

INTRODUCCIÓN

El paludismo un problema de salud pública.

El paludismo es la enfermedad parasitaria más importante en el mundo transmitida por un vector (OMS 1993). En términos de morbilidad y mortalidad humana, el paludismo es una de las enfermedades más importantes dentro de las enfermedades infecciosas reemergentes (Halstead 1992, Robert *et al.* 1997, Butler y Roberts 2000). En muchos países en vías de desarrollo especialmente en Africa, el paludismo provoca altos costos médicos, una enorme pérdida de vidas y de días laborables (Fleming 1986, World Health Organization 1998).

El paludismo se encuentra diseminado en más de 101 países en donde habitan cerca de 2,400 millones de personas (40% de la población del Mundo). Su prevalencia ha sido estimada en 300 a 500 millones de casos cada año. Un poco más del 90% de los casos clínicos de paludismo se encuentran localizados en el área de sub-Sahara Africa. En esta área, la mortalidad debido al paludismo, se calcula sobre 2 millones de muertes cada año, presentándose principalmente en niños (uno de cada 20 niños mueren de paludismo antes que cumplan los 5 años de edad) que viven en áreas rurales en donde no se tiene acceso a los servicios de salud. Al Oeste de Camerún, al menos 75% de los niños portan el parásito en su sangre. Otros grupos de humanos no inmunes que presentan alto riesgo de contraer el paludismo son las mujeres embarazadas, refugiados, personas desplazadas y personas que entran a laborar o de turistas a áreas endémicas (World Health Organization 1998).

El paludismo es endémico en un total de 101 países y territorios: 45 países ubicados en la región de Africa, 21 en la región de las Américas, 4 en la región de Europa, 14 en la región del Mediterráneo, 8 en la región sureste de Asia y 9 en la región del Pacífico (World Health Organization, 1998) (Figura 1).

En las Américas, en 1974, la morbilidad fue de 49 por 100.000 habitantes, mientras que en 1990 en esta misma área vivían alrededor de 278 millones de gentes en áreas endémicas de paludismo, registrando una morbilidad del paludismo para este año de 149 por 100,000 personas. En 1995 se presentaron 1,302,791 casos, con una morbilidad de 168.16 por 100 habitantes, ocupando el tercer lugar entre las enfermedades de notificación obligatoria (OPS 1995).

En México, en la década de los años 40s durante los primeros años de actividades de la Campaña de Erradicación se observó una disminución en el número de casos. Sin embargo, a partir de 1960, esta tendencia se invirtió alcanzando cifras alarmantes. Este incremento se presentó a finales de los años 70s, con un 133,698 casos en 1985, distribuidos en 13,901 localidades. Este aumento representó el 15.6% con relación al año anterior. En 1989, México registró aproximadamente el 10% de todos los casos de paludismo en las Américas (Rodríguez y Loyola, 1989), mientras que en el año de 1990 sólo se reportó el 4.2% de todos los casos de paludismo en esta misma área (Pan American Health Organization 1991), representando una reducción del 60% y del 34% de casos y de poblados con casos de paludismo, respectivamente. Respecto al último reporte. Esta reducción fue el resultado de la implementación del plan de acciones intensivas y simultáneas para el control de paludismo (también conocida como PAIS) (DGE 1991).

Durante los años 90s se observó un significativo decremento en los casos de paludismo hasta llegar a un número poco mayor a 10,000 casos en 1993, cifra que en 1997 llegó a ser de sólo 4,472 casos. Sin embargo, en el año 1998 se presentó de nueva cuenta un aumento de 14,198 siendo afectados principalmente los estados de Oaxaca y Chiapas. En 1999, en México, hasta la semana 51 se reportaron un total de 5,316 casos, de ellos sólo 1,002 se presentaron en Chiapas. Sin embargo, para el año del 2000 en la semana 39 se observó una reducción de 2,774 de casos en la República Mexicana siendo de 1,008 los casos reportados para el estado de Chiapas.

En México, el área palúdica se divide en tres regiones. Región de la vertiente del Golfo de México y Península de Yucatán; Región de la Vertiente Sur del Océano Pacífico y Región del Noroeste del País (Figura 2). En la actualidad se considera que la transmisión se ha interrumpido en la Región del Golfo de México y se ha focalizado en la región del Noroeste del País pero principalmente en la región del Océano Pacífico considerada la zona más endémica del paludismo (Rodríguez y Loyola 1989).. En estas dos últimas regiones viven aproximadamente 3.5 millones de habitantes o sea el 10% del total de área palúdica, pero entre ellos se reportaron 11,074 casos, comprendiendo el 75% del total registrado en el país en 1978 (OPS/OMS 1981). En la región del Océano Pacífico los casos de paludismo se encuentran localizados principalmente en los estados de Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Michoacán y Sinaloa.

Los parásitos del paludismo.

Se han descrito más de 100 especies de *Plasmodium* (Microsporidia: Plasmodidae), de los cuales 4 especies causan paludismo en el Hombre siendo, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. En primates y otros mamíferos se han identificado alrededor de 20 especies, mientras que en aves y reptiles se han reportado 40 especies (Garnham 1980).

Ciclo de vida del Plasmodium.

El ciclo de vida de todas las especies de *Plasmodium* del paludismo humano es esencialmente el mismo. Este comprende una fase exógena sexual denominada esporogónica con multiplicación en algunos mosquitos *Anopheles* y una fase endógena asexual denominada esquizogónica con multiplicación en el humano.

Fase sexual del Plasmodium

Esta fase inicia cuando un mosquito hembra ingiere sangre de un hospedero humano con parásitos en circulación. Estos llegan libres al estómago del mosquito. Los parásitos asexuales son digeridos juntos con las células de la

sangre mientras las células sexuales (gametocitos) experimentan cambios. En el gametocito macho el núcleo se divide hasta 4 u 8 núcleos, cada uno de ellos forma una larga estructura parecida a una hebra de 20 a 25 μ de largo denominado flagelo los cuales se liberan de la célula original. Este proceso de exflagelación toma pocos minutos a una temperatura apropiada y pueden ser observadas en sangre fresca bajo un microscopio. En el gametocito hembra se experimenta un proceso de maduración y se forma el gameto hembra o macrogameto; los flagelos o gametos machos son los microgametos.

En el estómago del mosquito un microgameto es atraído por un macrogameto; éste último forma una pequeña proyección a través de la cual el microgameto entra y así se completa la *fertilización*. El producto de fusión de los gametos macho y hembra se denomina *cigoto*. Al momento de su formación presenta un cuerpo globular y es inmóvil, pero dentro de 18 a 24 horas de su formación se convierte en un cuerpo móvil, este estado parecido a un gusano alcanzando una longitud de 18 a 24 μ y es conocido como *ooqueto*. Después de cruzar la capa epitelial, el *ooqueto* se aloja entre la región exterior del epitelio y la capa elástica del músculo. Ahora el *ooqueto* se vuelve esférico, secreta una delgada pared quística y crece hasta una forma esférica llamada *ooquiste*.

