecidas desde más tiempo que las de Luque. Esto sería factible al considerar que Luque se halla en el área de influencia del aeropuerto internacional y con ello, constantes reintroducciones serían posibles. Sin embargo, para poder corroborar esta hipótesis se requerirían otros tipos de análisis que no son objetivos de este trabajo. Además, a pesar de haberse detectado mayor cantidad de alelos exclusivos en las poblaciones de San Lorenzo, dado que estos se encuentran en frecuencias muy bajas, es de esperarse que no generen diferencias en las frecuencias alélicas, en concordancia con la baja divergencia génica observada en las poblaciones de este municipio.

En base a lo observado en las poblaciones muestreadas podría inferirse que la variabilidad establecida estaría promovida por el transporte pasivo, el cual mantiene el ingreso constante de *stocks* genéticos a las poblaciones. Las poblaciones pertenecientes a los barrios de la ciudad de San Lorenzo son las que se encuentran en vecindarios más urbanizados, con mayor densidad poblacional y domicilios con características socio-ambientales (como la presencia de materiales de construcción, contenedores, neumáticos e industrias en las proximidades) propicias para la cría y establecimiento de *Ae. aegypti*. Además, cabe destacar que esta zona fue reportada como foco de infestación durante los últimos brotes epidémicos (2). Por otra parte, los barrios de la ciudad de Luque, a pesar de su urbanización, cuentan con zonas de vegetación densa y autopistas, las cuales podrían limitar en cierto grado la dispersión efectiva de este vector. La influencia de estas características ambientales, dadas por modificaciones debido a intervenciones humanas, ya se han reportado en estudios similares (1,39,75).

- **5.2 Estructura poblacional de *Ae. aegypti*:**

Los valores del estimador de diferenciación genética *FST* pueden reflejar dos escenarios biológicos distintos. Valores de *FST* cercanos a 0 indican que los individuos analizados forman una unidad panmíctica; en el otro extremo, un valor cercano a 1, indica que al menos dos de las poblaciones muestreadas están fijadas para diferentes alelos (68). En términos sencillos para la interpretación del *FST*, se ha sugerido que un valor situado en el rango 0 - 0,05, indica poca diferenciación genética; un valor entre 0,05 y 0,15, una diferenciación moderada; un valor entre 0,15 y 0,25, marcada diferenciación; y valores por encima de 0,25, muy elevada diferenciación genética (15,80).

Por otra parte, el estimador de diferenciación genética *RST* propuesto por Slatkin (1995) (32) asume que cada mutación cambia la longitud de un alelo por una unidad repetida (mutación *stepwise*). En base a ello, *RST* se encuentra definido por la variación en la longitud de alelos de los loci analizados debido a diferencias entre las poblaciones, pudiendo presentar valores negativos en aquellos casos donde las diferencias de tamaños alélicos son mayores dentro de las poblaciones que entre ellas (67).

Los  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  se utilizan para describir la diferenciación de una población total en varios niveles de estructuración genética, ya sea directamente como estimadores de diferenciación o a través de su relación con el número efectivo de migrantes. Sin embargo, el  $R_{ST}$  parece reflejar mejor la diferenciación en poblaciones muy estructuradas y se encuentra menos afectado por las tasas mutacionales de sus secuencias genómicas. Por lo tanto, la comparación de los estadísticos  $F$  y  $R$  es meramente representativa, especialmente cuando se esperan diferencias importantes en los niveles de divergencia entre conjuntos de subpoblaciones (68).

En este estudio, los niveles de diferenciación genética entre pares de poblaciones fueron estadísticamente significativas para el 60% de las comparaciones, en el caso del índice  $F_{ST}$ , y en el 46,66% de las comparaciones considerando el índice  $R_{ST}$ . Con ambos estimadores, la divergencia genética observada entre poblaciones fue baja ( $F_{ST}=0,037$  y  $R_{ST}=0,024$ ), sugiriendo la presencia de un alto nivel de flujo génico que conduciría a homogeneizar las poblaciones, y esto a vez podría estar mediado por transporte pasivo.

En líneas generales, a pesar de diferencias menores observadas entre ambos estimadores, se obtuvieron patrones de divergencia genética semejantes. La población (LUB), divergió marcadamente de los demás barrios analizados, presentando con ambos índices el mayor valor al compararla con la población (SLB). La diferenciación observada dentro de los dos municipios estudiados, fue inversa entre ambos estimadores. Se detectó mayor diferenciación dentro del municipio Luque (LUA, LUB y LUC) utilizando  $F_{ST}$ , y se observó lo opuesto cuando se utilizó el estimador  $R_{ST}$ . No obstante, los valores obtenidos para  $R_{ST}$  en las comparaciones entre las poblaciones procedentes de los barrios de San Lorenzo (SLA, SLB y SLC), fueron mínimos; lo que podría explicar la diferencia observada entre ambos estimadores.

Por otra parte, en varias comparaciones entre poblaciones donde fue utilizado el estimador  $R_{ST}$ , los valores obtenidos fueron negativos (equivalentes a 0), lo que indicaría que existe nula diferenciación entre el par de poblaciones consideradas. Esta observación estaría indicando que la variación “dentro” de las poblaciones sería mayor que la existente “entre” dichas poblaciones, lo cual sería concordante con el elevado polimorfismo observado dentro de la mayoría de ellas.

Los valores de divergencia genética entre poblaciones fueron mayores para el índice  $F_{ST}$  que para el  $R_{ST}$ . En líneas generales, al tratarse de marcadores moleculares con alta tasa de mutación, se esperaría que fuera detectado lo contrario. Sin embargo, si las tasas de flujo génico fueran también elevadas, la diferenciación observada entre poblaciones estaría involucrando principalmente a las diferencias de frecuencias alélicas más que a las diferencias de los tamaños alélicos (67). Dado que los resultados obtenidos en este estudio permiten inferir un considerable intercambio génico entre las diferentes poblaciones analizadas, resulta coherente observar mayor diferenciación mediante el índice  $F_{ST}$ .

