



ARTÍCULO ORIGINAL

Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en el departamento de Sucre, Colombia, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial *ND4*

María Claudia Atencia, María de Jesús Pérez, Sandy Milena Caldera, María Cristina Jaramillo, Eduar Elías Bejarano

Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia

Introducción. *Aedes aegypti* es la especie de mosquito de mayor relevancia en América por transmitir los virus del dengue, del Zika, del chikungunya y de la fiebre amarilla. Tanto factores ecológicos como el control químico, pueden influir en la composición genética de las poblaciones de *Ae. aegypti*, por lo cual es necesaria su caracterización.

Objetivo. Determinar la variabilidad genética de las poblaciones de *Ae. aegypti* en cuatro municipios del departamento de Sucre, Colombia.

Materiales y métodos. Larvas de *Ae. aegypti*, recolectadas en los municipios de Sincelejo, Sampués, Corozal y Guaranda del departamento de Sucre, fueron criadas en laboratorio hasta el estado adulto. Como marcador genético, se utilizó un segmento del gen mitocondrial *ND4*, que codifica para la subunidad 4 de la enzima NADH-deshidrogenasa. El análisis genético incluyó la estimación de parámetros de diversidad de nucleótidos, haplotipos, de estructura genética y de flujo de genes.

Resultados. Se obtuvieron 108 secuencias parciales de 357 nucleótidos y cuatro haplotipos de nucleótidos del gen *ND4* de *Ae. aegypti*. Se encontró una diferenciación genética significativamente alta entre las poblaciones de Sampués y Guaranda mediante el índice de fijación ($F_{ST}=0,59467$), las de Sincelejo y Sampués ($F_{ST}=0,25637$), y las de Corozal y Guaranda ($F_{ST}=0,22237$). Se evidenció un gran flujo de genes ($Nm=\infty$) entre las poblaciones de Sincelejo y Corozal.

Conclusión. Existen diferencias genéticas entre las poblaciones del mosquito *Ae. aegypti* de los municipios del departamento de Sucre. Se registra la presencia de un nuevo haplotipo del gen mitocondrial *ND4* de *Ae. aegypti* en Colombia, el cual fue detectado en el municipio de Sincelejo.

Palabras clave: Culicidae; *Aedes*/genética; ADN mitocondrial; dengue; Colombia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3728>

Genetic variability of *Aedes aegypti* in the department of Sucre, Colombia, by analysis of the nucleotide sequence of the mitochondrial *ND4* gene

Introduction. *Aedes aegypti* is the most important mosquito species in America for the transmission of viruses of dengue, Zika, Chikungunya and yellow fever. Ecological factors as well as chemical controls can affect the genetic composition of *Ae. aegypti* populations, which is why its genetic characterization is necessary.

Objective. To determine the genetic variability of *Ae. aegypti* populations in four municipalities of Sucre department, Colombia.

Materials and methods. Larvae of *Ae. aegypti*, collected in the municipalities of Sincelejo, Sampués, Corozal and Guaranda, Sucre department, were reared under laboratory conditions to adult stage. A segment of the mitochondrial *ND4* gene which codes for the subunit 4 of the enzyme NADH-dehydrogenase was used as genetic marker. The genetic analysis included the estimation of parameters of nucleotide and haplotype diversity, genetic structure and gene flow.

Results. One hundred and eight partial sequences of 357 nucleotides and four nucleotide haplotypes of the *ND4* gene of *Ae. aegypti* were obtained. A significantly high genetic differentiation was found between the Sampués and Guaranda populations ($F_{ST}=0.59467$), Sincelejo and Sampués ($F_{ST}=0.25637$), and Corozal and Guaranda ($F_{ST}=0.22237$). A high gene flow ($Nm=\infty$) was observed among the populations of Sincelejo and Corozal.

Contribución de los autores:

María Claudia Atencia: montaje de las pruebas, análisis e interpretación de los datos y redacción del manuscrito

María de Jesús Pérez: montaje de las pruebas y análisis e interpretación de los datos

María Cristina Jaramillo y Sandy Milena Caldera: concepto y diseño del estudio, coordinación de la investigación y del trabajo de campo

Eduar Elías Bejarano: concepto y diseño del estudio, coordinación de la investigación y redacción del manuscrito

Conclusion. There are genetic differences between the *Ae. aegypti* populations from the municipalities of Sucre department. The presence of a new haplotype of the mitochondrial *ND4* gene of *Ae. aegypti* in Colombia was recorded, detected in the municipality of Sincelejo.

Key words: Culicidae; *Aedes*/genetics; DNA mitocondrial; dengue; Colombia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3728>

Aedes aegypti es el principal vector de arbovirus causantes de las enfermedades más comunes en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (1). Las poblaciones de este vector varían en su capacidad para infectar, propagar y transmitir *Flavivirus* como el del dengue (DENV1-4), el Zika (ZIKV), el chikungunya (CHYKV) y la fiebre amarilla (YFV) (2-4). La transmisión biológica de arbovirus por mosquitos está asociada tanto a factores ecológicos como a factores intrínsecos relacionados con el acervo genético del vector (variantes genéticas), la propensión a la infección y la permisividad para el desarrollo del patógeno (5-8).

