

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann,
VECTOR DE MALARIA, EN LA COSTA DE ECUADOR**

Realizado por:

JUAN JOSÉ BUSTILLOS HERRERA

Director del proyecto:

Juan Carlos Navarro, Ph.D.

Codirector del proyecto:

Sofía Beatriz Ocaña Mayorga, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

Máster en Biomedicina

Quito, 03 de Septiembre de 2021

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, JUAN JOSÉ BUSTILLOS HERRERA, con cédula de identidad # 171561823-5, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

171561823-5

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus*, VECTOR DE MALARIA EN LA
COSTA DE ECUADOR”**

Realizado por:

JUAN JOSÉ BUSTILLOS HERRERA

Como Requisito para la Obtención del Título de:

MÁSTER EN BIOMEDICINA

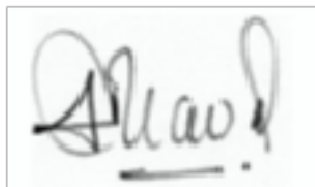
Ha sido dirigido por el profesor

JUAN CARLOS NAVARRO

Codirigido por

SOFÍA OCAÑA MAYORGA

Quienes consideran que constituye un trabajo original de su autor.



FIRMA

FIRMA

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JOSE RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS

LINO ARISQUETA-HERRENZ

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 03 de Septiembre de 2021

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor y su apoyo incondicional en cada momento y etapa de mi vida, siendo una guía y un ejemplo a seguir, a mi hermano, mi novia y resto de mi familia por siempre brindarme lo mejor de ellos y estar siempre pendiente de mí.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

AGRADECIMIENTO

A mis directores Sofía Ocaña y Juan Carlos Navarro, por brindarme su ayuda y compartir conmigo sus conocimientos, motivándome a seguir por los caminos de la investigación científica. A la Universidad Internacional SEK y a la PUCE por brindarme su apoyo y herramientas para que el presente trabajo pueda realizarse sin ningún inconveniente.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Para someter a:

Estructura genética poblacional y resistencia a insecticidas (Piretroides)

de *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann,

vector de malaria en la costa de Ecuador

Juan José Bustillos^{1,2*}, Juan Carlos Navarro ¹, Sofía Ocaña-Mayorga²

¹ Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud,
Quito, Ecuador. ² Centro de Investigación para la Salud en América Latina CISEAL, Pontificia
Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias
Biológicas, Quito, Ecuador

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Juan José Bustillos , Universidad Internacional SEK,
Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador; Centro de Investigación para la Salud en
América Latina CISEAL, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Biológicas, Quito, Ecuador

Teléfono: +593-990430033; email: jjbustillos@uisek.edu.ec

Título corto o Running title: **Estructura poblacional y resistencia a insecticidas de *Anopheles*
*albimanus***

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Resumen

La malaria es una enfermedad parasitaria, transmitida principalmente por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles*. Su distribución en zonas tropicales y los registros de la aparición de poblaciones vectoriales resistentes a insecticidas, la convierte en una enfermedad de importancia para los organismos de control de salud. En Ecuador, *Anopheles albimanus* es considerada una de las especies de mayor importancia para la transmisión de malaria en la costa ecuatoriana, además de existir reportes de una posible presencia de poblaciones resistentes a insecticidas. Por ende, la importancia de conocer la estructura genética poblacional de este vector, junto con las posibles rutas genéticas de origen de resistencia. Para el análisis poblacional, se utilizó un fragmento de 664 pb del gen *mtCOI* en un total de 37 muestras provenientes de las provincias de Esmeraldas y El Oro. Los principales índices de variabilidad genética mostraron: baja diversidad nucleotídica $Pi = 0.0085$; alta diversidad haplotípica $Hd = 0.9430$; índices de flujo genético negativos $Gst = -0.0014$ y $Fst = -0.0290$ y una distribución mismatch bimodal. Estos resultados se complementaron con el análisis de topologías basadas en máxima parsimonia (MP) y Bayes, mostrando parafilia con respecto al origen geográfico. Mediante una red de haplotipos, se observó la agrupación de las muestras. Se analizó el codón 1014 del gen *VGSC* en 69 muestras de Esmeraldas y El Oro, encontrando únicamente el genotipo susceptible a insecticidas TTG (87%) y el heterocigoto TTK (13%). En conclusión, *An. albimanus*, es una población de baja variabilidad, que necesita mayores estudios de los mecanismos de resistencia a insecticidas reportados, adicionalmente los datos obtenidos, brindan pautas para poder implementar y redefinir estrategias de control de mayor efectividad contra la malaria en la costa ecuatoriana.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Abstract

Malaria is a parasitic disease mainly caused by *Anopheles* female mosquitoes bite. The tropical worldwide distribution and the population's insecticide resistance records, make this important for health services around the world. In Ecuador, *Anopheles albimanus* is considered the main malaria vector in the coastal zone, reporting the possible presence of pyrethroid insecticide resistance populations. It's important the knowledge about genetic structure and the probably genetic mechanisms of resistance origins of this malaria vector in the country. For population's genetics, a 664bp fragment of *mtCOI* was analyzed in 37 samples of Esmeraldas and El Oro provinces. Genetic diversity indexes, showed: low nucleotide diversity $Pi= 0.0085$; high haplotype diversity $Hd= 0.9430$; negative genetic flow values $Gst= -0.0014$ y $Fst= -0.0290$ and bimodal distribution of allelic frequencies (mismatch distribution). Phylogenetic analyses were performed using maximum parsimony (MP) and Bayesian topologies showing a paraphyletic origin in compare with geographic origin of samples. Samples distribution, were performed by a haplotype network. The 1014 codon of *VGSC* gen was analyzed in 69 samples from Esmeraldas and El Oro, we found only susceptible TTG (87%) and heterozygous TKK (13%) genotypes. Concluding *An. albimanus* is a low genetic variability group in which It's necessary more studies about insecticide resistance mechanisms. Obtained data is important for implementation redefining better control strategies in de zone.

Key words: malaria, vector, *Anopheles albimanus*, pyrethroid, genetic variability, insecticide resistance, Ecuador.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Introducción

La malaria es una enfermedad parasitaria causado por organismos protozoarios pertenecientes al género *Plasmodium*, que se transmite mediante la picadura de mosquitos pertenecientes al género *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae: Anophelinae). Forma parte de un grupo de enfermedades transmitidas por vectores, para las cuales se han establecido estrategias continuas de control y prevención alrededor del planeta que han resultado en la reducción de la mortalidad e incidencia en las zonas donde existe riesgo de infección (WHO, 2013). Posee una distribución global, siendo endémica en las regiones tropicales de todos los continentes; donde el riesgo de infección de los habitantes, tiende a ser permanente durante casi todo el año y a medida que su distribución se aleja de los trópicos, el riesgo de contagio se torna estacional hasta volverse nulo en los polos (Caminade et al., 2014).

Reaparición de la malaria en América Latina.

En la actualidad se considera que en muchos países tecnológica y económicamente desarrollados, la malaria ha sido erradicada (Espinoza, 2019). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS-WHO), entre 2000 y 2015 las intervenciones para combatir la malaria a nivel mundial, condujeron a la reducción de la incidencia de esta enfermedad en un tercio y la mortalidad de la misma a más de la mitad (WHO, 2017). Sin embargo, estas medidas y los parámetros que se utilizan para obtener estos datos globales, no revelan la realidad focalizada de ciertas regiones, en las cuáles, una causalidad multifactorial no permite que las estrategias de control sean efectivas y;

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

han provocado un resurgimiento de esta enfermedad (Espinoza, 2019). Dentro del continente Americano, países como Ecuador, Brasil, Perú y Nicaragua, presentan un ligero aumento de reporte de casos durante los últimos 5 años. Sin embargo en Venezuela, un país en el cuál a inicios de 2010 se consideró en vías de erradicación, de la mencionada fecha hasta 2017 evidenció un aumento de casos en un 365% (WHO, 2018).

Vectores de malaria en el Ecuador.

En el Ecuador se ha reportado la presencia de al menos 36 especies de mosquitos del género *Anopheles*, que podrían cumplir el rol de vector de parásitos (*Plasmodium*), y por ende de provocar malaria en su zona de distribución. En la región costera y algunas localidades de la región andina, se reportó la presencia de *Anopheles (Nys.) albimanus* Wiedemann, (*An.*) *Anopheles pseudopunctipenis*, (*An.*) *Anopheles punctimacula*, con sus respectivos hábitats larvarios asociados a tierras de uso humano, caminos, ríos y poblados (Pinault & Hunter, 2012) y *Anopheles (Kerteszia) neivai*, limitado a criaderos naturales en bromelias (Navarro, Arrivillaga, Morales, Ponce, & Cevallos, 2015); además de la presencia de *Anopheles calderoni* únicamente para la región costera (González et al., 2010; Martin et al., 2020). Dentro de la Amazonía, recientemente se han reportado especies como *Anopheles (An.) mattogrosensis* y *Anopheles (An.) apicimacula* (Duque et al., 2019), también se tiene registros de *Anopheles (Nys.) rangeli* (Gabriela Arregui, Enriquez, Benítez-Ortiz, & Navarro, 2015), *Anopheles (Nys.) oswaldoi*, *Anopheles (Nys.) benarrochi* y *Anopheles (Nys.) konderi* (Ocaña-Mayorga et al., datos no publicados).

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

La especie *An. albimanus*, es ampliamente distribuido en América central, las Antillas y Sudamérica (Drahansky et al., 2016). En Ecuador, *An. albimanus*, se ha reportado en la región costera (Pinault & Hunter, 2012). Sus preferencias por criaderos de agua dulce, lugares con cobertura de sombra y zonas de influencia humana (especie antropofílica), catalogan a esta especie como de importancia epidemiológica en la transmisión de malaria (Sinka et al., 2010). Estudios recientes, proponen un re arreglo de la clasificación de los subgéneros dentro de *Anopheles* en el que se sugiere que el subgénero *Nyssorhynchus*, la elevación a género (Foster et al., 2017). No obstante, este estudio no muestra todas las especies del subgénero *Nyssorhynchus*, entre ellos *An albimanus*, especie típica del subgénero y la propuesta carece de equidad en el rango nomenclatural, en un afán de cambios sin toda la evidencia filogenética, genética, evolutiva en sentido amplio y taxonómica. Por estas razones, esta propuesta no ha tenido una aceptación de consenso.

Resistencia a insecticidas en poblaciones de mosquitos vectores de malaria.

Una de las principales estrategias para la erradicación de malaria a nivel mundial, ha sido el control vectorial. Es decir, controlar las poblaciones de mosquitos en localidades en las cuales los seres humanos se encuentran en constante interacción con estos vectores y de esta manera reducir la probabilidad de que los parásitos (agentes causales de la enfermedad), puedan llegar a infectar a la población y desencadenen nuevos brotes (Takken & Knols, 2009). Dentro del control vectorial, la aplicación de una amplia gama de insecticidas, ha sido durante muchos años la principal estrategia en varios países, logrando una eficiencia considerable en la reducción de las

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

poblaciones de mosquitos vectores. Sin embargo, mediante mecanismos evolutivos como la selección natural, se ha evidenciado la aparición de poblaciones genéticamente seleccionadas, capaces de resistir al efecto de ciertos grupos de insecticidas generando de esta manera la pérdida de eficacia a lo largo del tiempo (Oxborough et al., 2008).

Durante mucho tiempo, la OMS aceptó el uso de varios grupos de insecticidas para el control de malaria. Compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides; constituyen gran parte de la totalidad de insecticidas utilizados, limitando durante mucho tiempo la aparición de poblaciones vectoriales resistentes gracias al recambio de uso de estos compuestos. No obstante, en la última década; se empezó a evidenciar la aparición de poblaciones resistentes a varios tipos de insecticidas, dentro de especies de mosquitos consideradas como principales vectores de malaria (Choi, McIntyre, & Furnival-Adams, 2019). Los insecticidas piretroides, corresponden a un grupo amplio de compuestos químicos que ofrecen una serie de ventajas como baja bioacumulación, poca toxicidad en organismos no plaga como mamíferos y bajas dosis necesarias para la aplicación, en comparación del resto de agentes que se utilizan para el control de plagas. Su mecanismo de acción, es similar al de la mayoría de grupos de insecticidas; actuando sobre el sistema nervioso, influyendo sobre la transmisión de los impulsos nerviosos.

