

Variabilidad genética de *Anopheles punctimacula* s.l. en dos localidades de la zona endémica para la malaria: El Bajo Cauca y Alto Sinú

Genetic variability of *Anopheles punctimacula* s.l. at two locations in the endemic area for malaria: Bajo Cauca and Alto Sinú

Paula A. Urrea.¶*, Margarita M. Correa.*†, Nelson Naranjo-Díaz*§

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Anopheles punctimacula s.l. es un vector de la malaria de importancia local en Colombia. A pesar de su importancia epidemiológica, se conoce poco sobre su variabilidad genética en las áreas endémicas para la malaria donde se encuentra presente. Entre estas, las regiones de El Bajo Cauca y Alto Sinú son las que reportan el mayor número de casos anuales de malaria en el país. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la variabilidad genética de *An. punctimacula* s.l. en dos localidades de cada región, Nechí y Montería. El conocimiento obtenido permitirá orientar el diseño de medidas de control vectorial dirigidas y efectivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir del ADN de 20 hembras de *Anopheles punctimacula* s.l., se amplificaron los fragmentos del gen mitocondrial *COI* y el nuclear *CPS-CAD*. Se estimaron parámetros de diversidad nucleotídica, diversidad haplotípica, estructura genética y flujo de genes para las poblaciones.

RESULTADOS

Se obtuvieron 18 secuencias de cada marcador; de un tamaño de 719 pb para el gen *CPS-CAD* y de 1.158 pb para *COI*. En las secuencias *CPS-CAD* se detectaron cuatro sitios polimórficos y en las de *COI*, seis. Los análisis de estructura genética para *CPS-CAD* ($F_{ST}= 0,00054$) y *COI* ($F_{ST}= 0,00049$), indicaron ausencia de diferenciación genética y los valores de Nm (*CPS-CAD*= 7.78562; *COI*= 780.5199), evidencian un alto flujo de genes entre las poblaciones de *An. punctimacula* s.l. de ambos municipios.

CONCLUSIONES

Dada la baja estructuración detectada y el alto flujo de genes entre las poblaciones de *An. punctimacula* s.l. de Nechí y Montería sugieren que ellas son genéticamente similares.

PALABRAS CLAVE

Anopheles punctimacula, *CPS-CAD*, *COI*, Malaria, Variabilidad genética.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Anopheles punctimacula s.l. is a locally important malaria vector in Colombia. Despite its epidemiological importance, little is known about its genetic variability in the malaria endemic areas where it is present. Among these,

El Bajo Cauca - Alto Sinú regions report the highest number of malaria cases in the country. Therefore, the aim of this work was to evaluate genetic variability of *An. punctimacula* s.l. in two localities of each region, Nechí and Montería. This information will guide the design of targeted and effective vector control measures.

¶ Estudiante de Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia. * Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. † Ph.D. énfasis en Microbiología, Coordinadora del Grupo de Microbiología Molecular. § Candidato a Doctorado en el Posgrado de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Contacto: margaritacorrae@gmail.com Recepción: 5-12-2015. Aceptación: 10-28-2015.

MATERIALS AND METHODS

Starting with the DNA of 20 *An. punctimacula* s.l., females, fragments of the mitochondrial gene *COI* and nuclear *CPS-CAD* were amplified. Nucleotide diversity, haplotype diversity, genetic structure and gene flow parameters were estimated for the populations.

RESULTS

Eighteen nucleotide sequences were obtained for each marker with a size of 719 bp for *CPS-CAD* and 1,158 bp for *COI*. In the *CPS-CAD* sequences four polymorphic sites were detected and in *COI*, six. The genetic structure analyses for *CPS-CAD* ($F_{ST} = 0.00054$) and *COI* ($F_{ST} = 0.00049$) indicated lack of genetic differentiation and the Nm values (*CPS-CAD*= 7,78562; *COI*= 780,5199), evidenced high gene flow between the *An. punctimacula* s.l. populations of both municipalities.

CONCLUSIONS

Because of the low population structure detected and the high gene flow between the *An. Punctimacula* s.l. populations from Nechí and Montería suggest that they are genetically similar.

KEY WORDS

Anopheles punctimacula, *CPS-CAD*, *COI*, Malaria, Genetic variability.

INTRODUCCIÓN

La malaria continua siendo un grave problema de salud pública en el mundo; es producida por parásitos del género *Plasmodium* spp., de los cuales, cinco especies causan la enfermedad en humanos, *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, son transmitidos por mosquitos hembras del género *Anopheles*.¹ Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2013, en el mundo, se registraron 198 millones de casos de la malaria y 584.000 muertes.² En Colombia, esta enfermedad tiene un alto impacto epidemiológico debido a que casi el 85% del territorio rural está situado por debajo de los 1.600 metros sobre el nivel del mar, presentando las condiciones climáticas y ambientales adecuadas para la transmisión.³ Aunque la mortalidad por la malaria ha disminuido, el número de casos se mantiene relativamente estable. En los años 2013 y 2014 se reportaron 59.222 y 38.233 casos de

malaria, respectivamente;^{4,5} sin embargo, se considera que existe un importante subregistro de los casos.⁶ Entre las áreas endémicas para la malaria de Colombia, la región Urabá, Bajo Cauca y Alto Sinú, que comprenden los Departamentos de Antioquia y Córdoba, es la que reporta el mayor número de casos del país.⁷ En el año 2014, se notificaron para esta región 10.584 casos de los 38.464 registrados para el país.⁸