Para el análisis de la variabilidad genética de *Ae. aegypti*, se han utilizado múltiples marcadores y técnicas moleculares, como el análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados (*Amplified Fragment-Length Polymorphisms*, AFLP) (9), los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) (10), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD) (11-13), el polimorfismo de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) (14), las isoenzimas (15), el polimorfismo de conformación de cadena simple (*Single-Stranded Conformation Polymorphism*, SSCP) y los espaciadores transcritos internos (*Internal Transcribed Spacer*, ITS) (16), los microsatélites (17,18) y el marcador nuclear EPIC (*Exon-Primed Intron-Crossing*) (19).

Los genes mitocondriales han demostrado ser una herramienta útil para la diferenciación genética y el estudio del flujo génico en varios organismos (20). Entre los principales marcadores mitocondriales usados para el estudio de poblaciones de *Ae. aegypti*, están el gen mitocondrial *ND4* (NADH dehydrogenase subunit 4) (11,20-25), el gen mitocondrial *ND5* (NADH dehydrogenase subunit 5) (26,27) y el gen *COX1* (*cytochrome C oxidase subunit I*) (28-30).

El gen *ND4*, que codifica para la subunidad 4 de la enzima NADH deshidrogenasa, ha sido ampliamente usado como marcador para estudios de genética de poblaciones y permite inferir la historia evolutiva de las poblaciones del vector (11,20,22,24,25); además, la disponibilidad en los bancos de datos (GenBank, BOLD y EMBL) de secuencias nucleotídicas homólogas de poblaciones del mosquito de distintos países, facilita este tipo de estudios.

En el departamento de Sucre existe información limitada sobre la composición genética de *Ae. aegypti*, el flujo de genes y las relaciones evolutivas entre las poblaciones del vector; esta información es necesaria para comprender la dinámica poblacional, la distribución del vector en la región y la epidemiología de la enfermedad. A la fecha, solo se ha caracterizado la variabilidad genética del mosquito en dos municipios de Sucre (25).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la variabilidad y la estructura genética de las poblaciones de *Ae. aegypti* en cuatro municipios del departamento de Sucre, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial *ND4*.

Materiales y métodos

Área de estudio y recolección de larvas de *Aedes aegypti*

El estudio se llevó a cabo en cuatro municipios del departamento de Sucre, en la región Caribe de Colombia, que fueron Sincelejo (julio a agosto de 2011 y abril a mayo de 2013), Sampués (abril de 2013), Corozal (mayo de 2013) y Guaranda (abril de 2012) (figura 1). Las localidades seleccionadas en cada municipio y sus respectivas coordenadas geográficas, se describen en el cuadro 1. La escogencia de estas localidades se basó en los registros epidemiológicos sobre la presencia del vector, de la Secretaría de Salud de Sucre (datos sin publicar).

En cada localidad se hizo una búsqueda activa de larvas de *Ae. aegypti*, en la que se inspeccionaron los depósitos de almacenamiento de agua encontrados en el interior y alrededor de las viviendas seleccionadas; la distancia entre cada vivienda fue

Correspondencia:

María Claudia Atencia, Universidad de Sucre, Carrera 14 N° 16B-32, Sincelejo, Colombia

Teléfono: (575) 282 0830 fax: (575) 282 1240

mariclau_1112@hotmail.com

Recibido: 14/12/16; aceptado: 24/10/17

de 50 metros, aproximadamente. Se recolectaron larvas de tercer y cuarto estadio de *Ae. aegypti*, las cuales se transportaron al Laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, donde se criaron bajo condiciones estándares hasta alcanzar el estado adulto. La identificación taxonómica se llevó a cabo con las claves de Rueda (31).

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del gen ND4

Se hizo la extracción del ADN total a partir de hembras adultas de *Ae. aegypti*, según el protocolo descrito por Caldera, *et al.* (25), pero modificando el tiempo de incubación con proteinasa K, el cual fue ajustado a cinco horas a una temperatura de 65 °C (32). El ADN obtenido se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000™ de Thermo Scientific.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron los cebadores ND4F 5'-ATTGCCTAAGGCTCATGTAG-3' y ND4R 5'-TCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3' descritos por Bracco, *et al.* (22), los cuales flanquean una región de 361 pb, aproximadamente, del gen mitocondrial ND4 de *Ae. aegypti*. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, compuesto por MgCl₂ 5 mM, DNTP 0,2 mM, cebadores 0,4 µM, solución tampón de PCR 1X, dos unidades de *Taq* polimerasa y 1 µl de la solución con el ADN, que contenía aproximadamente 100 ng/µl. En cada serie de PCR, se incluyó un control negativo constituido por agua estéril en lugar de ADN.

