



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE ANOPHELES BASADOS EN ADN
RIBOSOMAL Y SU IMPORTANCIA EN LA INCIDENCIA DE LA MALARIA EN EL ECUADOR.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

William Patricio Ponce Yaulema, Ph.D.

Autora

Hally Gabriela Neacato Barreno

Año
2016

DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

William Patricio Ponce Yaulema
Doctor en Entomología
C.I. 1707786016

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Hally Gabriela Neacato Barreno
C.I. 1716548365

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la fortaleza para permitirme culminar esta etapa de mi vida. A mis padres y amigos que me brindaron todo su apoyo durante este trayecto. A Varsovia Cevallos, Ph.D. directora del Centro de Investigación y Referencia de Vectores INSPI, por darme la oportunidad de trabajar en el proyecto Sistema de Alerta Temprana para el Control de Vectores de Malaria y Leishmaniasis (SATVEC FASE I). A Patricio Ponce, Ph.D. por guiarme durante mi trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A mis padres por su amor y apoyo incondicional durante todos estos años. Gracias por motivarme a siempre seguir adelante.

RESUMEN

La malaria es una enfermedad infecciosa producida por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles*. Alrededor de 3.3 mil millones de personas en el mundo entero corren el riesgo de contraer la enfermedad. En el 2015 en Ecuador los casos ascendieron a 558. Existen alrededor de 465 especies de *Anopheles* reconocidas en el mundo. El conocimiento de la diversidad de especies de *Anopheles* en cada país es indispensable con el fin de comprender la dinámica de los vectores y de la enfermedad. La región ITS2 de ADN ribosomal es un marcador molecular, tiene regiones conservadas para el diseño de cebadores universales que permiten la amplificación de la región y a la vez posee suficientes sitios variables, aptos para diferenciar especies estrechamente relacionadas. Para la identificación se utilizó la técnica de PCR convencional. Se analizaron 57 secuencias para la elaboración del árbol filogenético. *An. trinkae* fue la especie de mayor abundancia con el 31,6% del total, seguido del complejo *cruzi* con 29,8%, *An. albimanus* con el 28,1%, *An. rangeli* con el 5,3%, *An. pseudopunctipennis* 3,5% y *An. apicimacula* con el 1,7%. Todas las especies identificadas, a excepción de *An. apicimacula*, han sido reportadas como vectores de malaria en otros países.

ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium* and transmitted by female *Anopheles* mosquitoes. Around 3.3 billion of people in all the world have the risk of contracting the disease. In 2015 Ecuador had 558 cases of malaria. About 465 *Anopheles* species are recognized in the world. Knowledge of the diversity of *Anopheles* species in each country is essential in order to understand the dynamics of the vector and the diseases. The ITS2 region is a ribosomal DNA molecular marker, it has conserved regions for the design of universal primers that allows the amplification of the region and simultaneously has variable sites, apt to differentiate closely related species. Conventional PCR technique was used for identification. 57 sequences were analysed for the development of the phylogenetic tree. *An. trinkae* was the most abundant specie with 31.6% of the total, followed by the cruzii complex with 29.8%, *An. albimanus* with 28.1%, *An. rangeli* 5.3%, *An. pseudopunctipennis* 3.5% and *An. apicimacula* with 1.7%. All the species identified except *An. apicimacula* have been reported as malaria vectors in other countries.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2 Alcance	3
1.3 Justificación	3
1.4 Objetivos	4
2. Capítulo II. Revisión Bibliográfica.....	5
2.1 Malaria.....	5
2.2 Agente causal <i>Plasmodium</i>	6
2.3 Vector <i>Anopheles</i>	7
2.3.1 Características generales de <i>Anopheles</i>	9
2.3.2 Distribución	10
2.3.3 Vector Primarios	11
2.3.4 Vector Secundarios.....	12
2.3.5 Ciclo biológico de <i>Anopheles</i>	13
2.3.6 Métodos de identificación de <i>Anopheles</i>	13
2.4 Espaciador Transcrito Interno 2	15
3. Capítulo III. Procedimientos	17
3.1 Recolección de individuos <i>Anopheles</i>	17
3.2 Identificación molecular	20
3.2.1 Diseño de cebadores	20
3.2.2 Extracción de ADN.....	22
3.2.2.1 Estandarización protocolo de extracción de ADN de individuos completos	22
3.2.2.2 Estandarización protocolo de extracción de ADN de patas	22
3.2.3 Amplificación del ADN ribosomal-ITS2 por PCR convencional	24
3.2.4 Secuenciación de la región ITS2	26
3.2.5 Alineamiento de secuencias	26
3.2.6 Mapa	29
4. Capítulo IV. Resultados.....	30

4.1 Amplificación ITS2 por PCR convencional.....	30
4.2 Alineamiento de Secuencia ITS2	30
4.3 Árbol filogenético.....	36
4.4 Identificación Molecular de especies de <i>Anopheles</i>	38
4.5 Relación epidemiología-especies	43
5. Capítulo V. Discusión	44
6. Capítulo VI. Conclusiones y Recomendaciones.....	50
6.1 Conclusiones	50
6.2 Recomendaciones	51
REFERENCIAS	52
ANEXOS	63

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Anopheles es un género de mosquitos que pertenecen de la familia *Culicidae* dentro del orden *Diptera*, está conformado de aproximadamente 465 especies reconocidas. Varias especies han sido identificadas como responsables de la transmisión de *Plasmodium spp.* que causa la malaria. El género *Anopheles* tiene siete subgéneros. *Stethomyia* contiene cinco especies, *Kerteszia* 12 especies, *Lophopodomyia* seis especies y *Nyssorhynchus* 39 especies. El 86 % del género *Anopheles* está conformado por dos subgéneros, *Cellia* con 220 especies y *Anopheles* con 182 especies. Se ha descrito al subgénero *Baimaia* sólo para incluir la especie *A. kyondawensis*, que se limita a la región Oriental (Harbach, 2013, p. 4). A pesar de su gran importancia médica no se ha llegado a un consenso sobre las relaciones filogenéticas entre subgéneros de *Anopheles* (Freitas et al., 2015, p.1).

La identificación taxonómica de mosquitos del género *Anopheles* se realiza por medio del análisis de los caracteres morfológicos en distintos estadios del mosquito, la observación de la quetotaxia, los radios de las patas, la genitalia de los machos y el patrón de venas de las alas son considerados (Faran, 1980, p. 9-13). Las características morfológicas son comparadas y contrastadas con modelos taxonómicos establecidos; sin embargo, las características nombradas no son suficientes, pues no permiten una correcta identificación de los mosquitos colectados en estadio adulto, debido a que muchos son morfológicamente indistinguibles (Olano, Brochero, Saenz y Molina, 2001, p. 402). Frente a dichas dificultades la ciencia se ha complementado a la identificación con métodos y tecnologías de biología molecular, para una confiable identificación de las especies.

El uso del ADN ribosomal (ADNr) en la identificación molecular es común a nivel de cualquier organismo, esto debido al bajo nivel de polimorfismos lo cual permite la caracterización de especies por contraste de secuencias (Schoch et al., 2012, p. 6242). Por ello el ITS2 (*internal transcribed spacer 2*) o espaciador transcrito interno 2, como marcador molecular polimórfico permite diferenciar

poblaciones de especies dadas dentro del mismo género y es utilizado en la clasificación taxonómica de especies o distintas variedades (Marcilla et al., 2000, p. 137 y Mogel y Solórzano, 2010, p. 24). Dicho principio es de gran utilidad para la identificación de especies del género *Anopheles*, debido al amplio número de especies por diferenciar.

Los marcadores moleculares de ADN ribosomal son utilizados para analizar diferencias intra e inter especie (Zapata et al., 2004, p. 2). En el año 1995 ya se había realizado la identificación de especies de *Anopheles* mediante la amplificación del ITS2 cortado con varias endonucleasas, mediante la técnica PCR-RFLP (Beebe y Saul, 1995, p. 480). Años más tarde el método continúa aplicándose para discriminar las especies de *Anopheles* del complejo *Hyrceanus* por la misma técnica PCR-RFLP (Xu et al., 2012, p. 436-439). No obstante, con el progreso de la secuenciación y la accesibilidad a la técnica, se facilitó la obtención de secuencias de ITS2 al punto de que hoy en día existen bases de datos exclusivamente de ITS2. Esto ha ayudado la identificación de especies anofelinas nuevas y determinaciones de relaciones filogenéticas, sin embargo, con alrededor de 465 especies en el mundo, no existen metodologías establecidas capaces de identificar a todas las especies de *Anopheles* existentes.

La malaria también llamada paludismo es una enfermedad potencialmente mortal y un problema de salud pública en el mundo entero. Es causada por parásitos del género *Plasmodium*. Batista y Filetti en 1980 reconocen que el parásito es transmitido al ser humano a través de picaduras de mosquitos *Anopheles* hembras infectadas. Alrededor de 3.3 mil millones de personas en el mundo son vulnerables de contraer malaria, en el 2013 se produjeron 198 millones de casos de malaria alrededor del mundo (Chan, 2014, p. 2). A pesar de que en Ecuador el número de casos de malaria disminuyeron, esta no se encuentra erradicada en su totalidad y no se puede dejar desatendida. En el Ecuador hasta el año 2014 los casos se mantuvieron en descenso. Un total de 88 casos fueron reportados en el 2014, mientras que para el año 2015 los casos ascendieron a 558 (Sistema de Alerta Temprana para el Control de Vectores de Malaria y Leishmaniasis [SATVEC], 2016, p. 3). En los últimos

años la urbanización y los grandes cambios ambientales pueden haber influido y afectado la transmisión de enfermedades parasitarias como es la malaria (León et al., 2014, p. 26). El resurgimiento del vector *Anopheles* y su presencia en regiones de grandes altitudes destacan la importancia de determinar la distribución de especies de *Anopheles* en el Ecuador (Pinault y Hunter, 2011, p. 2).

1.2 Alcance

El alcance del presente trabajo de titulación es identificar las especies de *Anopheles* de los especímenes obtenidos en el proyecto Sistema Nacional De Vigilancia y Alerta Temprana para el Control de Vectores de Malaria y Leishmaniasis SATVEC Fase I del Centro Nacional de Referencia e Investigación de Vectores CIREV del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI y colectadas en todo el Ecuador. La investigación será realizada en el laboratorio de Biología Molecular del CIREV-INSPI. El estudio contempla el diseño de cebadores, la estandarización del conjunto de técnicas moleculares utilizadas para la identificación y el análisis bioinformático. A la vez la determinación de la relación entre la presencia de especies de *Anopheles* y la incidencia de la malaria en el Ecuador. La identificación de especies se realizará mediante el uso de técnicas moleculares: PCR convencional con el empleo de cebadores específicos que amplificaran la región ITS2 del ADN ribosomal y la secuenciación del amplicon del ITS2 obtenido. Por otro lado se realizará el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, estas serán alineadas con las secuencias de ITS2 de especies de *Anopheles* reportadas en el genbank. Y se creará un árbol filogenético de la región ITS2 de especies de *Anopheles*. Este estudio permitirá relacionar la presencia de especies en una región con la incidencia de malaria.

1.3 Justificación

La transmisión de la malaria se les atribuye a los mosquitos *Anopheles* hembra infectados con parásitos del género *Plasmodium*. El conocimiento de la

diversidad de especies de *Anopheles* en cada país es indispensable para establecer las especies transmisoras de la malaria y comprender la dinámica del vector con la enfermedad. La malaria en el Ecuador tiene un comportamiento cíclico en su dinámica y está estrechamente relacionada con fenómenos climáticos y socioeconómicos (SATVEC, 2016, p. 2). En el 2015 se produjeron 201 millones de casos de malaria en el mundo (World Health Organization [WHO], 2016). En el Ecuador causa pérdidas económicas directas e indirectas que afectan principalmente a los estratos bajos de la sociedad.

El estudio busca identificar las especies de *Anopheles* utilizando la variación inter específica del ITS2. Se aprovecha a la biotecnología y sus herramientas moleculares para diferenciar especies de manera confiable. La investigación busca establecer registros de las especies ecuatorianas y relacionar a las especies con la incidencia de malaria en regiones en donde se encuentren presentes. Este estudio es parte del proyecto SATVEC malaria Fase I del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública INSPI, que propone una serie de proyectos derivados para en un futuro construir un Sistema Integrado de Alerta Temprana informático a nivel nacional disponible para los organismos competentes.

1.4 Objetivo General

Determinar la identidad de individuos *Anopheles* mediante la amplificación de la región ITS2 de ADN ribosomal y su relación con la incidencia de la malaria en el Ecuador.

1.5 Objetivos Específicos

- Identificar las especies del género *Anopheles* mediante la amplificación del ADN ribosomal por secuenciación.
- Relacionar la incidencia malaria con la presencia de especies de *Anopheles* identificados en las localidades Ecuatorianas.

2. CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

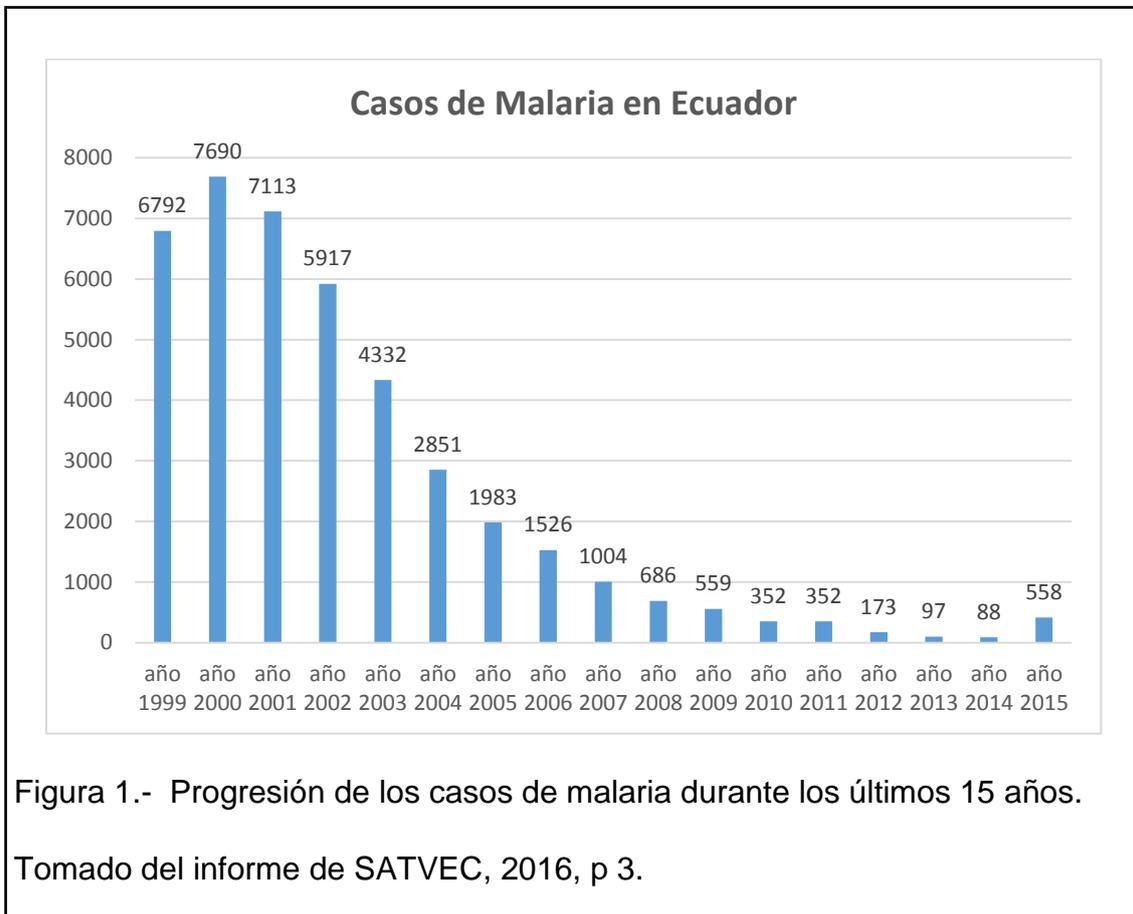
2.1 Malaria

La malaria es una enfermedad infecciosa producida por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos hembra del género *Anopheles* (Vargas, 2003, p. 1). No todas las especies de *Anopheles* son consideradas como vectores de la malaria debido a que no todas tienen la capacidad de infectarse y transmitir el parásito. Existen 465 especies de *Anopheles* reconocidas, de los cuales 30 especies han sido incriminadas en la transmisión del parásito (Chan, 2014, p. 1-17). La infección puede ser causada por *Plasmodium ovale*, *P. falciparum*, *P. malariae* y *P. vivax* estos son los que se encuentran adaptados al vector *Anopheles* y pueden infectar humanos (Uribarren, 2015).