En Colombia existen alrededor de 47 especies de *Anopheles*,⁹⁻¹⁰ distribuidas en cinco subgéneros; no obstante, solo tres especies son reconocidas como vectores principales: *Anopheles (Nys.) sorhynchus* albimanus Wiedemann, *Anopheles (Nys.) darlingi* Root y *Anopheles (Nys.) nuneztovari* Gabaldón, y seis vectores de importancia local, entre ellos, *Anopheles (Ano.) punctimacula* Dyar & Knab.^{7,1} Recientemente, *Anopheles (Ano.) calderoni* Wilkerson y *Anopheles (Nys.) triannulatus* Neiva & Pinto fueron detectados infectados naturalmente con *Plasmodium* spp., pero aún se desconoce su importancia epidemiológica en nuestro país.^{10,12,13} Se conoce que no todas las especies de *Anopheles* tienen la misma capacidad para transmitir el parásito.¹⁴ La OMS señala la importancia de la planificación y ejecución de medidas preventivas selectivas en la lucha anti-vectorial, para el control eficaz y la prevención de la transmisión de la malaria;¹⁶ para ello, es necesaria la identificación precisa de las especies involucradas en la transmisión.¹⁷ Se considera que en Colombia el control efectivo de vectores puede estar limitado debido a la poca información que existe sobre algunas especies de *Anopheles*.¹⁸ Este sería el caso de especies como *An. punctimacula*, perteneciente al subgénero *Anopheles*, considerada vector secundario en Colombia y otros países del neotrópico.^{19,20}

La serie Arribalzaga del subgénero *Anopheles* comprende 24 especies;²¹ a ella pertenece el Grupo informal Punctimacula, constituido por cuatro especies morfológicamente similares en el estadio adulto pero que pueden tener diferencias en comportamiento y transmisión:²² *An. punctimacula*, *An. calderoni*, *Anopheles (Ano.) malefactor* Dyar & Knab y *Anopheles (Ano.) guarao* Anduze & Capdevielle. Inicialmente, *An. punctimacula* s.l. y *An. malefactor* eran consideradas sinonimias, sin embargo, el análisis morfológico de estadios larvales y adultos, permitió asignarles estatus de especies separadas.²² Posteriormente en Perú, fue descrita la especie *An. calderoni*, previamente reportada como *An. punctimacula*.²¹ Y en Colombia y Ecuador, se reporta *An. calderoni* en especímenes de colección que habían sido identificados como *An. punctimacula*.²³ En Pana-

má, un país limítrofe con Colombia, se ha demostrado que *An. punctimacula* s.l. constituye un complejo de especies que comprende por lo menos dos linajes moleculares geográficamente aislados, designados A y B.²⁴ En Colombia, un estudio reciente evaluó las relaciones filogenéticas de siete especies de la Serie Arribalzagia y confirmó molecularmente la presencia *An. punctimacula* s.s. en el noreste del país y la región Caribe; estos especímenes correspondieron al linaje A hallado en Panamá.²⁵ A pesar de estos hallazgos, aún hay poca información sobre la bionomía y el papel en la transmisión de las especies de este grupo.

El conocimiento de la variabilidad genética intra-específica de los vectores es un aspecto que contribuye al diseño de estrategias de control vectorial dirigidas y efectivas, puesto que permite detectar cambios en la dinámica de las poblaciones que pueden afectar aspectos como la adaptación ambiental, la capacidad vectorial y la resistencia a insecticidas.^{26, 27} En este tipo de estudios se utilizan marcadores moleculares polimórficos de origen nuclear y mitocondrial que detectan variaciones genéticas y la existencia de divergencia entre los individuos,²⁸ permitiendo realizar estudios poblacionales y de relaciones filogenéticas entre especies de *Anopheles*.^{14, 29} Una región del ADN mitocondrial que codifica la subunidad I del gen citocromo oxidasa C (*COI*), ha demostrado ser de utilidad para análisis genéticos poblacionales porque presenta una alta tasa de mutación, altos índices de variabilidad intra-específica y ausencia de recombinación.³⁰ En Colombia, *COI* ha sido utilizado en estudios de variabilidad genética en poblaciones de vectores primarios en Antioquia y Córdoba, como son *An. darlingi* y *An. nuneztovari* donde hubo una baja diferenciación genética entre las poblaciones.^{31,32} Adicionalmente, se utilizó para evaluar la estructura poblacional de *An. triannulatus*, demostrando la existencia de dos linajes mitocondriales denominados grupo I y II, que tienen relación con su distribución al noreste y sureste del país.³³

Además de *COI*, para el estudio de la diversidad genética de *An. punctimacula* s.l. se exploró la utilización de una región nuclear de copia única, presente en el cromosoma X, la cual codifica tres enzimas implicadas en la biosíntesis de pirimidinas, carbamoil fosfato sintetasa (*CPS*), aspartato transcarbamilasa (*ATC*) y dihidroratas (*DHO*), y es denominada *CAD*. De esta, la región *CPS* ha sido utilizada para la reconstrucción filogenética de dípteros³⁴ y para esclarecer subgéneros y especies dentro de la familia Sarcophagidae.³⁵

Dado a la similitud morfológica con otras espe-

cies del Grupo Puctimacula y al poco conocimiento de la variabilidad genética inter e intrapoblacional de *An. punctimacula* s.l., este estudio tuvo como objetivo evaluar la variabilidad genética de este vector en dos localidades en la zona endémica para la malaria, el Bajo Cauca y Alto Sinú, utilizando fragmentos del gen *COI* y *CPS-CAD*.

MATERIALES Y MÉTODOS

COLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y EXTRACCIÓN DE ADN

Los mosquitos *Anopheles* utilizados en este trabajo fueron recolectados durante el mes de Junio y Octubre del 2013, en el municipio de Montería, Departamento de Córdoba y el municipio de Nechí, Departamento de Antioquia, en la región endémica para la malaria El Bajo Cauca y Alto Sinú. El Instituto Nacional de Salud a través del sistema de vigilancia rutinaria municipal, en el 2014 reportó 33 casos de la malaria en Montería y 218 casos en Nechí.³⁶ Los especímenes se recolectaron usando cebo humano, bajo consentimiento informado y un protocolo, aprobados por el Comité de Bioética de la Sede de Investigación Universitaria-SIU; la búsqueda se realizó en el peridomicilio hasta aproximadamente 10 metros de cada casa, entre las 18:00 y 24:00 horas. Los mosquitos fueron identificados por caracteres morfológicos siguiendo la clave taxonómica dicotómica de Gonzales & Carrejo.⁹ Se seleccionaron aleatoriamente 10 especímenes *An. punctimacula* s.l. de cada localidad y cada uno fue examinado morfológicamente utilizando la descripción de *An. punctimacula* s.l.²² Se extrajo el ADN a partir de los abdómenes de cada mosquito.³⁷ Los especímenes *An. punctimacula* s.l. fueron confirmados molecularmente utilizando una PCR-RFLP-ITS2.^{38,39,40}