El perfil térmico consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante cinco minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 60 segundos, alineamiento a 56 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C por 60 segundos, y una etapa final de extensión a 72 °C durante siete minutos.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (peso/volumen), desarrollada en solución tampón TBE 0,5X a 90 V

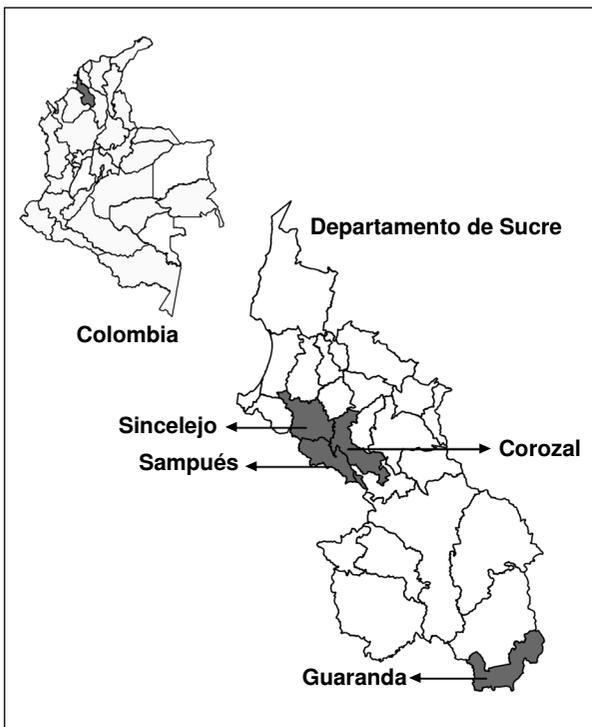


Figura 1. Mapa del departamento Sucre en el que se indica la ubicación de los cuatro municipios en los cuales se desarrolló el estudio.

Cuadro 1. Número absoluto de adultos de *Aedes aegypti* (N) analizados en cada localidad y municipio

Municipio	Localidad	n	N	Coordenadas geográficas
Sincelejo	Las Mercedes	5	43	9° 17' 21.66"N - 75° 23' 34.79"O
	Florencia	6		9° 18' 27.48"N - 75° 23' 1.65"O
	Las Delicias	4		9° 17' 5.00" N - 75° 24' 3.63"O
	Puerta Roja	4		9° 18' 46.32"N - 75° 23' 15.67"O
	El Cortijo	6		9° 16' 53.06"N - 75° 24' 28.36"O
	Botero	12		9° 18' 55.65"N - 75° 24' 8.30"O
	Divino Salvador	4		9° 19' 10.75"N - 75°24' 47.89"O
	Sevilla	1		9° 18' 30.44"N - 75° 24' 18.53"O
	20 de Julio	1		9° 18' 17.75"N - 75° 24' 7.71"O
	Sampedes	Doce de Octubre		8
Balcones de Río		13	9° 11' 12.98"N - 75° 22' 45.50"O	
Corozal	Dager Chadid	10	22	9° 18' 30.62"N - 75° 17' 31.50"O
	Cartagena de Indias	12		9° 18' 29.62"N - 75° 17' 42.18"O
Guaranda	San Joaquín	18	22	8° 28' 6.17"N - 75° 32' 17.25"O
	Calle Sexta	4		8° 28' 1.98"N - 75° 32' 13.91"O
	Total	108		108

por 50 minutos. El ADN se tiñó con GelStar™ y se visualizó con luz ultravioleta. Los productos amplificados fueron secuenciados mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático, con los mismos cebadores empleados para la PCR.

Análisis genético

Las secuencias derivadas de los electroforegramas fueron editadas y alineadas con el programa MEGA, versión 5.0 (33). Cada secuencia de consenso fue analizada con el BLASTn (34) para corroborar que correspondía al gen *ND4* de *Ae. aegypti*.

Con el programa DnaSP, versión 5.1.1.8 (35), se determinaron el número de haplotipos, la frecuencia de haplotipos, el número de sitios polimórficos (S), el número promedio de diferencias de nucleótidos (k), la diversidad de haplotipos (DH) y la diversidad de nucleótidos (π). Asimismo, se calcularon los valores de las pruebas de neutralidad D de Tajima (36), y la D y la F de Fu y Li (37). La genealogía entre los haplotipos fue construida utilizando el programa Network, versión 4.6.1.1 (38) con el algoritmo *median joining* (39). Además, con el programa Arlequin, versión 3.5.1.2 (40), se estimó la estructura genética mediante el índice de fijación (F_{ST}), y se calculó el flujo genético (Nm), y se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA).

La significación del efecto de las distancias geográficas en la diferenciación genética fue evaluada mediante el test de Mantel (41), el cual utiliza el coeficiente de regresión lineal entre el valor de F_{ST} ($1-F_{ST}$) (42) y el logaritmo de las distancias geográficas entre cada par poblacional. Las distancias geográficas entre los sitios de captura se obtuvieron a partir del calculador de distancias por coordenadas (disponible en la web). Los resultados del test de Mantel fueron tomados después de 1.000 permutaciones, usando el programa Mantel, versión 1.19 (43).

Las secuencias obtenidas durante esta investigación fueron registradas en el GenBank.

Resultados

Secuencias de nucleótidos

Se obtuvieron 108 secuencias de 357 nucleótidos del gen *ND4* de *Ae. aegypti*. El número de mosquitos de cada localidad de los cuales se derivan las secuencias de nucleótidos, se presenta en el cuadro 1. Las secuencias parciales del gen *ND4* de *Ae. aegypti* no mostraron inserciones, deleciones o codones de parada.

El análisis reveló la presencia de cuatro haplotipos mitocondriales denominados H1, H2, H3 y H4, los cuales fueron registrados en el GenBank, bajo los números de acceso KX580042, KX580043, KX580044 y KX580045, respectivamente. En conjunto, los cuatro haplotipos mostraron 343 sitios conservados y 14 sitios polimórficos, entre los cuales 13 sitios fueron parsimoniosamente informativos y uno correspondió a una mutación única.