En *An. albimanus*, la resistencia a insecticidas piretroides, ha sido reportada mediante una ruta metabólica descrita previamente en poblaciones de mosquitos de Mesoamérica, recolectados en un periodo de uso intensivo de insecticidas; tanto en el área de salud pública, como en el campo agrícola (Lol et al., 2013). Es así como se determinó que un importante mecanismo de

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

resistencia, consiste la aparición de mutaciones puntuales en la posición 1014 de un gen denominado Voltage Gated Sodium Channel (VGSC siglas en inglés), donde el codón TTG que sintetiza una Leucina (L1014), confiere el fenotipo susceptible a insecticidas piretroides. Una inversión en este codón, a TGT sintetizando una Cisteína (C1014) o una substitución TTC sintetizando fenilalanina (F1014), confiere un fenotipo resistente a la acción de piretroides. A dicha resistencia se la denomina *knock down resistance (kdr)* ya que evita que exista el efecto rápido de knock down y la letalidad del insecticida (Lol et al., 2013). En Ecuador, se ha reportado la presencia de poblaciones vectoriales, que fenotípicamente son resistentes, aunque los porcentajes indican que se sugiere resistencia que debe ser comprobada en la zona sur del país. La evaluación de resistencia, se realizó mediante ensayos tipo CDC (Real et al., 2019 datos no publicados; MSP, 2019), a pesar de que el 90% de los individuos presentan la secuencia susceptible en el codón 1014. No hay información sobre la variación de este gen en otras zonas del país, por lo que esta evidencia debe ser confirmada con más estudios. La presencia de posibles poblaciones resistentes a la deltametrina (piretroide) debe tener un seguimiento cercano para evitar un limitado efecto en el control de la malaria y una mayor selección de poblaciones resistentes (PAHO, 2018).

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

164 *Genética poblacional de vectores de enfermedades*

165 En enfermedades transmitidas por vectores (ETV), es muy importante el conocimiento sobre
166 la genética y la estructura de las poblaciones para comprender la competencia y capacidad
167 vectorial de las especies, tratar de mejorar y aumentar la eficiencia de los programas de control de
168 vectores existentes; y para implementar nuevas estrategias (Chen, Minakawa, Beier, & Yan,
169 2004; Gorrochotegui-Escalante et al., 2002). Estudios previos en el continente Asiático, sugieren
170 que las barrera geográficas influyen más que la distancia geográfica para las poblaciones de
171 mosquitos del género *Anopheles* (Weeraratne, Surendran, Walton, & Karunaratne, 2018). Los
172 primeros estudios que se realizaron en cuanto a genética poblacional de *A. albimanus* utilizando
173 marcadores mitocondriales, concluyen que la principal causa de la diferenciación poblacional en
174 esta especie, a lo largo del continente americano está guiado por aislamiento geográfico (De
175 Merida et al., 1999), donde los países más cercanos tienen poblaciones genéticamente similares,
176 que van diferenciándose conforme aumenta la distancia entre zonas de estudio. Posteriormente,
177 con el avance de los métodos moleculares, utilizando una técnica multilocus (microsatélites), se
178 evidencia una gran diferenciación entre poblaciones de Centro y Sudamérica a la vez que
179 mediante el estudio de mtDNA se propone que esta especie tiene su centro de origen en el Caribe,
180 donde se presentan los haplotipos de mayor ancestralidad y diversidad (Molina-Cruz et al., 2004).
181 Además, el análisis de un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (*mtCOI*), en un
182 rango geográfico más limitado, como por ejemplo entre poblaciones en Colombia, sugieren la
183 existencia de diferencias moderadas entre las diferentes regiones biogeográficas (Gutiérrez et al.,
184 2009). Sin embargo, estudios con ADN mitocondrial en *An. albimanus*, han encontrado una

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

diferenciación baja a moderada entre las poblaciones de *An. albimanus* de Centroamérica (Costa Rica y Panamá), que sugiere que las barreras ni la distancia geográfica son importantes, y más bien, que las reintroducciones recientes son las que dirigen la genética poblacional en esta especie (Loaiza, Scott, Bermingham, Rovira, & Conn, 2010). En otra visión más amplia, se propone adecuar el análisis clásico de ADN mitocondrial (mtDNA) y relacionar la información obtenida con pruebas estadísticas para genética poblacional, con nuevas variables abióticas para una mejor comprensión de la distribución e importancia de los vectores de la malaria. Los principales factores a considerar incluyen la topografía, los tipos de suelo, la información climática a largo plazo y las ecorregiones (Drahansky et al., 2016). Es muy importante el establecer si existe o no una diferenciación dentro de las poblaciones de una especie de vector, con el objetivo de utilizar esta información como una herramienta que guíe la implementación y mejoramiento de estrategias de control para la malaria. El conocimiento sobre la diferenciación genética, relacionada con las condiciones biogeográficas de diferentes puntos de recolección y la evaluación de la resistencia a insecticidas para *An. albimanus* en la costa de Ecuador, es necesario para aclarar el panorama del resurgimiento de la malaria en el país en los últimos años y desarrollar estrategias que ayuden a mejorar los sistemas nacionales de control.

Dentro del conocimiento acerca del origen de la resistencia a insecticidas, se señala constantemente el término “población” que se define biológicamente como un conjunto de individuos de la misma especie, que habitan en un lugar determinado y comparten características genotípicas y fenotípicas.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

• En la región costera del Ecuador, en todo el intervalo de distribución de *An. albimanus*, podemos observar diferentes condiciones ecoclimáticas que deben ser consideradas para un análisis poblacional de esta especie. Por esta razón, nuestro objetivo es analizar la estructura genética y la resistencia a piretroides de *An. albimanus*, recolectados en diferentes zonas de la región costa, evaluando diferentes índices de diferenciación genética, y establecer la presencia de genotipos resistentes a piretroides mediante el análisis del codón 1014 en el gen *VGSC*, y evaluar una posible diferenciación geográfica debido a las condiciones climáticas y biogeográficas de la región costa.

Materiales y Métodos.

Zona de Estudio

La costa Pacífica del Ecuador consta de 6 provincias (Figura 1). Los ejemplares procesados provienen de la provincia más septentrional (Esmeraldas), frontera con Colombia al norte, y la provincia de El Oro al sur, frontera con Perú (Figura 1). Esmeraldas presenta remanentes de la cordillera andina del bosque tropical del Chocó, caracterizado por un alto nivel de diversidad en flora y fauna. Sus suelos, son adecuados para la producción agrícola siendo los pastos cultivados los que ocupan la mayor extensión de tierras, seguido por los cultivos permanentes de una variedad de productos, entre ellos cacao, frutas de temporada, maíz y palma africana (MAGAP, 2020).

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

También es considerada como una de las provincias costera con los más altos índices de precipitación anual con aproximadamente 2000 mm (Buckalew, Scott, James, & Reed, 1998). Las colecciones de *An albimanus* para este trabajo, provienen de las comunidades: Unión de Atacames (UA), Limones (LI), Muisne (MU) y Chamanga (CH), cuya altitud fluctúa entre los 2 y los 22 m y la temperatura promedio es de 26°C; y de la comunidad Las Golondrinas (GL), que se encuentra más cercana a la zona de las estribaciones de la cordillera Andina con una altitud de aproximadamente 200 m y una temperatura media de 25 °C. El Oro, por su parte, presenta una amplia zona de cultivos principalmente de banano y cacao. Los ejemplares fueron colectados en localidades de Huaquillas (HQ) (cantón Huaquillas), Los Ángeles (LA) (cantón Machala), Barbones (BA) (cantón El Guabo) y La Victoria (LV) (cantón Pasaje). Este cantón presenta bajos niveles de precipitación anual (270.4 mm) y una temperatura que varía entre 24°C y 26°C (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2017); y una comunidad del cantón Santa Rosa (SR), considerada una zona de actividad turística, ganadera y agrícola (GAD Santa Rosa, 2017), donde el nivel de precipitación anual bordea los 672 mm y la temperatura varía entre los 22°C y 24°C (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2017) (Figura 1).

Dichas provincias cuentan con un componente de uso de tierra para la agricultura, esta característica, es de mucha importancia en el aspecto epidemiológico ya que durante mucho tiempo se ha tenido conocimiento de la estrecha relación que existe entre el uso de tierras para fines agrícolas, la malaria y la aplicación de plaguicidas (García Martín & Nájera-Morrondo, 1973).

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR



Figura 1. Mapa del origen geográfico de los especímenes recolectados en las provincias de Esmeraldas (Limonas (LI), Unión de Atacames (UA), Muisne (MU), Chamanga (CH) y Las Golondrinas (LG)) y El Oro (Barbones (BA), Los Angeles (LA), La Victoria (LV) y Huaquillas (HU)). Cada punto de color negro, representa una localidad diferente.

Selección de muestras y obtención de ADN

En este estudio se utilizaron especímenes de *An. albimanus* almacenados en seco o ADN almacenado a -20°C y mantenidos como parte de las colecciones del CISEAL (Anexo 1). En el caso de muestras almacenadas en seco, la extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy blood and tissue (Qiagen®, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

256 *Amplificación de los genes mitocondriales mtCOI y mtND5 para el análisis de poblaciones*

257 Con el material genético extraído, se realizó el proceso de amplificación de fragmentos mediante
258 PCR. La región del gen *mtCOI*, se amplificó mediante el uso de los primers UAE3_Fw 5'-TAT
259 AGC ATT CCC ACG AAT AAA TAA-3' y UEA10_Rev 5'-TCC AAT GCA CTA ATC TGC
260 CAT ATT A-3', para obtener un fragmento de 1300 pares de bases (pb) mediante las siguientes
261 condiciones de amplificación: 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C/40seg,
262 50°C/1min, 72°C/1min, y finalmente una extensión de 72°C durante 5 minutos (Loaiza et al.,
263 2010; Lunt et al., 1996). La amplificación del fragmento *mtND5*, de 390 pb de longitud, fue
264 realizada utilizando los primers ND5P1_Fw 5'-TWG CSC CTA ATC CKG CTA TA-3', y
265 ND5M2_Rev- 5'-YTW GGA TGA GAT GGS TTA GG-3'; las condiciones de amplificación
266 fueron: 95°C durante 5 minutos, seguidos de 10 ciclos de 92°C/1min, 48°C/1min y 72°C/1.5min,
267 luego se aplicaron 32 ciclos de 92°C/1min, 54°C/35seg y 72°C/1.5min, finalmente se aplicó una
268 extensión final de 72°C durante 7 minutos (De Merida et al., 1999). Los fragmentos obtenidos, se
269 verificaron mediante la visualización en geles de agarosa al 3% y los amplicones se enviaron a la
270 empresa Macrogen, Inc en Corea del Sur, para su purificación y secuenciación.

271

272 *Amplificación del gen VGSC para determinar genotipos de resistencia a insecticidas piretroides*

273 Para el análisis del codón 1014, se amplificó un fragmento de 225 pb de la región VGSC
274 mediante el uso de los primers: AKDRF 5'-CAT TCA TTT ATG ATT GTG TTT CGT G-3' y
275 AKDRR 5'-GCA ANG CTA AGA ANA GRT TNA G-3'. Como condiciones de amplificación
276 para este fragmento se utilizó una denaturación de 95°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

95°C/45 seg, 51.5°C/45 seg y 72°C/1 min, para finalizar con una extensión de 72°C durante 5 minutos (Lol et al., 2013).

Análisis de las secuencias y genética poblacional con los genes mtCOI y mtND5

Se utilizó el software Mega V10.2.6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) para la revisión, limpieza y corrección manual, obtención de secuencias consenso, alineamientos posicionales y análisis filogenéticos correspondientes al gen *mtCOI*. Dentro de los análisis filogenéticos realizados con este software, se estableció el mejor modelo de substitución nucleotídica para nuestro set de datos mediante un Model Test; basado en el cálculo de los valores de inferencia bayesiana (BIC) que mejor se adaptan a nuestro análisis. Posteriormente se elaboró una matriz de distancias genéticas clasificando a nuestras secuencias de acuerdo a las provincias de origen. Finalmente se construyó un árbol de máxima parsimonia (MP) cuyos valores de apoyo de clados o ramas, se determinaron por remuestreo de la matriz por bootstrapping con 1000 pseudoréplicas; se estableció un burning de los 100 primeros árboles, los cuales no se consideran dentro de la inferencia del árbol final; El método Heurístico de MP fue el TBR (Tree-Bisection-Reconnection). Para el análisis de genética poblacional del fragmento *mtCOI*, los valores de diversidad genética como: diversidad nucleotídica (P_i), diversidad haplotípica (H_d), número de sitios variables (s) y número de haplotipos (h); se calcularon mediante DNAsp V5.0 (Librado & Rozas, 2009). También se determinaron el índice de diferenciación genética entre poblaciones (G_{st}) (Owak & Rawford, 2002) y el índice de fijación (F_{st}) para determinar la reducción de heterocigocidad de una subpoblación por causa de los cruzamientos no al azar.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Finalmente, con el mismo software, se realizó un test de neutralidad de Tajima (Tajima's D) con la finalidad de determinar si existe contracción o expansión demográfica y un gráfico de la distribución mismatch que nos muestre la distribución de diferencias pareadas, que nos pueden ayudar a determinar información sobre los tamaños poblacionales pasados ((Rogers, 2004). Adicionalmente, para complementar los análisis evolutivos de las secuencias de *mtCOI*, se trabajó con el software BEAST V5.2 (Drummond. J., 2015), con la finalidad de emplear el algoritmo bayesiano para elaborar un árbol filogenético de alta resolución. Finalmente, mediante programa NETWORK (Fluxus Technology) V2.0, se realizó el trazado de una red de haplotipos, con la finalidad de observar la agrupación de las diferentes secuencias y la relación entre diferentes mosquitos recolectados en distintas zonas geográficas.