ANÁLISIS IN SÍLICO

Se utilizaron secuencias del gen *CAD* de *Anopheles (Cellia) gambiae* Patton de 6.844 pb⁴¹ y secuencias de la región *CPS* del gen *CAD* de *An. gambiae* de 4.092 pb,⁴² disponibles en GenBank (XM_310823.5 y KC1771121.1), con el fin de determinar la posición de hibridación de los oligonucleótidos degenerados F581-R1098 y F806-R843⁴³ Tabla 1 y el tamaño de amplificación del fragmento del gen *CPS-CAD*. Las secuencias obtenidas en GenBank fueron alineadas

con los dos set de oligonucleótidos degenerados, utilizando el algoritmo MUSCLE⁴⁴ en el programa Geneious 6.0.6.⁴⁵

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *CPS-CAD*.

Inicialmente, se utilizaron dos set de oligonucleótidos degenerados dirigidos a la región *CPS* del gen *CAD* F581-R1098 y F806-R843 **Tabla 1**. Se utilizaron condiciones previamente descritas,³⁴ y la reacción se optimizó a las condiciones del laboratorio utilizando ADN genómico de especies de la serie Arribalzagia presentes en Colombia que fueron confirmadas molecularmente por PCR-RFLP-ITS2,^{38,39,40} *An. punctimacula*, *An. calderoni*, *An. malefactor* y *An. neomaculipalpus*. En la primera reacción de la PCR anidada con los oligonucleótidos F581 y R1098, se amplificó un fragmento de 1.600 pb y en la segunda PCR, se realizaron dos reacciones con los oligonucleótidos F581-R843, y F806-1098, respectivamente, se amplificaron los fragmentos de 1.040 pb y 665 pb. Estos productos fueron secuenciados y utilizados para diseño de oligonucleótidos específi-

cos dirigidos a un fragmento del gen *CPS-CAD*. Las secuencias fueron editadas en el programa Geneious 6.0.6. Se realizó un análisis BLAST⁴⁶ para conocer el porcentaje de identidad genética con la región *CPS* del gen *CAD* de *Anopheles* spp. Las secuencias se alinearon con la secuencia de la región *CPS* de *An. gambiae*⁴² y con el gen *CAD* completo de *An. gambiae*⁴¹ obtenidas en GenBank utilizando el algoritmo MUSCLE en el programa Geneious 6.0.6. Finalmente, con la secuencia consenso, se realizó el diseño de los oligonucleótidos CADF y CADR **Tabla 1**, utilizando el programa Primer3 0.4.0.⁴⁷ Se evaluó la predicción de formación de estructuras secundarias, autodimerización y heterodimerización de los oligonucleótidos, también se calculó el ΔG de estabilidad interna de cada oligonucleótido a través de OligoAnalyzer 3.1.⁴⁸ Los oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente mediante el método de fosfitotriéster en fase sólida por la compañía Bioneer.

Para la optimización de la PCR específica para la región *CPS* del gen *CAD*, se realizaron varios ensayos para determinar las concentraciones óptimas de cada

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *CPS-CAD* y *COI*

Gen	Oligonucleótido	Posición ^a (pb)	Secuencia	Tamaño (pb)	%GC
<i>CPS-CAD</i>	**F581	1.633	5'GAN ACT GAR GAY MCR AAA ATM TTY GC 3'	26	40,4
	**R1098	3.168	5'TTN GGN AGY TGN CCN CCC AT3'	20	57,5
	**F806	2.314	5'GTN GTN AAR ATG CCN MGN TGG GA3'	23	52,2
	**R843	2.440	5'GCY TTY TGR AAN GCY TCY TCR AA3'	23	45,7
	*CADF	1.474	5'GAGTAYGTCCGAGCARGTGATMAAG3'	24	47,9
	*CADR	2.313	5'CAGTAGGTCKAGGCTSGGCTCRAAG3'	25	60
<i>COI</i>	**UEA3F	1.688	5'TATAGCATTCCCACGAATAAATAA3'	24	29,2
	**UEA10R	2.985	5'TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA3'	25	36

^a Posición: hibridación relativa de oligonucleótido en su extremo 5' para la secuencia de *CAD* de *Anopheles gambiae*⁴³ y el gen mitocondrial de *Anopheles darlingi*⁵². *Oligonucleótidos diseñados en este estudio. ** Oligonucleótidos reportados en la literatura.^{36,51}

componente. Los oligonucleótidos CADF y CADR se utilizaron a diferentes concentraciones, de 0,2 μM , 0,1 μM y 0,15 μM . Adicionalmente, se probaron gradientes de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos, 54,8°C, 56,4°C, 58,0°C y 59,7°C, y dos concentraciones de MgCl_2 , de 1,5 mM y 2 mM. La reacción final se realizó con ADN de *An. punctimacula*, *An. calderoni*, *An. malefactor* y *An. neomaculipalpus*, una mezcla de oligonucleótidos CADF y CADR de 0,15 μM , 20 ng/ μl ADN, 1 U/reacción DNA polimerasa termoestable (*Taq* polimerasa Boline), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, 2 mM MgCl_2 , 1 X de buffer y agua para PCR. Se utilizaron las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, un alineamiento de 59,7°C por 20 segundos, elongación de 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 8 minutos. Los productos amplificados fueron confirmados por secuenciación.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN *COI*

Para la amplificación del marcador mitocondrial *COI* se utilizó ADN genómico de *An. punctimacula* s.l. y se siguió un protocolo optimizado en el laboratorio de Microbiología Molecular.^{31,33} Se utilizaron los oligonucleótidos UEA3F y UEA10R⁴⁹ que amplifican un fragmento de aproximadamente 1.250 pb.

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS *CPS-CAD* Y *COI* DE *AN. PUNCTIMACULA* S.L.