En los sitios polimórficos se encontraron 10 transiciones de tipo T↔C, en las posiciones 15, 18, 21, 72, 123, 141, 189, 234, 276 y 312, tres transiciones de tipo A↔G en las posiciones 111, 216 y 267, y una transversión de tipo T↔A en la posición 270 (cuadro 2).

Distribución de haplotipos

El haplotipo más frecuente fue H1, seguido de H3 y H2. Los haplotipos H1 y H3 se encontraron en todos los municipios estudiados, el H2 se detectó en Sincelejo, Corozal y Guaranda, y el H4 se halló únicamente en el municipio de Sincelejo. La distribución de los haplotipos por municipio y la frecuencia de haplotipos, se muestran en la figura 2. La red de haplotipos inferida mostró a H1 como el haplotipo más antiguo, mientras que los demás haplotipos aparecieron como derivados suyos (figura 3). El haplotipo H3 se segregó de H1 por 12 pasos de mutaciones, en tanto que H2 y H4 se separaron de H1 por cuatro y dos pasos de mutaciones, respectivamente.

Cuadro 2. Sitios variables en cuatro haplotipos de nucleótidos, identificados en un segmento de 357 nucleótidos del gen mitocondrial *ND4* de *Aedes aegypti*

	Posiciones													
H	15	18	21	72	111	132	141	189	216	234	267	270	276	312
H1	T	T	T	T	A	C	T	T	A	T	A	T	T	C
H2	.	C	G	.	.	A	.	T
H3	C	.	C	C	.	T	C	C	G	C	G	A	C	T
H4	G	.	.	.	G

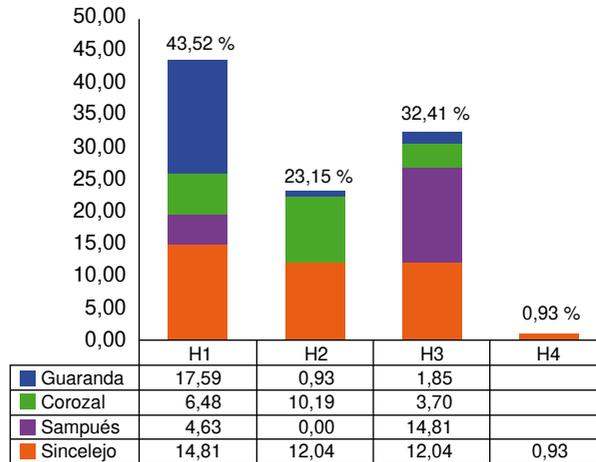


Figura 2. Frecuencias de haplotipos de nucleótidos del gen *ND4* en cuatro poblaciones naturales de *Aedes aegypti* del departamento de Sucre, Colombia

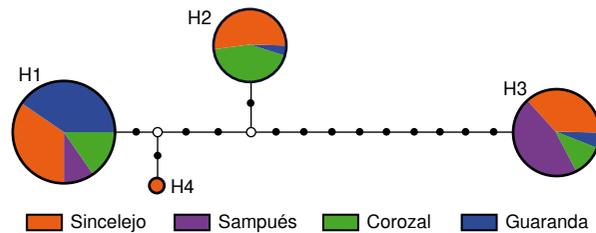


Figura 3. Red de haplotipos de nucleótidos del gen *ND4* en cuatro poblaciones naturales de *Aedes aegypti* del departamento de Sucre, Colombia. El área de cada círculo es proporcional a la frecuencia absoluta del haplotipo. Los círculos negros representan los pasos de mutaciones y, los círculos blancos, los haplotipos desaparecidos o no muestreados. La fracción de cada círculo indica la frecuencia de los haplotipos presentes en las poblaciones estudiadas.

Variabilidad genética, pruebas de neutralidad y AMOVA

En el cuadro 3 se presentan los valores estimados de los índices de diversidad genética y de las pruebas de neutralidad, para cada una y el total de todas las poblaciones de *Ae. aegypti*. Se destaca que los valores más altos de diversidad de nucleótidos y de haplotipos se encontraron en la población de Sincelejo y de Corozal.

Por otro lado, la prueba de neutralidad D de Tajima arrojó valores positivos y significativos para el grupo de las cuatro poblaciones y para la población de Sincelejo. La prueba D de Fu y Li mostró valores positivos y significativos en cada población, en tanto que los valores obtenidos con la prueba F de Fu y Li fueron positivos y significativos para las poblaciones de Sincelejo, Sampués y Corozal, y para todas las poblaciones.

Respecto al AMOVA (cuadro 4), los resultados mostraron que el 74,02 % de la variación es atribuible a diferencias genéticas intrapoblacionales, mientras que las diferencias entre poblaciones contribuyeron con el 25,98 %. El índice de fijación estimado ($F_{ST}=0,259$) indica la presencia de diferencias genéticas entre las poblaciones.