Análisis de las secuencias del gen asociado a resistencia a piretroides VGSC

Los análisis del gen VGSC permiten determinar si existen genotipos susceptibles o que reportados como resistentes a insecticidas piretroides con el mecanismo *kdr*. Se utilizó el software Mega V10.2.6 (Tamura et al., 2013), para la visualización de los cromatogramas y la evaluación de las diferentes mutaciones en el codón 1014. No se realizaron análisis de variabilidad genética con el gen VGSC, ya que este fragmento corresponde a una porción de ADN nuclear de baja variabilidad. El genotipo TTG (L1014) ha sido descrito para poblaciones susceptibles, mientras que los genotipos TGT (C1014) y TTC (F1014) han sido reportados en poblaciones resistentes

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

Resultados

Obtención de amplicones

Se extrajo ADN y se realizó la amplificación de los 3 diferentes fragmentos *mtND5* y *mtCOI* para los análisis poblacionales, y *VGSC* para el análisis del codón 1014 en cuanto a resistencia a insecticidas; en un total de 90 muestras, 50 de ellas corresponden a 5 localidades en la provincia de Esmeraldas: Chamanga (n = 10), Limones (n = 10), Las Golondrinas (n = 10), Unión de Atacames (n = 10) y Muisne (n = 10). Mientras que se obtuvieron 40 muestras restantes corresponden a 4 localidades de la provincia de El Oro: Barbones (n = 10), La Victoria (n = 10), Huaquillas (n = 10) y Los Ángeles (n = 10). Los productos de amplificación de algunos de los fragmentos obtenidos, se muestran en la Figura 2.

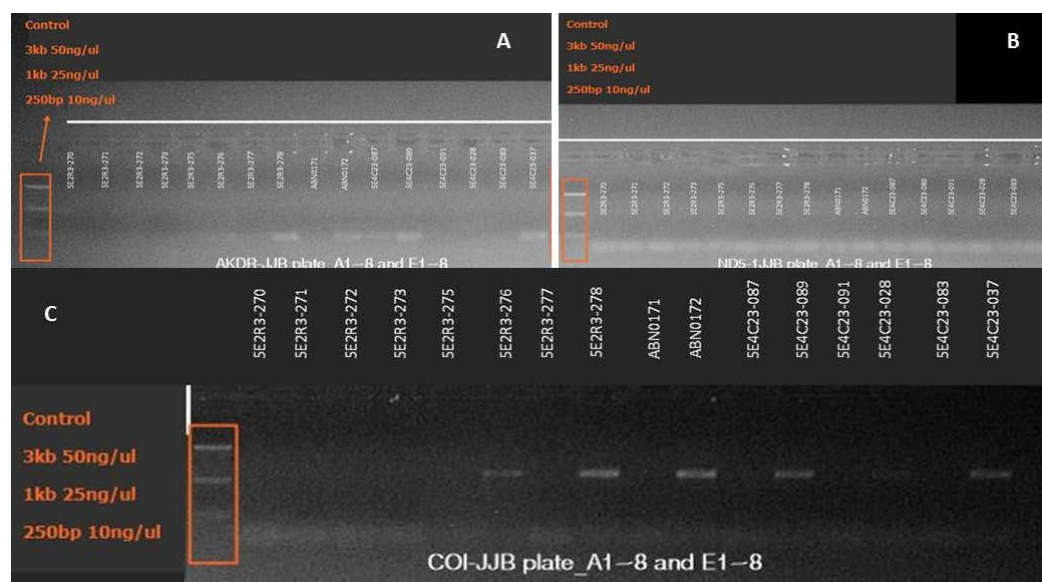


Figura 2. Visualización de productos de PCR en geles de agarosa 3%, para los diferentes genes: A. *VGSC*, tamaño de banda esperada de ± 300 pb; B. *mtND5* tamaño de banda esperada de ± 390 pb; C. *mtCOI* tamaño de banda esperada de ± 1300 pb.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Determinación de las secuencias aptas

Luego de la secuenciación de los fragmentos y del análisis inicial de dichas secuencias mediante el software Mega V6.0, se obtuvieron un total de 69 secuencias aptas para el análisis del codón 1014 del gen *VGSC*, relacionado con la resistencia a insecticidas, 32 correspondientes a Esmeraldas y las 37 restantes de la provincia de El Oro.

Para el gen *mtCOI*, se obtuvo 37 secuencias (17 para Esmeraldas y 20 de El Oro) para los posteriores análisis, mientras que para el gen *mtND5* no se obtuvieron resultados positivos en la amplificación ni en la secuenciación (Tabla 1).

Tabla 1. Número de muestras procesadas y secuencias obtenidas para cada provincia y sus correspondientes localidades.

	ADN/PCR	<i>VGSC</i>	<i>mtCOI</i>	<i>mtND5</i>
Esmeraldas				
Muisne (MU)	10	9	10	0
Unión de Atacames (UA)	10	7	0	0
Limones (LI)	10	5		0
Chamanga (CH)	10	10	7	0
Las Golondrinas (GL)	10	1	0	0
Total Esmeraldas	50	32	17	0
El Oro				
Huaquillas (HQ)	10	9	10	0
Barbones (BA)	10	10	0	0
Los Ángeles (LA)	10	9	1	0
La Victoria (LV)	10	9	19	0
Total El Oro	40	37	20	0
Total	90	69	37	0

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

Estructura genética poblacional mediante el análisis de secuencias del gen *mtCOI*

Análisis de variabilidad genética

El análisis de diversidad genética se realizó con un fragmento de 664 pb y se analizaron 17 muestras de las provincias de Esmeraldas y 20 muestras de El Oro para el gen *mtCOI*. Los resultados mostraron una baja diversidad genética ($Pi= 0.0085$); mientras que la diversidad haplotípica fue alta ($Hd= 0.9430$) con 19 haplotipos ($h= 19$) y 17 sitios variables ($S= 17$). Al comparar entre ambas provincias, no se encontró diferencias significativas en los índices de diversidad genética y haplotípica (Tabla 2).

Tabla 2. Principales índices de diversidad genética para el gen *COI* para cada provincia donde se recolectaron especímenes y para el set completo de secuencias.

Localidades	No de muestras	(<i>Pi</i>)	(<i>Hd</i>)	(<i>s</i>)	(<i>h</i>)
Esmeraldas	17	0.0084	0.9410	16	11
El Oro	20	0.0089	0.9470	16	13
General	37	0.0085	0.9430	17	19

Pi= diversidad genética; *Hd*= diversidad haplotípica; *s*= número de sitios variables y *h*= número de haplotipos.

La estimación de los valores de flujo génico entre las provincias de Esmeraldas y El Oro, demuestran un índice flujo haplotípico ($Gst= -0.0014$) y un bajo valor del índice de fijación ($Fst= -0.0290$), lo que nos indica que existe una baja diferenciación genética dentro de las muestras de cada provincia, así como entre Esmeraldas y El oro como subpoblaciones. Mediante el test de neutralidad, se obtuvo un valor *Tajima's D*= 1.0612, sin embargo su valor no se consideró

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

estadísticamente significativo $P > 0.10$. En el gráfico de la distribución mismatch, se pudo observar una curva bimodal, que sugiere que existe un equilibrio demográfico en la población (Figura 3).

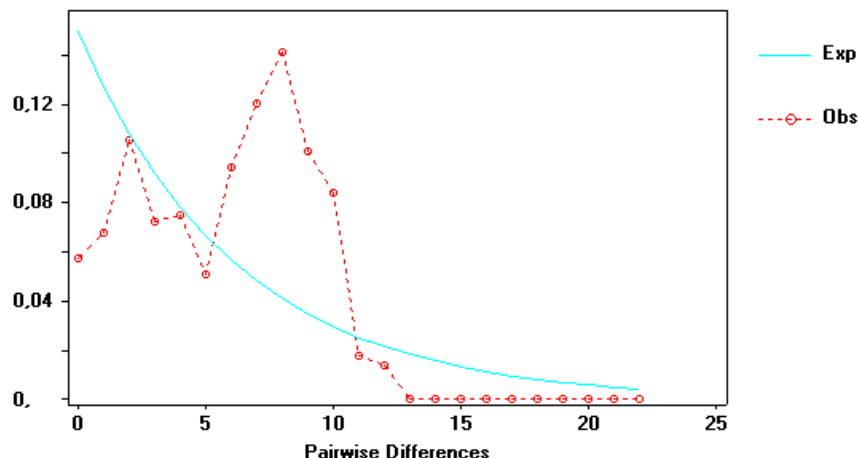


Figura 3. Distribución mismatch de las diferencias pareadas del set de muestras correspondientes a las provincias de Esmeraldas y El Oro. La línea celeste, representa los valores esperados, mientras que la línea punteada roja, representa los valores observados. La distribución bimodal, sugiere una población en equilibrio demográfico.

Análisis filogenéticos

Para el análisis de parentesco, se utilizaron 57 secuencias (17 de Esmeraldas y 20 de El Oro), incluyendo 5 secuencias correspondientes al trabajo realizado por Pinault y Hunter en el año 2011. Dichas secuencias corresponden a la provincia de Guayas y Manabí, y sus códigos de accesos son: (JN412829.1); (JN412828.1); (JN412827.1); (JN412826.1) y (JN412830.1). De igual manera, se agregó un set de 10 secuencias correspondientes a mosquitos recolectados en Colombia (Gutiérrez et al., 2009). Los códigos de acceso en GenBank de las secuencias utilizados son: (FJ015265.1); (FJ015263.1); (FJ015262.1); (FJ015264.1); (FJ015261.1);

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

(FJ015260.1); (FJ015268.1); (FJ015267.1); (FJ015266.1) y (FJ015258.1). Finalmente, como grupo externo se utilizaron secuencias correspondientes a *Anopheles calderoni* (González et al., 2010); (HQ642974.1); (HQ642973.1); (HQ642972.1); (HQ642971.1) y (HQ642970.1). Mediante un método de análisis de Model Test en MEGA, se procedió a la búsqueda del mejor modelo de sustitución nucleotídica de nuestras secuencias, basado en los valores de inferencia bayesiana (BIC) asignados por el software. El modelo que mejor se ajustó a nuestros datos según el análisis BIC fue el Tamura 3 parámetros (T92) sin distribución Gamma +G ni sitios invariables +I (Tabla 3).

Model	Parameters	BIC
T92	113	5144.291
HKY	115	5150.539
T92+G	114	5154.067
T92+I	114	5156.099

Tabla 3. Esquema de los 4 mejores modelos de sustitución nucleotídica para el alineamiento, basados en los valores más bajos del criterio de inferencia bayesiana (BIC). T92= Tamura 3 parámetros; HKY= Hasegawa-Kishino-Yano; +I= Sitios evolutivamente invariables dentro de la secuencia; +G = Distribución Gamma.

En el análisis filogenético de distancias, el promedio general de distancia entre las secuencias analizadas es de 0,010 (1%). Se obtuvo una matriz de comparación de distancias genéticas entre grupos de secuencias para determinar el índice de similitud entre las diferentes localidades (Tabla 4).

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Tabla 4. Matriz de distancias genéticas y su respectiva desviación estándar, para el set de secuencias, incluyendo las tomadas de GenBank para las localidades de Guayas, Manabí y Colombia. Los cálculos de los índices de diferenciación, están basados en un análisis de bootstrap de 1000 réplicas en base al modelo de sustitución nucleotídica Tamura 3 parámetros (T92).