Se seleccionaron aleatoriamente 10 especímenes de *An. punctimacula* s.l. de cada municipio y se amplificó un fragmento del gen *CPS-CAD* y de *COI*, bajo las condiciones descritas anteriormente. Los productos fueron enviados a secuenciar. Las secuencias fueron editadas en el programa Geneious 6.0.6. Se realizó un análisis BLAST de cada secuencia para comprobar el porcentaje de la identidad genética de cada marcador. Luego se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo MUSCLE disponible en el software Geneious 6.0.6, y finalmente se determinó la similitud y la posición de las secuencias en relación al gen nuclear *CPS-CAD* de *An. gambiae* y el gen mitocondrial *COI* de *An. darlingi*.⁵⁰ Se realizó una caracterización molecular para determinar la presencia de transiciones, transversiones, porcentaje de cada uno de los nucleótidos y la identificación de secuencias aminoácidas detectando cambios sinónimos y no sinónimos en cada secuencia.

ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Para calcular el número de haplotipos, la frecuencia haplotípica y el número de sitios polimórficos (S) de *An. punctimacula* s.l. de las dos localidades, se utilizó el software DnaSP versión 5.10.1⁵¹ y Arlequin versión 3.5.1.2.⁵² También se determinaron parámetros de diversidad genética, como la diversidad haplotípica (DH) y diversidad nucleotídica (π). Se determinó valor estadístico F_{ST} ⁵³ que mide el nivel de la diferenciación genética entre las poblaciones, y el N_m que corresponde al número efectivo de migrantes por generación. Finalmente se construyó una red haplotípica para determinar la distribución de los haplotipos en las dos localidades, con el programa TCS 1.21.⁵⁴

RESULTADOS

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN *CPS-CAD* Y *COI* EN ESPECÍMENES DE LA SERIE ARRIBALZAGIA.

Los oligonucleótidos diseñados, específicos CADF y CADR *Tabla 1* amplifican una región de 839 pb del gen *CPS-CAD* de *An. punctimacula*, *An. calderoni*, *An. malefactor* y *An. neomaculipalpus*, e hibridan en la posición 1.474 pb y 2.313 de la región CPS del gen *CAD* de *An. gambiae*. Se amplificaron las regiones *CPS-CAD* (839 pb) y de *COI* (1.250 pb) de 20 *An. punctimacula* s.l. *Figuras 1 y 2*.

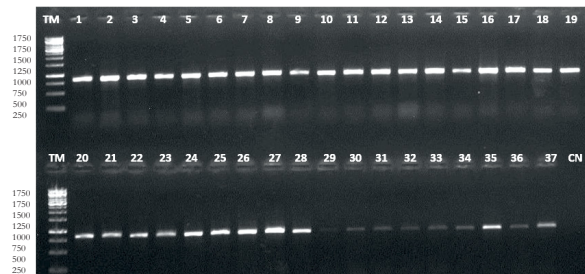


Figura 1. Productos de amplificación PCR *CPS-CAD*. Gel de agarosa al 1%. Carriles: TM: Marcador de tamaño molecular de 250-10000 pb. CN: control negativo. 1-37: producto de amplificación de 839 pb a partir de especímenes *An. punctimacula* s.l.

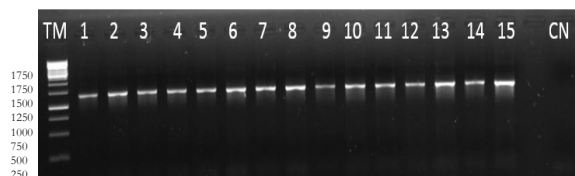


Figura 2. Productos de amplificación PCR-*COI*. Gel de agarosa al 1%. Carriles: TM: Marcador de peso molecular de 250-10000 pb. CN: control negativo. 1-15: producto de PCR de 1.250pb a partir de ADN de *An. punctimacula* s.l.

En el análisis BLAST se determinó que el porcentaje de identidad genética de la secuencia del gen *CPS-CAD* fue de 84% con *Anopheles (Ano.) atroparvus* Van Thiel y para *COI* de 99% con *An. punctimacula*. Para *CPS-CAD* la composición nucleotídica de la secuencia editada de 719 pb tuvo un mayor porcentaje de guanina, 30,1% y citosina, 26,1%, comparado con adenina, 21 % y timina, 22,7%. Estos resultados son congruentes con la composición nucleotídica de la región *CPS* de *An. gambiae* la cual tiene un mayor porcentaje de guanina, 35,6% y citosina, 29,4% y un porcentaje menor de timina, 16,7%. Se obtuvo 239 aminoácidos de los 1.364 codificados en la región *CPS-CAD* de *An. gambiae*, de los cuales 222 son idénticos a los aminoácidos en esta región de *An. gambiae*. El marco de lectura empieza en la 3 pb hasta la 719 pb (Tabla 2).

Las secuencias de *COI* tuvieron un mayor porcentaje de adenina, 29,8% y guanina, 37,7%, que de citosina, 16,9% y guanina, 15,5%. Dicha composición nucleotídica fue idéntica a la de *COI* de *An. punctimacula* del norte de Colombia (GenBank acceso: KC354818.1).⁵⁵ En *COI* se detectaron 385 aminoácidos de los 502 codificados por el gen *COI* de *An. punctimacula* del norte de Colombia; el marco de lectura empieza en la 2 pb hasta la 1.156 pb (Tabla 2).

SITOS POLIMÓRFICOS

De los 20 especímenes *An. punctimacula* s.l. se obtuvieron 19 secuencias *CPS-CAD* de 719 pb con calidad suficiente para realizar los análisis. Todas las secuencias se tradujeron a aminoácidos y no se detectaron condones de parada que indican cambios en el marco de lectura y la presencia de posibles pseudogenes. En el alineamiento múltiple se observaron 715 sitios con-

servados y 4 sitios variables (Tabla 3). En los que se encontraron siete sustituciones no sinónimas; una en la posición 95 pb y 656 pb, ambas con una transversión (T por G) cambiando el aminoácido valina por glicina, y cinco, en la posición 658 con una transición (C por T) introduciendo un cambio del aminoácido serina por fenilalanina; siendo esta la posición más polimórfica con una frecuencia de 0,13. Por otro lado, en la posición 6 pb hubo una sustitución sinónima, con una transición (C por T). Los fragmentos analizados inician en la posición 1.430 y terminan en la posición 2.148 de la región *CPS* del gen *CAD* de *An. gambiae*.