La malaria es una enfermedad mortal que afecta comúnmente zonas tropicales y subtropicales. Alrededor de 3.3 mil millones de personas en el mundo entero corren el riesgo de infectarse. En el 2013 se reportaron 198 millones de casos que causaron 584 000 muertes, en dicho año el financiamiento total para el control de la enfermedad fue de 2.7 mil millones de dólares, triplicando la cantidad utilizada en el 2005 (WHO, 2016). En el 2015 se presentaron 214 millones de casos y 400 000 muertes. Se estima que entre los años 2000 y 2015, 106 países fueron reportados como transmisores activos de malaria, de los cuales más de la mitad de ellos han logrado disminuir los casos de malaria en un 75% (OMS, 2016). Dentro del continente Americano 145 millones de personas son vulnerables a la infección. En el 2000 los casos superaron el millón a diferencia del año 2012 que disminuyó drásticamente a 469 000 casos con 108 muertes, lo que significa una reducción del 70% de mortalidad y 30% de infecciones (Seeger, 2012).

En el Ecuador el Ministerio de Salud Pública MSP es el organismo oficial encargado de emitir el número de casos de infecciones por malaria, los agentes causales y las localidades afectadas. Entre los años 2001 y 2012 la malaria disminuyó hasta 99%, con un 0% de mortalidad en esos últimos cuatro años. Según el MSP entre los años 1999 y 2014 los casos reportados se

mantuvieron en descenso continuo. Sin embargo, para el año 2015 los casos ascendieron a 558, indicando ser aun una potencial amenaza para el país (ver Figura 1).



La malaria se transmite cuando un mosquito *Anopheles* infectado se alimenta de sangre humana y los esporozoítos de *Plasmodium* se transfieren de la saliva del mosquito al huésped. En cuestión de horas, el parásito migra por el torrente sanguíneo hacia los hepatocitos del hígado, donde se multiplican, maduran y cambian a merozoítos. Al volver al torrente sanguíneo infectan los glóbulos rojos en donde se multiplican y provocan su fagocitosis (Schantz y Nour, 2009, p. 189).

2.2 Agente Causal *Plasmodium*

Los agentes causales de la malaria son parásitos del género *Plasmodium*, de la familia *Plasmodiidae*, del orden *Haemosporida*, clase *Aconoidasida*, filo *Apicomplexa* y perteneciente al reino Protista. Existen alrededor de 100 especies de *Plasmodium* que pueden infectar mamíferos, aves y reptiles (Castro y Rodríguez, 2009, p. 395). Las especies: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* son capaces de infectar a humanos (Arisue et al, 2011, p. 2). Se reportó que *P. knowlesi* también es una especie con la capacidad natural de infectar humanos (Chin, Contacos, Coatney y Kimball, 1965, p. 865).

Dentro del ciclo biológico el parásito tiene dos huéspedes: el mosquito vector y el huésped vertebrado. El ciclo de vida de *Plasmodium* inicia cuando un mosquito *Anopheles* hembra infectado se alimenta de la sangre del hospedero, en ese instante por medio de la saliva del mosquito introduce los esporozoítos a la sangre, a través de torrente sanguíneo estos viajan hasta el hígado e invaden los hepatocitos, maduran y se convierten en esquizontes. Dentro de los hepatocitos se replican asexualmente produciéndose merozoítos y estos se liberan a la sangre, los glóbulos rojos o eritrocitos son invadidos por los merozoítos, en este instante existen dos caminos: los merozoítos se replican asexualmente para invadir más glóbulos rojos o por otro lado producen gametocitos hembra y macho. Un mosquito puede tomar los gametocitos en el humano infectado al momento de alimentarse, ingiere la sangre infectada y entonces ocurre la gametogénesis, una vez que existe la fertilización se producen cigotos, los cuales se transforman en oocinetos que viaja al epitelio intestinal del mosquito, luego se convierten en ooquistes y producen más esporozoítos. De esta manera el ciclo se reinicia (Castro y Rodríguez, 2009, p. 396 y Carretero, 2003, p. 136).

2.3 Vector *Anopheles*

El género *Anopheles* pertenece a la familia *Culicidae*, orden *Diptera*, clase *Insecta*, filo *Arthropoda*, reino *Animalia*. Existen clasificaciones taxonómicas informales, no tienen carácter oficial conforme al Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Las categorías informales utilizadas en la clasificación

de *Anopheles* incluyen: series, secciones, grupos, subgrupos y complejos (Harbach, 2007, p. 595). La clasificación actual de subgéneros de *Anopheles* se basa principalmente en la posición y el número de setas especializada sobre los genitales masculinos, esta forma de clasificación ha sido aceptado desde que fue introducida por Rickard Christophers en 1915. El género tiene siete subgéneros *Anopheles* contiene 182 especies (Cosmopolitan), *Cellia* posee 220 especies (*Old World*), *Kerteszia* con 12 especies (Neotropical), *Lophopodomyia* posee seis especies (Neotropical), *Nyssorhynchus* contiene 39 especies (Neotropical), *Stethomyia* con cinco especies (Neotropical), finalmente, *Baimaia* contiene una sola especie (Oriental) (Harbach, 2013, p. 4). Los subgéneros: *Anopheles*, *Kerteszia*, *Cellia* y *Nyssorhynchus*, contiene las especies que transmiten parásitos causantes de malaria (Harbach, 2007, p. 606). El objetivo de la clasificación es agrupar y categorizar entidades biológicas que comparten algunas características en común. Sin embargo, en la práctica son agrupaciones subjetivas, se supone que representan grupos monofiléticos de especies que están asignados a los rangos taxonómicos pero están basados en las características morfológicas y biológicas comunes que no son una medida de equivalencia filogenética. Por esta razón, las categorías taxonómicas del género *Anopheles*, incluyendo el rango formal de subgénero, no deben ser considerados para representar grados filogenéticos equivalentes (Harbach, 2013, p. 6).

El subgénero *Anopheles* contiene 183 especies reconocidas, todas ellas relacionadas principalmente por similitudes morfológicas (Harbach, 2004, p. 541-547). Estudios moleculares y morfológicos no demuestran que el subgénero es monofilético. El subgénero *Cellia* incluye 224 especies reconocidas, todas ellas relacionadas principalmente por similitudes morfológicas. La armadura cibarial de las hembras en forma de cono y el lóbulo genital de las pupas proyectado en forma de dedo (Krzywonski, Wilkerson y Besansky, 2001, p. 480 y Sallum, Schultz y Wilkerson, 2000, p.757). Este es un subgénero monofilético (Sallum *et al.*, 2000, p. 774 y Harbach y Kitching, 2005, p. 346). El Subgénero *Kerteszia* está estrechamente relacionado con el subgénero *Nyssorhynchus*. Los dos subgéneros son muy similares

morfológicamente. Sin embargo, es posible distinguir ciertas características en adultos, larvas y pupas de *Kerteszia*. Son 12 las especies pertenecientes al subgénero: *An. cruzii*, *An. neivai*, *An. pholidotus*, *An. lepidotus*, *An. rollai*, *An. homunculus*, *An. bellator*, *An. boliviensis*, *An. bambusicolus*, *An. leneanus*, *An. gonzalezrinconesi* y *An. auyantepuiensis* (Harbach, 2007, p. 592). La distribución en general va del sur de México pasa por centro América y cubre la costa de sur América (Zavortink, 1979, p. 5). El subgénero *Lophopodomyia* contiene seis especies: *An. vargasi*, *An. gomezdelatorrei*, *An. squamifemur*, *An. gilesi*, *An. pseudotibiamaculatus* y *An. oiketorakras*. Es un subgénero poco estudiado. Sin embargo, se sabe que es un taxón monofilético y su distribución cubre Panamá y sur América (Sallum et al., 2000, p. 775; Freitas et al., 2015, p. 9 y Harbach y Kitching, 2005, p. 346). El subgénero *Nyssorhynchus* contiene 39 especies. Se distribuye a través del neotrópico, no obstante, *An. albimanus* es una especie que se extiende por todo el continente. *Stethomyia* contiene las especies: *An. acanthotorynus*, *An. canorii*, *An. kompi*, *An. nimbus* y *An. thomasi*. Se distribuye por centro y sur América. El subgénero *Baimai* contiene a la única especie *kyondawensis* y no es considerada como vector de malaria (Abraham, 1947, p. 173). La metodología más común de determinar un espécimen de mosquito, es a través de claves morfológicas. Sin embargo, para una clasificación taxonómica confiable, se realiza mediante técnicas moleculares. No obstante, las características morfológicas, ecológicas y de comportamiento son todavía importantes y se utilizan junto con la información de un gen o genoma (Helmersson, 2013, p. 6).

2.3.1 Características generales de *Anopheles*

El género *Anopheles* abarca un amplio número de especies, la clasificación taxonómica se hace mediante la sistemática propuesta por Theobald en 1907 y modificada posteriormente varias veces por Christophers en 1915, Edwards en 1932, Knight y Reid en 1951, en 1966 por Grjebine, Gillies y De Meillon en 1968, Reid hace modificaciones en 1968 y Peyton con sus colaboradores en 1992 entre otros que han intentado resolver las relaciones filogenéticas como Faran, Lithincum y Harbach. (Navarro J, 1996, p. 25-26 y Harbach 2007, p.

594). La sistemática de clasificación se fundamenta en la distinción entre especies basadas en características morfológicas en distintas etapas de desarrollo del mosquito. El análisis en larvas se lo realiza en el cuarto estadio, en pupas se recurre a la quetotaxia o análisis de sus pelos sensitivos y en adultos las características observadas son múltiples entre ellas: los palpos maxilares, las manchas en las patas, el patrón en las alas y la genitalia de los machos (Ibáñez-Benal, Strickman y Martínez-Campos, 1996, p. 660)

2.3.2 Distribución

En Venezuela se registran 36 especies del género *Anopheles* (Osborn, Rubio-Palis, Herrera, Figuera y Moreno, 2004, p. 2). En Brasil habitan 54 especies del género (Consoli y Oliveira, 1994). En Colombia se han registrado 43 especies de *Anopheles* (Gómez, Cienfuegos, Gutiérrez, Conn y Correa, 2010, p. 67). Sin embargo, publicaciones posteriores de identificación de especies por métodos de biología molecular indican la presencia de 11 especies de *Anopheles* en Colombia: *An. benarrochi*, *An. darlingi*, *An. albitarsis s.l.s*, *An. braziliensis*, *An. mattogrossensis*, *An. costai*, *An. oswaldoi*, *An. triannulatus*, *An. punctimacula*, *An. rangeli*, *An. neomaculipalpus* (Orjuela, Herrera, Erazo y Quiñones, 2013, p. 47). En Perú se reporta la presencia de 43 especies por identificación morfológica, al igual que el país fronterizo Colombia (Anexo 1) (Calderón, Fernández y Valle, 1995, p. 5), no existen registros de identificación molecular. En Ecuador existe muy poca información de las especies de anofelinos. En 1973 se publicó que en Ecuador hay 21 especies presentes, la identificación fue dada por análisis de caracteres morfológicos y fueron comparadas con las especies de los países: Perú, Chile y Bolivia, dicho estudio indica la presencia de 31, 32 y 2 especies en los países respectivamente (Anexo 2) (Gorham, Stajanovich y Scott, 1973, p. 103). La revisión bibliográfica de Culícidos en Ecuador da a conocer la presencia de 29 especies de *Anopheles*: *An. apicimacula*, *An. calderoni*, *An. punctimacula*, *An. eiseni*, *An. mattogrossensis*, *An. mediopunctatus*, *An. neomaculipalpus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. shannoni*, *An. bambusicolus*, *An. boliviensis*, *An. cruzii*, *An. neivai*, *An. gomezdelatorrei*, *An. squamifemur*, *An. vargasi*, *An.*

albimanus, *An. albirtarsis*, *An. aquasalis*, *An. algyratarsis*, *An. darlingi*, *An. konderi*, *An. oswaldoi*, *An. rangeli*, *An. triannulatus*, *An. trinkae*, *An. kompi*, *An. fluminensis* y *An. costai* (Ponce, Cevallos, Morales, Quetin y Mota-Sánchez, 2016, p. 6-17). Además, por métodos moleculares se realizó la identificación de las especies *An. rangeli* y *An. trinkae*, estas fueron halladas en la provincia de Napo y fueron identificadas por secuenciación del ITS2 (Fritz, 1997. P. 218). En el estudio por Pinault y Hunter en el 2011 (p. 3-16), hacen una identificación molecular de las especies de *Anopheles* del Ecuador, los resultados dan a conocer que son cuatro las especies encontradas; *An. albimanus*, *An. punctimacula*, *An. pseudopunctipennis* y *An. eiseni*. Otra investigación de diversidad de *Díptera* en el Toachi-Pilátón por métodos moleculares comprueba la presencia de *An. albimanus* e identifica la especie *An. neivai* (León et al., 2014, p. 25-31). La especie *An. lepidotus* fue identificada molecularmente por secuenciación de COI (Citocromo oxidasa I) y provino de la Provincia de Napo (Harrison et al., 2012, p. 1). La OMS en el reporte mundial de malaria del 2015 indica que las especies mayoritarias en el Ecuador son: *An. albimanus*, *An. punctimacula* y *An. pseudopunctipennis*. Pese a que Ecuador tiene frontera al norte con Colombia, al sureste con Perú y comparten características ambientales, las especies reportadas difieren en cada país.

2.3.3 Vectores primarios

Para que una especie de *Anopheles* sea considerada como vector principal de la malaria debe poseer características tales como: amplia distribución geográfica, capacidad de colonización alta, capacidad de adaptación a los entornos y ambientes modificados por el hombre, susceptibilidad a los plasmodios que afectan a humanos, preferencia alimentaria de sangre humana y longevidad (Bona y Navarro-Silva, 2010, p. 1119). Esta última característica incrementa la posibilidad de infectarse e infectar. Además, la capacidad de transmisión se ve afectada por su respuesta inmunitaria frente al ciclo esporogónico de *Plasmodium* (Arévalo-Herrera et al., 2011, p. 75). En Sur América *An. aquasalis*, *An. darlingi* y *An. albirtarsis* son considerados como los vectores principales y se les atribuye la transmisión de la malaria en la

Amazonia de los países: Colombia, Suriname, Bolivia, Perú, Guyana, Guayana Francesa y Venezuela (Zimmerman, 1992, p. 375 y Hiwat et al., 2010, p. 372). A pesar de que existen tres vectores principales en la región, cada país posee su registro de vectores. En Colombia los tres vectores principales son *An. albimanus*, *An. nuneztovari* y *An. darlingi* (Olano et al., 2001, p. 402). En Perú *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi* son incriminados como vectores principales, mientras que las especies *An. benarrochi* y *An. calderoni* están señaladas como vectores potenciales primarios (Calderón et al., 1995 p. 8) En Brasil el 99.5% de los casos se dan en la Amazonía y el vector principal es *An. darlingi*. Además, se encontró que *An. marajoara* reemplazó a *An. darlingi* como vector principal en Brasil (Conn et al., 2002, p. 18) En Venezuela los vectores con esta atribución son: *An. aquasalis*, *An. darlingi*, *An. marajoara* y *An. nuneztovari* (Osborn et al., 2004, p. 78).

2.3.4 Vectores secundarios

Se consideran vectores secundarios de la malaria a aquellas especies de *Anopheles* que debido a su baja densidad poblacional, a la preferencia alimentaria y distribución, únicamente se convierten en vectores ocasionales de la enfermedad (Deane, 1986, p 5). Dentro de este grupo se considera a *An. nuneztovari* y *An. triannulatus*, debido a evidencias de encontrarse infectados con *P. falciparum* y *P. vivax* en Sur América (Arruda, Ríos, Arante, Oliveira y Nascimento, 1982, p. 91 y De Oliveira- Ferreira, Laurengo-de-Oliveira, Teva, Deane, Daniel- Ribeiro, 1990, p. 8). En Colombia los vectores secundarios son: *An. punctimacula*, *An. pseudopunctipennis*, *An. neomaculipalpus*, *An. calderoni*, *An. neivai*, *An. rangeli*, *An. lepidotus* (Montoya-Lerma et al., 2011, p. 225). En Perú las especies consideradas como vectores secundarios son: *An. rangeli*, *An. nuneztovari*, *An. evansae*, *An. oswaldoi* y *An. dunhami* (Calderón et al., 1995, p. 16). En Brasil *An. triannulatus* y *An. goeldii* son importantes vectores de malaria pero no principales (Galardo, Arrudo, Dálmeida, Loudibos y Zimmerman, 2007, p. 461 y Póvoa, Wirtz, Lacerda, Miles y Warhust, 2001, p. 181).