	Esmeraldas	El Oro	Guayas	Manabí	Colombia
Esmeraldas	-	0,003	0,003	0,004	0,003
El Oro	0,009	-	0,003	0,005	0,004
Guayas	0,009	0,008	-	0,005	0,004
Manabí	0,010	0,012	0,010	-	0,003
Colombia	0,010	0,011	0,010	0,005	-

Mediante el algoritmo de máxima parsimonia (MP), se construyó un árbol filogenético con modelo inductivo con las 57 secuencias. El árbol resultante, presenta un valor de bootstrap de 1 en el nodo más externo del árbol, cuyo valor sustenta el origen monofilético de la especie. Los nodos subsiguientes, no presentaron valores bootstrap considerables que representen un buen soporte para las relaciones establecidas. Excepto por un clado de la parte superior del árbol, conformado por 24 secuencias correspondientes a Esmeraldas, El Oro, Guayas, Manabí y Colombia que presentan un valor de soporte de 0,72 de bootstrap. De manera clara, se pudo observar que no existe una estructuración poblacional entre secuencias de las mismas localidades, al contrario, se observa una heterogeneidad en la distribución y una estrecha relación sin importar la ubicación geográfica de origen. El árbol, sugiere que existe un origen parafilético con respecto al origen geográfico de las secuencias de los especímenes analizados (Figura 4). Junto con la construcción del árbol, se obtuvieron los índices de consistencia (CI= 0,955) que nos ayuda a determinar el nivel de homoplasia y el índice de retención (RI= 0,988), que nos indica el ajuste de los caracteres al cladograma, siendo 1 un valor de ajuste perfecto y 0 sin ajuste.

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles* (Nys.)

albimanus Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

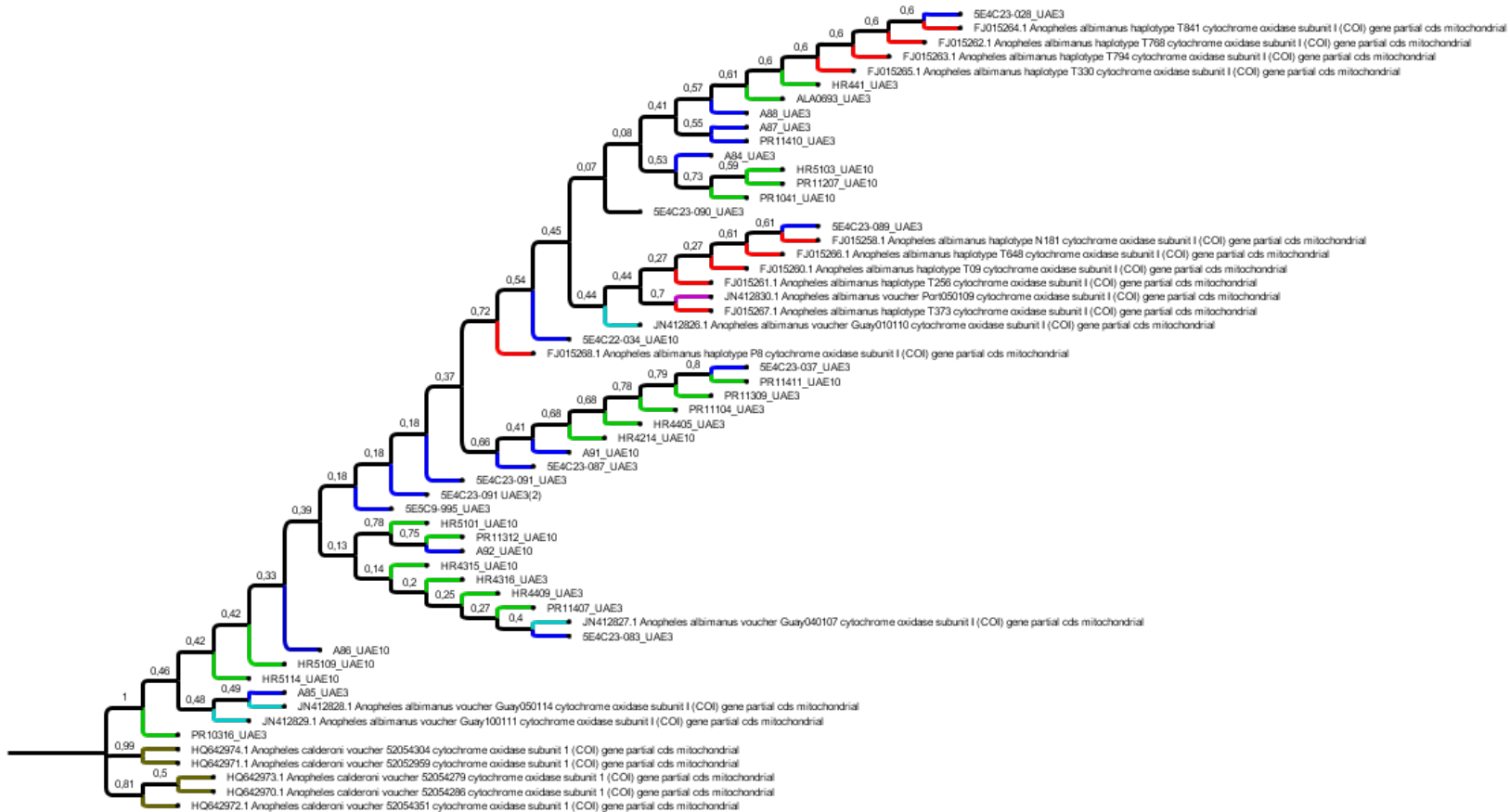


Figura 4. Dendrograma MP (Máxima Parsimonia) establecido para el análisis de relación entre las secuencias de *An. albimanus* de diferentes localidades. Cada color en las ramas terminales, representa una localidad diferente para poder evidenciar de mejor manera la distribución y relación de las secuencias y su lugar de origen. Se puede determinar que existe un origen parafilético de las secuencias, con respecto al origen geográfico de los grupos establecidos en el análisis. Índice de consistencia (0,955); Índice de retención (0,988). **Rojo**= Colombia; **Azul** = Esmeraldas; **Verde** = El Oro; **Celeste** = Guayas; **Lila** = Manabí; **Marrón** = Grupo externo (*Anopheles* (*An*) *calderoni*).

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

429 Mediante el software BEAST v1.10.4, se construyó un árbol filogenético basado en el algoritmo
430 Bayesiano con la finalidad de comparar los resultados con el de máxima verosimilitud. Para este
431 análisis se utilizan varios parámetros a priori, es decir se establecen ciertas condiciones antes de
432 continuar con la construcción del dendrograma. El modelo utilizado fue el T92 (Tamura 3
433 Parámetros), la base de frecuencias se realiza de forma estimada, se utilizaron 4 categorías
434 gamma y un tamaño constante de coalescencia. En este caso el algoritmo se basa en el uso de
435 cadenas probabilísticas MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) para las que se estableció una
436 longitud de 10 000 000. En el árbol filogenético basado en el algoritmo Bayesiano, dio mejores
437 valores en los nodos externos. Los valores de probabilidad desde 0,8 hasta 1 nos indican que
438 existe una relación fuertemente sustentada de las ramas que se forman en el árbol, sin embargo,
439 se confirma una distribución heterogénea de las secuencias sin un patrón agrupamiento
440 geográfico. Se puede observar que existen dos grandes grupos. Un grupo o clado que se sustenta
441 con un valor de probabilidad de 0,9 que incluye muestras de Colombia, Esmeraldas, Guayas,
442 Manabí y El Oro. En el segundo grupo, con un valor de probabilidad de 0,8 se agrupan
443 únicamente secuencias de Ecuador de las provincias de El Oro, Esmeraldas y Guayas. Al igual
444 que en el árbol de máxima parsimonia el grupo externo de *calderoni* se encuentra sustentado con
445 un valor probabilístico de 1 (Figura 5).

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles* (Nys.)

albimanus Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

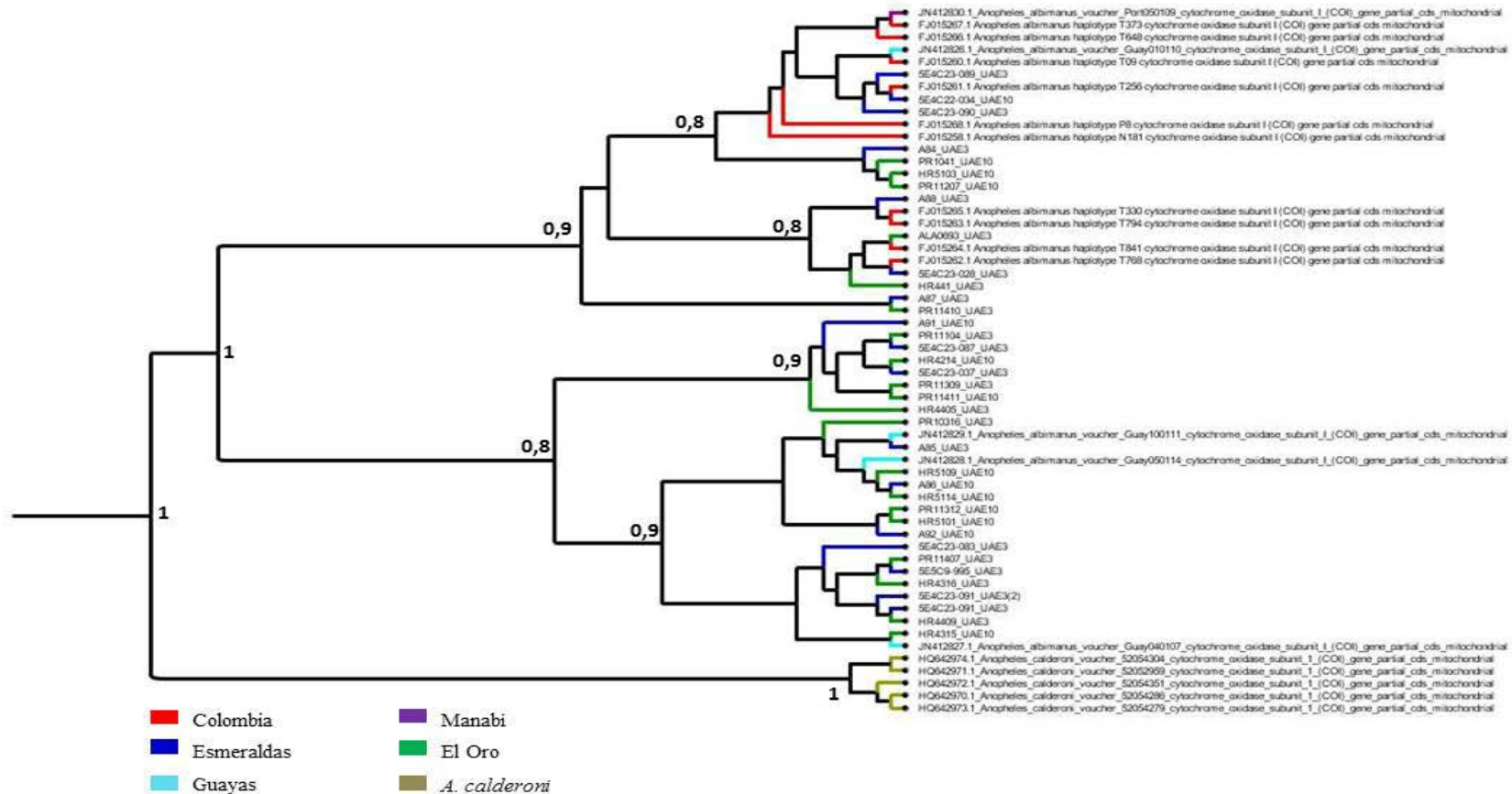
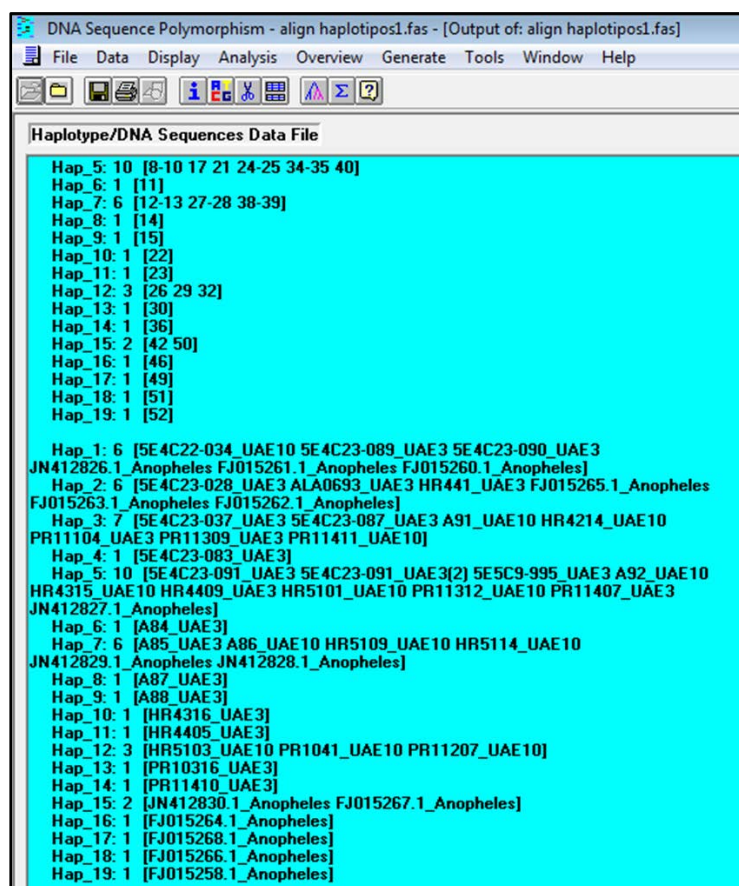


Figura 5. Dendrograma basado en el algoritmo Bayesiano, para establecer la relación de las secuencias de *An. albimanus*. Cada color en las ramas terminales, representa una localidad diferente para poder evidenciar de mejor manera la distribución y relación de las secuencias y su lugar de origen. Mediante el análisis de los valores de probabilidad bayesiana de los nodos, con respecto al origen geográfico de los especímenes, al igual que en el árbol de máxima parsimonia.