Al considerar el índice  $F_{ST}$  en el análisis de AMOVA, se observó que la mayor parte de la varianza genética fue atribuible a las diferencias entre los individuos dentro de cada población ( $F_{IS}=0,093$ , porcentaje de variación = 87%). Por el contrario, cuando fue considerado el índice  $R_{ST}$ , el mayor porcentaje de la varianza observada se atribuyó a las diferencias observadas entre las poblaciones ( $R_{ST}=0,024$ , porcentaje de variación = 87%). Estos resultados estarían indicando que la divergencia genética detectada entre los individuos, puede deberse principalmente a diferencias en las frecuencias alélicas, mientras que la diferenciación entre las distintas poblaciones sería mayormente determinada por diferencias en los tamaños alélicos.

Bajo el patrón de aislamiento por distancia, las poblaciones separadas por una mayor distancia geográfica, muestran mayores niveles de diferenciación genética, lo cual se logra cuando las poblaciones alcanzan un equilibrio entre deriva y flujo génico (81). En base a los datos aquí obtenidos, el test de Mantel evidenció una baja correlación no significativa entre las distancias geográfica y genética ( $r = 0,13$   $P = 0,30$ ). La tendencia positiva de la correlación sería reflejo de la preferencia de *Ae. aegypti* de aparearse principalmente dentro de pequeñas unidades reproductivas, por lo que a mayores distancias geográficas se observaría un menor grado de parentesco. Sin embargo, la ausencia de significancia estadística para los índices de correlación, indicaría cierto grado de flujo génico (mediado por transporte pasivo), lo que sugiere que la distancia geográfica no sería un factor determinante de la variación genética encontrada en las poblaciones de estudio. Finalmente, cabe esperar que, bajo el escenario previamente propuesto del constante ingreso de nuevos *stocks* genéticos, resulte poco probable que las poblaciones de esta especie presentes en el área de estudio logren estabilizarse hasta alcanzar un patrón de aislamiento por distancia.

### - 5.3 Determinación de *clusters* genéticos:

En contraste con la estadística tradicional, los métodos de asignación bayesiana permiten detectar discontinuidades genéticas a partir de genotipos multilocus de un individuo e infieren el número más probable de *clusters* genéticos sin suponer poblaciones definidas “a priori”.

Mediante el cálculo de las frecuencias alélicas, estiman para cada individuo la probabilidad de pertenecer a cada uno de los *clusters*, lo cual es una gran ventaja con respecto a los métodos tradicionales de análisis de estructura genética (82). Este análisis agrupó las 6 poblaciones de este estudio en dos *clusters* genéticos distintos y cada una de ellas presentó ancestrías mixtas, evidenciando una leve estructuración poblacional en el área de estudio, lo cual mostró concordancia con los bajos niveles de divergencia genética detectados por los índices *FST* y *RST*.

Cabe mencionar, que, en este agrupamiento Bayesiano (LUC) fue considerado un *cluster* independiente. Este patrón de diferenciación podría encontrarse influido por el contexto ecológico de la zona de muestreo, la cual presenta particularidades ambientales como heterogeneidad espacial y fragmentación del hábitat. Por ello, en un

rango estrecho de distancias geográficas, se pueden encontrar, zonas medianamente urbanas intercaladas con áreas rurales y boscosas, lo que podría estar restringiendo el intercambio genético con las poblaciones circundantes y promoviendo con ello, su diferenciación con el resto.

Finalmente, considerando las cortas distancias de dispersión activa ampliamente documentadas para *Ae. aegypti* y los resultados obtenidos en este trabajo (elevado polimorfismo genético y baja diferenciación genética entre poblaciones), se podría inferir que los controles sanitarios aplicados con anterioridad a este estudio no han sido lo suficientemente eficaces como para evitar el constante ingreso de nuevos *stocks* genéticos por transporte pasivo, así como su establecimiento e intercambio génico dentro del área analizada.

De acuerdo al aporte de datos generados en relación al comportamiento biológico y movimiento asociado al transporte pasivo de este vector, se sugiere realizar este tipo de monitoreos genéticos previamente a establecer cualquier campaña de control vectorial para maximizar su eficacia. Por otra parte, a tal efecto se recomienda aumentar la cantidad de individuos a ser incluidos en el estudio, para favorecer la aleatorización de datos e incluir otras zonas de muestreo con la finalidad de obtener un espectro más amplio acerca del comportamiento de este vector en la zona metropolitana del Departamento central del Paraguay.

## - 6. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- Los loci microsatélites utilizados en este estudio demostraron un alto grado de polimorfismo, confirmando su utilidad como marcadores para este tipo de estudio.
- La diferenciación genética moderada ( $F_{ST}$ ) y ( $R_{ST}$ ) encontrada entre poblaciones podría verse influenciada por factores que facilitan la dispersión de *Ae. aegypti*, teniendo en cuenta que las zonas muestreadas, en su mayoría correspondieron a centros urbanos, con marcado movimiento comercial, en el cual se han destacado los puntos muestreados de la ciudad de San Lorenzo.
- La distancia geográfica no sería un factor determinante de la variación genética encontrada en las poblaciones de estudio, se sugiere que la misma estaría mediada por el transporte activo del vector.
- Mediante los valores obtenidos con el AMOVA se evidenció que la divergencia genética detectada entre los individuos se debería principalmente a diferencias en las frecuencias alélicas ( $F_{ST}$ ), mientras que la diferenciación entre las distintas poblaciones sería mayormente determinada por diferencias en los tamaños alélicos ( $R_{ST}$ ).
- El análisis de estructura agrupó las poblaciones analizadas en dos *clusters* genéticos distintos y cada una de ellas presentó ancestrías mixtas, evidenciando una leve estructuración poblacional en el área de estudio.