2.3.5 Ciclo biológico de *Anopheles*

El ciclo de *Anopheles* varía en función de cada especie y condiciones ambientales, ciertas especies habitan en bosques con amplia vegetación mientras que otras lo hacen en zonas despejadas y pobladas. El ciclo consiste de 4 etapas: huevo, larva, pupa y adulto, las tres primeras etapas se desarrollan en el agua, a pesar de que habitualmente se desarrollan en agua limpia: dulce o salada, en otros casos lo hacen en agua sucia, estancada y turbia en distintos recipientes. El ciclo de vida inicia cuando las hembras adultas copulan, estas se alimentan de sangre alrededor de cada dos días, entonces depositan entre 40 y 200 huevos en el agua, el tiempo de eclosión depende de la temperatura ambiental, a temperaturas de climas tropicales el tiempo usual es de dos a tres días. En la etapa de larva poseen un cuerpo segmentado, respiran por espiráculos, carecen de patas y la cabeza se encuentra bien desarrollada, esta etapa se divide en cuatro estadios. En la etapa de pupa poseen un cefalotórax en forma de coma, se tarda días en que la parte dorsal del cefalotórax se quiebre y se forme el mosquito adulto. Los mosquitos *Anopheles* adultos viven pocas semanas y están constituidos por: I) Una cabeza con un par de antenas largas y segmentadas, también dos palpos sensoriales. II) Un tórax con tres pares de patas, la principal función de este es la locomoción. III) Y el abdomen se expande cuando está alimentado (CDC, 2015).

2.3.6 Métodos de identificación de *Anopheles*

El género *Anopheles* ha sido ampliamente estudiado, la identificación era únicamente realizada por análisis de claves morfológicas en distintos estadios, pero en las últimas décadas se han implementado métodos de identificación por técnicas de biología molecular. La identificación morfológica de *Anopheles* puede resultar muy complicada debido a que existe alta similitud interespecie e incluso gran variabilidad intraespecie (Gómez et al., 2010, p. 68). La identificación de hembras por caracteres morfológicos en mosquitos adultos es claramente compleja debido a la superposición de dichos caracteres. La

identificación morfológica de mosquitos hembra en etapa adulta necesita ser complementada con la identificación en varios estadios de desarrollo de *Anopheles* (Wilkerson, Strickman, Fernández-Salas y Ibáñez-Bernal, 1993, p. 7). De manera que el análisis de los caracteres de los huevos es una alternativa gracias a la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB). En el estudio de Estrada et al en el 2003 (p. 388) dan a conocer que por la última técnica mencionada se puede diferenciar a la especie *A. benarrochi* y *A. rangeli*, puesto que la corona anterior de *A. benarrochi* es de paredes pequeñas y es ventral a diferencia de la corona de los huevos de *A. rangeli* son de paredes más altas y apicales. Se puede reconocer los huevos de 12 especies del subgénero *Nyssorhynchus* (Harbach, 1994, p. 331). El análisis de larvas de cuarto estadio puede permitir identificar a nivel de género, pues en el caso de pertenecer al género *Anopheles*, el segmento abdominal 8 debe carecer del sifón respiratorio (Rossi y Almirón, 2004, p. 49). El uso de marcadores moleculares, segmentos de ADN rastreables, son aplicados en estudios de taxonomía y filogenia, permiten dar a conocer la especie independientemente de su similitud física (Moreno, 2005, p. 50). Otra manera de identificación es mediante la amplificación del marcador molecular ITS2 y mediante la técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), se realiza cortes específicos en las secuencias de ADN amplificado por acción de enzimas de restricción, la identificación consiste en las diferencias de fragmentos producidos por cada especie, es decir, la diferenciación del patrón de bandas en la electroforesis (Botstein, White, Skolnick y Davis, 1980, p. 314). El proceso mencionado es llevado a cabo por Zapata en el 2004, la enzima de restricción utilizada es la *AluI* y dan a conocer que el peso resultante de la amplificación de ITS2 es de alrededor de 500 pares de bases y varía en función de cada especie. La técnica molecular amplificación aleatoria del ADN polimórfico (*Random Amplification of Polymorphic ADN* ó RAPD) es otra forma de identificación de especies, esta técnica es mucho más simple porque no se necesita conocer previamente las secuencias, sino que amplifica regiones aleatorias (Casas, 2004). La técnica multiplex aleloespecífica-reacción en cadena de la polimerasa (multiplex allelespecific polymerase chain reaction ó

AS-PCR) permite la identificación de grupos de especies (Tainchum et al., 2014, p. 324). Así como la región del genoma nuclear ITS2, el gen citocromo oxidasa I (COI) del ADN mitocondrial también es utilizado como marcador molecular, ambas regiones son amplificadas y cortadas con la técnica RFLP y el empleo de la enzima de restricción *HaeIII* para diferenciar *An. oswaldoi* de *An. benarrochi* (Orjuela et al., 2013, p. 44).

2. 4 Espaciador Transcrito interno 2

El ADN es un polímero de nucleótidos que contiene el código genético, siendo este el reflejo total de la identidad fenotípica y genotípica de cada ser vivo. El ADN es comúnmente utilizado en la identificación de especies debido a que este permite la interpretación completa del individuo y posee menos influencia de factores externos. Un fragmento de ADN con regiones variables (polimorfismos) y fácilmente rastreable se denomina marcador molecular. Los marcadores moleculares son ADN estable por lo que es útil para la identificación de especies y poblaciones (Lewin, 2004, p. 52). En los estudios de diversidad genética se utiliza los marcadores de ADN nuclear y mitocondrial, los polimorfismos dentro de estos permiten el análisis filogenético. El uso del ADN ribosomal (ADNr) en la identificación molecular es común a nivel de cualquier organismo, esto debido al bajo nivel de polimorfismos lo cual permite la caracterización de especies por contraste de secuencias (Schoch et al., 2012, p. 6243). El ADN ribosomal se encuentra contenido en los cromosomas del nucléolo y codifica ARN ribosomal (ARNr). Los espaciadores transcritos internos ITS por sus siglas (*Internal Transcribed Spacer*) se refieren al ADN espaciador, es decir no codificante y se encuentran en medio de los tres genes codificantes de RNA ribosomal. El ITS1 está ubicado entre los genes RNAr 18S y 5.8S, mientras que el ITS2 se encuentra entre los genes 5.8S y 28S (Coleman, 2013, p. 1). Las regiones ITS son ampliamente utilizadas en la taxonomía y filogenia molecular porque es fácil de amplificar incluso a partir de pequeñas cantidades de ADN y tiene un alto grado de variación entre especies lejanas o estrechamente relacionadas. Por más de dos décadas, la región

ITS2 ha sido un marcador molecular de gran importancia en la filogenia y evolución (Merget et al., 2012, p. 1). ITS2 es un marcador molecular por excelencia debido a que tiene regiones conservadas para el diseño de cebadores universales que permiten la amplificación de la región y a la vez posee suficientes sitios variables interespecie, apto para diferenciar especies estrechamente relacionadas (Yao et al., 2010, p. 6). Las secuencias proporcionan información suficiente como para la reconstrucción de árboles filogenéticos (Keller et al., 2010, p. 12). Es el marcador eukaryota más popular, puede ser utilizado como código de barras de ADN para la identificación de especies y puede ser complementario a *COI* (Yao et al., 2010, p. 2 y Chen et al., 2010, p. 1). En la actualidad existen bases de datos de la región ITS2 de varios organismos, esto facilita la identificación de especies al compararlas.

3. CAPITULO III. PROCEDIMIENTOS

3.1 Recolección de individuos *Anopheles*

La recolección fue llevada a cabo por el personal de CIREV-INSPI para el proyecto SATVEC malaria Fase I. El establecimiento de los sitios de recolección de mosquitos adultos se realizó en base al historial epidémico de los casos de malaria o en base a los datos de las densidades del vector. Los especímenes fueron colectados en 22 localidades de 13 provincias del Ecuador durante cuatro años aproximadamente. Una vez examinados los individuos fueron almacenados individualmente en tubos eppendorf de 1.5mL con etanol al 70% para la identificación molecular, en el caso de que sean especies únicas son montadas para la colección seca del Instituto, por lo cual las patas del mosquito son retiradas y conservadas de igual manera en tubos eppendorf con etanol al 70% y almacenadas a -20° C para el análisis molecular.

Tabla 1. Códigos de especímenes utilizados para la identificación molecular de especies de *Anopheles* ordenado por fecha de colecta.

CÓDIGO DE MUESTRA	SEXO	EXTRACCIÓN ADN DE	PROVINCIA	CANTÓN	LOCALIDAD	FECHA DE COLECTA
ECU7884	Indeterminado	Patas	Imbabura	Ibarra	Lita	28/10/2012
ECU7877	Indeterminado	Patas	Carchi	Tulcán	Chical	29/10/2012
ECU7886	Indeterminado	Patas	Esmeraldas	San Lorenzo	Urbina	20/11/2012
ECU7887	Indeterminado	Patas	Esmeraldas	San Lorenzo	Urbina	20/11/2012
ECU7489	Hembra	Todo el individuo	Morona Santiago	Morona	Río Blanco	16/02/2014
ECU7516	Macho	Todo el individuo	Morona Santiago	Morona	Río Blanco	16/02/2014
ECU7508	Hembra	Todo el individuo	Morona Santiago	Morona	Río Blanco	17/02/2014
ECU7418	Macho	Todo el individuo	Morona Santiago	Sucúa	Sucúa	18/02/2014

CÓDIGO DE MUESTRA	SEXO	EXTRACCIÓN ADN DE	PROVINCIA	CANTÓN	LOCALIDAD	FECHA DE COLECTA
ECU7490	Macho	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Zamora	Centro	11/03/2014
ECU7419	Hembra	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Zamora	Guadalupe	13/03/2014
ECU7494	Macho	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Zamora	La Chacra	19/03/2014
ECU7511	Macho	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Yantzaza	Pangui	28/03/2014
ECU7512	Hembra	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Yantzaza	Pangui	28/03/2014
ECU7513	Macho	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Yantzaza	Pangui	28/03/2014
ECU7514	Hembra	Todo el individuo	El Oro	Pasaje	Barbones	30/04/2014
ECU7515	Hembra	Todo el individuo	El Oro	Pasaje	Barbones	30/04/2014
ECU7527	Indeterminado	Patas	El Oro	El Guabo	Barbones	30/04/2014
ECU7501	Indeterminado	Patas	Chimborazo	Pallatanga	Cumandá	28/05/2014
ECU7487	Hembra	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Zamora	La Chacra	30/05/2014
ECU7482	Macho	Todo el individuo	Manabí	Manta	María Auxiliadora	03/06/2014
ECU7499	Macho	Todo el individuo	Manabí	Manta	María Auxiliadora	03/06/2014
ECU7500	Macho	Todo el individuo	Manabí	Manta	María Auxiliadora	03/06/2014
ECU6924	Indeterminado	Todo el individuo	Manabí	Santa Ana	Lodana	16/09/2014
ECU6943	Hembra	Todo el individuo	Manabí	Puerto López	Puerto López	10/11/2014
ECU6944	Hembra	Todo el individuo	Manabí	Puerto López	Puerto López	10/11/2014
ECU7124	Hembra	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Zamora	Sabanilla	25/02/2015
ECU7125	Hembra	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Zamora	Sabanilla	25/02/2015
ECU7126	Hembra	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Zamora	Sabanilla	25/02/2015
ECU7127	Hembra	Todo el individuo	Zamora Chinchipe	Zamora	Sabanilla	25/02/2015
ECU7325	Hembra	Patas	Sucumbíos	Shushufindi	La Primavera	16/04/2015

CÓDIGO DE MUESTRA	SEXO	EXTRACCIÓN ADN DE	PROVINCIA	CANTÓN	LOCALIDAD	FECHA DE COLECTA
ECU7374	Hembra	Todo el individuo	Manabí	Portoviejo	El Florón	17/04/2015
ECU7137	Macho	Todo el individuo	Guayas	Guayaquil	Juan Gómez Rendón Progreso	22/04/2015
ECU7138	Macho	Todo el individuo	Guayas	Guayaquil	Juan Gómez Rendón Progreso	22/04/2015
ECU7024	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San miguel de los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7044	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7040	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7039	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7038	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7042	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7045	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7043	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7041	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7046	Hembra	Todo el individuo	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos	25/04/2015
ECU7299	Macho	Todo el individuo	Napo	Tena	Misahuallí	18/05/2015
ECU7175	Macho	Todo el individuo	Napo	Tena	Misahuallí	19/05/2015
ECU7179	Hembra	Todo el individuo	Napo	Tena	Misahuallí	19/05/2015

CÓDIGO DE MUESTRA	SEXO	EXTRACCIÓN ADN DE	PROVINCIA	CANTÓN	LOCALIDAD	FECHA DE COLECTA
<i>ECU7182</i>	Macho	Todo el individuo	Napo	Tena	Misahualí	19/05/2015
<i>ECU7183</i>	Macho	Todo el individuo	Napo	Tena	Misahualí	19/05/2015
<i>ECU8088</i>	Macho	Patas	Sucumbíos	Shushufindi	Shushufindi Centro	19/05/2015
<i>ECU7226</i>	Hembra	Patas	Morona Santiago	Morona	Macas	26/05/2015
<i>ECU8138</i>	Macho	Patas	Sucumbíos	Lago Agrio	General Farfán	20/07/2015
<i>ECU8160</i>	Hembra	Patas	Sucumbíos	Lago agrio	Sosoranga	21/07/2015
<i>ECU9897</i>	Hembra	Todo el individuo	Morona Santiago	Sucúa	Sucúa	18/08/2015
<i>ECU8553</i>	Hembra	Todo el individuo	Esmeraldas	Río Verde	Rocafuerte	02/10/2015
<i>ECU8555</i>	Hembra	Todo el individuo	Esmeraldas	Río Verde	Rocafuerte	02/10/2015
<i>ECU8543</i>	Hembra	Todo el individuo	Esmeraldas	Río Verde	Rocafuerte	02/10/2015
<i>ECU8546</i>	Hembra	Todo el individuo	Esmeraldas	Río Verde	Rocafuerte	02/10/2015

3. 2 Identificación molecular

3.2.1 Diseño de cebadores

Los cebadores fueron diseñados sobre los extremos 3' y 5' de los genes 5.8S y 28S respectivamente. El alto grado de conservación de estos genes permite el desarrollo de oligonucleótidos o cebadores para la amplificación. Se utilizan cebadores diseñados sobre secuencias conservadas y que dan lugar a amplicones de hasta 1.500 pares de bases (Rodicio y Mendoza, 2016). Se analizaron las secuencias de los genes 5.8S y 28S de varias especies de *Anopheles* y se observaron regiones conservadas en los extremos de estos genes. Sin embargo, existen dos alelos de estas regiones conservadas por lo que se diseñó dos pares de cebadores (ver tabla 2) que sean capaces de unirse complementariamente a dichas zonas conservadas de los genes 5.8S y 28S de ADNr de *Anopheles*.

En el extremo 3' del gen 5.8S existe la variación de una sola base de la secuencia de ADN. En ciertos individuos *Anopheles* poseen la base timina (T) mientras que otros tienen la base guanina (G) en la misma posición, se diseñó los cebadores directos ITS2_F_H1 e ITS2A respectivamente para que tengan la capacidad de unirse específicamente en cada caso (ver Figura 2).

Los cebadores inversos ITS2_R_H1 e ITS2R fueron diseñados para que tengan la capacidad de unirse complementariamente al extremo 5' del gen 28S del ADNr de *Anopheles*, esta región conservada posee de igual manera dos alelos, la variación es de una base, razón por la cual se diseñó dos cebadores. El un alelo tiene la base timina (T) en el extremo 5' del gen 28S y el otro alelo posee un espacio en la misma posición (ver Figura 3).

```

1. ITS2_F_H1 TGTGAACTGCATGACACAT
2. ITS2_F   TGTGAACTGCAGGACACAT

```

Figura 2. Cebadores iniciadores.