Los ooquistes gradualmente aumentan de tamaño, algunos de 40 a 80 μ , y se presentan en el estómago como cuerpos globosos semi-transparentes, conteniendo granos de pigmentos (la distribución de los granos y su color son características para las diferentes especies de *Plasmodium*). En virtud de que los ooquistes se alargan y el núcleo se divide, el pigmento se oscurece. Posteriormente los ooquistes se rompen y liberan miles de *esporozoitos* móviles hasta la cavidad del mosquito (hemocelo), desde donde muchos esporozoitos llegan a las glándulas salivales en donde a partir de esta fase las hembras anofelinas se convierten *infectivas*.

Fase asexual del *Plasmodium*.

Cuando las hembras se alimentan de la sangre, después de haber picado la piel del humano, los esporozoitos son inyectados hasta el torrente sanguíneo del hospedero humano. Después, los esporozoitos desaparecen de la sangre, algunos son destruidos por fagocitosis, pero muchos entran a las células parenquimatosas del hígado en donde experimentan un proceso de desarrollo y multiplicación conocida como *esquizogonia exoeritrocítica primaria* (esquizogonia EE), algunas veces denominada *esquizogonia pre-eritrocítica*.

Los esporozoitos que penetran a las células reticuloendoteliales toman una forma oval llamada *esquizontes exoeritrocíticos*, y sus núcleos se dividen repetidas veces. La esquizogonia exoeritrocítica da como resultado la liberación de un gran número de *merozoitos exoeritrocíticos* originados de los *esquizontes exoeritrocíticos*. La esquizogonia finaliza cuando los *merozoites* exoeritrocíticos han invadido las células rojas. Las primeras dos o tres generaciones de merozoitos exoeritrocíticos pueden reinvadir las células parenquimatosas, pero esto no ha sido demostrado.

La fase sanguínea esta compuesta principalmente por la esquizogonia eritrocítica asexual. Los esquizontes eritrocíticos completamente desarrollados desintegran a los glóbulos rojos y liberan *merozoitos* que penetran a los eritrocitos no parasitados, para continuar el ciclo en la sangre. La ruptura y liberación de merozoitos con las toxinas acompañantes, que ocurren en periodos típicos para las especies de *Plasmodium*, ocasionan los ciclos de escalofríos y fiebres que caracterizan a las malarías humanas (WHO 1963; Bruce-Chwatt 1980; Harwood y James 1987). (Figura 3). La periodicidad asegura que los gametocitos de corta vida, maduros y viables en la sangre coincidan con los periodos de actividad de los mosquitos vectores (Hawking *et al.* 1968).

Característica de la forma infectante del Plasmodium.

El estado infectivo de los parásitos del paludismo, es el esporozoito, estos están cubiertos por una capa superficial predominantemente hecha de una simple proteína (proteína circunsporozoítica CS) (Nussenzweig *et al.* 1985). Dos fenotipos CS de *Plasmodium vivax* han sido identificados de acuerdo a la secuencia de aminoácidos de las unidades repetidas localizadas en la región central (GDRAA/DGQPA) en el fenotipo VK210 (Arnot *et al.* 1985) y (ANGAGNQPG) en el fenotipo VK247 (Rosenberg *et al.* 1989). Estas variantes se encuentran distribuidas en todo el Mundo (Cochrane *et al.* 1990, Qari *et al.* 1991) incluyendo México (Kain *et al.* 1992a, Kain *et al.* 1992b). En México, el 98% de los casos de paludismo son debidos a las infecciones por *Plasmodium vivax*, mientras que el sólo 2% es debido a las infecciones por *Plasmodium falciparum* (Rodríguez y Loyola 1989). La distribución geográfica de los casos de paludismo indica que la prevalencia del fenotipo VK210 y VK247 están directamente asociadas con la distribución de los vectores. En Chiapas los casos de paludismo se encuentran asociados por el fenotipo VK210 en pacientes que viven en el plano costero de Chiapas en donde el principal vector es *An. albimanus*, mientras que los casos identificados con el fenotipo VK247 fueron asociados en pacientes que viven en áreas de pie de monte en donde el principal vector es *An. pseudopunctipennis* (Rodríguez *et al.* 2000).

El vector del paludismo.

El paludismo es transmitido a los humanos en la naturaleza solamente por los piquetes de hembras de mosquitos del género *Anopheles* uno de los tres géneros de la subfamilia Anophelinae (Diptera: Culicidae), el cual presenta un escutelo uniformemente redondeado, ala con el tronco de bifurcación media (M) recto. Los otros dos géneros de esta subfamilia son *Chagasia* el cual presenta un escutelo ligeramente trilobulado (4 especies en América tropical), y *Bironella* con el escutelo uniformemente redondeado, ala con el tronco de la bifurcación media ondulado (7 especies en Nueva Guinea y Melanesia). De las especies de *Bironella* y *Chagasia*, ninguna tiene importancia médica.

Los mosquitos *Anopheles* pertenecen al orden Diptera, sub-orden Nematóceras, familia Culicidae, sub-familia Anophelinae, tribu Anophelini. Dentro de la tribu Anophelini el género *Anopheles* presenta diversos sub-géneros: *Anopheles* con 120 especies, *Cellia*=*Myzomyia* con 151, *Lophopodomyia* con 6, *Nyssorhynchus* con 24, *Kerteszia* con 6 y *Stethomyia* con 5. Las divisiones de los subgéneros *Anopheles* han sido propuestos en las siguientes series: *Christyia*, *Arribalzagia*, *Myzorhynchus*, *Anopheles*, *Lophoscelomyia*, y *Ciclopepteron*. (Edward 1932, Reid y Knight 1961, Bruce-Chwatt 1980)

Los vectores del paludismo en el Mundo.

Los Anofelinos son distinguidos de otras subfamilias de Culicidae por la presencia de palpos usualmente tan largos como la proboscis en ambos sexos (Fleming 1986, Bruce-Chwatt 1980, Clements 1992). De las aproximadamente 400 especies descritas antes de 1978, su distribución por región geográfica fue: 118 especies distribuidas en la región Afrotropical, 118 especies en la región Oriental, 76 especies en la región Neotropical, 39 en la región Paleártica, 42 especies en la región Australiana y 16 especies en la región Neártica (Stone *et al.* 1959; Knight y Stone 1977; Knight 1978). De estos solamente 85 han sido incriminadas como vectores de paludismo (Harwood y James 1979, Wernsdorfer 1980).

La distribución de los principales vectores en el Mundo, fue propuesta dentro de 12 zonas epidemiológicas de paludismo (Macdonald 1957, Bown y Nelson 1993). (Figura 4).

Los vectores del paludismo en México.