Estructura genética y flujo de genes

La estructura genética estimada mediante el índice de fijación (F_{ST}), y el flujo de genes calculado entre las cuatro poblaciones estudiadas, se muestran en el cuadro 5. Los valores del índice de fijación (F_{ST}) evidenciaron una gran diferenciación entre Sampués y Guaranda, Sincelejo y Sampués, Corozal y Sampués, y Corozal y Guaranda. Todos los valores del índice F_{ST} fueron significativos, excepto el del obtenido al comparar las poblaciones de Sincelejo y Corozal.

El número efectivo de migrantes por generación entre poblaciones, indica que existe un número de migrantes que garantizan el intercambio genético entre las poblaciones de Sincelejo y Corozal, y las de Sincelejo y Guaranda.

No se encontró correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética en el test de Mantel ($r=0,508$; $p=0,8477$).

Discusión

En el presente estudio se detectaron cuatro haplotipos en las poblaciones de *Ae. aegypti* de los municipios de Sincelejo, Sampués, Corozal y Guaranda. Estas poblaciones compartieron tres haplotipos (H1, H2 y H3), con la excepción de la población de Sampués que solo compartió dos (H1 y H3).

El haplotipo H1, que fue el más frecuente, corresponde probablemente al más antiguo en el departamento de Sucre, como se puede inferir de su ubicación en la red de haplotipos (figura 2). Este haplotipo había sido identificado por Caldera, *et al.* (25), en los municipios de Sincelejo y Guaranda, y también está registrado en Bello, Antioquia (44), así como en Brasil (23,24), Perú (20) y México (19). Según Jaimes, *et al.* (44), el haplotipo H1 pertenece a un grupo ancestral en Colombia, el cual está relacionado con poblaciones de *Ae. aegypti* de Camerún, Guinea y Costa de Marfil.

El haplotipo H3, que fue el segundo más frecuente y estuvo presente en las cuatro poblaciones, también había sido reportado en Sucre (25), así como en Antioquia (44), Brasil (23,24), México

Cuadro 3. Parámetros de diversidad genética y pruebas de neutralidad en cuatro poblaciones naturales de *Aedes aegypti* del departamento de Sucre, Colombia

Municipio	NH	S	k	DH	π	D de Tajima	D de Fu y Li	F de Fu y Li
Sincelejo	4	14	5.75431	0.686	0.01612	2.97494**	1.55027*	2.44915 ⁺⁺
Sampués	2	12	4.45993	0.372	0.01249	1.82878	1.47579*	1.87402*
Corozal	3	13	4.58351	0.630	0.01284	1.63646	1.50879*	1.82951*
Guaranda	3	13	2.33404	0.249	0.00654	-0.67148	1.50879*	0.03163
Total	4	14	5.82326	0.655	0.01631	3.67357***	1.52183	2.8713 ⁺⁺

NH: número de haplotipos en cada población; S: sitios polimórficos; k: número promedio de diferencias de nucleótidos; DH: diversidad de haplotipos; π : diversidad de nucleótidos

En las pruebas de neutralidad se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0,05^*$), ($p < 0,01^{**}$), ($p < 0,001^{***}$) y ($p < 0,02^{++}$).

Cuadro 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de las frecuencias de haplotipos del gen *ND4* en cuatro poblaciones naturales de *Aedes aegypti* del departamento de Sucre

Tipos de variación	GL	SC	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Interpoblacional	3	70.643	0,81780 Va	25,98
Intrapoblacional	104	242.357	2,33036 Vb	74,02
Total	107	313.000	3,14815	
Índice de fijación	$F_{ST}=0,25977$			

GL: grados de libertad

SC: suma observada de cuadrados

Cuadro 5. Estructura genética (F_{ST}) y flujo de genes (Nm) entre cuatro poblaciones naturales de *Aedes aegypti* del departamento de Sucre

Municipio	Sincelejo	Sampués	Corozal	Guaranda
Sincelejo	-	0,25637*	-0,00036	0,17440*
Sampués	1,45034 (19,4)	-	0,39946*	0,59467*
Corozal	Infinito (16,1)	0,75168 (30,6)	-	0,22237*
Guaranda	2,36697 (301)	0,34080 (289)	1,74854 (314)	-

Entre paréntesis se presenta la distancia geográfica en km.

(11) y Bolivia (18). Este haplotipo se encontraría estrechamente relacionado con poblaciones del mosquito de Tanzania (41).

El haplotipo H2, que no se encontró en la población de Sampués, está registrado en los municipios colombianos de Sincelejo (25), Bello, Riohacha y Villavicencio (44), y en países vecinos como Brasil (24) y Perú (20), pero se presume que se originó en África occidental (24).

Entre los cuatro haplotipos detectados en el departamento de Sucre, se destaca la presencia del haplotipo H4, que únicamente se encontró en la población de Sincelejo. Este haplotipo solo había sido registrado en Brasil (23,24), donde presenta una amplia distribución, por lo cual se presume que pudo haber surgido en ese país (24). El presente hallazgo constituye el primer registro de este haplotipo en Colombia y pone en evidencia su posible dispersión en América.

Comparado con el estudio realizado por Caldera, et al. (25), en la población de Sincelejo (localidades de El Cortijo y Botero) y Guaranda (localidades de San Camilo y Calle Tercera), en el presente trabajo se encontró un menor número de haplotipos, aunque cabe resaltar que las localidades de la población de Guaranda estudiadas no son las mismas, pero el efecto temporal de las recolecciones y los fenómenos de extinción local y recolonización de haplotipos más comunes en las poblaciones, pueden ser la causa de la ausencia o pérdida de los haplotipos H5 al H10 y de la aparición de nuevas variantes.