- a) Secuencias de los cebadores iniciadores ITS2_F_H1 e ITS2F capaz de unirse complementariamente a la región conservada de extremo 3' del gen 5.8S de ADNr de *Anopheles*.

```

1. ITS2_R_H1 ATGCTTTAAATTTAGGGGGTA
2. ITS2_R   ATGC-TTAAATTTAGGGGGTA

```

Figura 3. Cebadores inversos.

- a) Secuencias de los cebadores inversos ITS2_R_H1 e ITS2R capaz de unirse complementariamente a la región conservada de extremo 5' del gen 28S de ADNr de *Anopheles*.

Tabla 2. Secuencia de los dos pares de cebadores

NOMBRE DEL CEBADOR	SENTIDO DEL CEBADOR	SECUENCIA	TEMPERATURA DE HIBRIDACIÓN
ITS2F	Iniciador (forward)	TGTGAACTGCAGGACACAT	52 °C
ITS2_F_H1	Iniciador (forward)	TGTGAACTGCATGACACAT	52 °C
ITS2_R	Inverso (reverse)	ATGCTTAAATTTAGGGGG-TA	52 °C
ITS2_R_H1	Inverso (reverse)	ATGCTTTAAATTTAGGGGGTA	52 °C

3.2.2 Extracción de ADN

3.2.2.1 Estandarización protocolo de extracción de ADN de individuos completos

La extracción de ADN de individuos completos se realizó mediante la aplicación del protocolo del kit comercial de Qiagen estandarizado para extracción de ADN de muestras de sangre y tejidos. Los cuerpos de los mosquitos fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 mL individualmente, en el cual se añadieron 180µL del tampón ATL y con ayuda del homogenizador y pistilos plásticos se trituró al mosquito hasta que quedaron pequeñas partículas. Luego se agregaron 20µL de proteinasa k y se le llevó al vórtex por 5 segundos. La muestra fue llevada toda la noche a baño maría con agitación a 56° C. Al día siguiente se añadieron 200µL del tampón AL y 200µL de etanol absoluto, se agitó en el vórtex 88880017LP THERMO SCIENTIFIC. El contenido acumulado en el eppendorf 1.5mL se pasó a un tubo colector con columna (DNeasy Mini spin column) que viene en el kit, esto mediante una micropipeta. Las centrifugaciones se llevaron a cabo en la centrifuga Sigma 2-16KL, se centrifugó por un minuto a 11000rpm, se eliminó el tubo y la columna se colocó en un nuevo tubo colector. Entonces, se realizaron dos lavados: se añadieron 500 µL del tampón AW1, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto. Se desechó el contenido líquido del tubo colector y se volvió a colocar la columna en el

mismo tubo, luego se adicionaron 500 μ L del tampón AW2 y se centrifugo a 16000rpm por seis minutos. Finalmente se desechó el tubo y se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL en donde se añadieron 100 μ L del tampón de elución AE (QIAamp ADN microkit, 2010). El producto se almacenó a -20°C y se analizó la absorbancia a 260/280nm en el nanodrop modelo 2100C para determinar la concentración y calidad del ADN extraído.

3.2.2.2 Estandarización protocolo de extracción de ADN de patas

La extracción de ADN de patas de individuos *Anopheles* se realizó con el uso del kit de Qiagen: QIAamp ADN Micro Kit para el aislamiento de ADN genómico de tejidos, el protocolo estandarizado fue para tejidos menores a 10 mg. Las patas retiradas del mosquito fueron colocadas en un tubo eppendorf de 1.5mL, se añadieron 180 μ L del tampón ATL, con la ayuda de un pistilo de plástico manualmente se trituraron las muestras hasta que quedaron pequeñas partículas, entonces, se añadieron 20 μ L de proteinasa k y se agitó en el vórtex 88880017LP THERMO SCIENTIFIC por 15 segundos. Se dejó toda la noche en baño maría con agitación a 56°C para la lisis de los tejidos. Al día siguiente se adicionaron 200 μ L del tampón AL y se agitó por 15 segundos en el vórtex, luego se añadieron 200 μ L de etanol absoluto y se agitó nuevamente en el vórtex. Se transfirió el volumen del tubo eppendorf a la columna con el tubo colector (QIAamp MinElute column), se aseguró de transferir todo y que no quede gotas en las paredes por lo que si es necesario se debe centrifugar ligeramente antes. Una vez en la columna, ésta se llevó a la centrifuga por un minuto a 8000rpm, se eliminó el tubo colector y se colocó la columna en un nuevo tubo. Después se añadieron 500 μ L del tampón AW1, se centrifugó a 8000rpm por un minuto, y se colocó la columna en un nuevo tubo colector. A continuación, se adicionaron 500 μ L del tampón AW2 e igualmente se centrifugó a 8000rpm durante un minuto, se descartó el tubo colector y la columna es colocada en uno nuevo. Nuevamente se centrifugó por tres minutos a 14000 rpm, se descartó el tubo y se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1.5mL. Finalmente se añadieron 30 μ L del tampón AE, se dejó incubar por 5

minutos a temperatura ambiente y se centrifugo a 14000rpm por un minuto. Finalmente, la calidad y concentración del ADN fue medida con la absorbancia 260/280 nm en el equipo nanodrop 2100C. El ADN aislado se conservó a -20°C hasta su uso.

3.2.3 Amplificación del ADN ribosomal-ITS2 por PCR convencional

El ADN extraído a partir de mosquitos *Anopheles* mediante el kit, es el utilizado en la PCR convencional para la amplificación de la región ITS2 del ADNr. Para el ensamblaje de la PCR se utilizó el reactivo Go taq Green Master Mix 2X de Promega, el cual es una premezcla de cloruro de magnesio MgCl₂, dNTPs (3 mM MgCl₂, 400µM dGTP, 400µM dCTP y 400µM dTTP, 400µM dATP), taq polimerasa y colorantes amarillo y azul. Se utilizaron los dos pares de cebadores diseñados iniciadores e inversos que se indican en la tabla 2, cada cebador fue adicionado en volúmenes iguales.

Cada lote de PCR fue acompañado de un control negativo el cual consistió en reemplazar el ADN por agua libre de nucleasas al momento de ensamblar la reacción. Los volúmenes y concentraciones de Go taq green, cebadores, ADN y agua libre de nucleasas utilizados en el ensamblaje de la PCR fueron estandarizados (ver Tabla 3). Una vez realizada la PCR se colocaron los tubos en el termociclador PCR GeneMateSeries ADVANCE modelo, los parámetros y ciclos utilizados en la denaturación, hibridación y elongación de la PCR se detallan en la tabla 4.

Tabla 3. Cuadro de volúmenes y concentraciones de reactivos de la PCR para una reacción de volumen final de 50 μ L.

	REACCIÓN x1	CONCENTRACIÓN
Go taq Green Master Mix	25 μ L	1x
Mix Cebadores iniciadores	0,8 μ L (0,4 μ L de cada cebador iniciador)	10 μ M
Mix Cebadores inversos	0,8 μ L (0,4 μ L de cada cebador inverso)	10 μ M
Agua libre de nucleasas	20,4 μ L	
ADN	3 μ L	
V final	50 μ L	

Tabla 4. Detalles de los ciclos de la PCR para la programación en el termociclador.

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MIN)	CICLOS
Denaturación inicial	95	5	1
Denaturación	94	1	30
Hibridación	52	1	30
Elongación	74	1	30
Elongación final	74	10	1
Incubación	4	-	-

Los amplicones fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (Ultrapure Agarose de Invitrogen) con *SYBR safe ADN gel stain*. Se montó el gel en la cámara electroforética horizontal y se cargaron 5 μ L del producto PCR, no se necesita tampón de carga porque el reactivo Go taq Green posee la densidad adecuada el cual facilita la carga, también contiene colorantes amarillo y azul para dar seguimiento de la migración. El marcador de peso molecular utilizado es de 100pb de Invitrogen. La electroforesis se corrió a 130V por 40 minutos. Los resultados se visualizaron en el transiluminador de Invitrogen con luz UV,

la presencia de la banda del amplicon de ITS2 en el gel es de aproximadamente 400 pares de bases.

3.2.4 Secuenciación de la región ITS2

La identificación de las especies de *Anopheles* se realizó mediante la amplificación de la región ITS2 del ADNr por PCR convencional, una vez obtenido el amplicon, este es secuenciado por la empresa Macrogen mediante secuenciación Sanger. Obtenidos los cromatogramas, con la herramienta bioinformática *Geneious R9* se realizaron las limpiezas de las secuencias, es decir, se eliminó el ADN de mala calidad de los extremos de las secuencias obtenidas. Luego se realizó el análisis blastN para conocer el grado de similitud de cada una de ellas. El software alineó la secuencia de nucleótidos query y las compara con la biblioteca de secuencias, disponibles en la base de datos genbank y otorgó el grado de similitud entre las secuencias comparadas en base a los elementos repetitivos (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool [NCBI BLAST], 2016, p. 4).

3.2.5 Alineamiento de secuencias

Se tomaron en cuenta todas las especies de *Anopheles* reportadas en Ecuador y se descargó la región ITS2 de todas aquellas especies disponibles en el genbank. Entonces se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas en el presente trabajo con las secuencias de la base de datos genbank (ver Tabla 5). Esto con el

fin de determinar las variaciones de las secuencias entre especies y crear un árbol filogenético de *Anopheles* mediante el empleo de la plataforma bioinformática *Geneious R9*.

Tabla 5. Números de acceso de las secuencias del genbank utilizadas en el alineamiento y árbol filogenético.

LARGO DE SECUENCIA	NÚMERO DE ACCESO	ESPECIE	CÓDIGO	ORIGEN
509	GU477267	<i>An. albimanus</i>	ITS2	Colombia
509	GU477269	<i>An. albimanus</i>	ITS2	Colombia
509	GU477270	<i>An. albimanus</i>	ITS2	Colombia
434	GU477271	<i>An. albimanus</i>	ITS2	Colombia
524	GU477274	<i>An. albimanus</i>	ITS2	Colombia
453	JX212820	<i>An. albimanus</i>	ITS2	Panamá
489	KF436939	<i>An. albimanus</i>	ITS2	Colombia
8312	L78065	<i>An. albimanus</i>	ITS2	Desconocido
480	KF698907	<i>An. apicimacula</i>	ITS2	Colombia
480	KF698910	<i>An. apicimacula</i>	ITS2	Colombia
480	KM262754	<i>An. apicimacula</i>	ITS2	Colombia
527	KU945816	<i>An. rangeli</i>	ITS2	Colombia
469	AF462381.1	<i>An. rangeli</i>	ITS2	Brasil
476	HM022428	<i>An. pseudopunctipennis</i>	ITS2	Colombia
476	HM022429	<i>An. pseudopunctipennis</i>	ITS2	Colombia
476	HM022430	<i>An. pseudopunctipennis</i>	ITS2	Colombia
480	Y09075	<i>An. trinkae</i>	ITS2	Ecuador
401	ATU92346	<i>An. trinkae</i>	ITS2	Desconocido
396	ATU92355	<i>An. trinkae</i>	ITS2	Desconocido
429	AF035227.1	<i>An. cruzii</i>	ITS2	Brasil
436	DQ364653	<i>An. cruzii</i>	ITS2	Brasil
436	DQ364654	<i>An. cruzii</i>	ITS2	Brasil
477	KP994164	<i>An. neivai</i>	ITS2	Guiana Francesa
474	AF462376	<i>An. aquasalis</i>	ITS2	Brasil

LARGO DE SECUENCIA	NÚMERO DE ACCESO	ESPECIE	CÓDIGO	ORIGEN
352	U92324	<i>An. aquasalis</i>	ITS2	Desconocido
342	AY849553.1	<i>An. argyritarsis</i>	ITS2	Brasil
342	AY849554.1	<i>An. argyritarsis</i>	ITS2	Brasil
450	AF462379.1	<i>An. mediopunctatus</i>	ITS2	Brasil
536	AF462389	<i>An. darlingi</i>	ITS2	Brasil
461	AF032133	<i>An. darlingi</i>	ITS2	Brasil
541	GU477277	<i>An. darlingi</i>	ITS2	Colombia
458	AF462380	<i>An. eiseni</i>	ITS2	Brasil
491	JF437936	<i>An. konderi</i>	ITS2	Brasil
491	JF437951	<i>An. konderi</i>	ITS2	Brasil
534	KF305833	<i>An. konderi</i>	ITS2	Brasil
649	DQ328638	<i>An. fluminensis</i>	ITS2	Bolivia
458	AF461754	<i>An. mattogrossensis</i>	ITS2	Brasil
491	AF461749	<i>An nuneztovari</i>	ITS2	Brasil
549	AY028094	<i>An nuneztovari</i>	ITS2	Colombia
549	AY02895	<i>An nuneztovari</i>	ITS2	Colombia
501	AF055068	<i>An. oswaldoi</i>	ITS2	Brasil
499	AF055069	<i>An. oswaldoi</i>	ITS2	Brasil
496	AF056318	<i>An. oswaldoi</i>	ITS2	Brasil
428	KC167778	<i>An. triannulatus</i>	ITS2	Brasil
428	KC167780	<i>An. triannulatus</i>	ITS2	Brasil
562	GU477280	<i>An. triannulatus</i>	ITS2	Colombia
393	GU477275	<i>An. punctimacula</i>	ITS2	Colombia
366	KC354809	<i>An. punctimacula</i>	ITS2	Colombia
401	KF698883	<i>An. calderoni</i>	ITS2	Colombia
401	KF698885	<i>An. calderoni</i>	ITS2	Colombia
453	HQ622619	<i>An. calderoni</i>	ITS2	Ecuador

LARGO DE SECUENCIA	NÚMERO DE ACCESO	ESPECIE	CÓDIGO	ORIGEN
394	JX212821	<i>An. neomaculipalpus</i>	ITS2	Panama
425	JX198306	<i>An. neomaculipalpus</i>	ITS2	Colombia
452	KF698900	<i>An. neomaculipalpus</i>	ITS2	Colombia
394	HM022431.1	<i>An. costai</i>	ITS2	Colombia
394	HM022433.1	<i>An. costai</i>	ITS2	Colombia
391	JX198308.1	<i>An. costai</i>	ITS2	Colombia
421	KP994167.1	<i>An. costai</i>	ITS2	Guiana Francesa

3.2.6 Mapa de *Anopheles* en Ecuador

La elaboración del mapa se realizó mediante el empleo del software Arcgis 10.2. Se utilizó la información recopilada en campo y se la ubico espacialmente sobre las coberturas (tipo polígono) de las provincias, cantones y parroquias del Ecuador obtenidas a través del SNI (Sistema Nacional de Información). A cada especie identificada en el territorio se le asignó una simbología diferente para facilitar la visualización.

4. CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1 Amplificación de ITS2 por PCR convencional

Para la amplificación del ITS2 se estandarizaron las condiciones de la PCR para un volumen final de 50 μ L por reacción, el ADN utilizado fue el obtenido a través de la aplicación de dos protocolos de extracción de ADN estandarizados en metodología: se extrajeron 46 muestras de ADN de individuos completos de *Anopheles* y 11 muestras de ADN a partir de las patas extraídas de individuos *Anopheles*. Se obtuvieron en total 57 amplicones de ITS2 de aproximadamente 400pb cada uno.

4.2 Alineamiento de Secuencias ITS2

Con el empleo del software *Geneious R9* se realizó el alineamiento clustal W, de la región ITS2 de las 57 secuencias obtenidas por los protocolos desarrollados y las 61 secuencias de ITS2 del genbank enlistadas en la Tabla 5 para la posterior elaboración del árbol filogenético.