En México, se han reportado un total de 26 especies de *Anopheles* (Vargas y Martinez-Palacios 1956, Vargas 1976, Wilkerson y Strickman 1990) (Tabla 1). De este número de especies sólo *Anopheles albimanus* Wiedemann, *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald y *Anopheles vestitipennis* Dyar y Knab, han sido incriminadas como vectores principales de paludismo. En Chiapas, se han identificados tres áreas epidemiológicamente importantes de paludismo (Figura 5). 1) *Area de la Planicie Costera del Estado*, área comprendida entre los 0 y 200 msnm, en donde el vector primario es *An. albimanus*, especialmente a lo largo de esta zona y Centro América (Hoffman 1932, Ramsey *et al.* 1986, Rodríguez y Loyola 1989), especie distribuida desde el sur de Texas hasta Venezuela, Colombia y Perú, y comúnmente ocurre a través del Caribe (Faran 1980); 2) *Area de las zonas montañosas*, comprendida desde los 200 a los 800 msnm, en donde *An. pseudopunctipennis* es el principal vector de paludismo (Hoffman 1932, Vargas 1941, Rodríguez y Loyola 1989). También se ha reportado como vector principal en otros países incluyendo Guatemala, Honduras, Ecuador, Perú y Bolivia (Pan American Health Organization 1991). Esta especie, se encuentra distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y esta asociado con altas montañas como la Sierra Madre en México y los Andes en América del Sur (Aitkin 1945); 3) *Area de la Selva Lacandona*, zona localizada en el área de la región de Marqués de Comillas, cerca de la frontera con Guatemala al noreste de Chiapas, ubicada entre los 40 y 300 msnm. En esta área *An. vestitipennis* ha sido incriminado como el principal vector de paludismo (Loyola *et al.* 1991).

Importancia médica de An. vestitipennis.

Anopheles (Anopheles) vestitipennis (Diptera: Culidae), pertenece a la serie Arribalzagia (Reid y Knight 1961, Wilkerson y Peyton 1990) y está relacionado al complejo *Maculipennis* (Chowdaiah et al. 1966, Kitzmiller et al. 1967).

An. vestitipennis fue originalmente descrito por Dyar y Knab en 1906, es un mosquito neotropical nativo de Centro América (Lane 1949). Su distribución comprende desde San Luis Potosí México, hasta el Norte de Sudamérica, incluyendo las dos Islas Antillas (Vargas 1958; Foote y Cook 1959; Belkin et al. 1970; Wilkerson y Strickman 1990) (Figura 6).

Estudios recientes demostraron que *An. vestitipennis* es la especie más abundante en la región de Marqués de Comillas, Chiapas., seguido de *An. albimanus*, *An. punctimacula*, *An. darlingi* y *An. pseudopunctipennis* (Loyola et al. 1991, Arredondo-Jiménez 1995). De estos sólo *An. vestitipennis* y *An. darlingi* presentaron preferencias por alimentarse sobre hospederos humanos (Loyola et al 1991).

Muestras analizadas de poblaciones de *An. vestitipennis* colectadas en el área de la Selva Lacandona resultaron infectados con *Plasmodium vivax* Grassi y Feletti y *Plasmodium falciparum* Welch, estimándose una tasa de infección de 4.67 por 1000 mosquitos, con este hallazgo *An. vestitipennis* se incriminó como el principal vector de paludismo en dicha área (Loyola et al. 1991, Arredondo-Jiménez 1995).

En algunas comunidades del plano costero de Chiapas *An. vestitipennis* es una especie prevalente durante todo el año. Sin embargo, su participación en la transmisión de paludismo aún no ha sido confirmada (Arredondo-Jiménez 1995).

En otros países la importancia médica de *An. vestitipennis* ha sido reportada, en Jamaica *An. vestitipennis* fue incriminado como vector potencial de

paludismo, debido a su alta preferencia por alimentarse sobre hospederos humanos. Sin embargo, debido a su limitada distribución y a la ausencia de mosquitos naturalmente infectados se descartó a esta especie como posible vector de paludismo (Belkin *et al.* 1970). En Stann Creek Valley Belice, se reportó por primera vez la presencia de esporozoitos en glándulas salivales de *An. vestitipennis* en forma natural, con un porcentaje de infección de 2.4%, sin mencionar la especie del *Plasmodium* (Kumm y Ram 1941). Mientras que en el Distrito de Toledo Belice, se encontró que *An. vestitipennis* fue la especie con mayor densidad, picando dentro de las casas, considerándose a este Anofelino como un vector importante (Roberts *et al.* 1993). En el norte de Guatemala se incriminó a *An. vestitipennis* como vector primario al encontrarse un índice de infección de 1.42% y de 6.24% para poblaciones colectadas en la zona de Cobán y Petén respectivamente. En 1952 en Guatemala, *An. albimanus*, *An. vestitipennis* y *An. pseudopuntipennis* fueron reportados como los vectores de paludismo, *An. vestitipennis* fue considerado como el segundo vector más importante debido al alto grado de índice de infección con esporozoitos, alta densidad, amplia distribución geográfica y disponibilidad de criaderos (De León 1952, Padilla *et al.* 1992).

Estudios en *Anopheles vestitipennis*.

La bionomía de *An. vestitipennis* ha sido reportada por Torre-Bueno en 1989, quién definió el concepto de bionomía como los hábitos, reproducción y adaptación de las formas de vida. Entre los estudios de la bionomía de *An. vestitipennis* destacan aquellos en las que se describen y caracterizan los sitios que sirven de criaderos, indicando que *An. vestitipennis* pueden desarrollarse en zanjas estancadas con vegetación abundante y algas, arroyos sombreados y frescos con corriente lenta, charcas y estanques, márgenes de arrozales y pantanos preferentemente con agua clara, todos estos sitios se han encontrado abajo de los 50 msnm. (Kumm *et al.* 1940; Russell *et al.* 1943; Belkin *et al.* 1970; Torre Bueno 1989),

Belkin *et al.* (1970), encontraron larvas de *An. vestitipennis* asociadas con poblaciones de *An. grabhamii*, *Cx. nigripalpus* y *Cx. pilosus*, describiendo las características propias de la larva, pupa, hembra, macho y sistemática. Un estudio similar fue realizado con poblaciones de *An. vestitipennis* del sur de Chiapas, en donde se realizaron colectas de hembras sobre hospederos animales a las cuales se les obtuvo la filial F1 y posteriormente se les describió la morfología de larvas de IV estadio, pupas y adultos (Orozco-Bonilla 1994).

En Guatemala, se estudió la longitud del ciclo gonotrófico y sobrevida de una población de *An. vestitipennis* colectada sobre hospedero humano, en donde se reportó que la longitud del ciclo gonotrófico fue de 2 días y la tasa de sobrevida por ciclo gonotrófico fue de 0.202. Sobre la base de estos resultados, se sugirió que en la estación de secas es poco probable que *An. vestitipennis* que esté involucrado en la transmisión de paludismo (Juárez Sandoval 1994).

En la República Dominicana, se reportó que la longitud del ciclo gonotrófico de *An. vestitipennis* fue de 3 días, resultado que concuerda con el de Arredondo-Jiménez (1995), quién en Chiapas reportó un ciclo gonotrófico de 3 días para las poblaciones nulipara (siendo la estructura de edad de los mosquitos más

abundantes entre 68-80% de las capturas totales), mientras que la longitud del ciclo gonotrófico para mosquitos de la población parida se encontró un ciclo gonotrófico de 2 días (Mekuria *et al.* 1991).