Con respecto a la población de Sincelejo, donde se analizaron más localidades y más especímenes que en el estudio previo, es importante resaltar que en esta ciudad, catalogada como 'hiperendémica para dengue' (45), los insecticidas son la estrategia más usada para controlar la enfermedad. Por este motivo, las poblaciones de insectos en este

municipio están expuestas constantemente a una presión de selección por insecticidas, lo que podría llevar a que los haplotipos menos frecuentes tiendan a desaparecer, mientras que los haplotipos más frecuentes en la población disminuirían en número, pero se mantendrían en ella (10,12).

En estas circunstancias, se originarían procesos de extinción local y de colonización de las variantes que lograron permanecer en la población a pesar del control químico implementado para disminuir las poblaciones del vector. Es posible formular la hipótesis que el control con insecticidas pudo haber eliminado los haplotipos H4 y H5 encontrados por Caldera, *et al.* (25) en el año 2010 en la localidad de El Cortijo. Sin embargo, el no haber detectado estos haplotipos también podría atribuirse a las limitaciones del presente trabajo, que fueron la restricción en la cantidad de muestreos y el escaso número de ejemplares analizados.

Los valores de diversidad de haplotipos y de nucleótidos encontrados en este estudio ($DH=0,655$; $\pi=0,01631$), fueron menores que los registrados en otros trabajos para la misma especie (22,44,46). Por población, los valores más altos de DH y π se observaron en Sincelejo ($DH=0,686$; $\pi=0,01612$) y Corozal ($DH=0,630$; $\pi=0,01284$).

Aunque en la población de Sincelejo esto se explicaría por la presencia de cuatro haplotipos, lo que en parte podría atribuirse al mayor número de individuos analizados en este municipio, es destacable la gran diversidad de la población de Corozal a pesar de que el número de individuos estudiados fue semejante al de Sampués y Guaranda. No obstante, los valores de DH encontrados en el presente estudio son similares a los registrados por Lima y Scarpassa (24) en poblaciones de la Amazonia brasileña ($DH=0,666$), y por Caldera, *et al.* (25) en el departamento de Sucre, Colombia ($DH=0,6794$).

Los resultados de las pruebas D de Tajima, y D y F de Fu y Li, permiten rechazar la hipótesis de neutralidad para estas poblaciones. Los valores de estos estimadores fueron positivos y significativos, lo cual indica que estas poblaciones están bajo selección positiva (47), en la que se favorecen los organismos que no presentan variación con respecto a las características promedio de la población, es decir, en relación con aquellos que están bien adaptados (48).

El AMOVA mostró que el componente que más pesó en la variabilidad encontrada, fue la variación intrapoblacional (74,02 %). Esta variación podría

atribuirse principalmente a la gran diversidad de haplotipos encontrada en las poblaciones de Sincelejo y Corozal. La gran variación intrapoblacional observada indicaría que las poblaciones de Sincelejo, Sampués, Corozal y Guaranda están diferenciadas, es decir que parte de la variabilidad existente está restringida dentro de las respectivas poblaciones. Por otro lado, la menor variación inter-poblacional (25,98 %) podría atribuirse a la gran frecuencia del haplotipo H1, presente en las cuatro poblaciones bajo estudio, y a la poca frecuencia del haplotipo H4, encontrado en la población de Sincelejo. El valor significativo del índice de fijación ($F_{ST}=0,25977$; $p<0,000$) indica que existe diferenciación genética entre las poblaciones.

El análisis de la estructura genética de las poblaciones naturales de *Ae. aegypti* en Sincelejo, Sampués, Corozal y Guaranda, muestra la existencia de una diferenciación genética muy grande entre Sampués y Guaranda, gran diferenciación entre las poblaciones de Sincelejo y Sampués, las de Sincelejo y Guaranda, las de Corozal y Sampués, y las de Corozal y Guaranda, y una escasa o nula diferenciación entre las de Sincelejo y Corozal, según los criterios propuestos por Wright (49). La escasa diferenciación observada entre Sincelejo y Corozal demuestra que las frecuencias alélicas son iguales en estas poblaciones (50).

Esto puede ser efecto de la cercanía geográfica de estas dos poblaciones, por lo que es muy probable que compartan un acervo genético similar; además, la dispersión de tres kilómetros, aproximadamente, del mosquito, también puede influir en la similitud genética de estas poblaciones (51). Es posible que la diferenciación que se presenta entre las poblaciones de Sampués y Guaranda, de Sincelejo y Sampués, de Sincelejo y Guaranda, de Corozal y Sampués, y de Corozal y Guaranda, se deba a la ausencia del haplotipo H2 en Sampués y a la presencia de H4 en Sincelejo; pero también, a la frecuencia de los haplotipos en cada una de las poblaciones.