Por otra parte, se realizaron alineamientos clustal W separados por grupos de especies. Cabe recalcar que estos alineamientos no se tomaron en cuenta para la formación del árbol, únicamente se realizó para poder observar las variaciones de las secuencias entre especies. No se realizó un alineamiento de *An. apicimacula* porque únicamente existe una secuencia. En la figura 4 se muestra el alineamiento de las 16 secuencias de forma continua de las especies de *An. albimanus*, la coloración de las bases se debe a que difieren de las demás, en la posición 89 de las secuencias ECU6944, ECU8553 y ECU7138 existe una guanina sustituyendo una citosina. En la posición 27, 38, 43 y 53 del ECU6943 una timina sustituye un espacio. Mientras que el ECU7499 posee una timina sustituyendo un espacio en la posición 53. En la figura 5 que representa el alineamiento de dos secuencias de *An. pseudopunctipennis* no existen diferencias entre secuencias. En la figura 6 se alinean tres secuencias de *An. rangeli*, el ECU8138 difiere de los demás individuos en una base en la posición 373. En la figura 7 las secuencias

alineadas difieren en las posiciones 364 y 365, mientras que el ECU9897 tiene la diferencia de una base en la posición 84 y el ECU7513 tiene un cambio en la posición 417. Finalmente, en la figura 8 se muestra el alineamiento de 18 secuencias, donde se observan varias diferencias, que darán el indicio para establecer grupos de especies dentro del árbol filogenético.

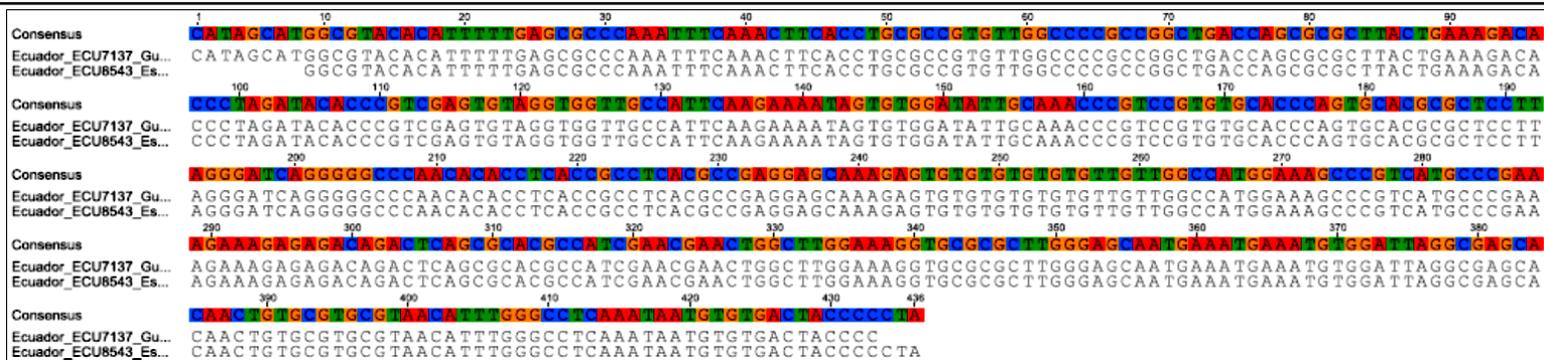


Figura 5. Alineamiento Clustal w de dos secuencias de *An. pseudopunctipennis* obtenidas por secuenciación del ITS2.

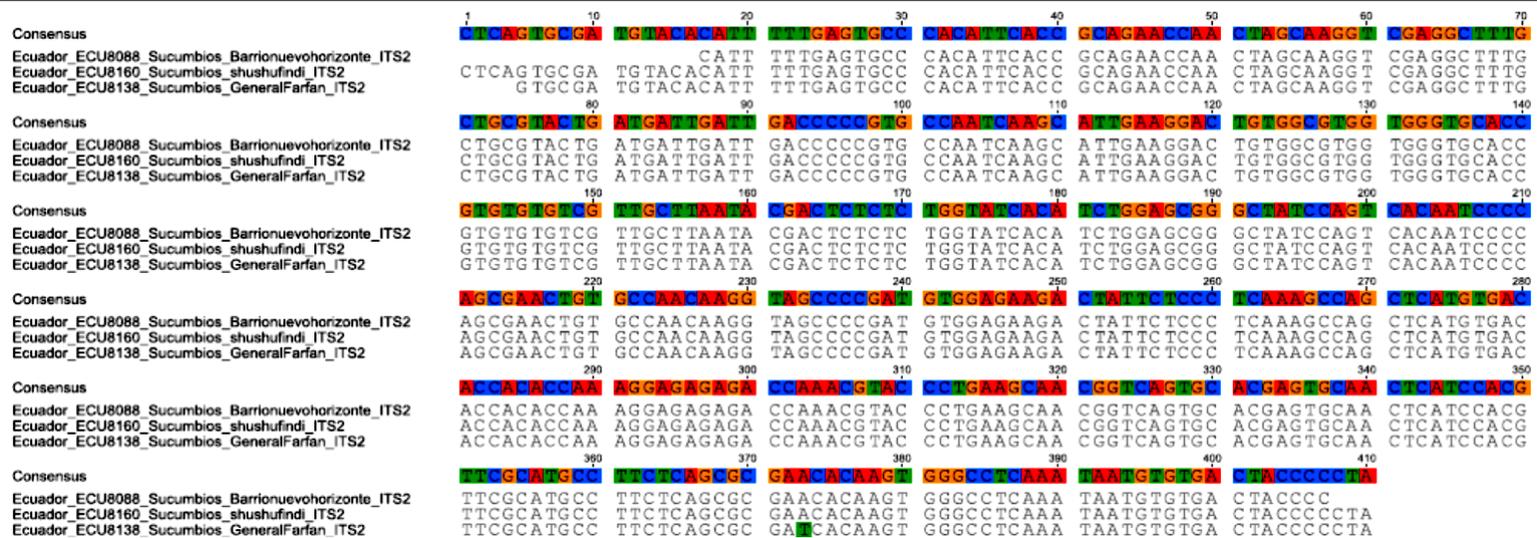


Figura 6. Alineamiento Clustal W de tres secuencias de *An. rangeli* obtenidas por secuenciación del ITS2

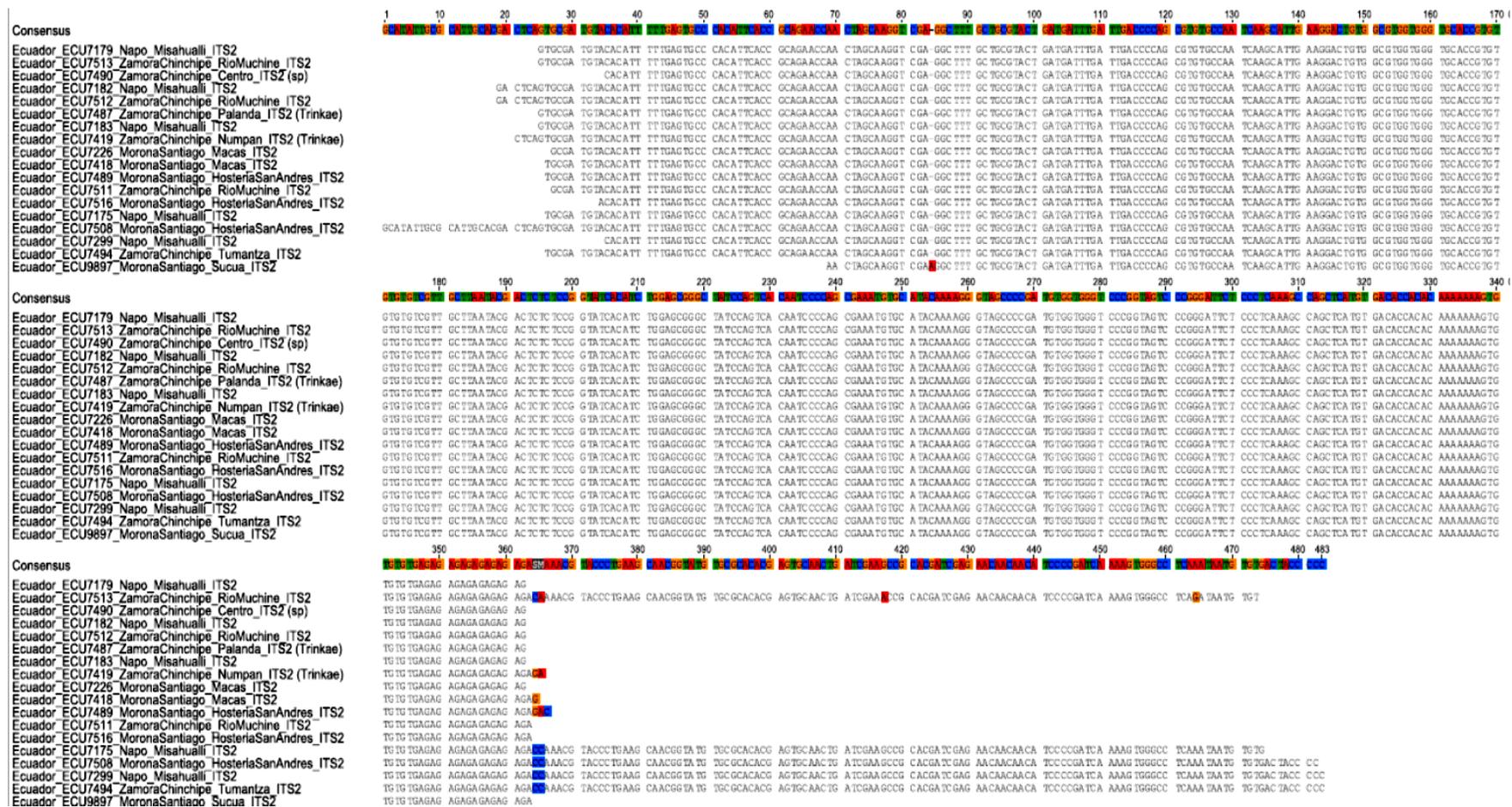


Figura 7. Alineamiento Clustal W de 18 secuencias de *An. botanoides* para secuenciación del ITS2.

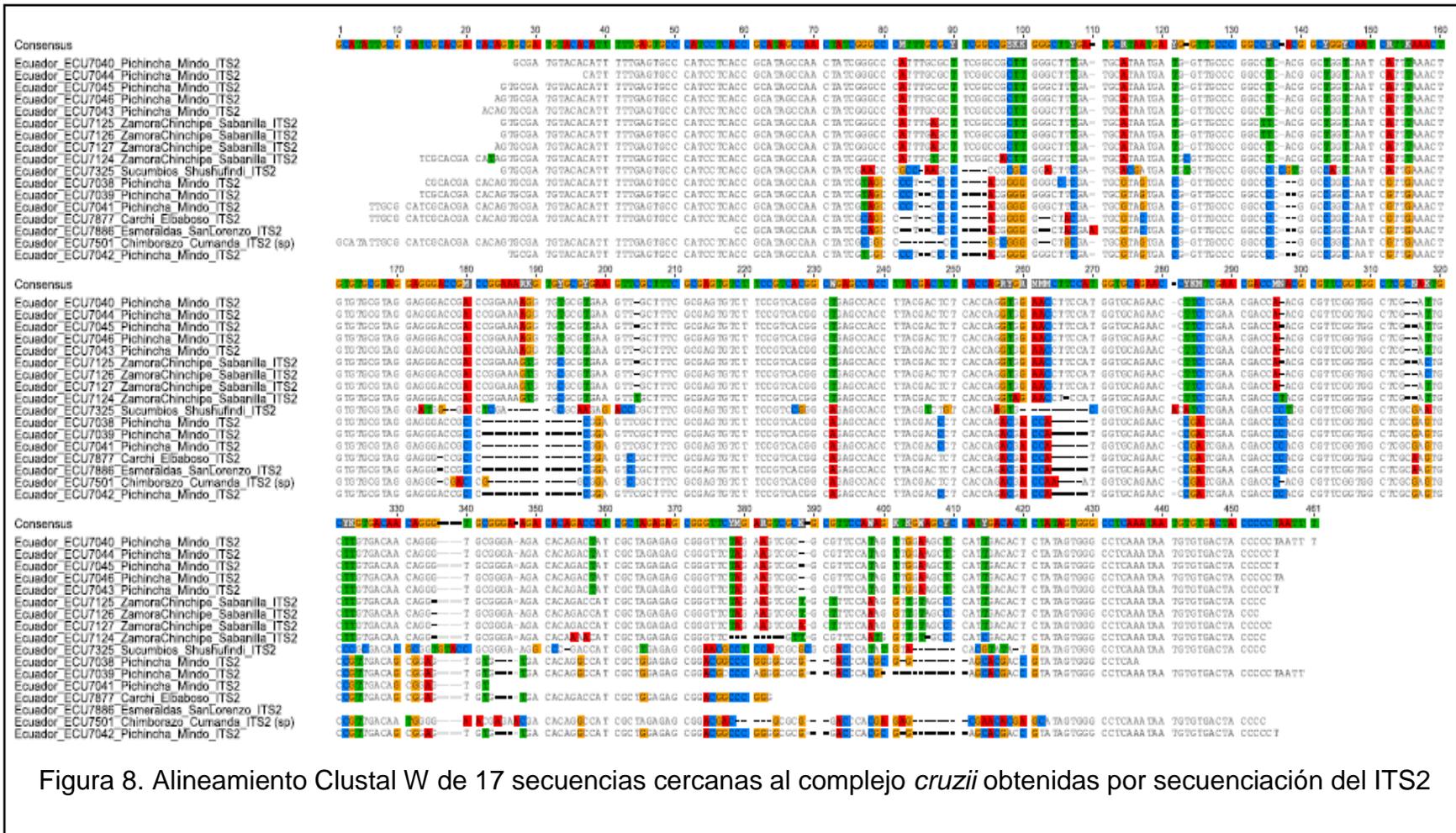


Figura 8. Alineamiento Clustal W de 17 secuencias cercanas al complejo *cruzii* obtenidas por secuenciación del ITS2

4.3 Árbol filogenético

Con el empleo del software *Geneious R9* se realizó el alineamiento clustal W de la región ITS2 de las 118 secuencias de la región ITS2 de *Anopheles*. 57 identificadas en este estudio y 61 secuencias de referencia descargadas del genbank.

Se creó un árbol filogenético con el modelo de distancia genética Tamura-Nei y el método de construcción del árbol Neighbor-Joining, Bootstrap 100, umbral de soporte de 70. El árbol de consenso formado proporcionó un grado de soporte que confirma la conformación de cada clado en el árbol final. La construcción del árbol fue el resultado de combinaciones de los clados que se produjeron en un mínimo porcentaje. Dicho porcentaje se llama umbral de soporte, un umbral de soporte de 50 proporciona la conformación de los clados que están presentes en la mayoría de los árboles formados, los umbrales de soporte mayor a 50 confirma dicha conformación por la presencia en más árboles.