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

Análisis de Haplotipos

Para confirmar la relación entre estructura poblacional y origen geográfico, se realizó un análisis que clasifica las secuencias del gen *mtCOI* en haplotipos, es decir, agrupa las secuencias de acuerdo a su similitud. El primer paso, consistió en obtener la lista de haplotipos de nuestro set de secuencias. Se encontraron 19 haplotipos (Figura 6).



```

DNA Sequence Polymorphism - align haplotipos1.fas - [Output of: align haplotipos1.fas]
File Data Display Analysis Overview Generate Tools Window Help

Haplotype/DNA Sequences Data File

Hap_5: 10 [8-10 17 21 24-25 34-35 40]
Hap_6: 1 [11]
Hap_7: 6 [12-13 27-28 38-39]
Hap_8: 1 [14]
Hap_9: 1 [15]
Hap_10: 1 [22]
Hap_11: 1 [23]
Hap_12: 3 [26 29 32]
Hap_13: 1 [30]
Hap_14: 1 [36]
Hap_15: 2 [42 50]
Hap_16: 1 [46]
Hap_17: 1 [49]
Hap_18: 1 [51]
Hap_19: 1 [52]

Hap_1: 6 [5E4C22-034_UAE10 5E4C23-089_UAE3 5E4C23-090_UAE3
JN412826.1_Anopheles FJ015261.1_Anopheles FJ015260.1_Anopheles]
Hap_2: 6 [5E4C23-028_UAE3 ALA0693_UAE3 HR441_UAE3 FJ015265.1_Anopheles
FJ015263.1_Anopheles FJ015262.1_Anopheles]
Hap_3: 7 [5E4C23-037_UAE3 5E4C23-087_UAE3 A91_UAE10 HR4214_UAE10
PR11104_UAE3 PR11309_UAE3 PR11411_UAE10]
Hap_4: 1 [5E4C23-083_UAE3]
Hap_5: 10 [5E4C23-091_UAE3 5E4C23-091_UAE3(2) 5E5C9-995_UAE3 A92_UAE10
HR4315_UAE10 HR4409_UAE3 HR5101_UAE10 PR11312_UAE10 PR11407_UAE3
JN412827.1_Anopheles]
Hap_6: 1 [A84_UAE3]
Hap_7: 6 [A85_UAE3 A86_UAE10 HR5109_UAE10 HR5114_UAE10
JN412829.1_Anopheles JN412828.1_Anopheles]
Hap_8: 1 [A87_UAE3]
Hap_9: 1 [A88_UAE3]
Hap_10: 1 [HR4316_UAE3]
Hap_11: 1 [HR4405_UAE3]
Hap_12: 3 [HR5103_UAE10 PR1041_UAE10 PR11207_UAE10]
Hap_13: 1 [PR10316_UAE3]
Hap_14: 1 [PR11410_UAE3]
Hap_15: 2 [JN412830.1_Anopheles FJ015267.1_Anopheles]
Hap_16: 1 [FJ015264.1_Anopheles]
Hap_17: 1 [FJ015268.1_Anopheles]
Hap_18: 1 [FJ015266.1_Anopheles]
Hap_19: 1 [FJ015258.1_Anopheles]

```

Figura 6. Lista de haplotipos obtenida mediante el software DnaSP. Se describe un total de 19 haplotipos enumerados, junto con las secuencias que forman parte de cada uno de ellos.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Mediante el software Network v10.0 (Fluxus Technology), se realizaron los cálculos mediante el algoritmo Neighbor Joining (NJ) y se graficó la red de haplotípica para observar la distribución de los diferentes grupos de secuencias y su relación. En la red, se observaron 5 haplotipos con mayor frecuencia (H01, H02, H03, H05 y H07). Se observa que muestras de las provincias de Esmeralda se encuentran distribuidas en estos 5 haplotipos principales, seguidas de muestras de El Oro, que solo está ausente en el H01. Las muestras de la provincia de Guayas están presentes en los haplotipos H01, H05 y H07. Las muestras de Colombia se agrupan en los haplotipos H01 y H02. Las muestras de la provincia de El Oro, tiene 5 haplotipos adicionales (H10, H11, H12, H13 y H14), y las muestras de Guayas 4 haplotipos adicionales (H04, H06, H08, H09) (Figura 7). Al observar la estructura de la red, se observa que aunque existe cierta distribución heterogénea de las secuencias, sugiere una tendencia de separación entre las muestras de Colombia y las muestras de Ecuador, principalmente de Esmeraldas y El Oro., pero alejados de cierta manera de los haplotipos centrales de mayor tamaño correspondientes a secuencias exclusivamente de Ecuador (Figura 8).

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

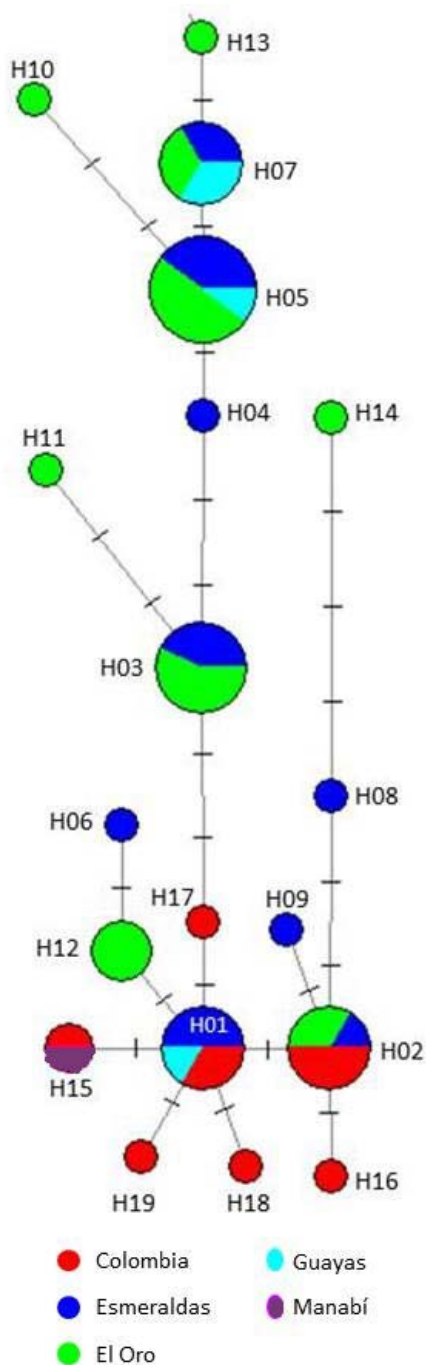


Figura 7. Red de haplotipos del gen *mtCOI*, basada en el algoritmo de Neighbor Joining (NJ), para evidenciar la distribución espacial de los haplotipos calculados previamente y la relación que existe entre los mismos. Cada línea transversal representa un cambio nucleotídico.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

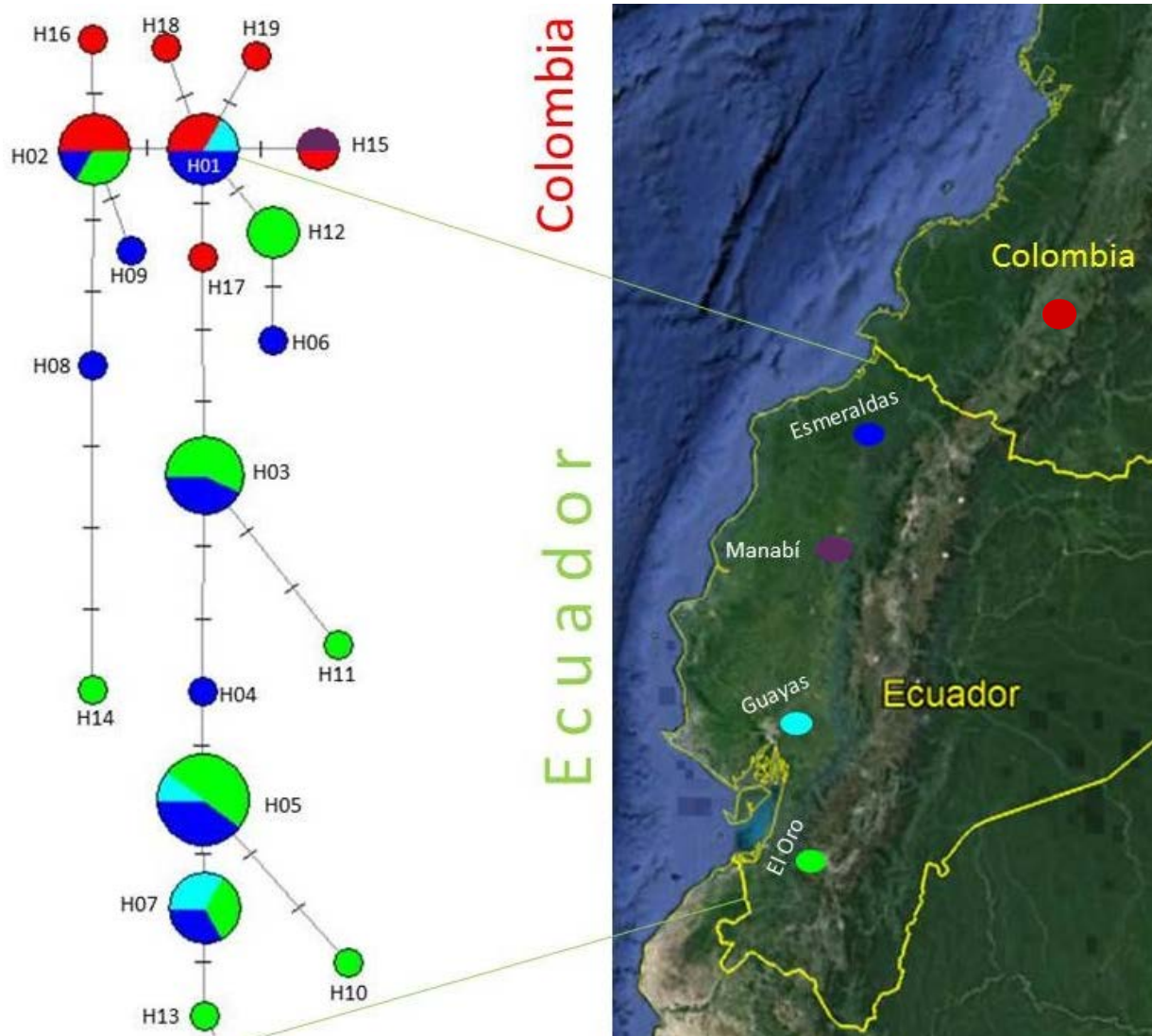


Figura8. Esquema de solapamiento de la red de haplotipos establecida para gen *mtCOI*, con la distribución geográfica de las localidades a las que corresponden las secuencias del análisis.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Análisis de la variabilidad del codón 1014 del gen VGSC

Se analizaron 69 muestras, 37 de ellas correspondientes a 4 comunidades de El Oro y 32 muestras de 5 comunidades en Esmeraldas. El 87% del total de las muestras, presentaron el genotipo susceptible TTG (L1014) en el codón 1014. Este genotipo susceptible fue encontrado en el 83.7% de muestras de la provincia de El Oro y en el 90.6% de las muestras de la provincia de Esmeraldas. Se identificó también, la presencia de genotipos heterocigotos en un bajo número de secuencias (9) (13%) tanto para Esmeraldas (3 secuencias) como para el Oro (6 secuencias) (Tabla 5). El genotipo heterocigoto identificado en ambas provincias es denominado TKK, donde la letra K se utiliza para la opción de la presencia de una Guanina (G) o una Timina (T) en dicha posición. Esta condición, impide poder identificar estos genotipos como susceptibles o resistentes dentro del análisis (Figura 9).