## - 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pless E, Gloria-Soria A, Evans BR, Kramer V, Bolling BG, Tabachnick WJ, et al. Multiple introductions of the dengue vector, *Aedes aegypti*, into California. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(8):e0005718.
2. WEB D.G.V.S. [Internet]. [cited 2021 Oct 28]. Available from: <https://dgvs.mspbs.gov.py/page/#arbovirosis.html>
3. Declaran alerta epidemiológica por Dengue, Zika y Chikungunya en todo el país » Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social [Internet]. [cited 2019 Jun 14]. Available from: <http://portal.mspbs.gov.py/declaran-alerta-epidemiologica-por-dengue-zika-y-chikungunya-en-todo-el-pais/>
4. Michael N. *Aedes Aegypti*: Biología y Ecología [Internet]. 1986 [cited 2021 Nov 1]. Available from: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28513/PNSP8663\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/28513/PNSP8663_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
5. Fuentes-Vallejo M, Higuera-Mendieta DR, García-Betancourt T, Alcalá-Espinosa LA, García-Sánchez D, Munévar-Cagigas DA, et al. Análisis territorial de la distribución de *Aedes aegypti* en dos ciudades de Colombia: Aproximación desde la coremática y el enfoque ecosistémico. *Cad Saude Publica*. 2015;31(3):517–30.
6. Reiter P.. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007 Jun;7(2):261–73.
7. Almiron W., Gurtler E., Coto H., Einam M., Miceli V. Protocolo de acciones de control de *Aedes aegypti* [Internet]. 2009 [cited 2021 May 13]. p. 1–60. Available from: <https://www.msal.gob.ar/images/stories/cofesa/2009/acta-02-09/anexo-7-control-de-vectores-02-09.pdf>.

8. Rivera García O. *Aedes aegypti*, virus dengue, chinkugunia, zika y el cambio climático. Máxima alerta médica y oficial. REDVET Rev Electrónica Vet. 2014;15(10).
9. Salvatella R. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas. la situación de Uruguay [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://www.rmu.org.uy/revista/1996v1/art5.pdf>
10. Transmisión | Dengue | CDC [Internet]. [cited 2021 Oct 27]. Available from: <https://www.cdc.gov/dengue/es/transmission/index.html>
11. Acerca del dengue: lo que necesita saber | Dengue | Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>
12. Dengue - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/dengue>
13. Fin de la epidemia de Dengue más grande de las últimas dos décadas - Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://www.mspbs.gov.py/portal/20658/fin-de-la-epidemia-de-dengue-mas-grande-de-las-ultimas-dos-decadas.html>
14. Programa Nacional de Control Vectorial del Dengue - Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo [Internet]. [cited 2019 Jun 14]. Available from: <https://www.mspbs.gov.py/senepa/dengue.html>
15. Hartl DL, Clark AG. Principles of Population Genetics. 4<sup>o</sup> edición. Massachusetts. Sinauer Associated. Inc. 1997.
16. Solomon B. Biología. 9<sup>o</sup> edición. México: CENGAGE Learning; 2013.
17. Rochambeau H de, Fournet-Hanocq F, Khang JVT. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann Zootech*. 2000. 49(2):7.
18. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA, McInnes KH. Introduction to Conservation Genetics. Vol. 7. Cambridge University Press. Evolutionary Ecology Research. 2002.
19. Aranguren-Méndez JA, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y, Jordana J. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. *Arch Latinoam Prod Anim*. 2005;13(1):1.

20. P.W H. Genetics of populations. 2°. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers; 2000.
21. Eguiarte L, Aguirre-Planter E, Scheinvar E, Gonzalez A. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. In 2010.
22. Julio NB, Chiappero MB, Rossi HJ, Dueñas JCR, Gardenal CN. Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Córdoba (Argentina), a recently reinfested area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(4):626–31.
23. Brown JE, Obas V, Morley V, Powell JR. Phylogeography and spatio-temporal genetic variation of *aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in the Florida keys. *J Med Entomol*. 2013;50(2):294–9.
24. Endersby NM, Hoffmann AA, White VL, Lowenstein S, Ritchie S, Johnson PH, et al. Genetic Structure of *Aedes aegypti* in Australia and Vietnam Revealed by Microsatellite and Exon Primed Intron Crossing Markers Suggests Feasibility of Local Control Options. *J Med Entomol*. 2009; 46(5):1074–83.
25. McCoy KD. The population genetic structure of vectors and our understanding of disease epidemiology. *Parasite*. 2008. 15(3):444–8.
26. Ayala AM, Vera NS, Chiappero MB, Almirón WR, Gardenal CN. Urban Populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) From Central Argentina: Dispersal Patterns Assessed by Bayesian and Multivariate Methods. *J Med Entomol*. 2020;(X):1–8.
27. Kalinowski ST. Counting Alleles with Rarefaction: Private Alleles and Hierarchical Sampling Designs. *Conserv Genet* 2004. 2004. 5(4):539–43.
28. Murray BW. The estimation of genetics distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. 1996.
29. Piñero D, Barahona A, Eguiarte L, Rocha-Olivares A, Lizana RS. El conocimiento de la variabilidad genética. *Cap Nat México Vol I Conoc actual la Biodivers*. 2008;415–35.
30. Crow JF, Aoki K. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1984.81(19):6073.