En el alineamiento múltiple de *COI* se observaron 1.152 sitios conservados y 6 sitios variables (Tabla 3); se hallaron 11 sustituciones sinónimas de tipo transicional con una frecuencia de 0,58 y ausencia de transversiones. La posición 37 pb del fragmento del gen *COI* revela un alto polimorfismo con una frecuencia de 0,21, seguida de la posición 823 pb y 832 pb, ambas con una frecuencia de 0,10. El inicio de los fragmentos analizados corresponde a la posición 318 del gen mitocondrial *COI* de *An. punctimacula* y el nucleótido final se sitúa en la posición 1.475 del mismo gen.⁵⁵

DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA HAPLOTÍPICA

Con el marcador nuclear *CPS-CAD* se hallaron 5 haplotipos. El haplotipo H1 fue el más común en Montería y Nechí, con una frecuencia de 0,78 mientras que los haplotipos H2, H3, H4 y H5 solo se hallaron en el municipio de Nechí. La red de haplotipos construida, relaciona entre sí las secuencias mediante cambios de nucleótidos, se observa que el H2, H3 y H5 están separados del H1 solo por una sustitución nucleotídica. En el caso del haplotipo H2 la sustitución fue una transversión (G por T) cambió el aminoácido valina por

Tabla 2. Composición nucleotídica y aminoacídica de los fragmento de *CPS-CAD* y *COI*

Gen	Municipio	Longitud ^a (pb)	Sitios idénticos ^b	% A ^c	% T ^c	% C ^c	% G ^c	% G-C ^c	Número de aminoácidos ^d	Marco de lectura ^e
<i>COI</i>	Montería Nechí	1.158	1.152	29,8	37,7	16,9	15,5	32,5	385	2-1.156pb
<i>CPS-CAD</i>	Montería Nechí	719	715	21,1	22,7	26,1	30,1	56,2	239	3-719pb

^a Longitud en pares de base de cada fragmento del secuenciado. ^b Número de nucleótidos idénticos en los fragmentos secuenciados. ^c Porcentaje de nucleótidos de cada fragmento. A: adenina, T: timina, G: guanina, C: citosina. ^d Número de aminoácidos que codifica el fragmento del gen secuenciado. ^e Nucleótido donde inicia y finaliza la codificación de los aminoácidos.

glicina; en los haplotipos H3 y H5 la sustitución fue una transición (C por T), ocasionando un cambio del aminoácido fenilalanina por serina y el haplotipo H4 se separa del H1 por dos sustituciones que provocan un cambio no sinónimo en la secuencia aminoacídica; la sustitución fue una transversión (T por G), cambió el aminoácido valina por glicina y una transición (C por T), con cambio de fenilalanina por serina **Figura 3**.

Con el marcador mitocondrial *COI* se hallaron 7 haplotipos. El haplotipo H2 presentó una frecuencia de 0,58 siendo el más común en Montería y Nechí. Los haplotipos H1, H5, H6 y H7 solo se encontraron en Nechí. La red de haplotipos muestra que el H1 y el H5 están separados del H2 por dos sustituciones nucleotídicas transicionales sinónimas por lo que no se hallan cambios en los aminoácidos codificados **Figura 4**.

DIVERSIDAD GENÉTICA

Se determinó la variabilidad genética intra e inter poblacional en 19 especímenes de *An. punctimacula* s.l. con los marcadores moleculares *CPS-CAD* y *COI*, respectivamente. Los análisis de estructura genética con el gen *CPS-CAD* $F_{ST} = 0,00054$ y *COI* $F_{ST} = 0,00049$ indican la ausencia de diferenciación genética entre las poblaciones y la tasa efectiva de migración de *CPS-CAD* $Nm = 7.758$ y de *COI* $Nm = 780,52$ evidencian un alto flujo de genes entre los especímenes *An. punctimacula* s.l. de am-

bos municipios; la tasa de migración es suficiente para demostrar que ambas poblaciones son genéticamente similares **Tabla 4**.

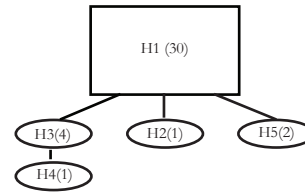


Figura 3. Red haplotípica basada en secuencias *CPS-CAD* de los especímenes de *An. punctimacula* s.l. de los municipios Montería y Nechí, Colombia. El rectángulo corresponde al haplotipo más frecuente. Los demás haplotipos se muestran en óvalos y su tamaño es proporcional al número de individuos que presentan el haplotipo el cual está indicado entre paréntesis.

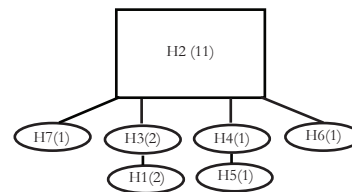


Figura 4. Red haplotípica basada en secuencias *COI* de los especímenes de *An. punctimacula* s.l. de los municipios Montería y Nechí, Colombia. El rectángulo corresponde al haplotipo más frecuente. Los demás haplotipos se muestran en óvalos y su tamaño es proporcional al número de individuos que presentan el haplotipo el cual está indicado entre paréntesis.

Tabla 3. Sitios polimórficos de los haplotipos de las secuencias de *CPS-CAD* y *COI* de *An. punctimacula* s.l. de Montería y Nechí, Colombia

CPS-CAD		COI	
Haplotipos	posición de sitios polimórficos	Haplotipos	posición de sitios polimórficos
	0 0 6 6 0 9 5 5 6 5 6 8		0 0 0 0 0 0 0 3 6 8 8 6 3 5 9 2 3 8 7 6 7 3 2 6
H1	C T T C	H1	A T A G A T
H2	- G - -	H2	G - - A - -
H3	- T - T	H3	A - - - - -
H4	- - G T	H4	G - - - G -
H5	T - T C	H5	- - G - G -
		H6	- - A - A C
		H7	- C - - - T

Tabla 4. Parámetros de diversidad genética de *An. punctimacula* s.l. con el marcador *CPS-CAD* y *COI* de Nechí y Montería, Colombia.