Tabla 5. Recuento de las mutaciones encontradas en el análisis del gen *kdr* en secuencias correspondientes a localidades de las provincias de Esmeraldas y El Oro.

	Heterocigoto	Susceptible	Total general
El Oro	6	31	37
Aguas Blancas	0	10	10
Huaquillas	1	8	9
La Victoria	1	8	9
Los Ángeles	4	5	9
Esmeraldas	3	29	32
Chamanga	0	10	10
Las Golondrinas	0	1	1
Limones	0	5	5
Muisne	0	9	9
Unión de Atacames	3	4	7
Total general	9	60	69

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

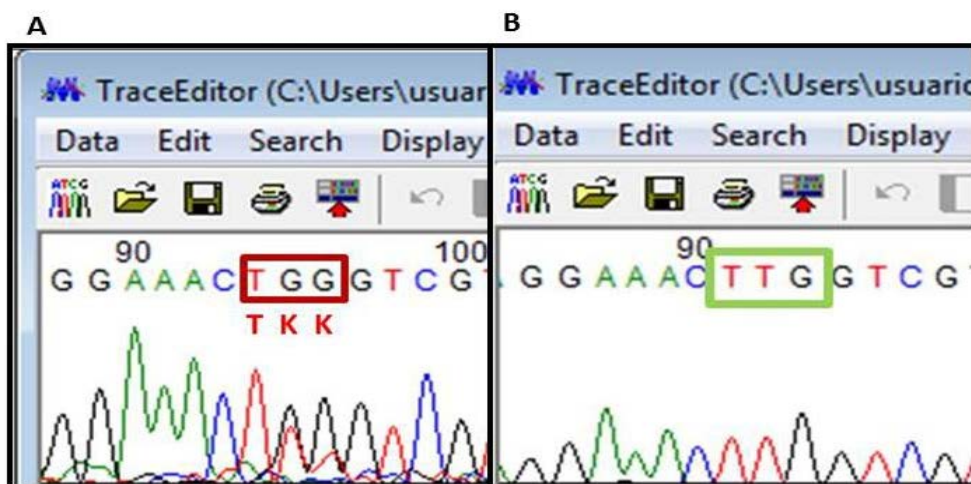


Figura 9. Esquema gráfico de las mutaciones encontradas en el análisis de cromatogramas del gen VGSC. A. Cromatograma ejemplo del genotipo heterocigoto encontrado en muestras de ambas provincias; B. Cromatograma del genotipo susceptible (TTG).

Discusión

En el Ecuador, existen estudios filogenéticos basados en mtDNA, que involucran a *An albimanus* dentro de análisis de taxonomía molecular junto con otras especies de vectores de malaria; con la finalidad de esclarecer los orígenes y las relaciones que tienen dichas especies (G Arregui, Enriquez, Benítez-Ortiz, & Navarro, 2015). Sin embargo, no se encuentran estudios realizados a nivel intra específico dentro del país con *An albimanus*, por lo que este estudio constituye una primera base para el conocimiento de la estructura poblacional de este vector en ciertas zonas de distribución donde se ha registrado incidencia de casos de malaria y a su vez mediante análisis moleculares, evaluar una posible ruta de origen de resistencia a insecticidas piretroides que recientemente se ha registrada hasta en un 50% dentro de ensayos realizados con individuos provenientes de 8 diferentes provincias (Caicedo, R, et al; 2021).

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

513 *Recuperación de ADN de muestras*

514 Uno de los principales inconvenientes de este estudio, radicó en el bajo número de
515 muestras de las que se pudo obtener ADN analizable. Para Esmeraldas en las comunidades (BA),
516 (MU), (LI), (UA) y en El Oro (BA) y (LA), los especímenes utilizados en el análisis, fueron
517 colectados entre 2012 y 2013 y almacenados a temperatura ambiente; lo que complicó la
518 obtención de material genético de calidad y cantidad suficiente. En el caso de (CH), se tenían
519 almacenadas muestras de ADN de mosquitos recolectados en 2019 que se extrajeron una vez se
520 regresó del campo (Martin et al., 2020). Finalmente para (HU) y (LV), las muestras
521 corresponden a alícuotas de ADN almacenadas desde 2019 (Real-Jaramillo, 2019; Datos no
522 publicados). Muchos de los especímenes utilizados, no fueron recolectados con el estricto
523 propósito de que a futuro se realicen análisis de tipo molecular con los mismos. Por esta razón
524 los métodos de preservación fueron relativamente sencillos utilizando tubos ependorf de 0,6 ml y
525 almacenándolos en bolsas con silica gel para evitar la aparición de hongos por la humedad. Al
526 realizar la extracción de ADN a partir de los restos que quedaban de estos mosquitos, pudimos
527 observar que el material genético de la gran mayoría, se encontraba degradado y por esta razón
528 no se pudo obtener amplicones de buena calidad principalmente para el caso del gen ND5 donde
529 todos los resultados fueron negativos. Para el gen COI, se pudo obtener secuencias de ciertos
530 individuos, sin embargo se obtuvo amplicones de la totalidad de muestras que se encontraban
531 almacenadas como alícuotas de ADN. Basados en dichas observaciones, las condiciones ideales
532 para poder conservar especímenes por largos periodos de tiempo, sin tener problemas posteriores
533 al momento de realizar análisis moleculares, radican en utilizar metodologías de preservación

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

como el almacenamiento en etanol a una temperatura de 4°C o el uso de nitrógeno líquido para congelar completamente los especímenes (Post, Flook, & Millest, 1993) De igual forma, estudios sugieren el uso de preservación en bajas temperaturas, etanol y desecantes para otro tipo de análisis en los que se necesite conservar características morfológicas como por ejemplo el uso de microscopía (Dowell, Noutcha, & Michel, 2011). Para el gen *VGSC*, la cantidad de secuencias que se pudo recuperar fue mayor y provino tanto de individuos de los que se extrajo ADN para este estudio, como de alícuotas almacenadas en el laboratorio. El mayor éxito en la obtención de secuencias de este gen, probablemente radica en el tipo de ADN del que proviene este amplicón. Mientras los genes *ND5* y *COI* se amplifican a partir de material genético mitocondrial (mtDNA), el gen para evaluar posibles mutaciones que confieran resistencia a insecticidas, se encuentra en el genoma nuclear de los especímenes. La diferencia en el tipo de genoma (nuclear o mitocondrial) de origen de cada gen de estudio, puede relacionarse al número de secuencias finales obtenidas en cada caso; esto se explica ya que se han descrito diferencias en la degradación del genoma mitocondrial y nuclear en cuanto al tiempo y a diferentes variables como la ubicación o el número de copias de cada gen en cada caso dentro de la célula (Foran, 2006).

Variabilidad genética del gen *mtCOI*

Los índices de variabilidad genética tradicionales, se calculan a partir de una matriz de cambios nucleotídicos. Los valores de *Pi* para cada provincia y en general para todo el set de secuencias, son valores que se consideran bajos, debido a que este índice se calcula en base al promedio de divergencia entre las secuencias y en este caso los cambios son mínimos ya que solo

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

existen un total de 19 sitios variables identificados en un fragmento de 664 pb. Por otro lado, los valores de diversidad nucleotídica Hd , tienden a ser elevados (0,9430) ya que se calcula a partir de las frecuencias y el número de haplotipos entre individuos. Con estos datos de un valor Pi bajo (0.0085) y un Hd elevado para nuestro set de secuencias podemos evidenciar la homogeneidad de la población (Avice, Neigel, & Arnold, 1984). El valor del test de Tajima: ($Tajima's D = 1.0612$) no fue estadísticamente significativo ($P > 0.10$) por lo que no se puede inferir una hipótesis sustentada en este análisis. Por otro lado, el gráfico de la distribución mismatch, nos muestra una distribución bimodal de las frecuencias alélicas. Esto nos sugiere que la población se encuentra en equilibrio demográfico, es decir en un estado en el que el crecimiento de la población es nulo. Dicha hipótesis plantea que de ser este el caso, también se puede evidenciar una silueta estocástica (al azar) en el árbol filogenético del gen *mtCOI* (Rogers, 2004), siendo este el caso de nuestros datos que al establecer su topología, no se agrupan de manera ordenada de acuerdo a su origen geográfico, si no que tienden a distribuirse de manera heterogénea.

El índice F_{st} , es un valor que nos permite evaluar el nivel de diferenciación genética que existe dentro de una población. En este estudio el valor de F_{st} fue bajo (0.02902) lo que indica que existe una baja diferenciación genética dentro de los individuos de ambas provincias. Mientras que el G_{st} , que corresponde a un índice de variabilidad entre localidades también fue bajo (0,00145), esto = nos indica no existe evidencia de diferenciación poblacional establecida por el origen geográfico en las muestras de *An. albimanus* en la costa de Ecuador (Nei, 1973).

Estos datos, concuerdan con estudios previos, donde se sugiere que las poblaciones de *An. albimanus*, tienden a diferenciarse genéticamente en escalas geográficas mayores. Es el caso de

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

una comparación en la que individuos de la zona del Caribe (Magdalena, Bolívar, Córdoba y Antioquia) que se diferencian claramente de individuos de la región del Pacífico (Chocó, Valle del Cauca y Nariño) en Colombia; sin embargo, dentro del mismo estudio, se determina que existe una baja variabilidad entre individuos que comprenden una misma región (Gutiérrez et al., 2009). Por otro lado, históricamente se ha encontrado que existió un escenario de fragmentación de una gran población de *An. albimanus* durante el Pleistoceno debido por los cambios geográficos que en ese periodo tuvieron lugar. A partir de dicha fragmentación, se cree que empieza el aumento en el rango de expansión de esta especie, hacia la parte sur de América Central y la parte norte de América del Sur (Loaiza et al., 2010).

La falta de agrupación genética entre las poblaciones ecuatorianas de *An. albimanus* con diferente origen geográfico también se observa al analizar las topologías. En este estudio podemos observar que existe el mismo patrón de agrupación tanto para los análisis de ML y Bayesiano. Sin embargo, se observa una cierta tendencia de separación cuando analizamos las secuencias provenientes de Colombia, con las secuencias de Ecuador. La construcción de este tipo de árboles, nos permite tener una mejor perspectiva de las relaciones genéticas que existen dentro de nuestro set de secuencias. El patrón similar de los resultados con el uso de dos algoritmos diferentes, nos permite confirmar la tendencia de nuestros datos. En estudios previos de poblaciones de *An. albimanus*, llevados a cabo con muestras originarias de Centroamérica, Sudamérica y el Caribe, se ha encontrado baja diferenciación entre poblaciones geográficamente cercanas, y esto se mantiene al realizar análisis de fragmentos de genoma mitocondrial, así como con el uso de micro satélites (Molina-Cruz et al., 2004). En este estudio, se decidió el uso de un marcador mitocondrial, ya que

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

la característica de herencia materna estricta los hace ideales para un análisis intraespecífico (dentro de una misma especie); y al no estar sometidos a una presión evolutiva rigurosa y por lo tanto tienden a ser altamente variables a diferencia de los genomas nucleares (Lanteri, Honey, & Garcia-deras, 2003).

En la red de haplotipos establecida para nuestro análisis, no observamos una diferenciación entre diferentes localidades dentro de Ecuador. Muestra de ello, es el observar haplotipos como H03, H05 y H07, que se forman con secuencias de Esmeraldas (norte), Guayas (centro) y El Oro (sur). Este resultado, nos lleva a pensar que no debemos sobredimensionar el aspecto de diferenciación geográfico que tiene cada una de estas provincias, para establecer una diferenciación poblacional de esta especie de mosquito vector. Un estudio, llevado a cabo en Guatemala, encontró que existen bajos índices de diferenciación genética entre poblaciones de mosquitos de la zona del Pacífico y del Atlántico. Evidenciando que existen casos en los que incluso mayores barreras geográficas, no han constituido un factor de impacto para la divergencia poblacional de esta misma especie en otros países, (De Merida et al., 1999).

Basado en los resultados obtenidos en los análisis poblacionales de *An albimanus*, se evidencia una especie vector en la que el origen geográfico, no tiene correlación con la variabilidad genética de los individuos. Siendo una especie muy homogénea que relativamente se encuentra estable en cuanto a su crecimiento poblacional. Esto puede deberse en parte al amplio rango de distribución de este vector a lo largo de la costa ecuatoriana y una baja presión selectiva, características que influyen de manera directa en que *An albimanus*, sea considerada una de las

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

principales especies vectores de malaria en el país. El conocimiento de las características a nivel poblacional de esta especie, permite a futuro plantear y redefinir estrategias de control con la finalidad de aumentar la probabilidad de éxito en el control y erradicación de malaria en el Ecuador.