31. PW H. Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*. 1999; 53(2):313–8.
32. Slatkin M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 1995;139(1).
33. Michalakis Y, Excoffier L. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles With Special Reference for Microsatellite Loci. *Genetics*. 1996;142(3):1061–4.
34. Garrido-Garduño T, Vázquez-Domínguez E. Genetic, spatial and connectivity methods of analysis in landscape genetics. *Rev Mex Biodivers*. 2013;84:1031–54.
35. Wright S. Isolation by distance. *Genetics*. 1943;28(2).
36. Dieckmann U, Doebeli M. On the origin of species by sympatric speciation. *Nat* 1999;400(6742):354–7.
37. Coulon A, Cosson J, Angibault J, Cargnelutti B, Galan M, Morellet N, et al. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Mol Ecol*. 2004;13(9):2841–50.
38. Hiragi C, Simões K, Martins E, Queiroz P, Lima L, Monnerat R. Va riabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. *Neusa Hamada – INPA Neotrop Entomol*. 2009;38(4):542–7.
39. Costa-Ribeiro MCV da, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux A-B. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(8):917–21.
40. Soliani C, Rondan-Dueñas J, Chiappero M, Martínez M, Rosa Eg Da, Gardenal Cn. Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* from Uruguay and northeastern Argentina inferred from ISSR-PCR data. *Med Vet Entomol*. 2010;24(3):316–23.
41. You-Chu L, Abraham K, Tziom F, Avigdor B, Eviatar N. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*. 2002;11(12):2453–65.

42. Hamada H, Seidman M, Howard B, Gorman C. Enhanced gene expression by the poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequence. *Mol Cell Biol*. 1984; 4(12):2622–30.
43. Oliveira E, Pádua J, Zucchi M, Vencovsky R, Vieira M. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol*. 2006;29(2):294–307.
44. Eguiarte L, Souza V, Aguirre X. (PDF) Ecología molecular [Internet]. 2007 [cited 2021 Nov 1]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/258129643\\_Ecologia\\_Molecular](https://www.researchgate.net/publication/258129643_Ecologia_Molecular)
45. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*. 2004;5(6):435–45.
46. Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*. 1990 Aug 1;7(4):524–30.
47. Haymer DS. Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. *Insect Mol Biol*. 1994;3(3):191–4.
48. Carlsson J. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *J Hered*. 2008;99(6):616–23.
49. C S. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 2000;109(6):365–71.
50. Li WS. *Molecular Evolution*. Sunderland: Sinauer Ass. Inc; 1997.
51. Infestación larvaria se mantiene con altos índices en once regiones sanitarias - Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social [Internet]. [cited 2019 Jun 14]. Available from: <https://www.mspbs.gov.py/portal/17102/infestacion-larvaria-se-mantiene-con-altos-indices-en-once-regiones-sanitarias.html>
52. Grassi B. Estado del clima Paraguay 2019: Cambio climático, evidencias científicas e impacto [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 1]. Available from: <http://dncc.mades.gov.py/wp-content/uploads/2020/10/Estudio-del-Clima-Paraguay-2019-1.pdf>
53. Atlas Demográfico del Paraguay, 2012 [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://www.ine.gov.py/publication-single.php?codec=MzY=>
54. Reiter P, Amador MA, Colon N. Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *J Am Mosq Control Assoc*. 1991 Mar;7(1):52-5.

55. Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios | Semantic Scholar [Internet]. [cited 2021 Nov 1]. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/Manual-de-Indicaciones-Técnicas-para-Insectarios-Bisset/24d97c28e14ae7eac98363852d9093c41cb23ad7>
56. Darsie RF. Mosquitos de Argentina. Oarte I. Claves para identificación de hembras adultas y larvas de cuarto estadio (Diptera Culicidae). Sistemática de mosquitos. In: 3rd ed. 1985. 153–253.
57. De Armas Y, Capó V, González E, Mederos L, Díaz R. DNA extraction from paraffin embedded tissues by Chelex-100. *Esp. Patol.* 2006; 39(3):171-174
58. Brown TA. *Gen Cloning and Introduction*. 3rd ed. Manchester UK: Champman and Hall; 1995.
59. Chambers EW, Meece JK, McGowan JA, Lovin DD, Hemme RR, Chadee DD, et al. Microsatellite isolation and linkage group identification in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Hered.* 2007;98(3):202–10.
60. Slotman MA, Kelly NB, Harrington LC, Kitthawee S, Jones JW, Scott TW, et al. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. *Mol Ecol Notes.* 2007;7(1):168–71.
61. Alberto F. MsatAllele\_1.0: An R Package to Visualize the Binning of Microsatellite Alleles. *J Hered.* 2009 May 1;100(3):394–7.
62. Goudet, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3. 2001
63. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills D, Shipley P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes.* 2004;4(3):535–8.
64. El Mousadik A, Petit RJ. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor Appl Genet.* 1996;92(7):832–9.
65. Peakall R, Smouse PE. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics.* 2012;28(19):2537.

66. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* (N Y). 1984;38(6):1358.
67. Rousset F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*. 1997 Apr;145(4):1219–28.
68. Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol*. 2002 Feb;11(2):155-65.
69. Garcia-Vallvé S, Palau J, Romeu A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol Biol Evol*. 1999 Sep;16(9):1125-34.
70. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000 Jun;155(2):945–59.
71. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol*. 2005 Jul;14(8):2611–20.
72. Earl DA, vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour*. 2012 Oct 13;4(2):359–61.
73. Jakobsson M, Rosenberg NA. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 2007;23(14):1801–6.
74. Rosenberg NA. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes*. 2004;4(1):137–8.
75. Huber K, Loan L Le, Chantha N, Failloux AB. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Acta Trop*. 2004;90(1):23–9.
75. Huber K, Loan L Le, Chantha N, Failloux AB. Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Acta Trop*. 2004;90(1):23–9.
76. Calvez E, Guillaumot L, Millet L, Marie J, Bossin H, Rama V, et al. Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):1–18.
77. Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):1–10.

78. Wilke ABB, Wilk-da-Silva R, Marrelli MT. Microgeographic population structuring of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*. 2017;12(9).
79. Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja S, et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infect Genet Evol*. 2012;12(6):1260–9.
80. Wright S. *Evolution and the genetics of Populations*. Vol. 4. Chicago: The University of Chicago Press; 1978.
81. Hutchison DW, Templeton AR. Correlation Of Pairwise Genetic And Geographic Distance Measures: Inferring The Relative Influences Of Gene Flow And Drift On The Distribution Of Genetic Variability. *Evolution*. 1999;53(6):1898–914.
82. Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends Ecol Evol*. 2005 Mar 1;20(3):136–42.