Gen	Municipio	S	NH	DH	π	F_{st}	Nm
<i>CPS-CAD</i>	Montería	0	1	NA	NA	0,00054	7.758
	Nechí	4	5	0,660	0,00119		
<i>COI</i>	Montería	3	4	0,6444	0,00088	0,00049	780,52
	Nechí	5	5	0,7222	0,00096		

S: número de sitios polimórficos, NH: número de haplotipos para cada localidad, DH: diversidad haplotípica, π : diversidad nucleotídica, F_{st} : Índice de diversidad genética, Nm: Tasa efectiva de migración. NA: no aplica.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la variabilidad genética intra e inter poblacional de *An. punctimacula* s.l., en dos localidades Montería y Nechí de una importante zona endémica para la malaria como es el Bajo Cauca y Alto Sinú. Para ello, fue importante primero diseñar oligonucleótidos específicos para lograr la amplificación un fragmento del gen *CPS-CAD* en cuatro especies de la serie Arribalzagia, *An. punctimacula* s.l., *An. calderoni*, *An. malefactor* y *An. neomaculipalpus*. Estos oligonucleótidos podrán ser utilizados en futuros estudios para obtener un mayor conocimiento sobre estas especies de la serie Arribalzagia.

El análisis BLAST para *CPS-CAD* arrojó un porcentaje de identidad genética de 84% con *Anopheles artroparvus*, especie perteneciente al subgénero *Anopheles*, que fue un importante vector de malaria en Países Bajos, España y Portugal.⁵⁶ La ausencia de secuencias reportadas para este gen en GenBank en especies cercanas como las de la serie Arribalzagia, es lo que probablemente impidió encontrar porcentajes más altos de identidad genética. Con respecto a la secuencia de nucleótidos del gen *COI*, el análisis BLAST arrojó una alta identidad genética (99%) con *An. punctimacula* del norte de Colombia.⁵⁵ Este marcador ha sido más ampliamente utilizado, lo que permite realizar comparación de las secuencias y su relación con aquellas de otras especies anofelinas. Además, no se encontraron

codones de parada lo que indica la ausencia de pseudogenes o copias nucleares de origen mitocondrial (NUTMs) en las secuencias *COI* de *An. punctimacula* s.l.

En este trabajo se utilizaron regiones de los genes *COI* y *CPS-CAD*; estas han sido muy utilizadas para examinar relaciones genéticas de dípteros³⁵ y específicamente para *Anopheles*,³¹⁻³³ lo cual sugería que estas secuencias podrían ser de utilidad para evaluar la diversidad genética de *An. punctimacula* s.l. y el nivel de diferenciación genética entre los especímenes de Nechí y Montería.

En las secuencias *CPS-CAD* de los especímenes del municipio Montería no se encontraron sitios polimórficos y todos los individuos pertenecían al mismo haplotipo; en consecuencia, los indicadores de diversidad genética para esta localidad fueron valores iguales a cero. En los especímenes de Nechí solo hubo 4 sitios polimórficos, los valores de F_{st} (0,00054) y Nm (7.758) indican que no existe diferenciación genética intra e inter poblacional, probablemente debido al alto intercambio genético entre ellas. Estos resultados sugieren que el fragmento del gen *CPS-CAD* analizado en *An. punctimacula* s.l. es conservado entre ambas poblaciones y puede tener poca utilidad en estudios poblacionales. Sin embargo, este gen podría ser útil en estudios filogénicos en especies de la serie Arribalzagia.

Los índices de diferenciación genética para *COI* F_{st} (0,00049) y Nm (780,52), indican que entre las poblaciones de *An. punctimacula* s.l. de ambos municipios hay poca estructuración genética y un alto flujo de genes

causando su homogeneidad genética. Los niveles de diversidad nucleotídica de Montería ($\pi=0,00088$) y Nechí ($\pi=0,00096$) fueron bajos y similares entre ambas poblaciones, indicando que existe poca diferencia nucleotídica. Además, la mayoría los haplotipos fueron compartidos entre ambos municipios, lo que indica que existe flujo genético entre las dos poblaciones.

Los Municipios de Montería y Nechí se encuentran a una distancia aproximada de 141,13 km. Comparten la eco-región bosque húmedo Magdalena Urabá,⁵⁷ y según la zonificación climática, presentan clima cálido pero subclima seco en Montería y muy húmedo en Nechí;⁵⁸ comparten el paisaje bioclimático de bosque seco tropical (Bs-T). Sin embargo, algunas zonas del municipio de Nechí se encuentran en el bioma bosque húmedo tropical (Bh-T).⁵⁸ La cercanía entre ambos municipios y la similitud de características ecológicas y geográficas, podría favorecer la posible existencia de metapoblaciones que mantiene un constante flujo genético entre los especímenes de *An. punctimacula* de ambos municipios, originando una escasa diferenciación genética. Estos resultados son similares a los de estudios previos realizados con el marcador *COI* en poblaciones de *An. nuneztovari* y *An. darlingi* presentes en los Departamentos de Antioquia y Córdoba. En dichos trabajos, los análisis mostraron una baja diferenciación genética y un alto flujo de genes entre las poblaciones de estos dos vectores, en ambos departamentos.³¹⁻³² Dado que *An. punctimacula* s.l. se encuentra ampliamente distribuido en Colombia,¹⁹ es necesario realizar análisis genéticos que incluyan poblaciones de este vector en regiones geográficamente separadas como las regiones del Caribe, Pacífico y la región Amazónica, y utilizar otros marcadores moleculares que posean una mayor resolución para detectar cambios genéticos recientes. Una alternativa podría ser el uso de microsatélites (*SSR simple sequence repeat*) que son ampliamente utilizados en estudios poblacionales y han permitido estimar el flujo de genes en especies de *Anopheles*.²⁷ Esto se debe a que su alta tasa de mutación permite detectar la diferenciación genética de especies, incluso débilmente estructuradas.⁵⁹ Un estudio realizado en poblaciones de *An. albimanus* de la región del Pacífico y Caribe Colombiano, detectó una variación genética moderada a baja utilizando una región del gen mitocondrial *COI* y cuatro loci de microsatélites.²⁶