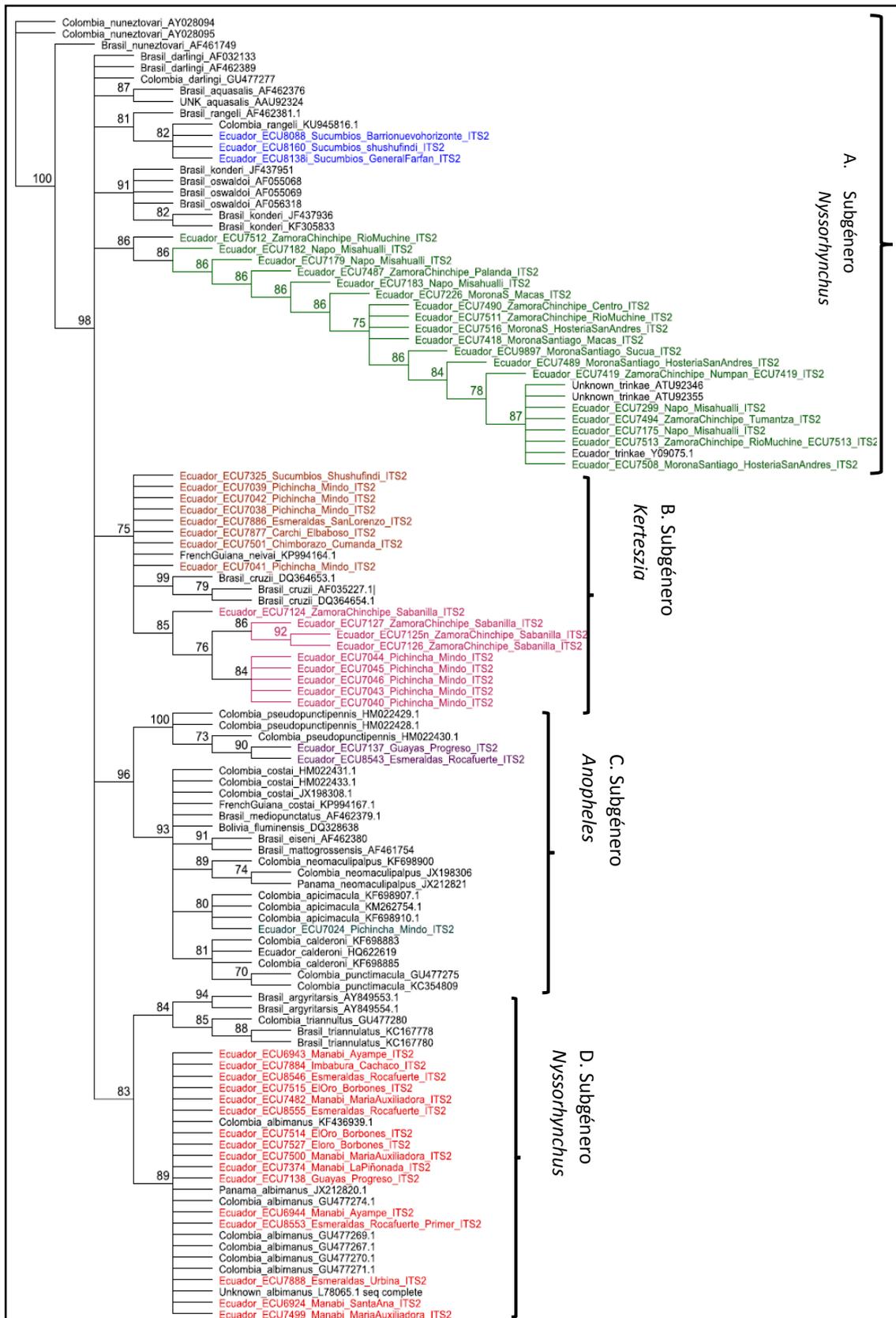


Figura 9. Árbol filogenético de 118 secuencias de la región ITS2 de especies de *Anopheles*

El grupo *An. rangeli* del Ecuador en **color azul**, el grupo de especies de *An. trinkae* del Ecuador en **color verde**, el grupo de especies de *An. pseudopunctipennis* en **color morado**, el grupo de especies de *An. albimanus* del Ecuador en **color rojo**, los grupos del complejo cruzii en **color vino** y **color fucsia**. Las reportadas en el genbank de color negro y el nombre de la secuencia en orden del país de origen, especie y número de acceso.

4.4 Identificación molecular de las especies de *Anopheles*.

En el presente estudio se incluyeron la región ITS2 de 57 individuos del género *Anopheles* (n=57). Zamora Chinchipe (n=11), Pichincha (n=10), Manabí (n=7), Morona Santiago (n=6), Napo (n=5), Sucumbíos (n=4), El Oro (n=3), Guayas (n=2), Imbabura (n=1), Carchi (n=1), Chimborazo (n=1).

La especie de mayor abundancia identificada fue *An. trinkae* con 18 individuos, se identificaron 16 individuos de *An. albimanus*, dos individuos de *An. pseudopunctipennis*, tres individuos de *An. rangeli*, un solo individuo de *An. apicimacula* y 17 pertenecientes al complejo cruzii.



Figura 10. Mapa de especies de *Anopheles* identificadas en el Ecuador.

a) Creado a partir de los datos de recolección en campo y mediante el software Arcgis V10.2

Tabla 6. Identificación de especie por código de individuo, el subgénero y el sitio de donde proviene el individuo muestra.

CÓDIGO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE MOLECULAR	SUBGÉNERO	PROVINCIA	CANTÓN	LOCALIDAD
ECU7877	<i>Complejo cruzii</i>	<i>Kerteszia</i>	Carchi	Tulcán	Chical
ECU7501	<i>Complejo cruzii</i>	<i>Kerteszia</i>	Chimborazo	Pallatanga	Cumandá
ECU7514	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	El Oro	Pasaje	Barbones
ECU7515	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	El Oro	Pasaje	Barbones
ECU7527	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	El Oro	El Guabo	Barbones
ECU7886	<i>Complejo cruzii</i>	<i>Kerteszia</i>	Esmeraldas	San Lorenzo	Urbina
ECU7887	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Esmeraldas	San Lorenzo	Urbina
ECU8553	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Esmeraldas	Rio Verde	Rocafuerte
ECU8555	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Esmeraldas	Rio Verde	Rocafuerte
ECU8546	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Esmeraldas	Rio Verde	Rocafuerte
ECU8543	<i>An. pseudopunctipennis</i>	<i>Anopheles</i>	Esmeraldas	Rio Verde	Rocafuerte
ECU7138	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Guayas	Guayaquil	Juan Gómez Rendón Progreso
ECU7137	<i>An. pseudopunctipennis</i>	<i>Anopheles</i>	Guayas	Guayaquil	Juan Gómez Rendón Progreso
ECU7884	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Imbabura	Ibarra	Lita
ECU6924	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Manabí	Santa Ana	Lodana
ECU6943	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Manabí	Puerto López	Puerto López
ECU6944	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Manabí	Puerto López	Puerto López
ECU7374	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Manabí	Portoviejo	El Florón
ECU7482	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Manabí	Manta	María Auxiliadora
ECU7499	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Manabí	Manta	María Auxiliadora
ECU7500	<i>An. albimanus</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Manabí	Manta	María Auxiliadora
ECU7418	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Morona Santiago	Sucúa	Sucúa
ECU7489	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Morona Santiago	Morona	Río Blanco
ECU7508	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Morona Santiago	Morona	Río Blanco

CÓDIGO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE MOLECULAR	SUBGÉNERO	PROVINCIA	CANTÓN	LOCALIDAD
ECU7226	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Morona Santiago	Morona	Macas
ECU7516	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Morona Santiago	Morona	Río Blanco
ECU9897	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Morona Santiago	Sucúa	Sucúa
ECU7175	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Napo	Tena	Misahualí
ECU7182	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Napo	Tena	Misahualí
ECU7183	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Napo	Tena	Misahualí
ECU7299	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Napo	Tena	Misahualí
ECU7179	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Napo	Tena	Misahualí
ECU7024	<i>An. apicimacula</i>	<i>Anopheles</i>	Pichincha	San miguel de los bancos	Los Bancos
ECU7039	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU7038	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU7042	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU7044	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU7040	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU7045	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU7043	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU7041	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU7046	Complejo cruzii	<i>Kerteszia</i>	Pichincha	San Miguel de Los Bancos	Los Bancos
ECU8160	<i>An. rangeli</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Sucumbíos	Lago agrio	Sosoranga
ECU8088	<i>An. rangeli</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Sucumbíos	Shushufindi	Shushufindi Centro
ECU8138	<i>An. rangeli</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Sucumbíos	Lago Agrio	General

CÓDIGO DE MUESTRA	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE MOLECULAR	SUBGÉNERO	PROVINCIA	CANTÓN	Farfán
					LOCALIDAD
ECU7325	<i>Complejo cruzii</i>	<i>Kerteszia</i>	Sucumbíos	Shushufindi	La Primavera
ECU7419	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Zamora Chinchipe	Zamora	Guadalupe
ECU7487	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Zamora Chinchipe	Zamora	La Chacra
ECU7490	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Zamora Chinchipe	Zamora	Centro
ECU7494	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Zamora Chinchipe	Zamora	La Chacra
ECU7511	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Zamora Chinchipe	Yantzaza	Pangui
ECU7512	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Zamora Chinchipe	Yantzaza	Pangui
ECU7513	<i>An. trinkae</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	Zamora Chinchipe	Yantzaza	Pangui
ECU7124	<i>Complejo cruzii</i>	<i>Kerteszia</i>	Zamora Chinchipe	Zamora	Sabanilla
ECU7125	<i>Complejo cruzii</i>	<i>Kerteszia</i>	Zamora Chinchipe	Zamora	Sabanilla
ECU7126	<i>Complejo cruzii</i>	<i>Kerteszia</i>	Zamora Chinchipe	Zamora	Sabanilla
ECU7127	<i>Complejo cruzii</i>	<i>Kerteszia</i>	Zamora Chinchipe	Zamora	Sabanilla

4.5 Relación epidemiología- especies

Se utilizó los datos epidemiológicos proporcionados por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador y se procedió a clasificar por provincias para relacionar con las especies identificadas en dichas provincias. La tabla 7 indica que en la provincia con mayor número de casos, Esmeraldas, se identificaron las especies *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis* y el complejo cruzii.

Tabla 7. Epidemiología y especies de *Anopheles* identificados por provincia.

Provincia	Número de casos de Malaria 2013-2015	Especies de <i>Anopheles</i> identificadas
Zamora Chinchipe	0	<i>An. trinkae</i> Complejo cruzii
Pichincha	7	<i>An. apicimacula</i> Complejo cruzii
Esmeraldas	271	<i>An. Albimanus</i> <i>An. pseudopunctipennis</i> Complejo cruzii
Manabí	7	<i>An. albimanus</i>
Sucumbíos	36	<i>An. rangeli</i> Complejo cruzii
Morona Santiago	83	<i>An. trinkae</i>
Imbabura	6	<i>An. albimanus</i>
Carchi	75	Complejo cruzii
Chimborazo	1	Complejo cruzii
Napo	2	<i>An. trinkae</i>
El Oro	1	<i>An. abimanus</i>
Guayas	106	<i>An. albimanus</i> <i>An pseudopunctipennis</i>

5. CAPITULO V. DISCUSIÓN

La identificación de especies de *Anopheles* es la base necesaria para conocer la dinámica de transmisión de la malaria en el país. A pesar de que en otros países ya se les incrimina a ciertas especies la capacidad de infectar no hay un estudio que pruebe el hallazgo de *Plasmodium* en las especies de Ecuador. A pesar de que existen varios métodos para identificar la gran cantidad de especies de *Anopheles*, en el presente estudio se realizó la identificación molecular por la región ITS2. La identificación morfológica es la más común, pero considera características que pueden confundirse entre sí y dar una identificación errónea. Los caracteres incluso no pueden ser suficientes debido a la similitud morfológica externa (Fernández et al., 2004, p. 221). La técnica PCR-RFLP es el método molecular más común en los estudios de identificación. La técnica RFLP arroja resultados en forma de patrones de bandas, es decir se diferencian en el peso y la cantidad de fragmentos generados por las enzimas de restricción. Esta técnica presenta dificultades frente a la identificación de especies estrechamente relacionada debido a que molecularmente posee variaciones de una sola base que no pueden ser percibidas por el método RFLP. Por esto únicamente mediante secuenciación se obtiene la información completa de un individuo y solo de esta manera se puede distinguir las variaciones intraespecíficas (Martínez, 1997, p. 124).

La identificación de especies es posible mediante el análisis de un conjunto de características, regiones o genes (Helmersson, 2013, p. 6). Los datos del presente estudio demuestran que la identificación de especies de *Anopheles* es posible mediante la amplificación de la región ITS2. Puesto que se comprueba que el ITS2 posee suficientes sitios variables inter e intraespecie, aptos para diferenciar especies estrechamente relacionadas (Yao et al., 2010, p. 6). El análisis de una sola región proporciona una etiqueta eficiente para diferenciar especímenes conocidos (Hajibabaei et al., 2006, p. 851).

La aplicación de los protocolos estandarizados permitió la identificación molecular de las especies *An. trinkae*, *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. rangeli*, *An. apicimacula* y especímenes que son del complejo *cruzi*. Se les incrimina que forman parte de un complejo debido a que son especies que aún

no han sido reconocidas individualmente, sin embargo, se piensa que son especies diferentes pero con una relación cercana (Davis, 2016, p.2). Mediante el análisis de un solo gen o región de ADN es difícil identificar grupos incipientes que comparten haplotipos, en estos casos para poder llegar a especie es necesario analizar un conjunto de características morfológicas, genes o marcadores moleculares (Helmersson, 2013, p. 12). Sin embargo, debido a que el complejo *cruzii* no ha sido separado por especies, así se realice el análisis de varios marcadores moleculares no es posible identificar a este nivel debido a que la demarcación de especies del complejo es poco clara y existe muy poca información acerca del mismo.

En el árbol filogenético creado (ver Figura 9) se puede fácilmente diferenciar a las especies: *An. trinkae*, *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. rangeli* y *An. apicimacula* porque cada grupo de especies formó un clado por separado con los individuos de su misma especie reportados en el genbank. Se identificó un complejo de *cruzii*, en la figura 9B se puede notar que divergen tres clados, un grupo de 8 secuencias (ECU7325, ECU7039, ECU7042, ECU7038, ECU7886, ECU7877, ECU7501, ECU7041) se alinea con la secuencia de *An. neivai* (KP994164.1). Existe una única secuencia del ITS2 de esta especie, por lo que no es posible aseverar que esta sea correcta y corresponda a la especie *An. neivai*. En el mismo clado nombrado se deriva otro grupo descendiente de 9 secuencias obtenidas (ECU7124, ECU7127, ECU7125, ECU7126, ECU7044, ECU7045, ECU7046, ECU7043, ECU7040). Finalmente, el tercer grupo que se deriva es de tres secuencias de *An. cruzii* reportadas en el genbank (DQ364653.1, AF035227.1, DQ364654.1). Debido a que los dos grupos son hermanos del grupo de *An. cruzii* se presume que estos especímenes pertenezcan al complejo *cruzii*. La presencia del complejo de especies se puede haber producido por especiación alopátrica, esto se refiere al origen de una especie a partir de otra por aislamiento geográfico (Paludismo.org, 1992). *An. cruzii* es un importante vector de malaria en humanos y simios (Rachou, 1958; Deane et al., 1970). El complejo *cruzii* se debe al idéntico físico que posee, estas especies difieren en los patrones de comportamiento. Diferencias en el cromosoma X dan a conocer que existen tres especies hermanas

(Ramírez y Dessen, 2000, p. p. 73-80) El análisis de los genes: *cyc* (cycle), *tim* (timeless), *Clk* (clock), *RpL32* (proteína ribosomal L32), *Rp49* (proteína ribosomal 49) y *RpS29* (proteína ribosomal S29) revela un alto nivel de diferenciación entre tres especies de una población de *cruzii*, lo que confirma la existencia de un complejo de *cruzii* (Rona, Carvahlo y Peixot, 2013, p. 2-13). En base a las investigaciones mencionadas, el presente estudio demuestra la existencia de dos secuencias de ITS2 distintas, es decir dos especies que forman parte del complejo *cruzii*. Entre las secuencias mencionadas recolectadas en Ecuador y las descargadas del genbank se forman tres grupos del mismo nudo interno lo cual da a concluir que estos tres grupos son las tres especies del complejo *cruzii* que se mencionan en los estudios citados. Se puede denotar que este clado de tres grupos descendientes todos pertenecen al subgénero *Kerteszia*.

En el caso de las secuencias ITS2 de: ECU6943, ECU7884, ECU8546, ECU7515, ECU7482, ECU8555, ECU7514, ECU7527, ECU7500, ECU7374, ECU7138, ECU6944, ECU8553, ECU7888, ECU6924 y ECU7499 se puede aseverar que son *An. albimanus* porque al comparar la secuencia *query* con todas las secuencias disponible en la base de datos genbank por el análisis de blastN, todas las *query* arrojaron entre 98.9 y 100% de similitud con las distintas secuencias de *An. albimanus* de la base de datos. Las secuencias: ECU7512, ECU7182, ECU7179, ECU7487, ECU7183, ECU7226, ECU7490, ECU7511, ECU7516, ECU7418, ECU9897, ECU7489, ECU7419, ECU7299, ECU7494, ECU7175, ECU7513 y ECU7508 resultaron ser *An. trinkae* por el 98.7 a 100% de similitud con la variedad de Secuencias de ITS2 de *An. trinkae* del genbank. Las secuencias ECU8088, ECU8160 y ECU8138 son *An. rangeli* y poseen un 100% de grado de similitud con las secuencias DQ666854, AF462381, KU945816 del genbank que corresponden a la especie *An. rangeli*. Las secuencias ECU7137 y ECU8543 corresponden a *An. pseudopunctipennis* por el grado de similitud del 99.5 y 99.9% con la variedad de secuencias de *An. pseudopunctipennis* de la base de datos. Finalmente, la secuencia ECU7024 pertenece a la especie *An. apicimacula* con un porcentaje de similitud del 96.3% con varias secuencias de *An. apicimacula* de la base de datos.