Mutaciones del gen VGSC

Es importante poder evaluar mediante el uso de herramientas moleculares y bioinformáticas, los posibles mecanismos de origen de resistencia a insecticidas piretroides. En este caso visualizando mutaciones puntuales de un codón determinado (1014), en un gen de actividad regulatoria de canales iónicos (VGSC) para de esta manera, determinar las mejores estrategias de control de poblaciones vectoriales de enfermedades infecciosas. En este caso, fué evidente la presencia mayoritaria del genotipo L1014 (TTG), que confiere la condición de susceptibilidad hacia insecticidas piretroides tanto en las muestras de Esmeraldas como de El Oro. Una pequeña porción de individuos (13%), mostraron un genotipo heterocigoto, que nos impide identificar si su condición es resistente o susceptible ya que en ciertas posiciones de cada codón, puede expresarse una u otra base nitrogenada cambiando el marco de lectura y la codificación a un aminoácido diferente (Lol et al., 2013). Similares resultados, se han obtenido en estudios realizados en Colombia. Utilizando el mismo análisis del codón 1014 en el gen VGSC, no se encontraron genotipos que confieran resistencia a insecticidas en 3 especies de mosquitos vectores de malaria entre ellos *An albimanus* que incluso previamente sobrevivieron a ensayos de botellas impregnadas con insecticida (Orjuela et al., 2019). Con esta evidencia, es

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

posible asumir que esta no es la única vía de un posible origen de resistencia hacia insecticidas en poblaciones de mosquitos vectores de malaria. Si bien, en América, no se tiene un conocimiento sólido a cerca de los mecanismos de origen de poblaciones de mosquitos vectores de malaria resistentes a insecticidas, recientes investigaciones con herramientas moleculares de mayor resolución, como por el ejemplo el análisis de expresión génica; sugieren que dichos mecanismos de resistencia, son consecuencia de una serie de interacciones en la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo y no únicamente se basa en mutaciones puntuales no sinónimas de un solo gen. En el caso de *An albimanus*, los estudios de expresión génica llevados a cabo con especímenes de Perú y Guatemala, sugieren el origen de resistencia a piretroides, se correlaciona con el aumento en la expresión de varios genes ligados a la actividad metabólica (detoxificación), que pertenecen a la familia Citocromo P450 (CYP 450) (Mackenzie-Impoinvil et al., 2019). Es posible en futuros análisis, evaluar la expresión génica de mosquitos recolectados en Ecuador mediante esta metodología, con la finalidad de evaluar otra posible ruta de resistencia a insecticidas mediante mecanismos de detoxificación que no solo involucra mutaciones puntuales en un codón determinado de un gen, si no que constituyen interacciones de mayor complejidad entre diferentes genes de una misma familia.

Conclusiones

No se observó estructuración genética dentro de las diferentes zonas geográficas donde se colectaron las muestras de *An. albimanus* dentro del país, con base en los índices de genética poblacional (*Fst* y *Gst*).

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

Las hipótesis evolutivas mediante el gen *mtCOI*, mostraron parafilia entre las secuencias con respecto al origen geográfico de las mismas, lo que apoya la hipótesis de ausencia de estructuración genético-poblacional previamente determinada por los índices de diferenciación genética *Fst* y *Gst*.

La red de haplotipos del gen *mtCOI*, mostró una topología consistente con diferenciación entre los extremos norte y sur, sin embargo una distancia/divergencia genética puede estar apoyando un gradiente de distancia geográfica con respecto a las poblaciones/secuencias que requerirá el análisis de poblaciones intermedias en el intervalo geográfico

No existe evidencia de presencia de poblaciones resistentes a piretroides con base al análisis de mutaciones del gen *VGSC* y la presencia de la mutación asociada. En este estudio, se encontró el genotipo susceptible (L1014) TTG y el genotipo heterocigoto TKK. Es importante continuar con el estudio de los mecanismos de resistencia de las poblaciones de vectores en el Ecuador, utilizando un mayor número de muestra, necesario para corroborar o modificar la hipótesis.

Desde un punto de vista epidemiológico, los resultados de este trabajo nos muestran una población homogénea de *An. albimanus* en Ecuador, que inicialmente aparenta susceptibilidad a la aplicación de controles basados en insecticidas piretroides.

Esto conlleva a una idea inicial de que una estrategia de control que sea efectiva en una localidad, puede llegar a tener el mismo o parecido nivel de éxito en cualquier otro lugar, indiferentemente de la ubicación geográfica dentro del país. Sin embargo es necesario sustentar esta hipótesis inicial, con estudios a futuro que sustenten y corroboren este planteamiento.

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

678 Bibliografía

- 679 Arregui, G, Enriquez, S., Benítez-Ortiz, W., & Navarro, J.-C. (2015). Molecular taxonomy of
680 anopheles from Ecuador, using mitochondrial DNA (Cytochrome c Oxidase I) and
681 maximum parsimony optimization | Taxonomía molecular de Anopheles del Ecuador
682 mediante ADN mitocondrial (Citocromo c Oxidasa I) y optimización por parsimoni. *Boletin*
683 *de Malariologia y Salud Ambiental*, LV(2), 132–154. Retrieved from
684 [http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-](http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84962223690&partnerID=MN8TOARS)
685 [84962223690&partnerID=MN8TOARS](http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84962223690&partnerID=MN8TOARS)
- 686 Arregui, Gabriela, Enriquez, S., Benítez-Ortiz, W., & Navarro, J. C. (2015). Taxonomía
687 molecular de Anopheles del Ecuador mediante ADN mitocondrial (Citocromo c Oxidasa I)
688 y optimización por parsimonia Máxima. *Boletin de Malariologia y Salud Ambiental*, 55(2),
689 132–154.
- 690 Avise, J. C., Neigel, J. E., & Arnold, J. (1984). Demographic influences on mitochondrial DNA
691 lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20(2), 99–105.
692 <https://doi.org/10.1007/BF02257369>
- 693 Buckalew, J., Scott, L., James, M., & Reed, P. (1998). *Evaluacion de los Recursos de Agua del*
694 *Ecuador REPORT*.
- 695 Caicedo, R. G., Córdova, M. A. L., Domínguez, D. M. L., & Acosta, L. E. F. (2021). Vigilancia
696 de la resistencia a los insecticidas organosintéticos en *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti*

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

- 697 de Ecuador 2019. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 61(109).
- 698 Caminade, C., Kovats, S., Rocklov, J., Tompkins, A. M., Morse, A. P., Colón-González, F. J., ...
699 Lloyd, S. J. (2014). Impact of climate change on global malaria distribution. *Proceedings of*
700 *the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(9), 3286–3291.
701 <https://doi.org/10.1073/pnas.1302089111>
- 702 Chen, H., Minakawa, N., Beier, J., & Yan, G. (2004). Population genetic structure of *Anopheles*
703 *gambiae* mosquitoes on Lake Victoria islands, west Kenya. *Malaria Journal*, 3, 1–8.
704 <https://doi.org/10.1186/1475-2875-3-48>
- 705 Choi, L., McIntyre, S., & Furnival-Adams, J. (2019). Indoor residual spraying for preventing
706 malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(3).
707 <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013300>
- 708 De Merida, A. M. P., Palmieri, M., Yurrita, M. M., Molina, A., Molina, E., & Black IV, W. C.
709 (1999). Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. *American*
710 *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(2), 230–239.
711 <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.230>
- 712 Dowell, F. E., Noutcha, A. E. M., & Michel, K. (2011). Short report: The effect of preservation
713 methods on predicting mosquito age by near infrared spectroscopy. *American Journal of*
714 *Tropical Medicine and Hygiene*, 85(6), 1093–1096. [https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-](https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0438)
715 0438

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

- 716 Drahansky, M., Paridah, M. ., Moradbak, A., Mohamed, A. ., Owolabi, F. abdulwahab taiwo,
717 Asniza, M., & Abdul Khalid, S. H. . (2016). We are IntechOpen , the world ' s leading
718 publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. *Intech*,
719 *i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- 720 Drummond. J., B. R. (2015). No TitleBayesian Evolutionary Analysis with BEAST. *University of*
721 *Auckland*.
- 722 Duque, P. L., Liria, J., Enríquez, S., Burgaleta, E., Salazar, J., Arrivillaga-Henríquez, J., &
723 Navarro, J. C. (2019). High mosquito diversity in an Amazonian village of Ecuador,
724 surrounded by a Biological Reserve, using a rapid assessment method. *Journal of*
725 *Entomological and Acarological Research*, 51(1). <https://doi.org/10.4081/jear.2019.7775>
- 726 Espinoza, J. L. (2019). Malaria resurgence in the Americas: An underestimated threat.
727 *Pathogens*, 8(1), 1–4. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010011>
- 728 Foran, D. R. (2006). Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: An experimental
729 approach. *Journal of Forensic Sciences*, 51(4), 766–770. [https://doi.org/10.1111/j.1556-](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00176.x)
730 [4029.2006.00176.x](https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00176.x)
- 731 Foster, P. G., Porangaba, T. M., Oliveira, D., Bergo, E. S., Conn, J. E., Ana, C. S., ... Foster, P.
732 G. (2017). Phylogeny of Anophelinae using mitochondrial protein coding genes Subject
733 Category : Subject Areas : Author for correspondence :
- 734 GAD Santa Rosa. (2017). Actualización del plan de desarrollo y ordenamiento territorial del

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

- 735 cantón Santa Rosa 2014-2017, 0(0), 194. Retrieved from <https://bit.ly/3iNwDxw>
- 736 García Martín, D. G., & Nájera-Morrondo, J. A. (1973). Agricultura, malaria y el uso de
737 plaguicidas. *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana*, 74(6), 469–479.
- 738 González, R., Carrejo, N., Wilkerson, R. C., Alarcon, J., Alarcon-Ormasa, J., Ruiz, F., ... Linton,
739 Y. M. (2010). Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera:
740 Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with
741 topotypic material. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(8), 1001–1009.
742 <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800009>
- 743 Gorrochotegui-Escalante, N., Gomez-Machorro, C., Lozano-Fuentes, S., Fernandez-Salas, I.,
744 Munoz, M. D. L., Farfan-Ale, J. A., ... Black IV, W. C. (2002). Breeding structure of *aedes*
745 *aegypti* populations in Mexico varies by region. *American Journal of Tropical Medicine and*
746 *Hygiene*, 66(2), 213–222. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.213>
- 747 Gutiérrez, L. A., Naranjo, N. J., Cienfuegos, A. V., Muskus, C. E., Luckhart, S., Conn, J. E., &
748 Correa, M. M. (2009). Population structure analyses and demographic history of the malaria
749 vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia.
750 *Malaria Journal*, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-259>
- 751 Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. (2017). *Anuario meteorológico № 53-2013*.
752 *Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología*. Retrieved from
753 http://www.serviciometeorologico.gob.ec/docum_institucion/anuarios/meteorologicos/Am

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

- 754 Lanteri, A., Honey, M., & Garcia-deras, G. (2003). 2003 filogeografia.pdf.
- 755 Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA
756 polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
757 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- 758 Loaiza, J. R., Scott, M. E., Bermingham, E., Rovira, J., & Conn, J. E. (2010). Evidence for
759 pleistocene population divergence and expansion of *anopheles albimanus* in southern
760 Central America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(1), 156–164.
761 <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0423>
- 762 Loaiza, J. R., Scott, M. E., Bermingham, E., Sanjur, O. I., Wilkerson, R., Rovira, J., ... Conn, J.
763 E. (2010). Late Pleistocene environmental changes lead to unstable demography and
764 population divergence of *Anopheles albimanus* in the northern Neotropics. *Molecular*
765 *Phylogenetics and Evolution*, 57(3), 1341–1346.
766 <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.09.016>
- 767 Lol, J. C., Castellanos, M. E., Liebman, K. A., Lenhart, A., Pennington, P. M., & Padilla, N. R.
768 (2013). Molecular evidence for historical presence of knock-down resistance in *Anopheles*
769 *albimanus*, a key malaria vector in Latin America. *Parasites & Vectors*, 6, 268.
770 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-268>