- 8. ANEXOS

**Anexo A**

**Consentimiento informado a los propietarios de las viviendas visitadas.**

**Proyecto:** Diversidad Genética de mosquitos *Aedes aegypti* mediante el empleo de Marcadores Microsatélites (SSR) en cuatro poblaciones con alto índice de infestación larvaria del Paraguay.

**Objetivo:** Investigar la variabilidad genética en poblaciones de *Aedes aegypti*.

La colecta de material biológico (huevos de mosquitos) es necesario para la cría de estos mosquitos para su posterior análisis genético, sólo será necesario colocar ovitrampas en la periferia de las casas. Las mismas serán retiradas siete días después de su colocación.

Los nombres, ni datos de ninguno de los dueños de las viviendas seleccionadas serán divulgados y la información obtenida será solo para uso de la investigación.

En caso de participar en el trabajo

Yo.....

Cel. N°.....

Declaro haber leído la hoja de información y permito a la investigadora Sady Britez estudiante de maestría, quien me explicó sobre la investigación, acceder a mi casa, bajo mi responsabilidad, para colocar trampas en busca de huevos de mosquitos. Mi participación es voluntaria, entiendo que las actividades realizadas en esta investigación no representan ningún riesgo para los humanos y animales, además de no generar ningún gasto de mi parte, también puedo retirarme si considero pertinente.

-----

Firma del propietario

-----

Lic. Sady Britez L.

CI: Investigador responsable

CI: 4.177.999

(0971) 7955-267

## Anexo B

### Hoja de información a los propietarios de las viviendas visitadas

**Proyecto:** Diversidad Genética de mosquitos *Aedes aegypti* mediante el empleo de Marcadores Microsatélites (SSR) en cuatro poblaciones con alto índice de infestación larvaria del Paraguay.

**Objetivo:** Investigar la variabilidad genética de las poblaciones de *Aedes aegypti*.

**Responsable:** Lic. Biol. Sady Britez

La colecta de material biológico (huevos de mosquitos) es necesario para su cría en el laboratorio, para su posterior análisis genético, sólo será necesario colocar las ovitrampas en el patio de sus hogares, estos consisten en recipientes (planteras de plástico) con paletas (de madera) que no se rompen, a las cuales se les agrega solamente agua, una única vez, en presencia del investigador; no será necesario recargarlas o cambiarlas de lugar, las mismas serán retiradas cinco a siete días después de su instalación, serán transportadas al laboratorio antes de la eclosión de los huevos, por ello la colecta de este material biológico, no será considerado como potenciales criaderos, y no representará ningún riesgo para usted, ni a la comunidad.

Se deja en claro que esta colecta no se realiza en conjunto con otras entidades, todo material o dato colectado será de uso exclusivo y con fines investigativos.

Ante cualquier duda que no haya sido aclarada favor comunicarse con la investigadora principal Lic. Sady Britez estudiante de Maestría del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina Tropical, Dependencia Insectario al siguiente número (0971)795267.

Su participación es de carácter voluntario y podría retirarse en caso de considerar pertinente, sin ningún perjuicio.

Desde ya agradecemos su colaboración

-----

Lic. Sady Camila Britez L.

Investigador responsable

CI: 4.177.999

## Anexo C

### Procedimiento de tinción con Nitrato de Plata

**Reactivos:**

Etanol al 10%

Ácido Nítrico al 1%

Nitrato de Plata al 1%

Carbonato de Sodio  $\text{NaNO}_3$

Formaldehído

Ácido acético

**Procedimientos:**

1. Desmontar el gel y separar los vidrios en una placa, agregar Etanol al 10%. Remover por 10 min y luego descartar.
2. Incubar (sin lavar) en Ác. Nítrico 1% por 3 min. Remover y luego descartar, lavar con agua destilada 2 veces por 30 seg.
3. Incubar con Nitrato de Plata por 20 min. Remover continuamente para evitar que precipite la Plata, luego descartar y lavar con agua destilada 2 veces por 30 seg.
4. Mezclar 100 ml de  $\text{NaNO}_3$  con 180 ul de formaldehído, verter la mitad de la solución, agitar por 1 min. y luego remover el precipitado, adicionar lo restante, agitar y luego descartar.
5. Detener la reacción con Ác. acético por tiempo necesario, luego descartar.

## Anexo D

## Riqueza alélica de cada locus microsatélite por población de estudio

<b>Población</b>							
<b>Locus</b>	<b>LUA</b>	<b>LUB</b>	<b>LUC</b>	<b>SLA</b>	<b>SLB</b>	<b>SLC</b>	<i>All samples</i>
<b>AG1</b>	5	3	3.931	3	4	3	3.611
<b>AT1</b>	4.867	2.998	4	6.795	5.864	7.867	5,85
<b>AG3</b>	5	3.998	5	5	5.864	4.933	4.959
<b>AG5</b>	3.933	3	4.864	4	3.933	5	4.418
<b>AC7</b>	5.864	4.867	5.931	6.929	5.862	5.933	6.616
<b>AG4</b>	5	5.931	5.933	4.933	4.933	5.864	5.653
<b>AG2</b>	6,8	4.933	5.998	7.929	6.933	6.933	7.302
<b>B07</b>	5	3.933	6	5.862	8.731	4.931	6.679

## Anexo E

Presencia de *stuttering*, dominio del alelo corto y alelos nulos determinada por el programa Microchecker para cada locus y población.