Evidencias de dos poblaciones de An. vestitipennis.

En estudios recientes, relacionados al hábito de alimentación de *An. vestitipennis* se ha observado que dentro de *An. vestitipennis* existen dos poblaciones con diferentes preferencias alimenticias, una población más prevalente con evidente preferencia por hospederos humanos (≈población antropofílica) y que se alimenta en el interior de las casas reposando fuera de las mismas y otra población pequeña que se alimenta preferentemente por hospederos animales (≈población zoofílica) (Hecht y Hernández-Corzo 1958, Elliot y De Zulueta 1985, Loyola *et al.* 1991, Arredondo-Jiménez 1995).

Este hallazgo en *An. vestitipennis*, permitió la formulación de la siguiente pregunta ¿tienen una base genética las diferencias conductuales de alimentación entre las dos poblaciones de *An. vestitipennis*? (Arredondo-Jiménez 1995), este cuestionamiento fue abordado por dos estudios genéticos mediante la técnica de electroforesis y RAPD-PCR. En el primer estudio se usaron tres poblaciones, 2 colectadas en una población de la Selva Lacandona (Benemérito de las Américas-16°31'08"N, 90°39'02"W), y una población colectada en el plano costero del Pacífico (Cosalapa-14°37'30"N, 92°16'54"W). En ambos estudios fueron evidentes la existencia de divergencias genéticas entre las dos poblaciones simpátricas y alopátricas (Arredondo-Jiménez 1995, Murillo *et al.* 2001). Estos hallazgos permitieron definir que las diferencias en la preferencia de alimentación que demuestran las dos poblaciones tienen una base genética.

En otra serie de estudios basados en características morfométricas, se encontraron que la longitud y amplitud promedio de los huevos originados de hembras colectadas en hospedero humano fueron significativamente diferente de aquellos huevos originados de hembras colectadas en animales, por tanto fue

posible separar a las poblaciones de *An. vestitipennis* en dos grupos de acuerdo a las características morfológicas de los huevos (Rodríguez *et al.* 1999). Por otro lado, al comparar hembras F1 de ambas poblaciones de *An. vestitipennis*, se encontró que la longitud alar y mancha del sector oscuro de mosquitos de la población antropofílica fueron significativamente más grande que las de hembras de la población zoofílica (Orozco-Bonilla *et al.* 2001).

Los resultados obtenidos hasta la fecha en los diferentes estudios han sugerido la ocurrencia de variaciones biológicas consistentes entre las dos supuestas poblaciones de *An. vestitipennis*, por lo que se sospecha que dentro del taxón de *An. vestitipennis* existe probablemente un proceso de especiación, conformando un complejo de especies de al menos 2 especies (White 1977: especies hermanas que presentan diferencias morfológicas ocultas).

En especies de *Anopheles* reconocidas como miembros de un complejo, la existencia de diferencias en algunas características biológicas y morfológicas fueron criterios para elevarlos a este rango. Por ejemplo, las primeras evidencias de la existencia de dos grupos dentro *An. maculipennis* se basaron en las diferencias en el tamaño alar, uno con alas grandes y otro con alas chicas y su asociación con el tipo de agua de sus criaderos (Bruce-Chwatt 1985, WHO 1987, Kettle 1992). En Italia, en otros estudios se sugirieron que en *An. maculipennis* presentaba diferentes formas y que podían ser separados por el patrón del color de los huevecillos (Falleroni 1926, Bruce-Chwatt 1985). Posteriormente, estudios del patrón del comportamiento de los diferentes grupos y su compatibilidad reproductiva, sugirieron que dentro de *An. maculipennis* se encuentran al menos 5 especies hermanas y dos sub-especies, todas ellas formando el complejo *Maculipennis* (, Kitzmiller 1977, Bruce-Chwatt 1985, Kettle 1992)

Otro ejemplo importante, es el grupo del complejo *An. gambiae*, considerada como una sola especie hasta 1956. Sin embargo, a la fecha se ha propuesto que dentro de *An. gambiae* es un complejo de al menos seis especies,

separadas principalmente por su asociación con el tipo de agua en que se desarrollan. Cuatro de ellas se desarrollan en agua dulce *An. gambiae* s.s. Giles, *An. arabiensis* Patton, *An. quadriannulatus* Theobald, y *An. bwambae*, y las otras dos especies se desarrollan en aguas salobres que son *An. melas* Theobald, y *An. merus* Dönitz. De estas seis especies las dos primeras son las especies vectores más eficientes de paludismo a través de continente Africano (White 1974, Mattingly 1977, WHO 1987, Bruce-Chwatt 1985)

La importancia práctica de estos hallazgos es la clara evidencia que las diferentes especies dentro del complejo *An. maculipennis* y *An. gambiae* difieren en sus hábitos alimenticios, así como en la habilidad para transmitir el paludismo, mientras que aquellas especies que no participan en la transmisión fueron ignorados en los programas de control (Bruce-Chwatt 1980).

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.

Los estudios propuestos con *Anopheles vestitipennis* aportarán una serie de evidencias biológicas, conductuales y relaciones genéticas, que permitirán definir el estatus taxonómico de esta especie.

La identificación de una población antropofílica dentro de la especie *An. vestitipennis* permitirá implementar medidas de control más adecuadas, dirigidas a esta población.

En esta investigación desarrollada como tesis doctoral, se presentan resultados de 4 estudios en las cuales se confirma la existencia de dos poblaciones de *Anopheles vestitipennis* en el Sur de Chiapas, México.

- a) Estimación del ciclo gonotrófico y sobrevivencia de dos poblaciones simpátricas de *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae).
- b) Estudios de selección de hospederos en dos poblaciones de *An. vestitipennis* (Diptera:Culicidae).
- c) Estudios de fidelidad innata de hospederos en *An. vestitipennis* (Diptera:Culicidae).
- d) Compatibilidad reproductiva entre dos poblaciones de *An. vestitipennis* (Diptera:Culicidae).

Todos los estudios fueron desarrollados en la comunidad de Nueva Independencia (14°36'86"N 92°15'69"W), municipio de Suchiate, Chiapas, comunidad localizada en la planicie costera de Chiapas. Los estudios b y c también fueron desarrollados en una comunidad de la Zona Selva Lacandona denominada Benemérito de las Américas (16°31'08"N 90°39'02" W) considerada zona endémica del paludismo. Los registros de los casos de paludismo en esta comunidad se iniciaron desde el año de 1993 hasta el año 1997 sin tener clasificado el tipo de paludismo, a partir de 1998 el registro de los casos fueron ya especificados por tipo de paludismo (Figura 7 y Figura 8).