Las especies identificadas actualmente concuerdan con especies registradas anteriormente por identificación morfológica. En el caso de las especies identificadas molecularmente únicamente concuerda con la identificación de: *An. rangeli* y *An. trinkae* (Fritz, 1997, p. 215) también *An. albimanus*, y *An. pseudopunctipennis* (Pinault y Hunter, 2011, p. 3). *An. apicimacula* y el complejo *cruzi* no tienen registros por identificación molecular, pero sí por morfológica. A pesar de la concordancia, difieren en parte con las localidades halladas y esto puede haber cambiado debido a la actividad humana y la adaptación de especies de *Anopheles* (Toledo et al., 2006, p. 818). Los hallazgos de *An. trinkae* en Sucumbíos, Zamora Chinchipe y Napo concuerdan con Fritz et al (2004, p. 215) que cita la presencia de esta especie en la Amazonia del Ecuador. En Perú se le incrimina como el vector principal de la malaria porque se ha hallado el parásito en la especie, por esta razón es fundamental profundizar y examinar la presencia de *Plasmodium* en los *An. trinkae* de Ecuador (Hayes et al., 1987, p. 419). *An. albimanus* fue encontrado en la costa y la amazonia de Ecuador a bajas alturas como en la Ciudad de Guayaquil (Pinault y Hunter, 2011, p. 2), aproximadamente 1500 m del nivel del mar (Ramírez, 1953, p. 73; Levi-Castillo, 1958). Este estudio encontró *An. albimanus* en las provincias de la región litoral El Oro, Guayas, Manabí, y Esmeraldas, sin embargo, también se halló la especie en la sierra ecuatoriana en la localidad Lita de la ciudad de Ibarra en Imbabura, este sitio se encuentra a 568 msnm. La especie es considerada como vector primario de la malaria en los países vecinos Colombia y Perú, al igual que en México y Cuba. Se evidencia que *An. albimanus* representa un vector de la malaria en la zona de construcción de la represa Toachi-Pilatón (León et al., 2014, p. 27). Se considera a la especie el vector principal en la costa ecuatoriana y es reconocida por la transmisión de la enfermedad en bajas alturas (Pinault y Hunter, 2012, p. 2). *An. rangeli* fue hallado únicamente en la provincia de Sucumbíos en los cantones Lago Agrio y Shushufindi. Otros trabajos de identificación dan a conocer que el hábitat de la especie es a bajas alturas del este del Ecuador (Fritz et al., 1995, p. 215). Por otro lado, evidencian el hallazgo de *An. rangeli* al sur y sureste del Ecuador (Ramírez, 1953, p. 74). Se

ha hallado *Plasmodium* en *An. rangeli* en Perú y Colombia (Calderón et al., 1995, p. 18). Los dos individuos de *An. pseudopunctipennis* identificados provinieron de las provincias de Esmeraldas y Guayas. A la especie se la ha encontrado en los valles de la Sierra del Ecuador, en regiones altas cerca de Quito (Ramírez, 1953, p. 75; Levi-Castillo, 1945) Pinault y Hunter (2012, p. 2) registran la presencia de la especie alrededor de toda la sierra y costa del Ecuador. *An. pseudopunctipennis* es un vector principal de malaria en el Perú mientras que en Colombia se considera un vector secundario (Calderón et al., 1995, p. 8 y Montoya et al. 2011, p. 223). En Ecuador hay registros de ser un vector de la malaria a alturas de 1500msnm (Rubio-Palis y Zimmerman, 1997, p. 503). El complejo *cruzi* fue hallado principalmente en la sierra ecuatoriana y concuerda con Zavortink, 1979 el cual indico la presencia de las especies del subgénero *Kerteszia* en zonas altas de América del sur. El espécimen de *An. apicimacula* identificado fue colectado en la localidad de los bancos en la provincia de Pichincha. Registros anteriores señalan la presencia de la especie en el País (Ramírez, 1953, p. 74). No existen reportes de que la especie sea vector de enfermedades de importancia médica.

A pesar de que la asignación de subgéneros se basa en claves morfológicas. La identificación molecular y el árbol filogenético demuestran la agrupación de especies por subgéneros. *An. nuneztovari*, *An. darlingi*, *An. aquasalis*, *An. An. rangeli*, *An. oswaldoi*, *An. trinkae* y *An. konderi* se agrupan y todas pertenecen al subgénero *Nyssorhynchus* (Figura 9A). Por otra parte, se agrupa *An. argyritarsis*, *An. triannulatus* y *An. albimanus* también pertenecientes al subgénero *Nyssorhynchus* (Figura 9D). *An. pseudopunctipennis*, *An. costai*, *An. mediopunctatus*, *An. fluminensis*, *An. eiseni*, *An. mattogrossensis*, *An. neomaculipalpus*, *An. apicimacula*, *An. calderoni* y *An. punctimacula* pertenecen al subgénero *Anopheles* (Figura 9C). Y por último *An. neivai*, *An. cruzii* y dos grupos hermanos pertenecen al subgénero *Kerteszia* (Figura 9B).

Es importante señalar que únicamente se descarta como vector a la especie *An. apicimacula* que se encontró en Los Bancos provincia de Pichincha, debido a que no existen reportes en que se le incriminen como vector de la malaria en ningún país. De manera que todas las demás especies son posibles vectores

de la malaria en Ecuador. Es decir, las 12 provincias de las que se recolectaron los especímenes se encuentran vulnerables a la reemergencia de casos de malaria, incluyendo Pichincha porque además de *An. apicimacula* se evidenció la presencia de las especies del complejo *cruzii*. Vale decir que esto concuerda porque en las 12 provincias se han señalado casos de malaria según el MSP.

Se puede decir que una de las limitaciones de este estudio fue el número de especímenes utilizados, puesto que para sacar índices de biodiversidad de especies es importante trabajar con números de muestras más amplios y cubrir todas las zonas del país. Esto es de gran importancia en los estudios de identificación de especies, pues es necesario monitorear el efecto del ambiente en la biodiversidad de especies de *Anopheles* (Moreno, 2001, p. 84).

Por otra parte, el estudio de identificación de especies por amplificación de la región ITS2 fue posible, incluso a partir de las patas del espécimen. Esto se creía una debilidad porque lograr extraer el ADN de especímenes de menos de 5mg es un reto. Extraer ADN de anofelinos puede ser complicado debido al escaso material de un solo mosquito (Rosero, Gutiérrez, Cienfuegos, Jaramillo y Correa, 2010, p. 262).

El objetivo es obtener concentraciones de ADN altas para los consecuentes procesos. Estudios de variación genética de Artrópodos requieren utilizar ADN de buena calidad. El uso de marcadores moleculares como el citocromo oxidasa I (*COI*) no amplifican la región correctamente a partir de muestras de alas y patas (Gutiérrez citado en Rosero et al., 2008, p. 260). La amplificación de la región ITS2 fue efectiva a partir de individuos completos y patas de los mosquitos.

6. CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

En base a todos los protocolos desarrollados se evidenció la identificación de *Anopheles* a nivel de especie: *An. trinkae*, *An. albimanus*, *An. rangeli*, *An. pseudopunctipennis* y el complejo de *cruzi*.

No existe nuevos registros de especies de *Anopheles* de Ecuador, todas estaban reportadas por distintos estudios de identificación morfológica. La identificación molecular concuerda con el hallazgo de las especies *An. rangeli*, *An. trinkae*, *An. Albimanus* y *An. pseudopunctipennis*, pero no de *An. apicimacula* y el complejo *cruzi*.

An. trinkae fue la especie de mayor abundancia con el 31,6% del total, seguido de *An. albimanus* con el 28,1%, el grupo cercano al complejo *cruzi* con 29,8% *An rangeli* con el 5,3%, *An. pseudopunctipennis* 3.5% y *An. apicimacula* con el 1,7%.

En la provincia de Esmeraldas se encontró a las especies *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, y el complejo *cruzi*, todas las especies se han registrado como vectores de la malaria. En la provincia del Guayas habitan las especies *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis*. Ambos son vectores de la malaria, *An. albimanus* es considerada como un vector principal de la malaria. En Morona Santiago se halló a la especie *An. trinkae*, la cual es reconocida como vector principal de la enfermedad. En Carchi y Chimborazo se encontraron al complejo *cruzi*. En Imbabura, Manabí y El Oro se identificó a la especie *An. albimanus*. En Sucumbíos se identificaron al complejo *cruzi* y la especie *An. rangeli*. En Pichincha se evidenció la presencia del complejo *cruzi* y *An. apicimacula*, el cual no tiene reportes como vector. Finalmente, en Zamora Chinchipe se encontró *An. trinkae* y el complejo *cruzi*.

6.2 Recomendaciones

Al momento de extraer el ADN de patas de individuos *Anopheles* se debe triturar vigorosamente con el fin de facilitar la lisis y obtener mejores resultados de calidad y concentración de ADN.

Se recomienda hacer el análisis de la región COI para comprobar la especie de aquellas muestras que por el bajo grado de similitud (<90%) se tenga dudas.

Se necesita mayor conocimiento sobre la biodiversidad en la Provincias en donde existen alto número de casos de malaria como Orellana y Pastaza por lo cual en un futuro se debe realizar mayores esfuerzos de muestreo en dichas zonas, tomando en cuenta las épocas del año en la cual los focos de malaria se disparan.

REFERENCIAS

- Abraham, O. (1947). *Anopheles* (Anopheles) *kyondawensis* n. sp., from Lower Burma. *Medical Journal of Malaya*. 1(1), 173, 176.
- Arévalo-Herrera, M., Solarte, Y., Rocha, L., Alvarez, D., Beier, J. y Herrera, S. (2011). Characterization of *Plasmodium vivax* transmission-blocking activity in low to moderate malaria transmission settings of the Colombian Pacific coast. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 84(2), 71-77.
- Arisue, N., Kawai, S., Hirai, M., Palapac, N., Jia, M., Kaneko, A., Tanabe, K. y Horii, T. (2011). Clues to Evolution of SERA Multigen Family in 18 *Plasmodium* Species. *Plos One Journal*. 6(3), 1-12.
- Arruda, M., Ríos, R., Arante, P., Oliveira, A. y Nascimento, L. (1982). Manutecao em laboratorio de *Anopheles Albitarsis* e *Anopheles aquasalis* por copulacao induzida. *Memoria do Instituto Oswaldo Cruz*. 77(1), 89-91.
- Beebe, N. y Saul, A. (1995). Discrimination of all members of *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-fragment length polymorphism analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 53(5), 478-81.
- Bona, A. y Navarro-Silva, M. (2006). *Anopheles cruzii* parity in dense rain forest in Southern Brazil. *Revista Saude Publica*. 40(1), 1118-1123.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. y Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32(1), 314-331.
- Calderón, G., Fernández, R. y Valle, J. (1995). Especie de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e inefectividad en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*. Perú. 8(2), 6-23.

- Carretero, M. (2003). Quimioprofilaxis de la malaria. *OFFarm*. 22(08), 136-138
- Casas, M. (2004). Especie de Anopheles en el sur de México y su distribución geográfica actual con enfoque en taxonomía clásica y molecular. Recuperado el 5 de Diciembre de 2016 de <http://www.conabio.gob.mx/institucion/cgi-bin/datos.cgi?Letras=V&Numero=019>
- Castro, R. y Rodríguez, G. (2009). Análisis Proteómico de Plasmodium, el agente causal de la malaria. *Revista de Salud Pública de México*. 51(3), 395-402.
- Center for Disease Control and Prevention CDC. (2015). *Anopheles Mosquitoes*. Recuperado el 16 de Enero de 2016 de <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>
- Chan, M. (2014). World Malaria Report 2014. *World Health Organization*. 1-17.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, Y. y Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel barcode for identifying medicinal plant species. *Plos One Journal*. 5(1), 1-8.
- Chin, W., Contacos, P., Coatney, G. y Kimball. (1965). A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science*. 149(3686), 865.
- Coleman, A. (2013). Analysis of Mammalian rDNA Internal Transcribed Spacers. *Plos One Journal*. 8(11), e79122.
- Conn, J., Wilkerson, R., Segura, M., De Souza, R., Schlichting, C., Wirtz, R. y Póvoa, M. (2002). Emergence of a new neotropical malaria vector facilitated by human migration and changes in the land use. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 66(1), 18-22.
- Consoli, R. y Oliveira, R. (1994). *Principais Mosquitos de importancia no Brasil*. Scielo Books.

- Davis, M., Douglas, M., Collyer, M. y Douglas M. (2016). Deconstructing a Species-Complex: geometric morphometric and molecular analyses define species in the western Rattlesnake (*Crotalus viridis*). *Plos One Journal*. 11(1), 1-21.
- Deane, L. (1986). Malaria Vectors in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 81(2), 5- 14.
- De Oliveira- Ferreira, J., LaurencO- de-Oliveira, L., Teva, A., Deane, L. y Daniel-Ribeiro, C. (1990). Natural malaria infections in anophelines in Rondonia state. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 43(1), 6-10.
- Estrada, D., Quiñones, M., Sierra, D., Calle, D., Ruíz, F., Erazo, H. y Linton, Y. (2003). Utilidad de la morfología de los huevos como un método indirecto para identificar *Anopheles benarrochi* Galdón, Cova García & López, *Anopheles owaldoi* (Peryassu) y *Anopheles rangeli* Gabaldón, Cova García & López, (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Revista Biomédica*. 23(1), 388-395.
- Faran, M. (1980). *Mosquito studies (Diptera:Culicidae) XXXIV. A revision of the albimanus section of subgenus Nyssorhynchus of Anopheles*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 15(7), 1-214.
- Fernández, R., Schoeler, G. y Stancil, J. (2004). Presencia de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *benarrochi* en áreas de selva con transmisión malárica. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 21(4).
- Freitas, L., Russo, C., Voioch, C., Mutaquiha, O., Marques, L. y Schrago, C. (2015). Diversification of the Genus *Anopheles* and a Neotropical Clade from the late Cretaceous. *Plos One Journal*. 10(8), 1-12.
- Fritz, G. (1997). Sequence analysis of the rDNA Internal Transcribed Spacer 2 of five species of South American human malaria mosquitoes. *The journal of sequencing and mapping*. 8(4), 215-221.

- Galardo, A., Arrudo, M., D'Almeida, A., Loudibos, L. y Zimmerman, R. (2007). Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 76(1), 461-469.
- Gómez, G., Cienfuegos, A., Gutierrez, L., Conn, J. y Correa, M. (2010). Análisis morfológico y molecular evidencia problemas al identificar *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) por claves dicótomicas. *Revista Colombiana de Entomología*. 36(1), 68-75.
- Gorham, J., Stajanovich, C. y Scott, H. (1973). Clave ilustrada para los mosquitos anofelinas de Sudamérica Occidental. *Mosquito Systematic*. 5(1), 103.
- Gutiérrez, L., Naranjo, N., Jaramillo, L., Muskus, C., Luckhart, S., Conn, J. y Correa, M. (2008). Natural ineffectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica*. 107(1), 99-105.
- Hajibabaei, M., Singer, A. y Hickey, D. (2006). Benchmarking DNA barcodes: an assessment using available primate sequences. *Genome*. 49(7), 968-971.
- Harbach, R. (1994). Review of the Internal Classification of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): the foundation for comparative systematics and phylogenetic research. *Bulletin of Entomological Research*. 84(1), 331-342.
- Harbach, R. (2013). Mosquito Taxonomic Inventory. Recuperado El 2 de Abril de 2016 de <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>
- Harbach, R. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*. 1668(1), 591-638.
- Harbach, R. (2004). The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bulletin of Entomological Research*. 94(1). 537-5553.

- Harbach, R. (2013). The Phylogeny and Classification of Anopheles. *Anopheles Mosquitoes- New insight into Malaria Vectors. Intech.* 1(1), 1-55.
- Harbach, R. y Kitching, I. (2005). Reconsideration of anopheline phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. *Systematic and biodiversity.* 3(1). 345-374.
- Harrison, B., Ruíz-López, F., Calderón, G., Savage, H., Pecor, J. y Wilkerson, R. (2012). *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera:Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and a molecular verification. *Zootaxa.* 1-17.
- Hayes, J., Calderon G., Falcon R. y Zambrano V. (1987). Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin Department, Peru. *Journal of the American Mosquito Control Association.* 3(3), 418-422.
- Helmerson, E. (2013). *Molecular identification of Mosquito Species.* (Tesis) UPPSALA UNIVERSITET.
- Hiwat, H., Issaly, J., Gaborit, P., Somai, A., Samjhawan, A., Sardjoe, P., Soekhoe, T. y Girod, R. (2010). Behavioral heterogeneity of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) and malaria transmission dynamics along the Maroni River, Suriname, French Guiana. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 104(1), 207-213.
- Ibáñez-Bernal, S., Strickman, S. y Martínez-Campos. (1996). *Culicidae (Diptera). Biodiversidad, taxonomía y bideogeografía de artrópodos de México: hacia una síntesis de su conocimiento.* (Tesis). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Keller, A., Forseter, F., Muller, T., Dandekar, T., Schultz, J. y Wolf, M. (2010). Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees. *Biology Direct.* 5(4), 2-12.