La estimación del flujo de genes reveló un restringido intercambio de genes entre las poblaciones. Sin embargo, el valor de Nm obtenido (2,36697) para el par de Sincelejo y Guaranda, evidencia un flujo genético entre estas poblaciones que geográficamente están separadas por una distancia de 301 km. Considerando lo anterior, es posible que el aparente flujo de genes entre estas dos poblaciones obedezca a la presencia de los tres haplotipos más frecuentes, en especial de H1 que

puede ser la cepa más antigua del departamento, y que de este se derivaron los otros haplotipos, como se muestra en la red. Caldera, *et al.* (25), concluyeron que el H1 pudo ser uno de los primeros haplotipos introducidos y que, posteriormente, se diseminó en el departamento.

Otro aspecto importante es que la comunicación entre estas dos poblaciones es bastante restringida debido a su ubicación geográfica en zonas ecológicamente diferentes, por lo que el flujo de genes entre ellas sería inexistente: Sincelejo se ubica en la subregión Sabanas y, Guaranda, en la subregión Mojana. Asimismo, la presión selectiva ejercida por los insecticidas es diferente, pues en Sincelejo, considerado un municipio hiperendémico (45), se hacen constantemente aspersiones con insecticidas para disminuir las poblaciones del vector, mientras que en Guaranda, solo se asperja cuando se presenta un aumento significativo de casos (25).

En el par de poblaciones de Sincelejo y Corozal, el valor de Nm fue 'infinito', lo que demuestra que el flujo de genes es grande y que estas poblaciones se comportan como una gran población. Probablemente, esto se debe a dos factores, que son la corta distancia entre estas ciudades y la baja o nula diferenciación genética presente en ellas.

En conclusión, existen diferencias genéticas entre las poblaciones del mosquito *Ae. aegypti* de municipios del departamento de Sucre, sustentadas por los valores del F_{ST} y el Nm encontrados entre los pares de poblaciones.

Se destaca la presencia del haplotipo H4 en la población de Sincelejo, el cual solo estaba registrado en Brasil, lo que implica múltiples reintroducciones de otras áreas geográficas adyacentes al departamento de Sucre y la costa Caribe.

Se recomienda evaluar si existen diferencias entre estas poblaciones en cuanto a su capacidad para infectarse y transmitir arbovirus, y la sensibilidad o resistencia a los insecticidas, teniendo en cuenta que Atencia, *et al.* (32) reportaron la presencia de la mutación F1534C en el gen *kdr* de *Ae. aegypti* en el municipio de Sincelejo, la cual confiere resistencia al piretroide permetrina y al organoclorado DDT.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de interés por declarar.

Financiación

Este trabajo recibió apoyo financiero del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación—Colciencias (proyecto 112951929257).

Referencias

1. **Organización Mundial de la Salud.** Dengue: guías para diagnóstico, tratamiento, prevención y control. OMS; 2009. Fecha de consulta: 12 de septiembre de 2015. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44504/1/9789995479213_spa.pdf?ua=1
2. **Aitken TH, Downs WG, Shope RE.** *Aedes aegypti* strain fitness for yellow fever virus transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26:985-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1977.26.985>
3. **Bennett KE, Olson KE, Muñoz M, Fernández-Salas I, Farfán-Ale JA, Higgs S, et al.** Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67:85-92. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.67.85>
4. **World Health Organization.** Guidelines for prevention and control of chikungunya fever. World Health Organization. Fecha de consulta: 13 de mayo de 2016. Disponible en: http://www.wpro.who.int/mvp/topics/ntd/Chikungunya_WHO_SEARO.pdf.
5. **Bosio CF, Beaty BJ, Black WC.** Quantitative genetics of vector competence for dengue-2 virus in *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:965-70. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.965>
6. **Anderson JR, Rico-Hesse R.** *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:886-92. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.886>
7. **Quintero D, Osorio J, Martínez M.** Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *Iatreia.* 2010;23:146-56.
8. **Lozano S, Fernández I, Muñoz M, García J, Olson K, Beaty B, et al.** The neovolcanic axis is a barrier to gene flow among *Aedes aegypti* populations in Mexico that differ in vector competence for dengue 2 virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e468. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000468>
9. **Ravela S, Montenyb N, Velasco D, Verdugob J, Cunya G.** A preliminary study of the population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Mexico using microsatellite and AFLP markers. *Acta Trop.* 2001;78:241-50. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00083-3)
10. **Yan G, Chadee D, Severson D.** Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics.* 1998;148:793-800.
11. **Gorochotegui-Escalante N, Gómez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernández-Salas L, Muñoz M, Farfán-Ale JA, et al.** Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:213-22. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.213>
12. **Ocampo C, Wesson D.** Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71:506-13. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.506>
13. **Julio NB, Chiappero MB, Rossi HJ, Rondan-Dueñas JC, Gardenal CN.** Genetic structure of *Aedes aegypti* in the city of Córdoba (Argentina), a recently reinfested area. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:626-31. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000400016>