LITERATURA CITADA

- Aitkin THG. 1945. Studies on the anopheline complex of western America. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* 7:273-364.
- Arnot DE, Barnwell JW, Tam JP, Nussenzweig V, Nussenzweig RS, Eneas V. 1985. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*, gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. *Science* 230:815-818.
- Arredondo-Jiménez JI. 1995. Comparative ecology of allopatric populations of *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae). *Ph. D. Dissertation. University of California, Davis, CA.*
- Belkin JN, Heinemann SJ, Page WA. 1970. The culicidae of Jamaica. *Contributions of the American Entomological Institute* 6, 1-458.
- Bown ND, Nelson M. 1993. Anopheline vectors of human Plasmodia. Parasitic Protozoa, Volume 5. *Academic Press, Inc.*
- Bruce-Chwatt LJ. 1985. Essential Malariology. *Heinemann Medical Books Ltd. London.* 354 pp.
- Butler WP, Roberts DR. 2000. Malaria in the Americas: a model of reemergence. *Mil Med.* 165:897-902.
- Clements AN. 1992. The biology of mosquitoes, vol. 1 Development, nutrition and reproduction. *Chapman & Hall, London.* 508 pp.
- Cochrane AH, Nardin EH, de Arruda M, Maracic M, Clavijo P, Collins WE, Nussenzweig RS, 1990. Widespread reactivity of human sera with a variant

repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 43:446-451.

Chowdaiah BM, Baker RH, Kitzmiller JB 1966. The salivary chromosomes of *Anopheles vestitipennis*. *Cytol.* 31:154-162.

De León JR. 1952. Los anofelinos transmisores de malaria en Guatemala. *Rev. Ins. Cient. USAC.* 7:1-11.

Dirección General de Epidemiología-Secretaría de Salud. 1991. Paludismo y otras enfermedades transmitidas por vector. *Dirección General de Epidemiología-Secretaría de Salud, México.*

Edward FW. 1932. Diptera: fam. Culicidae. *Genera Insect.*, fasc. 194.

Elliott R, De Zulueta J. 1985. Ethological resistance in malaria vectors: Behavioural response to intradomestic residual insecticides. *Doc. Memeografiado. WHO/NBC* 75-569.

Falleroni D. 1926. Fauna anofelica italiana e suo habitat (paludi, risaie, canali). *Metodi di lotta contro la malaria. Rivista di Malariologia* 5:553-593.

Faran ME. 1980. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles albimanus* Wiedemann in El Salvador. I. Dispersal and survival during the dry season. *Mosq. News* 34:389-293.

Fleming 1986. Biology and ecology of malaria vectors in the Americas. *Pan American Health organization, Washington D. C.* 51 pp.

- Footo RH, Cook DR. 1959. Mosquitoes of medical importance. *Agriculture Handbook 152, United States Department of Agriculture, Washington.*
- Garnham PCC. 1980. Malaria in its various vertebrate hosts. Pp. 95-144 in volume I, *Malaria*, J.P. Kreier (ed), *Academic Press, New York.*
- Halstead SB. 1992. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *World Health Stat. Q.* 45:292-298.
- Harwood R.F, James MT. 1979. "Entomology in human and animal health" *Macmillan, New York.*
- Hawking F, Worms M, Gammage 1968. 23- and 48 hour cycles of malaria parasites in the blood; their purpose, production and control. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 62:731-760.
- Hecht O, Hernández-Corzo J. 1958. Contribución al estudio de los hábitos de los anofelinos adultos. *Anopheles albimanus, An. albimanus, An. vestitipennis en México. Acta Zool. Méx.* 2:1-12.
- Hoffman CH. 1932. On *Anopheles pseudopunctipennis* and its relation to malaria in Mexico. *South Med J* 25:523-528.
- Juárez-Sandoval JA. 1994. Bionomía del vector de la Malaria *Anopheles vestitipennis* Dyar and Knab (Diptera:Culicidae) en la cuenca del río polochic Alta Verapaz, Guatemala. *Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.*
- Kain KC, Brown AE, Webster HK, Wirtz RA, Keystone JS, Rodríguez MH, Kinahan J, Rowland M, Lanar DE, 1992a. Circumsporozoite genotyping of global

isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. *J Clin Microbiol* 30:1863-1866.

Kain KC, Wirtz RA, Fernández I, Franke ED, Rodríguez MH, Lanar DE, 1992b. Serologic and genetic characterization of *Plasmodium vivax* from whole blood impregnated filter paper discs. *Am J Trop Med Hyg* 46:473-479.

Kettle DS. 1992. Medical and Veterinary Entomology. CAB international. Wallingford Oxon 658 pp.

Kitzmiller JB, Frizzi G, Baker RH. 1967. Evolution and speciation within the *Maculipennis* complex of the genus *Anopheles*. Pag 151-210. In Wright JW and Pal (eds). Genetics of insect disease vectors. Elsevier Amsterdam, London and New York.

Kitzmiller JB. 1977. Chromosomal differences among species of *Anopheles* mosquitoes. *Mosquito Systematics*. 9:112-123.

Knight KL, Stone A. 1977. "A catalog of the Mosquitoes of the Worlds (Diptera:Culicidae)" *Entomological Society of America*. Baltimore, Maryland.

Knight KL. 1978. "Supplement to a catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera:Culicidae)" *Entomological Society of America*. Baltimore, Maryland.

Kumm HW, Komp WHW, Ruiz H. 1940. The mosquitoes of Costa Rica. Rep. *Am J Trop Med* 20:385-422.

Kumm HW, Ram LM -1941--Observation on the *Anopheles* of British Honduras. *Am. J. Trop. Med.* 21:556-559.

- Lane J. 1949. Anophelines of the neotropical region. Pp 399-418. *In Boyd MF (ed) Malariaology W. B. Saunder, Philadelphia and London.*
- Lewontin EC. 1984. Detecting population differences in quantitative characters as opposed to gene frecuencies. *Am Nat.* 123:115-124.
- Loyola GE, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH, Bown DN, Vaca Marín MA. 1991. *Anopheles vestitipennis*, the probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon forest of Chiapas, Mexico. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine.* 85:171-174.
- Mattingly PF. 1977. Names of the *Anopheles gambiae* Complex. *Mosquito Systematics.* 9:323-328.
- Macdonald G. 1957. The epidemiology and control of Malaria, *Oxford University Press, London.*
- Mekuria Y, Granados R, Tidwell MA, Williams DC, Wirtz RA, Roberts DR. 1991. Malaria transmission potential by *Anopheles* mosquitoes of Dajabon, Dominican Republic. *J. of the American Mosquito Control Association.* 7:456-461.
- Murillo-Sánchez MH 2001. Variabilidad genética de subpoblaciones de *Anopheles vestitipennis* (Diptera: Culicidae) mediante el uso de RAPD-PCR. *Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.* 100p.
- Nussenzweig V, Nussenzweig RS. 1985. Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell* 42:401-403.