771

772

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

- 773 Lunt, D., Zhang, D., Szymura, J., & Hewitt, G. (1996). The insects and COI gene: evolutionary
774 patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*,
775 5(November 1995), 153–165.
- 776 Mackenzie-Impoinvil, L., Weedall, G. D., Lol, J. C., Pinto, J., Vizcaino, L., Dzuris, N., ...
777 Lenhart, A. (2019). Contrasting patterns of gene expression indicate differing pyrethroid
778 resistance mechanisms across the range of the New World malaria vector *Anopheles*
779 *albimanus*. *PLoS ONE*, 14(1), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210586>
- 780 Martin, J. A., Hendershot, A. L., Saá Portilla, I. A., English, D. J., Woodruff, M., Vera-Arias, C.
781 A., ... Lobo, N. F. (2020). Anopheline and human drivers of malaria risk in northern coastal,
782 Ecuador: A pilot study. *Malaria Journal*, 19(1), 1–11. [https://doi.org/10.1186/s12936-020-](https://doi.org/10.1186/s12936-020-03426-y)
783 [03426-y](https://doi.org/10.1186/s12936-020-03426-y)
- 784 MHE. (2019). Insecticide resistance monitoring (document in Spanish). Ministry of Health of
785 Ecuador: January to June., 2. Retrieved from [https://www.salud.gob.ec/wp-](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/07/gaceta_insecticidas_julio2019.pdf)
786 [content/uploads/2019/07/gaceta_insecticidas_julio2019.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/07/gaceta_insecticidas_julio2019.pdf)
- 787 Molina-Cruz, A., De Mérida, A. M. P., Mills, K., Rodríguez, F., Schoua, C., Yurrita, M. M., ...
788 Black IV, W. C. (2004). Gene flow among *Anopheles albimanus* populations in Central
789 America, South America, and the Caribbean assessed by microsatellites and mitochondrial
790 DNA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(3), 350–359.
791 <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.350>

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

- 792 Navarro, J. C., Arrivillaga, J., Morales, D., Ponce, P., & Cevallos, V. (2015). Evaluación rápida
793 de biodiversidad de mosquitos (Diptera: Culicidae) y riesgo en salud ambiental en un área
794 montana del chocó Ecuatoriano. *Entomotropica*, 30(2015), 160–173.
- 795 Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the*
796 *National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12 (I)), 3321–3323.
797 <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- 798 Orjuela, L. I., Álvarez-Díaz, D. A., Morales, J. A., Grisales, N., Ahumada, M. L., Venegas, J. H.,
799 ... Yasnot, M. F. (2019). Absence of knockdown mutations in pyrethroid and DDT resistant
800 populations of the main malaria vectors in Colombia. *Malaria Journal*, 18(1), 1–9.
801 <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3034-1>
- 802 Owak, M. G. E., & Rawford, D. A. J. C. (2002). *N* □, 89(3), 460–465.
- 803 Oxborough, R. M., Mosha, F. W., Matowo, J., Mndeme, R., Feston, E., Hemingway, J., &
804 Rowland, M. (2008). Mosquitoes and bednets: Testing the spatial positioning of insecticide
805 on nets and the rationale behind combination insecticide treatments. *Annals of Tropical*
806 *Medicine and Parasitology*, 102(8), 717–727. <https://doi.org/10.1179/136485908X337553>
- 807 PAHO. (2018). Actualización Epidemiológica. Aumento de malaria en las Américas, 5.
808 <https://doi.org/10.1128/JVI.77.6.3690>
- 809

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

- 810 Pinault, L. L., & Hunter, F. F. (2012). Larval habitat associations with human land uses, roads,
811 rivers, and land cover for *Anopheles albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, and *A.*
812 *punctimacula* (Diptera: Culicidae) in coastal and highland Ecuador. *Frontiers in Physiology*,
813 3 MAR(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00059>
- 814 Post, R. J., Flook, P. K., & Millest, A. L. (1993). Methods for the preservation of insects for
815 DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(1), 85–92.
816 [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90012-G](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90012-G)
- 817 Rogers, A. R. (2004). Lecture Notes on Gene Genealogies Subdivided Populations. *Population*
818 *(English Edition)*.
- 819 Sinka, M. E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., ...
820 Hay, S. I. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas:
821 Occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites and Vectors*, 3(1), 1–26.
822 <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-72>
- 823 Takken, W., & Knols, B. G. J. (2009). Malaria vector control: current and future strategies.
824 *Trends in Parasitology*, 25(3), 101–104. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.12.002>
- 825 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular
826 evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–
827 2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

**ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS
(PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA
EN LA COSTA DE ECUADOR**

- 829 Weeraratne, T. C., Surendran, S. N., Walton, C., & Karunaratne, S. H. P. P. (2018). Genetic
830 diversity and population structure of malaria vector mosquitoes *Anopheles subpictus*,
831 *Anopheles peditaeniatus*, and *Anopheles vagus* in five districts of Sri Lanka. *Malaria*
832 *Journal*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2419-x>
- 833 WHO. (2017). World Malaria Report 2016: Summary. Geneva: World Health Organization; 2017
834 (WHO/HTM/GMP/2017.4). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 4, 186.
- 835 World Health Organization. (2018). WHO | *The World malaria report 2018*. Who. Retrieved
836 from
837 [www.who.int/malaria%0Ahttps://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1)
838 [565653-eng.pdf?ua=1%0Ahttps://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-](https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/)
839 [2018/en/; consulté le 22/03/2019%0Ahttps://www.who.int/malaria/media/world-malaria-rep](https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-rep)
840

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

841 Anexos

842 Anexo 1. Base de datos correspondiente a las muestras utilizadas en este estudio. +++ Representa buena calidad de las secuencias obtenidas a partir del ADN
843 extraído de los mosquitos recolectados; NA= no analizado.

Código	Provincia	Localidad	Fecha de Extracción	AKDR	ND5	COI	COI cover	COI identidad	COI BLAST	Genotipo KDR	Codón
A82	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	+++	93%	96%	MT706456.1	Susceptible	TTG
A92	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	+++	98%	95%	MT706456.1	Susceptible	TTG
A83	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
A84	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	+++	99%	97%	KC354823.1	Susceptible	TTG
A85	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	+++	97%	96%	MT706456.1	Susceptible	TTG
A86	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	+++	98%	96%	KC354823.1	Susceptible	TTG
A87	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	+++	90%	98%	FJ015266.1	Susceptible	TTG
A88	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	+++	91%	98%	FJ015265.1	Susceptible	TTG
A90	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
A91	Esmeraldas	Chamanga	20/03/2019	+++	-	+++	98%	95%	MT706456.1	Susceptible	TTG
5E1H4-005	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E1H4-006	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	++	100%	100%	FJ015269.1	NA	NA
5E1H4-007	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E1H4-002	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E1H4-008	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E1H4-010	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E1C4-014	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E1C5-015	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
5E1C14-018	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E1C22-019	Esmeraldas	Las Golondrinas	07/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E5C9-991	Esmeraldas	Limones	07/04/2021	-	-	+++	90%	96%	MT706456.1	NA	NA
5E5C9-992	Esmeraldas	Limones	07/04/2021	+++	-	+++	96%	99%	JN412826.1	Susceptible	TTG

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

5E5C9-993	Esmeraldas	Limonas	07/04/2021	+++	-	+	NA	NA		Susceptible	TTG
5E5C9-994	Esmeraldas	Limonas	07/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
5E5C9-995	Esmeraldas	Limonas	07/04/2021	+++	-	+++	92%	97%	FJ015237.1	NA	NA
5E5C9-996	Esmeraldas	Limonas	07/04/2021	+++	-	+++	99%	97%	AF417695.1	Susceptible	TTG
5E5C9-997	Esmeraldas	Limonas	07/04/2021	-	-	+++	97%	99%	JN412826.1	NA	NA
5E5C9-998	Esmeraldas	Limonas	07/04/2021	-	-	+++	97%	99%	JN412826.1	NA	NA
5E5C9-999	Esmeraldas	Limonas	07/04/2021	-	-	+	NA	NA		NA	NA
5E5H10-801	Esmeraldas	Limonas	07/04/2021	++	-	+++	100%	98%	MT706456.1	Susceptible	TTG
5E4C23-092	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	99%	97%	MT048398.1	Susceptible	TTG
5E4C22-034	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	100%	97%	MT706456.1	Susceptible	TTG
5E4C22-031	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	94%	99%	JN412826.1	Susceptible	TTG
5E4C23-087	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	91%	93%	FJ015255.1	Susceptible	TTG
5E4C23-089	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	87%	97%	FJ015261.1	Susceptible	TTG
5E4C23-091	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	85%	97%	FJ015237.1	Susceptible	TTG
5E4C23-028	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	90%	98%	FJ015265.1	Susceptible	TTG
5E4C23-083	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	-	-	+++	99%	98%	MT706456.1	NA	NA
5E4C23-037	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	99%	95%	MT706456.1	Susceptible	TTG
5E4C23-090	Esmeraldas	Muisne	20/04/2021	+++	-	+++	90%	97%	FJ015261.1	Susceptible	TTG
5E2R3-270	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Heterocigoto	TKK
5E2R3-280	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	+++	-	+	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
5E2R3-271	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Heterocigoto	TYG
5E2R3-272	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
5E2R3-273	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	Heterocigoto	TKK
5E2R3-275	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E2R3-276	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
5E2R3-277	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
5E2R3-278	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
5E2R3-279	Esmeraldas	Unión de Atacames	30/04/2021	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

ABN0147	El Oro	Aguas Blancas	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0170	El Oro	Aguas Blancas	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0166	El Oro	Aguas Blancas	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0451	El Oro	Barbones	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0174	El Oro	Barbones	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0473	El Oro	Barbones	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0444	El Oro	Barbones	13/04/2021	+++	-	+	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0478	El Oro	Barbones	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0171	El Oro	Barbones	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ABN0172	El Oro	Barbones	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
HR441	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	90%	98%	FJ015265.1	Susceptible	TTG
HR4316	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	76%	96%	MT706456.1	Susceptible	TTG
HR5114	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	99%	96%	KC354823.1	Heterocigoto	TYG
HR4409	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	-	-	+++	93%	99%	FJ015237.1	NA	NA
HR5109	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	98%	95%	MT706456.1	Susceptible	TTG
HR5101	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	99%	95%	KC354823.1	Susceptible	TTG
HR5103	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	98%	95%	MT706456.1	Susceptible	TTG
HR4214	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	100%	97%	MT706456.1	Susceptible	TTG
HR4405	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	90%	94%	MT706456.1	Susceptible	TTG
HR4315	El Oro	Huaquillas	11/11/2019	+++	-	+++	99%	96%	MT706456.1	Susceptible	TTG
PR11207	El Oro	La Victoria	11/11/2019	+++	-	+++	99%	96%	MT706456.1	Susceptible	TTG
PR11104	El Oro	La Victoria	11/11/2019	+	-	+++	87%	98%	FJ015255.1	Susceptible	TTG
PR10316	El Oro	La Victoria	11/11/2019	+++	-	+++	99%	97%	KC354823.1	Susceptible	TTG
PR11309	El Oro	La Victoria	11/11/2019	+	-	+++	94%	98%	FJ015255.1	Susceptible	TTG
PR1041	El Oro	La Victoria	11/11/2019	+++	-	+++	97%	95%	MT706456.1	Susceptible	TTG
PR11312	El Oro	La Victoria	11/11/2019	-	-	+++	98%	96%	MT706456.1	NA	NA
PR11401	El Oro	La Victoria	11/11/2019	-	-	+++	99%	96%	MT706456.1	Heterocigoto	TKY
PR11411	El Oro	La Victoria	11/11/2019	-	-	+++	97%	96%	MT706456.1	Susceptible	TTG

ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y RESISTENCIA A INSECTICIDAS (PIRETROIDES) DE *Anopheles (Nys.) albimanus* Weidemann, VECTOR DE MALARIA EN LA COSTA DE ECUADOR

PR11410	El Oro	La Victoria	11/11/2019	+++	-	+++	86%	94%	FJ015261.1	Susceptible	TTG
PR11407	El Oro	La Victoria	11/11/2019	+++	-	+++	91%	97%	FJ015237.1	Susceptible	TTG
ALA0692	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+++	-	+++	99%	97%	MT048398.1	Susceptible	TTG
ALA0693	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+++	-	+++	100%	96%	KC354823.1	Heterocigoto	TKK
ALA0688	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+++	-	+	NA	NA	NA	Heterocigoto	TKK
ALA0689	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Susceptible	TTG
ALA0690	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+	-	+	99%	99%	KU900808.1	Susceptible	TTG
ALA0694	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+++	-	+++	97%	99%	JN412826.1	Susceptible	TTG
ALA0695	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+++	-	++	99%	100%	KU900793.1	Susceptible	TTG
ALA0696	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Heterocigoto	TKK
ALA0697	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	+++	-	-	NA	NA	NA	Heterocigoto	TKK
ALA0691	El Oro	Los Ángeles	13/04/2021	-	-	++	96%	99%	JN412826.1	NA	NA