El uso combinado de marcadores nucleares y mitocondriales en estudios poblacionales puede ser relevante, debido a que la información que ofrecen en la

detección de variación genética es complementaria, ya que revelan diferentes aspectos genéticos que ayudan a comprender la historia evolutiva de las especies.^{27,61}

CONCLUSIÓN

La ausencia de diferenciación genética y el alto flujo de genes entre las poblaciones de *An. punctimacula* s.l. de Montería y Nechí, indica que esta especie es un taxón único y por su ubicación geográfica podría estar relacionado con el linaje A hallado en Panamá²⁴ y en el Noreste y Caribe de Colombia.²⁵ Este hallazgo proporciona datos importantes que podrían ser aplicados en las estrategias de control vectorial de estos dos municipios. Dado que la información sobre la genética de poblaciones de vectores permite inferir si existe una propagación de genes importantes que pueden estar relacionados con la resistencia a insecticidas.¹⁴

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a investigadores del grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, por su cooperación para la ejecución de este trabajo.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

Este trabajo recibió apoyo para su ejecución de un proyecto financiado por Colciencias, proyecto código 596-2013 y la Universidad de Antioquia. PAU es Joven Investigador CODI, UdeA, años 2012-2015.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses en esta publicación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **World Health Organization.** Malaria, Fact sheet N°94, 2015. Consultado el 6 de abril de 2015, Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>
2. **Organización Mundial de la Salud.** Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030. Gine-

- bra, Suiza, 2014. Disponible en: http://www.who.int/malaria/areas/global_technical_strategy/draft-gts-spanish.pdf?ua=1
3. **Mantilla G, Oliveros H, & Barnston AG.** The role of ENSO in understanding changes in Colombia's annual malaria burden by region, 1960-2006. *Malaria Journal* 2009; 8, 6. doi:10.1186/1475-2875-8-6
 4. **Instituto Nacional de Salud.** Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Sistema de vigilancia en salud pública –SIVIGILA. 2013. Semana Epidemiológica 53
 5. **Instituto Nacional de Salud.** Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Sistema de vigilancia en salud pública –SIVIGILA. 2014. Semana Epidemiológica 53
 6. **Chaparro P, Soto E, Padilla J, & Vargas.** Estimation of the underreporting of malaria measurement in ten municipalities of the Pacific coast of Nariño during, 2009. *Biomedica* 2009; 32: 29–37.
 7. **Gutiérrez La, González JJ, Gómez G F, Castro M I, Rosero, D. a., Luckhart, S., et al.** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(8), 1117–1124.
 8. **Instituto Nacional de Salud.** Informe del evento malaria, hasta el período epidemiológico XII, Colombia, 2014. Comportamiento de la malaria por regiones de procedencia, Subdirección prevención, vigilancia y control en salud pública. 2014 Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/MALARIA%20Periodo%20XIII%202014.pdf>
 9. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. 2ª ed. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle; 2009.
 10. **Naranjo-Díaz N, Rosero DA, Rua-Urbe G, Luckhart S, & Correa MM.** Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasites & Vectors.* 2013; 6(1): 61.
 11. **Gutiérrez La, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, et al.** Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica.* 2009; 107(2): 99–105.
 12. **Naranjo-Díaz N, Altamiranda M, Luckhart S, Conn JE, & Correa MM.** Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific region. *Plos One.* 2014; 9(8): 1–9.
 13. **Rosero Da, Naranjo-Díaz N, Alvarez N, Cienfuegos AV, Torres C, Luckhart S, et al.** Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera: Culicidae) Naturally Infected with *Plasmodium* spp. *ISRN Parasitology*, 2013; 10.
 14. **Cohuet A, Harris C, Robert V, & Fontenille D.** Evolutionary forces on *Anopheles*: what makes a malaria vector?. *Trends in Parasitology.* 2010; 26(3): 130–6.
 15. **Donnelly MJ, Simard F, & Lehmann T.** Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends in Parasitology.* 2002; 18(2): 75–80.
 16. **World Health Organization.** Global technical strategy and targets for malaria 2016–2030. 2014. Consultado 23 de marzo de 2015. Disponible en: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_28-en.pdf?ua=1
 17. **Ulrich JN, Naranjo DP, Alimi TO, Müller GC, & Beier JC.** How much vector control is needed to achieve malaria elimination?. *Trends in Parasitology.* 2013; 29(3):104–9.
 18. **Brochero H, & Quiñones ML.** Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia : reflexión para el caso de malaria. *Biomedica.* 2008. 28: 18–24.
 19. **Olano VA, Brochero HL, Sáenz R, Quiñones ML, & Molina Ja.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomedica.* 2001; 21(1): 402–408.
 20. **Rubio-Palis Y, & Zimmerman RH.** Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *MedEntomol.* 1997; 34(5): 499–510.
 21. **Wilkerson RC.** *Anopheles (Anopheles) calderoni* sp. a malaria vector of the Arribalzagia series from Peru (Diptera: culicidae). *Mosq Sys.* 1991; 23(1): 25-38.
 22. **Wilkerson RC.** Redescriptions of *Anopheles punctimacula* and *An. malefactor* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1990; 27 (2): 226-47.
 23. **González R, Carrejo N, Wilkerson RC, Alarcon J, Alarcon-Ormasa J, Ruiz F, et al.** Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(8): 1001–1009.
 24. **Loaiza JR, Scott ME, Bermingham E, Sanjurjo OI, Rovira JR, Dutari LC, et al.** Novel genetic diversity within *Anopheles punctimacula* s.l.: Phylogenetic discrepancy between the Barcode cytochrome c oxidase I (COI) gene and the rDNA second internal transcribed spacer (ITS2). *Acta Tropica.* 2013; 128(1): 1–9.
 25. **Gómez GF, Bickersmith Sa, González R, Conn JE, & Correa MM.** Molecular taxonomy