- OPS/OMS 1981. *Malaria en las Americas. III Reunión de Directores de los servicios nacionales de erradicación de la malaria en las Américas. Oaxtepec, Morelos, México. 153 pp.*
- OPS/Washington. *Situación de los programas de malaria en las Américas 1995.*
- Orozco-Bonilla A. 1994. *Morfología de las etapas en larvas de IV estadio, pupa, y adulto de Anopheles (Anopheles) vestitipennis. Dyar & Knab, 1906 (Diptera.Culicidae) en el Sur de Chiapas, México. Tesis. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México. 54p.*
- Orozco-Bonilla A, Ulloa A, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH 2001. *Morphological differences among Anopheles vestitipennis populations. The 67th Annual Meeting of the AMCA. Dallas Texas.*
- Padilla N, Molina P, Juárez J, Bown D, Córdón-Rosales C. 1992. *Potential malaria vectors in northern Guatemala. J. of the American Mosquito Control Association. 8:307-308.*
- Pan American Health Organization 1991. *Status of malaria programs in the Americas XXXIX Report. Pan American Health Organization, Washington, DC.*
- Qari SH, Goldman IF, Povoas MM, Oliveira S, Alpers MP, Lal AA, 1991. *Wide distribution of the variant form of the human malaria parasite Plasmodium vivax. J Biol Chem 266:16297-16300.*
- Ramsey JM, Bown DN, Aron J, Beaudoin, Méndez J. 1986. *Field trial of a rapid detection method for malaria in anopheline vectors with low infection rates in Mexico. Am J Trop Med Hyg 35:234-238.*

- Reid JA, Knight KL. 1961. Classification within the subgenus *Anopheles* (Diptera:Culicidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 55:474-488.
- Roberts DR, Alecrim WD, Tavares AM, McNeill KM. 1983. Field observations on the gonotrophic cycle of *Anopheles darlingi* (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomology* 20:189-192.
- Roberts DR, Chan O, Pecor J, Rejmankova E, Manguin D, Polanco J, Legters L.J. 1993. Preliminary observations on the changing roles of malaria vectors in southern Belize. *J. of the American Mosquito Control Association* 9:456-459.
- Roberts DR, Laughlin LL, Hsueh P, Legters LL. 1997. DDT Global strategies, and a malaria control crisis in south America. *Emerg. Infect. Dis.* 3:295-302.
- Rodríguez MH, Loyola EG. 1989. Situación epidemiológica actual y perspectivas de la investigación entomológica del paludismo en México. Memorias del IV Simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria, Oaxtepec, Mor. *Sociedad Mexicana de Entomología.* 15-40 pp
- Rodríguez MH, Chavez B, Orozco A, Loyola EG, Martínez-Palomo A. 1992. Scanning electron microscopic observations of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) eggs. *J. Med. Entomol.* 29:400-406.
- Rodríguez MH, Chavez B, Hernández-Avila JE, Orozco A, Arredondo-Jimenez JI. 1999. Description morphometric analysis of the eggs of *Anopheles* (*Anopheles*) *vestitipennis* (Diptera:Culicidae) from Southern Mexico. *J Med. Entomol* 36:78-87.
- Rodríguez MH, Gonzalez-Ceron L, Hernández JE, Nettel JA, Villarreal C, Kain KC, Wirtz RA. 2000. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus*

and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 62:122-127.

Rosenberg R, Wirtz R.A, Lanar D.E, Sattabongkot J, Hall T, Waters A.P, Prassittisuk. 1989. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* 245:308-316.

Russell PF, Rozeboom LE, Stone A. 1943. Keys to the Anopheline mosquitoes of the world with notes on their identification, distribution, biology, and relation to malaria. *Am Entomol Soc and Acad Nat Cienc Philad* 152 p.

Stone A, Knight KL, Starcke H. 1959. "A synoptic catalog of the mosquitoes of the World (Diptera:Culicidae)" *Entomological Society of America*. Washington D. C.

Torre-Bueno JR. 1989. The Torre-Bueno Glossary of Entomology. *The New York Entomological Society* 840 pp.

Vargas L, Casis G, Earle W. 1941. *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald, a vector of malaria in México. *Am. J. Trop. Med.* 21: 779-788.

Vargas L, Martínez-Palacios A. 1956. Anofelinos mexicanos taxonomía y distribución. *Secretaría de Salubridad y Asistencia. Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo*. México D. F.

Vargas L. 1958. Nuevos datos de la distribución de anofelinos mexicanos. *Bol. Epidemiol. (Mex)* 32:33-56.

Vargas L. 1976. Nueva Lista de especies de *Anopheles* de México (Culicidae:Diptera). *Revista de Investigación en Salud Pública* 18:87-91.

- Wernsdorfer WH. 1980. The importance of malaria in the World pp. 1-93 in volume I, Malaria, J.P. (ed), *Academic Press, New York*.
- White GB. 1974. *Anopheles gambiae* complex and disease transmission in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68:278-298.
- White GB. 1977. The place of morphological studies in the Investigation of *Anopheles* species complexes. *Mosquito Systematics*. 9:1-24.
- Wilkerson RC, Peyton EL. 1990. Standardized nomenclature for the costal wing spots of the genus *Anopheles* and other spotted-wing mosquitoes (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol* 27:207-224.
- Wilkerson RC, Strickman D. 1990. Illustrated key to the female anophelinae mosquitoes of Central America and Mexico. *J. of the American Mosquito Control Association* 6:7-34.
- World Health Organization. 1963. Terminology of malaria and of malaria eradication, Monograph Series No. 13 Geneva.
- World Health Organization. 1987. Vector bionomic in the epidemiology and control of Malaria. Part II. VBC/88.5
- World Health Organization. 1998. Malaria epidemics: Detection and control Forecasting and prevention. *WHO/MAL/98.1084*

Tabla 1.- Especies de *Anopheles* reportadas en México.