Locus	LUA			LUB			LUC			SLA			SLB			SLC		
	SB	LAD	NA	SB	LAD	NA	SB	LAD	NA	SB	LAD	NA	SB	LAD	NA	SB	LAD	NA
AG1	no	no	no	no	no	no	no	no	<u>si</u>	no	no	no	no	no	no	no	no	no
AG4	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
AG2	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	<u>si</u>
AT1	no	no	no	no	no	no	<u>si</u>	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
AC7	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
AG5	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
B07	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	<u>si</u>	no	<u>si</u>
AG3	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	<u>si</u>	no	no	no
Obs.:	Esta población se encuentra probablemente en equilibrio de H-W			Esta población se encuentra probablemente en equilibrio de H-W			Esta población se encuentra probablemente en equilibrio de H-W con los loci AG1 y AT1 mostrando signos de alelos nulos o <i>stuttering</i>			Esta población se encuentra probablemente en equilibrio de H-W			Esta población se encuentra probablemente en equilibrio de H-W con el locus AG3 mostrando signos de alelos nulos			Esta población se encuentra probablemente en equilibrio de H-W con los loci AG2 y B07 mostrando signos de alelos nulos o <i>stuttering</i>		
SB: <i>stutter band</i> , bandas productos de <i>stuttering</i> ; LAD: <i>large allele dropout</i> , amplificación diferencial del alelo corto; NA: <i>null alleles</i> , alelos nulos.																		

### Anexo F

#### Probabilidades de desequilibrio genotípico por locus y población calculadas por el software FSTAT.

		LUA	LUB	LUC	SLA	SLB	SLC	Total
AG1	X AT1	0,353350	0,746040	0,753530	0,963550	0,860990	0,622410	0,716610
AG1	X AG3	0,004720	<u>0,000000</u>	0,820580	0,002070	0,000510	0,357990	<u>0,000000</u>
AG1	X AG5	0,289010	0,418980	0,907410	0,368250	0,439080	0,775590	0,436230
AG1	X AC7	0,182850	0,001260	0,392130	0,007460	0,222440	0,552520	0,000090
AG1	X AG4	0,499390	0,204300	0,820440	0,447900	0,195810	0,465470	0,068370
AG1	X AG2	0,406840	0,766660	0,370310	1,000000	0,097410	0,634180	0,164320
AG1	X B07	1,000000	0,953690	0,923430	0,840280	0,146660	0,407190	0,728110
AT1	X AG3	0,087410	0,176710	1,000000	1,000000	0,502280	0,343120	0,185820
AT1	X AG5	0,476240	0,003550	0,971300	0,869810	0,500670	0,037810	0,042320
AT1	X AC7	0,814060	0,008030	0,466760	0,775980	0,157780	0,183050	0,016100
AT1	X AG4	0,777900	0,002560	0,466500	0,320070	0,862570	0,061950	0,015090
AT1	X AG2	0,584850	0,119480	1,000000	0,043960	0,069010	1,000000	0,014880
AT1	X B07	0,036830	0,091480	0,130100	0,358980	0,105180	0,544140	0,001990
AG3	X AG5	0,814480	0,070940	1,000000	0,710980	0,172540	0,474610	0,325660
AG3	X AC7	0,030470	<u>0,000010</u>	1,000000	0,130680	0,035430	0,275840	<u>0,000000</u>
AG3	X AG4	1,000000	0,077600	0,304940	0,779520	0,179070	0,547080	0,114560
AG3	X AG2	0,470900	0,527240	1,000000	1,000000	0,261730	1,000000	0,492760
AG3	X B07	0,699930	0,936020	0,395960	0,371210	0,033820	0,268860	0,102610
AG5	X AC7	0,035460	0,001140	0,846870	0,863560	0,332850	0,157370	0,002170
AG5	X AG4	0,923490	0,000710	0,847200	0,226340	0,972300	0,201660	0,110080
AG5	X AG2	0,043050	0,047030	0,829920	0,609570	0,822060	1,000000	0,098770
AG5	X B07	0,024810	0,594570	0,913540	0,488520	0,485550	0,558800	0,174300
AC7	X AG4	0,546510	0,224220	0,003490	1,000000	0,602550	0,312660	0,047110
AC7	X AG2	0,049450	0,074920	1,000000	1,000000	0,530050	1,000000	0,064800
AC7	X B07	0,148410	0,548990	0,396260	0,733690	0,602220	0,068030	0,049830
AG4	X AG2	0,338410	1,000000	1,000000	0,013350	0,122290	1,000000	0,053930
AG4	X B07	0,036100	0,093800	0,395740	0,001030	0,179350	0,364750	<u>0,000020</u>
AG2	X B07	0,045150	0,573860	1,000000	0,013150	0,261450	1,000000	0,046390

Valores p ajustados para el nivel nominal del 5% y basados en 1.680.000 permutaciones. Valores subrayados: valores de p estadísticamente significativos después de la corrección de Bonferroni ( $p = 0,00003$ ).