14. **Sylla M, Bosio C, Urdaneta-Márquez L, Ndiaye M, Black WC.** Gene flow, subspecies composition, and dengue virus-2 susceptibility among *Aedes aegypti* collections in Senegal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e408. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000408>
15. **Da Costa-Ribeiro M, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux A.** Low gene flow of *Aedes aegypti* between dengue-endemic and dengue-free areas in Southeastern and Southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:303-9. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.303>
16. **Leiva N, Cáceres O.** Variabilidad genética de *Aedes aegypti* en algunas áreas del Perú usando Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP). *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2004;21:158-66.
17. **Da Costa-Ribeiro M, Lourenço-de-Oliveira R, Failloux A.** Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101:917-21. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000800015>.
18. **Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja Z, 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.012>
19. **Olanratmanee P, Kittayapong P, Chansang C, Hoffmann AA, Weeks AR, Endersby NM.** Population genetic structure of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) at a micro-spatial scale in Thailand: Implications for a dengue suppression strategy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e1913. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001913>
20. **Costa-da-Silva A, Capurro M, Bracco JE.** Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100:639-44. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000600007>
21. **Bosio CF, Harrington LC, Jones JW, Sithiprasasna R, Norris DE, Scott TW.** Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using Mitochondrial DNA. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:434-42. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.434>
22. **Bracco J, Capurro M, Lourenço-de-Oliveira R, Mureb-Sallum M.** Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Américas using a mitochondrial gene: Evidence of multiple introductions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:573-80. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000062>
23. **Paduan K, Ribolla P.** Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J Med Entomol.* 2008;45:59-67. <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.1.59>
24. **Lima R, Scarpassa V.** Evidence of two lineages of the dengue vector *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA ND4 gene sequences. *Genet Mol Biol.* 2009;32:414-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572009005000036>
25. **Caldera S, Jaramillo MC, Cochero S, Pérez-Doria A, Bejarano EE.** Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del Norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica.* 2013;33:89-98. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v33i0.1573>
26. **Albrieu G, Gardenal N.** Phylogeography of *Aedes aegypti* in Argentina: long-distance colonization and rapid restoration of fragmented relicts after a continental control campaign. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;12:254-61. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0696>
27. **Damal K, Murrell E, Juliano S, Conn J, Loew S.** Phylogeography of *Aedes aegypti* (yellow fever mosquito) in South Florida: mtDNA evidence for human-aided dispersal. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89:482-88. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0102>
28. **Scarpassa V, Bacry T, Cardoso R.** Population genetics and phylogeography of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78:895–903. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.895>
29. **Cadavid J, Rúa G, Campo O, Bedoya G, Rojas W.** Cambios genéticos temporales y microgeográficos de *Aedes aegypti* en Medellín, Colombia. *Biomédica.* 2015;35:53-6. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2343>
30. **Hoyos-López R, Pardo SR, Castaño JC, Gallego-Gómez JC.** Código de barras para la tipificación de culicidos inmaduros de Armenia y Circasia (Quindío, Colombia). *Rev Colomb Entomol.* 2015;41:218-27. ISSN 0120-0488.
31. **Rueda L.** Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue virus transmission. *Zootaxa.* 2004;589:1-60. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.589.1.1>
32. **Atencia M, Pérez M, Jaramillo M, Caldera S, Bejarano E.** Primer reporte de la mutación F1534C asociada con resistencia cruzada a DDT y piretroides en *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomédica.* 2016;36:432-7. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2834>
33. **Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731-739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
34. **Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D.** Blast BLAST. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
35. **Librado P, Rozas J.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009;25:1451-2. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
36. **Tajima F.** Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics.* 1983;105:437-60.
37. **Fu Y, Li W.** Statistical tests of neutrality mutations. *Genetics.* 1993;133:693-709.
38. **Fluxus Technology Ltd.** NETWORK 4.6.1.1. Steiner (MP) algorithm developed by Tobias Polzin and Siavash Vahdati Daneshmand. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2013. Disponible en: <http://www.fluxusengineering.com>
39. **Bandelt H, Forster P, Rohl A.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 1999;16:37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
40. **Excoffier L, Lischer H.** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10:564-67.

41. **Mantel N.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 1967;27:209-20.
42. **Rousset F.** Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics.* 1997;145:1219-28.
43. **Cavalcanti M.** MANTEL v1.19. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Santa Úrsula. 2008. Fecha de consulta: 15 de septiembre de 2017. Disponible en: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/morphmet/mantel32.exe>
44. **Jaimes J, Arboleda S, Triana O, Gómez A.** Spatio-temporal distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mitochondrial lineages in cities with distinct dengue incidence rates suggests complex population dynamics of the dengue vector in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e0003553. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003553>
45. **Ministerio de Salud y Protección Social, República de Colombia.** Situación actual de Dengue a semana 12 de 2013 periodo de análisis: 2008-2013. Fecha de consulta: 15 de septiembre de 2017. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/INFORME%20SITUACION%20DE%20DENGUE.pdf>
46. **Twerdochlib A, Dalla A, Leite S, Chitolina R, Westphal B, Navarro M.** Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial *ND4* gene. *Rev Bras Entomol.* 2012;56:249-56. <http://dx.doi.org/10.1590/S0085-56262012005000030>
47. **Brito R, Manfrin M, Sene F.** Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. *Genet Mol Biol.* 2002;25:161-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572002000200009>
48. **Iturbe U.** Adaptaciones y adaptación biológica. *Sesbe.* 2010;5:5-12.
49. **Wright S.** Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations. Chicago: The University of Chicago Press; 1978. p. 4.
50. **Wright S.** The genetical structure of populations. Chicago: University of Chicago Press. *Annals of Eugenics.* 1951; 15:323-54.
51. **Nelson MJ.** *Aedes aegypti*: Biología y ecología. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 1986. p. 1-50.