Vargas & Martínez-Palacios (1956)	Vargas (1976)	Wilkerson et al. (1990)
<i>An. albimanus</i>	<i>An. albimanus</i>	<i>An. albimanus</i>
<i>An. apicimacula</i>	<i>An. apicimacula</i>	<i>An. apicimacula</i>
<i>An. argyritarsis</i>	<i>An. argyritarsis</i>	<i>An. argyritarsis</i>
<i>An. aztecus</i>	<i>An. aztecus</i>	<i>An. aztecus</i>
<i>An. barberi</i>	-	-
<i>An. bradleyi</i>	<i>An. bradleyi</i>	<i>An. bradleyi</i>
<i>An. crucians</i>	<i>An. crucians</i>	<i>An. crucians</i>
<i>An. darlingi</i>	<i>An. darlingi</i>	<i>An. darlingi</i>
<i>An. eiseni</i>	<i>An. eiseni</i>	<i>An. eiseni</i>
-	<i>An. evansae</i>	-
<i>An. freeborni</i>	<i>An. freeborni</i>	<i>An. freeborni</i>
-	-	<i>An. franciscanus</i>
<i>An. fusti</i>	-	<i>An. fusti</i>
<i>An. gavaldoni</i>	<i>An. gavaldoni</i>	- <i>An. gavaldoni</i>
<i>An. hectoris</i>	<i>An. hectoris</i>	<i>An. hectoris</i>
-	<i>An. intermedius</i>	-
-	<i>An. judithae</i>	<i>An. judithae</i>
- <i>An. neivai</i>	<i>An. neivai</i>	<i>An. neivai</i>
<i>An. neomaculipalpus</i>	<i>An. neomaculipalpus</i>	<i>An. neomaculipalpus</i>
<i>An. parapunctipennis parapunctipennis</i>	<i>An. parapunctipennis parap.</i>	<i>An. parapunctipennis parap.</i>
<i>An. pseudopunctipennis pseudopunctipennis.</i>	<i>An. pseudopunctipennis ps.</i>	<i>An. pseudopunctipennis ps.</i>
<i>An. pseudopunctipennis willardi</i>	<i>An. pseudopunctipennis willardi</i>	-
<i>An. punctimacula</i>	<i>An. punctimacula</i>	<i>An. punctimacula</i>
<i>An. punctipennis</i>	<i>An. punctipennis</i>	<i>An. punctipennis</i>
<i>An. quadrimaculatus</i>	<i>An. quadrimaculatus</i>	<i>An. quadrimaculatus</i>
<i>An. strodei</i>	-	<i>An. strodei</i>
-	-	<i>An. veruslanei</i>
<i>An. vestitipennis</i>	<i>An. vestitipennis</i>	<i>An. vestitipennis</i>
<i>An. walkeri</i>	-	<i>An. walkeri</i>
<i>An. xelajuensis</i>	<i>An. xelajuensis</i>	<i>An. xelajuensis</i>
	<i>An. mediopunctatus</i>	

La especie *An. hermsi* ha sido sugerida a esta lista (COPE 1989, Kunz et al. 1989).



Figura 1.1.- Distribución del paludismo en el Mundo.



Figura 2.- Tres regiones epidemiológicas de paludismo en México

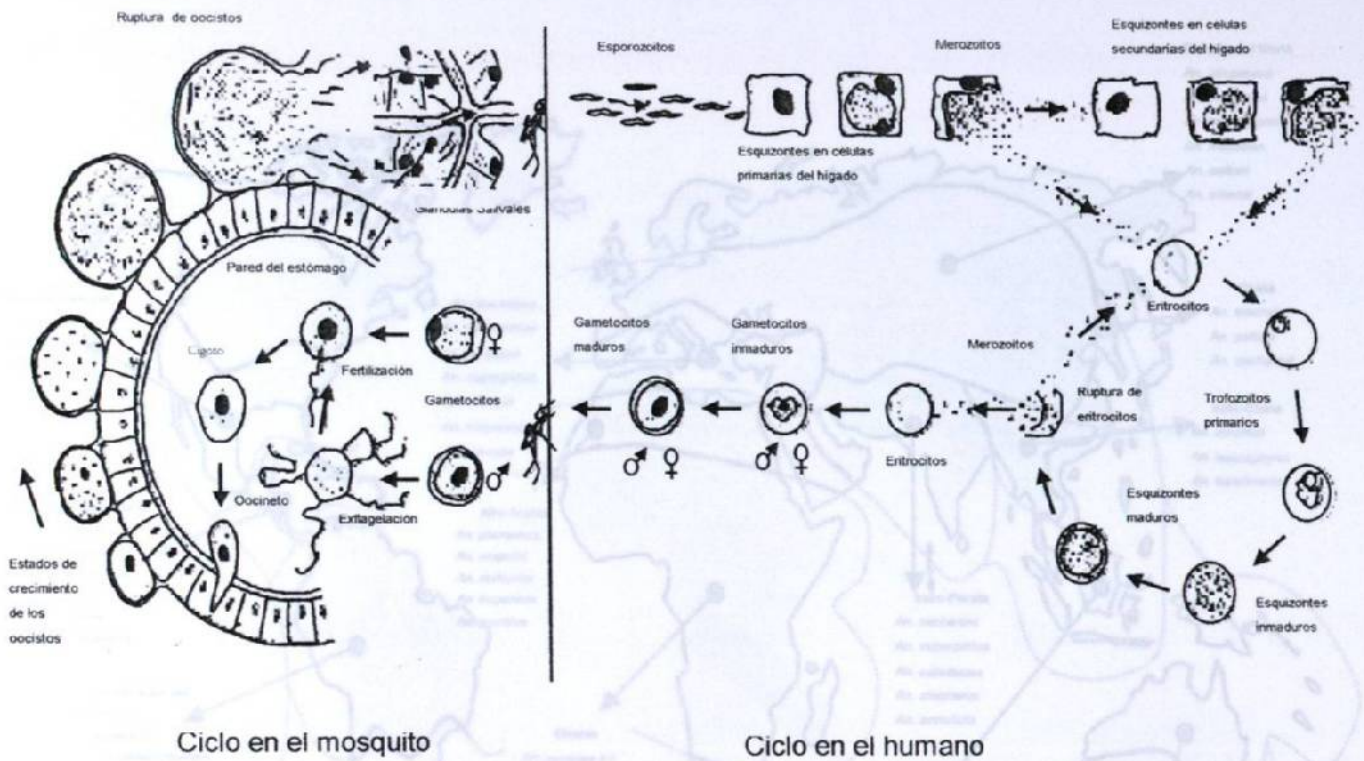


Figura 3.- Ciclo de vida del *Plasmodium vivax* en el mosquito y en el hospedero humano (WHO 1963)