- Krzywinski, J., Wilkerson, R. y Besansky, N. (2001). Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequence in Anophelinae (Diptera:Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. *Molecular Phlogenetics and Evolution*. 18(1), 479-487.
- León, R., Ortega, L., Gualapura, M., Morales, F., Rojas, M. y Espinel, M. (2014). Identificación de Dípteros Nematóceros de interés médico en zonas aledañas a la construcción de la Represa Hidroeléctrica Toachi-Pilatón. *Avances en Ciencias e Ingenierías*. 6(2), B25, B31.
- Levi-Castillo, R. (1958). Provisional List of the Culicidae, Simuliidae, Phlebotomus and Culicoides of Ecuador. *Proceedings of the 10th International Congress of Entomology*. 3(1), 867-872.
- Lewin, B. (2004). Genes VIII. Eight edition. Pearson Prentice Hall. United States of America.
- Marcilla, A., BARGUES, M., Ramsey, J., Magallon-Gastelum, E., Salazar-Schettino, P., Abad-Franch, F., Dujardin, J., Schofield, C. y Mas-Coma, S. (2001). The ITS2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas Disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 18(1), 136-42.
- Martínez, M. (1997). Sistemática molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60(1), 123-136.
- Merget, B., Koetschan, C., Hackl, T., Foster, F., Dandekar, T., Muller, T., Schultz, J. y Wolf, M. (2012). The ITS2 Database. *Journal of Visualized Experiments*. 61(1), 1-5.
- Mogel, B, y Solórzano, E. (2006). Análisis por medio de la técnica de espaciadores internos transcritos ITS2 de poblaciones re infestantes de *Triatoma dimidiata* Latreille. Colectadas pre y post rociamiento en 10 localidades del departamento de Jutiapa. Secretaria Nacional de

Ciencia y Tecnología. Guatemala. Recuperado el 30 de Julio de 2016 de <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.101.pdf>

Montoya-Lerma, J., Solarte, Y., Giraldo-Calderón, G., Quiñones, M., Ruiz-López, F., Wilkerson, R., González, R. (2011). Malaria vector specie in Colombia: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 106(1), 223-238.

Moreno, C. (2001). Métodos para medir la biodiversidad. *Revista de Biología Tropical*. 49(4), 84.

Moreno, M. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. *Real Sociedad Española de Historia Natural*. 100(1-4), 45-65.

National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool NCBI BLAST. (2016). Recuperado de El 5 de Junio de 2016 de ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/factsheets/HowTo_BLASTGuide.pdf

Navarro, J. (1996). Actualización taxonómica de la tribu Anophelini de Venezuela, con nueva clave para la identificación de larva 4to estadio. *Boletín de la Dirección de la Mariología y Saneamiento Ambiental*. 36(1), 25-43.

Olano, V., Brochero, H., Saenz, M., Molina, J. (2001). Mapas preliminares de la distribución de especies de Anopheles vectores de Malaria en Colombia. *Revista Biomédica*. 21(4), 402-408.

Organización Mundial de la Salud OMS. (2016). Paludismo progresos y desafíos. Recuperado el 26 de Mayo de 2016 de <http://www.who.int/malaria/es/>

Orjuela, L., Herrera, M., Erazo, H. y Quiñones, M. (2013). Especies de Anopheles presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con Plasmodium. *Revista Biomédica del instituto Nacional de Salud*. 33(1), 42-52.

- Osborn, F., Rubio-Palis, Y., Herrera, M., Figuera, A. y Moreno, J. (2004). Caracterización Ecoregional de los Vectores de Malaria en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. 44(2), 77-92.
- Paludismo.org. (2016). Paludismo. Recuperado el 27 de Mayo de 2016 de <http://www.paludismo.org/>
- Pinault, L. y Hunter, F. (2001). New Highland distribution records of multiple Anopheles species in the Ecuadorian Andes. *Malaria Journal*. 10(1), 1-10.
- Ponce, P., Cevallos, V., Morales, D., Quetin, E. y Sánchez, D. (2016). A revised checklist, new records and medical importance of mosquitoes in Ecuador (Diptera: Culicidae). Unpublished. 1-23.
- Póvoa, M., Wirtz, R., Lacerda, R., Miles, M. y Warhust, D. (2001). Malaria vectors in the municipality of Sera do Navio, state of Amapá. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96(1), 179-184.
- QIAamp DNA microkit. (2010). Handbook de Qiagen. Recuperado el 23 de Abril de 2016 de <https://www.qiagen.com/ec/shop/sample-technologies/dna/dna-preparation/qiaamp-dna-micro-kit#orderinginformation>.
- QIAamp DNeasy Blood and Tissue Kit. (2016). Handbook. . Recuperado el 23 de Abril de 2016 de http://diagnostics1.com/MANUAL/General_Qiagen.pdf
- Rachou, R. (1958). Anofelinos do Brasil: comportamento das especies vectoras de malaria. *Revista brasileira de malariologia e doencas tropicais*. 10(1) 145-181.
- Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. (Tesis). Universidad de Oviedo.

- Ramírez, C. y Dessen, E. (2000). Chromosome differentiated populations of *Anopheles cruzii*: evidence for third sibling species. *Genetica*. 108(1), 73-80.
- Rona, L., Carvahlo, C. y Peixot, A. (2013). Evidence for occurrence of two sympatric sibling species within the *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzi* complex in southeast Brazil and the detection of asymmetric introgression between them using a multilocus analysis. *BMC Evolutionary Biology*. 207(1), 1-13.
- Rosero, D., Gutiérrez, L., Cienfuegos, A., Jaramillo, L. y Correa, M. (2010). Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Revista Colombiana de Entomología*. 36(2), 260-263.
- Rossi, G. y Almirón, W. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criadero artificial en la Argentina. Recuperado el 24 de Febrero de 2016 de <https://www.mundosano.org/download/bibliografia/Monografia%205.pdf>
- Rubio-Palis, Y. y Zimmerman, R. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *Journal medical entomology*. 34(5), 499-510
- Sallum, M., Schultz, y Wilkerson, R. (2000). Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. *Annals of the Entomological Society of América*. 93(1), 745-775.
- Schantz, J. y Nour, N. (2009). *Malaria and Pregnancy: a global health perspective*. *Journal Obstetrics and Gynecology*. 2(3); 186-192.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhdorf, S., Rober, V., Spouge, J., Levesque, C. y Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *National Institute of Health*. 109(16).
- Seeger, M. (2012). Organización Panamericana de la Salud. Recuperado el 25 de Febrero de 2016 de

http://www.paho.org/arg/index.php?option=com_content&view=article&id=1101:casos-malaria-bajaron-casi-60percent-ultima-decada-americas-segun-nuevo-informe-oms-&Itemid=268.

Sistema de Alerta Temprana para el Control de Vectores de Malaria y Leishmaniasis SATVEC. (2016). Informe final SATVEC 2015. CIREV-INSPI.

Tainchum, K., Ritthison, W., Chuaycharoensuk, T., Bangs, M., Manguin, S. y Chareonviriyaphap, T. (2014). Diversity of Anopheles species and trophic behaviour of putative malaria vectors in two malaria endemic areas of northwestern Thailand. *Journal Vector Ecology*. 39(2), 424-436.

Toledo, M., Mureb, M. y Marinotti, O. (2006). The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a toll for Latin American anopheline taxonomy. A critical review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101(8), 817-832.

Uribarren, T. (2015). Malaria. Departamento de microbiología y parasitología. Recuperado el 25 de Febrero de 2016 de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/paludismo.html>

Wilkerson, R., Strickman, D., Fernández-Salas, L. e Ibáñez-Bernal, S. (1993). *Clave ilustrada para la identificación de las hembras de mosquitos anofelinos de México y Centroamérica*. (Tesis). Universidad Autónoma de Nuevo León.

World Health Organization WHO. (2016). Recuperado el 25 de Febrero de 2016 de <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/WMR2015.pdf>

Vargas, J. (2003). Prevención y control de la Malaria y otras enfermedades transmitidas por vectores en el Perú. *Revista Peruana de Epidemiología*. 11(1).

- Xu, S., Zhou, H., Tang, J., Li, J., Zhu, G., Su, Y., Huang, G., Gao, Q. (2012). Molecular identification of Anopheles Hyrcanus complex by using single enzyme digestion PCR-RFLP method. *Jiangsu Institute of Parasitic Diseases*. 24(4), 435-9.
- Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiaoo, P. y Chen, S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *Plos One*. 5(10), 1-9.
- Zapata, M., Trujillo, A., Agudelo, O., Quiñones, M., Tu, J., Luckhart, S. y Correa, M. (2004). PCR-RFLP de secuencias ITS como método de identificación de especies de Anopheles del subgénero Nyssorhynchus. *Revista Médica Universidad de Antioquia*. 17(2).
- Zavortink, T. (1979). *Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXIX*. A review of the subgenus Kerteszia of Anopheles. *Instituto Contrib Am Entomol*. 3(1), 1-54.
- Zimmerman, R. (1992). Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87(3), 371-383.

ANEXOS

Anexo 1. Especies de Anopheles por departamentos en Perú.

Tomado de Especies de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre sus abundancia e inefectividad en el Perú de la revista Peruana de epidemiología 1995

ESPECIES DE ANOPHELINOS (a)	TUMBES	PIURA	LAMBAYEQUE	LA LIBERTAD	CAJAMARCA	ANCASH	LIMA	ICA	AREQUIPA	MOQUEGUA	TACNA	AMAZONAS	SAN MARTIN	HELIANUCO	PASCO	JUNIN	HUANCABELICA	AYACUCHO	APURIMAC	CUSCO	PUNO	LORETO	UCAYALI	MADRE DE DIOS	
1 An.(Ano.)jeiemi	X	X	X		X								X					X	X	X	X			X	
2 An.(Ano.)mattogrossensis																							X	X	X
3 An.(Ano.)peruviana													X							X			X	X	X
4 An.(Ano.)pseudopancipennis	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					X
5 An.(Ano.)nigromaculatus																X		X							
6 An.(Ano.)calderoni (1) (&)	X	X	X	X		X	X	X																	
7 An.(Ano.)flutrinensis (1)					X							X	X				X	X		X		X	X	X	
8 An.(Ano.)intermedius (1)					X								X			X						X			
9 An.(Ano.)mediopunctatus (1)													X	X	X					X		X	X	X	
10 An.(Ano.)neomaculipalpis (1)														X								X	X		
11 An.(Ano.)pseudomaculipes (1)																						X			
12 An.(Ano.)shannoni (1)																						X		X	
13 An.(Lop.)squameifemur (&)																						X	X		
14 An.(Nys.)albimarus	X	X	X	X	X	X																			
15 An.(Nys.)albimarus	X				X							X	X									X		X	
16 An.(Nys.)argyritarsis	X				X								X							X	X	X	X	X	
17 An.(Nys.)benarrochi													X	X		X				X		X	X	X	
18 An.(Nys.)brasilensis													X												
19 An.(Nys.)darlingi																				X		X		X	
20 An.(Nys.)dunhami (=trinkae) (&)																X								X	
21 An.(Nys.)evansae (=nordestensis) (&)																						X	X	X	
22 An.(Nys.)galvaoi (&)																									X
23 An.(Nys.)insectivora														X	X							X	X	X	
24 An.(Nys.)oswaldoi					X								X	X		X		X				X	X	X	
25 An.(Nys.)rangeli					X							X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	
26 An.(Nys.)strodei																						X			
27 An.(Nys.)triannulatus	X				X								X	X	X		X	X		X		X	X	X	
28 An.(Nys.)hatsi (2)																					X				
29 An.(Nys.)parvus (2)															X	X									
30 An.(Ker.)boliviensis																		X							
31 An.(Ker.)bambucolus																		X				X			
32 An.(Ker.)cruzei																		X				X			
33 An.(Ker.)homunculus																				X					
34 An.(Ker.)lanceatus																				X					
35 An.(Ker.)lepidotus (&)																X									
36 An.(Ker.)neivai																							X		
37 An.(Str.)acanthotorynus																							X		
38 An.(Str.)kurupi																							X	X	
39 An.(Str.)nimbus																							X		
40 An.(Str.)thomasi																							X		
41 Chagasia bathanasi	X											X	X						X		X	X	X	X	
42 Ch. Bonneae														X		X						X			
43 Ch. fajardoii (&)																X									

(1) Anopheles (Anopheles) serie Ambalagis (2) An (Nyssorhynchus) grupo Myzozhynchella (&) Nuevos records (a) No se incluye An.(Ano.) apicimaculatus porque esta especie se distribuye sólo del norte de Colombia hasta México.

Anexo 2. Especies de Anopheles en Ecuador, Perú, Bolivia y Chile

Tomado de Gorjam, Stojanovich y Scott, 1973, p 103.

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS ANOFELINOS DE SUDAMERICA OCCIDENTAL

ESPECIES	ECUADOR	PERU	BOLIVIA	CHILE
Subgénero <i>Stethomyia</i>				
<i>A. acanthotorynus</i>		X		
<i>A. kompi</i>	X	X		
<i>A. nimbus</i>		X	X	
<i>A. thomasi</i>		X		
Subgénero <i>Anopheles</i>				
<i>A. apicimacula</i>	X	X		
<i>A. eiseni</i>	X	X	X	
<i>A. fluminensis</i>		X	X	
<i>A. intermedius</i>		X	X	
<i>A. maculipes</i>			X	
<i>A. mattogrossensis</i>	X	X	X	
<i>A. mediopunctatus</i>	X	X	X	
<i>A. neomaulipalpus</i>	X	X	X	
<i>A. peryassut</i>		X	X	
<i>A. pseudopunctipennis</i> ..	X	X	X	X
<i>A. punctimacula</i>	X	X	X	
<i>A. shannoni</i>		X	X	
<i>A. tibiamaculatus</i>		X	X	
Subgénero <i>Lophopodomyia</i>				
<i>A. gilesi</i>			X	
<i>A. gomezdelatorrei</i>	X			
<i>A. squamifemur</i>	X			
<i>A. vargasi</i>	X			
Subgénero <i>Nyssorhynchus</i>				
<i>A. albimanus</i>	X	X		
<i>A. albitarsis</i>		X	X	
<i>A. aquasalis</i>	X			
<i>A. argyritarsis</i>		X	X	
<i>A. benarrochi</i>		X	X	
<i>A. brasiliensis</i>			X	
<i>A. darlingi</i>	X	X	X	
<i>A. evansae</i>			X	
<i>A. lutsi</i>			X	
<i>A. noroestensis</i>	X		X	
<i>A. mnestovari</i>		X	X	
<i>A. oswaldoi</i>	X	X	X	
<i>A. parvus</i>		X	X	
<i>A. platipennis</i>				X
<i>A. rangeli</i>	X	X	X	
<i>A. rondoni</i>			X	
<i>A. triannulatus</i>	X	X	X	
Subgénero <i>Kerteszia</i>				
<i>A. bambusicola</i>	X	X		
<i>A. boliviensis</i>	X	X	X	
<i>A. cruzi</i>		X		
<i>A. homoculus</i>		X		
<i>A. lanceatus</i>			X	
<i>A. neivai</i>	X	X	X	
TOTAL.....	44	21	31	2

Anexo 3. Abreviaturas

AS-PCR: Allelespecific polymerase Chain Reaction

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CIREV: Centro Nacional de Referencia e Investigación de Vectores

COI: Citocromo Oxidasa I

INSPI: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública

ITS: Internal Transcribed Spacer

ITS2: Internal Transcribed Spacer 2

MEB: Microscopía electrónica de barrido

MSP: Ministerio de Salud Pública

PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism

RAPD: Random Amplification of Polymorphic

SATVEC: Sistema de Alerta Temprana para el Control de Vectores de Malaria y Leishmaniasis