- provides new insights into *Anopheles* species of the neotropical Arribalzagia series. *Plos One*. 2015; 10(3): e0119488.
26. **Gutiérrez La, Naranjo NJ, Cienfuegos AV, Muskus CE, Luckhart S, Conn JE, et al.** Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria Journal*. 2009; 8: 259.
 27. **Loaiza JR, Bermingham E, Sanjur OI, Scott ME, Bickersmith Sa, & Conn JE.** Review of genetic diversity in malaria vectors (Culicidae: Anophelinae). *Infection Genetics and Evolution*. 2012; 12(1): 1–12.
 28. **Norris DE.** Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. *Int J Parasitol*. 2002; 32(13): 1607–1615.
 29. **Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TMP, Nagaki SS, Sant’Ana DC, et al.** Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (*Nyssorhynchus*). *Plos One*. 2013; 8(2): e54063.
 30. **Gillham NW.** Organelle genes and genomes. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/19950103696.html;jsessionid=6F351C0601C86D799695B7B269166F7A>
 31. **Gutierrez LA, Gomez GF, Gonzalez JJ, Castro MI, Luckhart S, Conn JE, et al.** Microgeographic Genetic Variation of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Cordoba and Antioquia, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83(1): 38–47.
 32. **Jaramillo LM, Gutiérrez La, Luckhart S, Conn JE, & Correa MM.** Molecular evidence for a single Taxon, *Anopheles nuneztovari* s.l., from two endemic malaria regions in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2011; 106(8): 1017–1023.
 33. **Rosero Da, Naranjo-Diaz N, Alvarez N, Cienfuegos AV, Torres C, Luckhart S, et al.** Colombian *Anopheles triannulatus* (Diptera : Culicidae) Naturally Infected with Plasmodium spp . *ISRN Parasitology* . 2013; 10.
 34. **Moulton JK, & Wiegmann BM.** Evolution and phylogenetic utility of *CAD* (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004; 31: 363–378.
 35. **Meiklejohn KA, Wallman JF, Pape T, Cameron SL, & Downton M.** Utility of *COI*, *CAD* and morphological data for resolving relationships within the genus *Sarcophaga* (sensu lato) (Diptera: Sarcophagidae): a preliminary study. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2013; 69(1): 133–41.
 36. **Instituto Nacional de Salud.** Portal SIVIGILA. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. Vigilancia rutinaria por evento municipal 2014. Consultado de. <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>
 37. **Rosero Da, Gutiérrez La, Cienfuegos AV, Jaramillo LM, & Correa MM.** Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Rev Colomb Entomol*. 2010; 36(53): 260–263.
 38. **Cienfuegos AV, Gómez GF, Córdoba La, Luckhart S, Conn JE, et al.** Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera : Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Biomédica*. 2008;19(53): 35–44.
 39. **Cienfuegos AV, Rosero Da, Naranjo N, Luckhart S, Conn JE, & Correa MM.** Evaluation of a PCR-RFLP-ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. *Acta Tropica*. 2011; 118(2): 128–135.
 40. **Zapata Ma, Cienfuegos AV, Quirós OI, Quiñones ML, Luckhart S, & Correa MM.** Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of its sequences. *Am J Trop Med Hyg* . 2008; 77(53): 67–72.
 41. **Mongin E, Louis C, Holt RA, Birney E, & Collins FH.** *The Anopheles gambiae* genome: an update. *Trends in Parasitology*. 2004; 20(2): 49–52.
 42. **Wiegmann BM, Trautwein MD, Winkler IS, Barr NB, Kim JW, Lambkin C, et al.** Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(14): 5690–5.
 43. **Moulton JK, & Wiegmann BM.** Evolution and phylogenetic utility of *CAD* (rudimentary) among Mesozoic-aged Eremoneuran Diptera (Insecta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2004; 31: 363–378.
 44. **Edgar RC.** MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004; 32(5): 1792–z1797.
 45. **Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, et al.** Geneious version 6.0.6. Available: Available from www.geneious.com.
 46. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, & Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990; 215(3): 403–10.
 47. **Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG.** Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids*

- Research* 40(15):e115
48. **Koressaar T, Remm M.** Enhancements and modifications of primer design program Primer3 Bioinformatics 2007;23(10):1289-9
 49. **Copyright 2015 Inc Integrated DNA Technologies IDT®.** Disponible en: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>.
 50. **Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, & Hewitt GM.** The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*. 1996; 5(3): 153–165.
 51. **Moreno M, Marinotti O, Krzywinski J, Tadei WP, James AA, Achee, N. L, et al.** Complete mtDNA genomes of *Anopheles darlingi* and an approach to anopheline divergence time. *Malaria J*. 2010; 9: 127.
 52. **Rozas J.** DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. Pp. 337-350. In Posada, D. (ed.) Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537. Humana Press, NJ, USA.
 53. **Excoffier L, Laval G, & Schneider S.** Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 1: 47–50.
 54. **Wright S.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 1949; 15(1): 323–354.
 55. **Clement M, Posada D and Crandall K.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660
 56. **Herrera-Varela M, Orjuela LI, Peñalver C, Conn JE, & Quiñones ML.** *Anopheles* species composition explains differences in *Plasmodium* transmission in La Guajira, northern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(7): 955–959.
 57. **Bates M.** The nomenclature and taxonomic status of the mosquitoes of the *Anopheles maculipennis* complex. *Ann. Entomol soc Am*. 1940; 33: 343-356
 58. **Fund W.** Ecoregion. Retrieved from <http://www.eoearth.org/view/article/51cbed7a7896bb431f692731>.
 59. **IGAC-Instituto Geográfico Agustín Codazzi.** Sistema de Información Geográfica para la planeación y el Ordenamiento Territorial SIG-OT. fecha de consulta: Abril de 2014, fecha de actualización del sitio web: noviembre de 2011. disponible en: http://sigotn.igac.gov.co/sigotn/documentos%20SIGOTN/SIGOT_PresentacionSIGOT_V1.1_2010_11_27.pdf
 60. **Vicente JL, Sousa CA, Alten B, Caglar SS, Falcut E, Latorre JM, et al.** Genetic and phenotypic variation of the malaria vector *Anopheles atroparvus* in southern Europe. *Malaria J*. 2011; 10(1): 5.
 61. **Gutiérrez La, Naranjo NJ, Cienfuegos AV, Muskus CE, Luckhart S, Conn JE, et al.** Population structure analyses and demographic history of the malaria vector *Anopheles albimanus* from the Caribbean and the Pacific regions of Colombia. *Malaria J*. 2009; 8: 259.
 62. **Zhang, D-X, & Hewitt GM.** Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 2003; 12(3): 563–584.