## Anexo G-1

**Matriz de genotipos multilocus generada, mediante el genotipado de 8 loci  
microsatélites (Luque).**

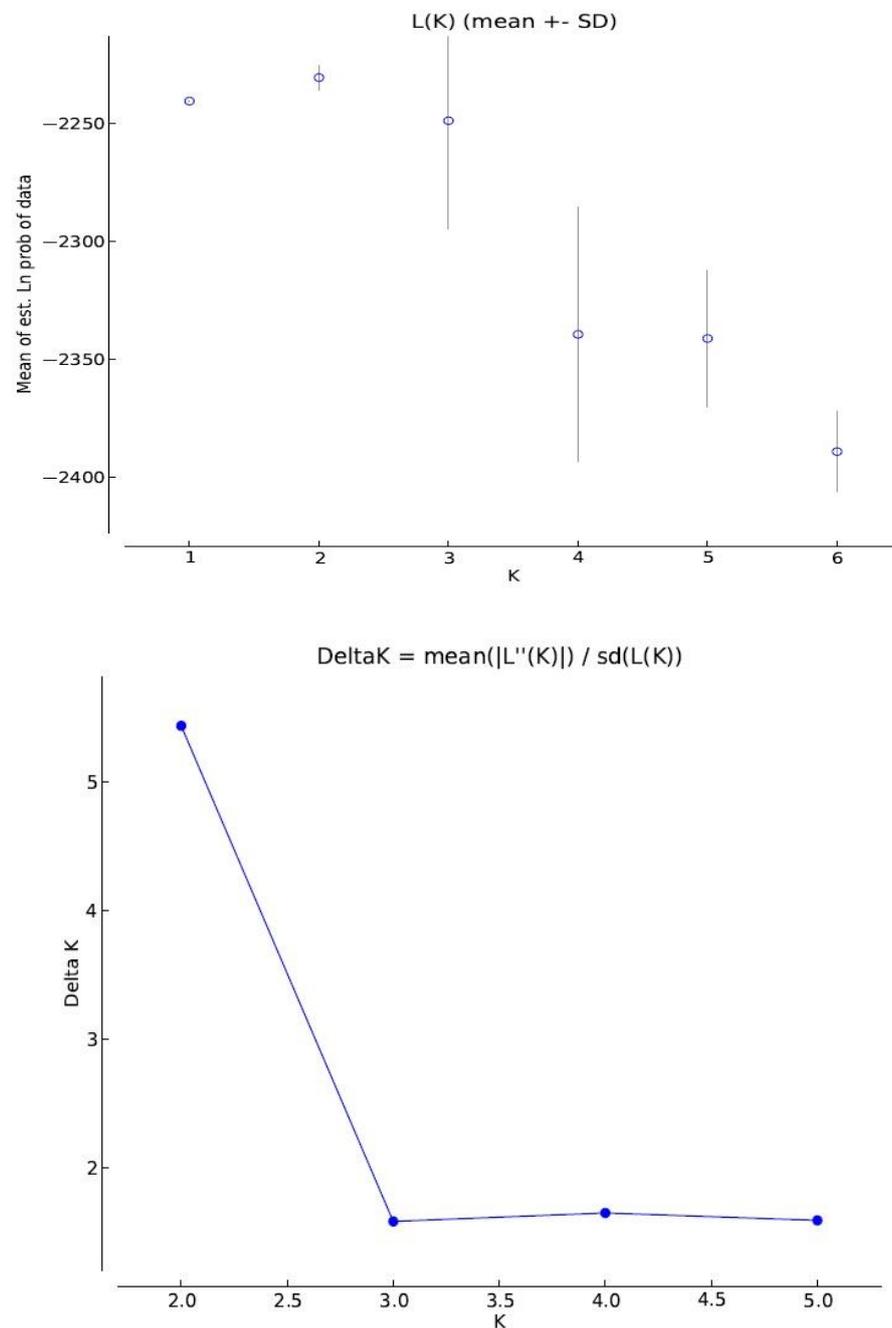
	AG1		AT1		AG3		AG5		AC7		AG4		AG2		B07	
LA1	103	107	141	145	155	159	158	162	117	131	130	130	104	108	166	186
LA2	0	0	141	145	151	159	158	158	117	127	144	152	108	132	168	176
LA3	105	105	141	147	151	157	154	158	117	121	140	152	104	128	170	176
LA4	99	105	141	141	151	153	158	162	117	127	130	140	104	108	166	166
LA5	105	107	141	143	151	153	158	162	117	127	140	152	104	106	0	0
LA6	103	107	141	143	155	159	158	162	117	131	0	0	106	128	166	170
LA7	107	107	143	145	159	159	158	162	131	131	130	144	108	128	166	166
LA8	103	107	141	145	155	159	154	158	117	117	142	152	106	128	170	176
LA9	105	105	145	145	157	157	154	158	117	137	144	152	106	106	170	170
LA10	103	103	141	145	155	159	162	162	131	131	140	152	104	130	170	176
LA11	103	107	143	149	155	159	158	158	117	117	152	152	102	106	170	170
LA12	103	105	141	141	151	155	158	160	131	135	152	152	104	104	168	168
LA13	105	107	141	145	151	159	154	158	117	121	140	152	104	128	170	176
LA14	101	103	141	141	153	155	158	158	127	131	130	152	108	108	166	168
LA15	105	107	141	143	157	159	158	162	117	131	140	144	106	128	166	170
LB1	103	107	141	145	155	159	154	158	117	137	140	142	104	104	170	170
LB2	105	107	143	143	159	159	158	160	117	121	130	152	104	132	170	170
LB3	103	105	141	141	151	155	154	154	131	137	130	150	104	108	168	170
LB4	103	107	141	143	155	159	154	160	131	137	140	140	108	108	166	168
LB5	103	105	141	143	151	155	154	154	131	137	130	140	108	130	166	168
LB6	103	103	141	143	155	155	160	160	117	117	130	144	104	132	166	168
LB7	105	107	141	143	151	159	154	154	117	131	140	150	104	130	166	170
LB8	105	105	141	143	151	151	154	154	117	131	150	150	104	108	170	170
LB9	103	107	141	143	155	159	154	154	131	137	140	150	108	108	166	170
LB10	105	107	141	143	151	159	154	154	117	131	130	140	108	108	166	168
LB11	105	107	141	141	157	159	154	160	131	131	140	152	108	132	160	170
LB12	103	103	143	143	155	155	158	160	117	117	130	152	108	128	166	170
LB13	105	107	141	143	151	159	154	154	117	131	140	150	104	108	170	170
LB14	105	105	141	143	151	151	154	154	117	131	150	150	104	130	170	170
LB15	107	107	141	145	155	157	154	158	117	127	140	144	130	130	170	170
LC1	105	105	0	0	153	159	158	158	121	127	140	144	132	132	168	168
LC2	105	107	141	143	157	157	154	154	127	137	144	150	104	108	170	170
LC3	105	105	141	141	151	151	154	158	117	131	130	150	106	106	160	160
LC4	107	107	141	147	151	159	158	158	121	131	150	152	128	132	170	186
LC5	105	107	141	141	151	157	158	158	117	117	140	152	132	132	168	170
LC6	105	105	143	145	151	159	158	162	121	137	144	152	108	128	160	186
LC7	103	107	145	145	155	159	158	158	117	121	144	152	128	128	170	170
LC8	105	107	143	143	151	155	154	160	117	127	130	144	132	132	170	186
LC9	101	103	141	145	153	155	158	158	117	117	140	152	104	108	186	186
LC10	105	107	141	143	157	159	158	164	119	131	130	142	104	130	170	170
LC11	107	107	143	143	159	159	158	158	121	121	130	140	106	132	0	0
LC12	105	107	141	145	159	159	154	158	117	117	140	152	108	132	186	186
LC13	105	107	141	141	159	159	158	164	117	121	150	152	104	108	160	170
LC14	107	107	141	141	153	159	154	158	121	131	140	144	130	132	176	188
LC15	107	107	143	145	157	159	158	158	117	127	140	140	104	128	170	170

## Anexo G-2

**Matriz de genotipos multilocus generada, mediante el genotipado de 8 loci microsatélites (San Lorenzo).**

	AG1		AT1		AG3		AG5		AC7		AG4		AG2		B07	
SA1	105	107	143	151	159	159	158	164	119	131	152	152	130	132	166	170
SA2	103	107	141	143	155	159	154	158	121	131	130	152	104	128	168	170
SA3	105	107	141	141	157	159	158	158	117	121	140	152	104	112	168	168
SA4	107	107	141	141	159	159	154	158	117	117	140	152	104	112	168	168
SA5	105	107	141	155	151	153	154	158	117	131	130	150	104	128	170	170
SA6	105	105	141	145	151	157	158	158	131	137	130	152	104	108	168	170
SA7	107	107	141	155	159	159	158	162	117	117	130	130	112	112	160	168
SA8	105	105	141	149	151	151	158	158	121	137	130	152	106	108	168	170
SA9	103	103	141	141	155	155	154	158	127	133	130	150	108	132	170	170
SA10	103	105	141	141	151	155	154	164	121	137	140	144	112	130	176	182
SA11	103	105	143	145	155	155	158	158	121	137	152	152	108	128	170	170
SA12	103	103	141	143	155	155	154	158	121	133	150	152	128	134	168	168
SA13	107	107	141	147	159	159	154	158	119	131	130	150	112	134	166	170
SA14	103	107	141	141	155	159	154	162	117	137	130	152	104	132	160	168
SA15	103	105	141	141	0	0	0	0	121	137	140	152	104	112	168	168
SB1	105	109	143	143	151	161	158	162	117	121	152	152	128	134	176	184
SB2	103	107	141	141	153	155	158	162	117	117	140	152	104	112	166	170
SB3	105	107	141	141	159	159	158	158	121	137	150	150	104	112	168	170
SB4	103	107	141	145	155	159	158	158	121	121	130	140	104	104	166	168
SB5	103	107	141	145	155	159	158	158	121	121	130	140	104	104	166	168
SB6	105	107	141	155	157	159	158	164	117	123	150	152	108	128	170	170
SB7	0	0	151	151	151	155	158	158	117	119	130	152	108	108	176	176
SB8	103	107	143	143	155	159	158	158	121	121	144	152	106	108	174	178
SB9	105	105	143	145	151	159	158	158	121	121	150	152	106	106	170	186
SB10	105	107	141	145	151	153	154	158	121	121	140	152	104	112	166	176
SB11	107	107	141	143	159	159	154	158	117	121	152	152	108	128	168	170
SB12	105	105	141	145	151	151	154	158	117	117	150	152	104	132	170	170
SB13	105	105	141	141	151	151	158	158	121	131	152	152	108	132	170	186
SB14	103	105	141	143	155	155	154	162	121	131	150	152	104	128	168	170
SB15	103	105	145	147	155	155	154	158	121	137	150	152	112	132	170	172
SC1	107	107	141	141	159	159	154	158	123	133	150	152	104	104	170	170
SC2	105	107	155	157	151	159	154	158	117	117	150	152	112	112	170	170
SC3	105	105	143	145	151	157	158	162	127	127	144	152	106	106	170	170
SC4	105	105	143	149	151	151	154	154	117	127	130	152	104	104	186	186
SC5	105	105	141	145	151	155	154	158	137	137	144	152	108	128	182	182
SC6	103	105	143	145	155	159	154	164	127	137	130	130	108	128	170	176
SC7	103	103	151	151	155	155	154	158	117	131	152	152	108	130	170	186
SC8	105	107	141	145	155	159	154	154	117	137	130	148	104	112	168	170
SC9	105	105	141	143	157	157	158	160	117	137	152	152	106	106	168	168
SC10	105	105	141	143	157	157	158	160	117	137	152	152	104	106	168	168
SC11	105	107	147	149	157	159	158	158	123	137	130	152	108	128	170	170
SC12	103	107	141	149	155	159	0	0	131	131	130	152	130	130	168	170
SC13	107	107	151	151	155	159	154	158	123	127	146	150	108	108	168	168
SC14	105	107	151	157	151	159	154	158	123	131	130	150	106	108	168	170
SC15	103	107	151	157	153	155	154	158	123	127	130	150	108	132	168	168

## Anexo H



**Figura X: Resultados obtenidos por asignación Bayesiana con Structure para un  $k=2$ .** Se muestra el número de agrupamientos con mayor verosimilitud, logaritmo natural de la probabilidad de pertenencia [LnP(K)] para todas las poblaciones del estudio y los valores promedios para el DeltaK de Evano para cada k calculado.