Figura 4.- Zonas epidemiológicas del paludismo en el Mundo

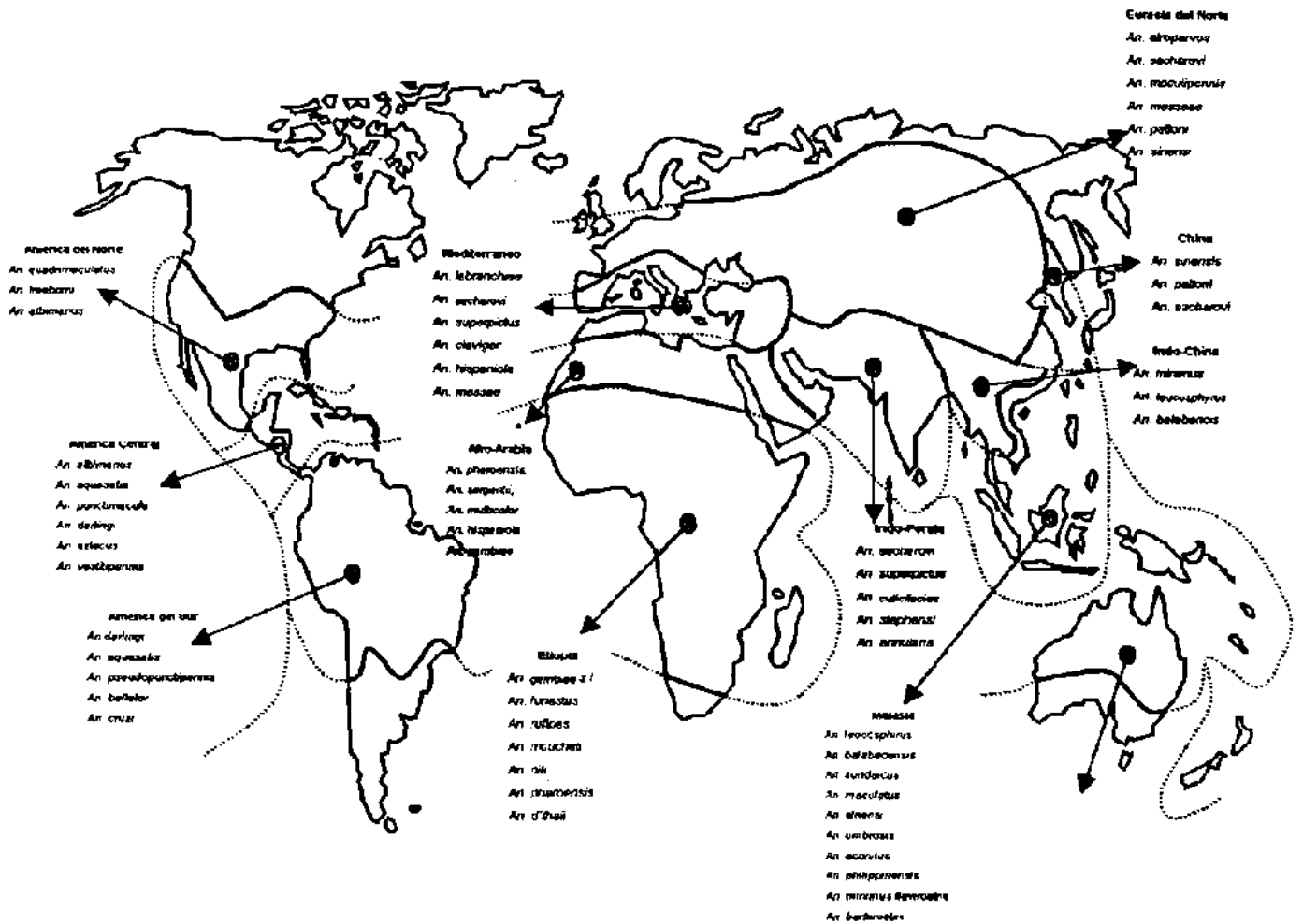


Figura 4.- Zonas epidemiológicas del paludismo en el Mundo

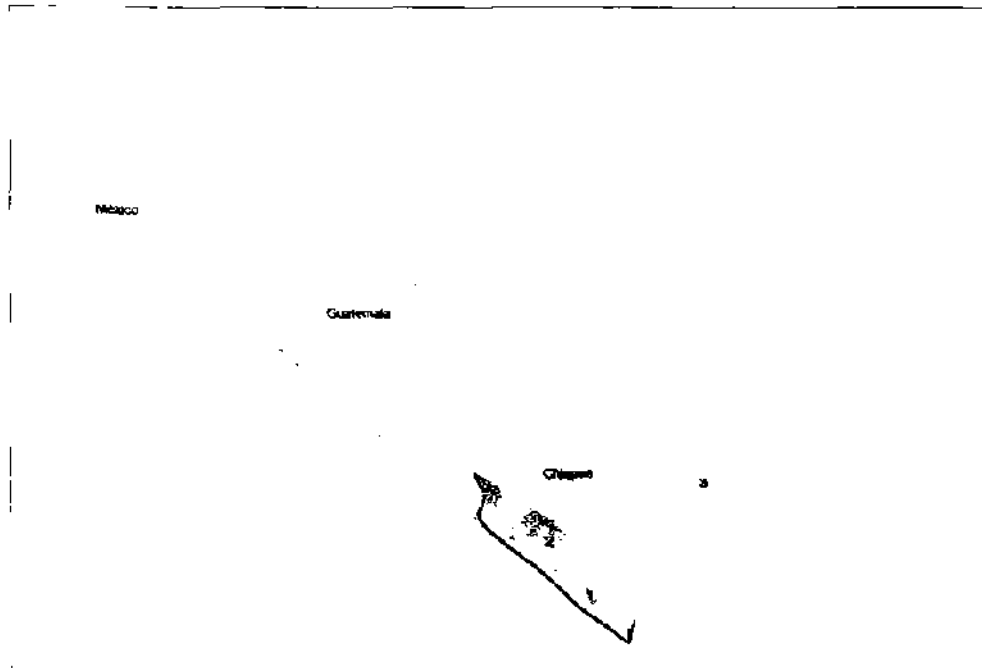


Figura 5.- Tres áreas epidemiológicas del paludismo en Chiapas

1) Plano costero; 2) Pie de Monte; 3) Selva Lacandona.



Figura 6.- Distribución de *Anopheles vestitipennis* en las Américas.

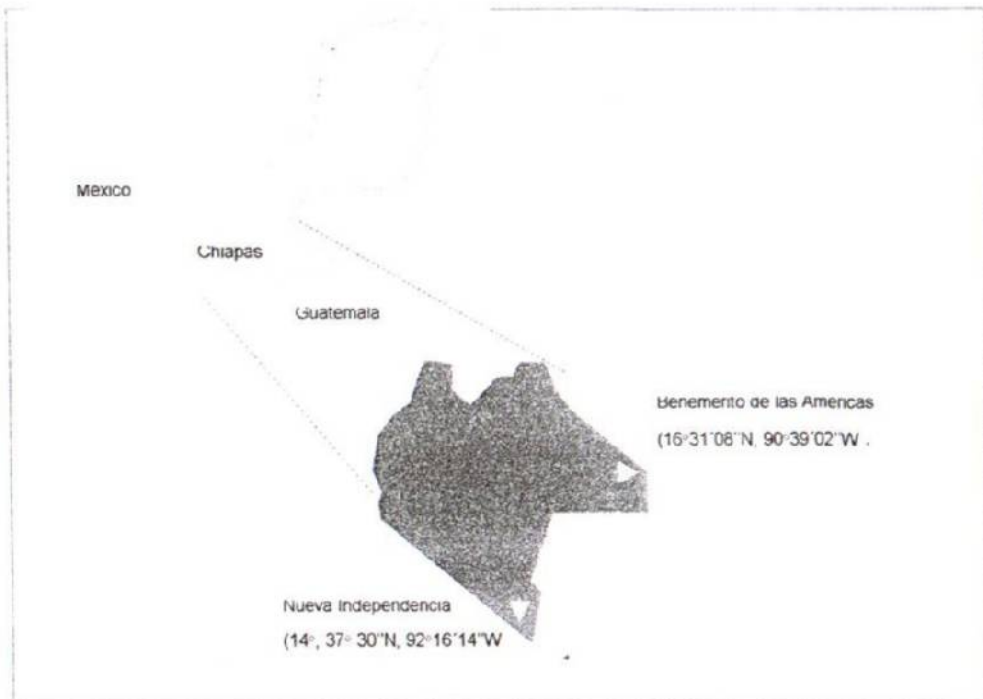


Figura 7.- Area de estudio.

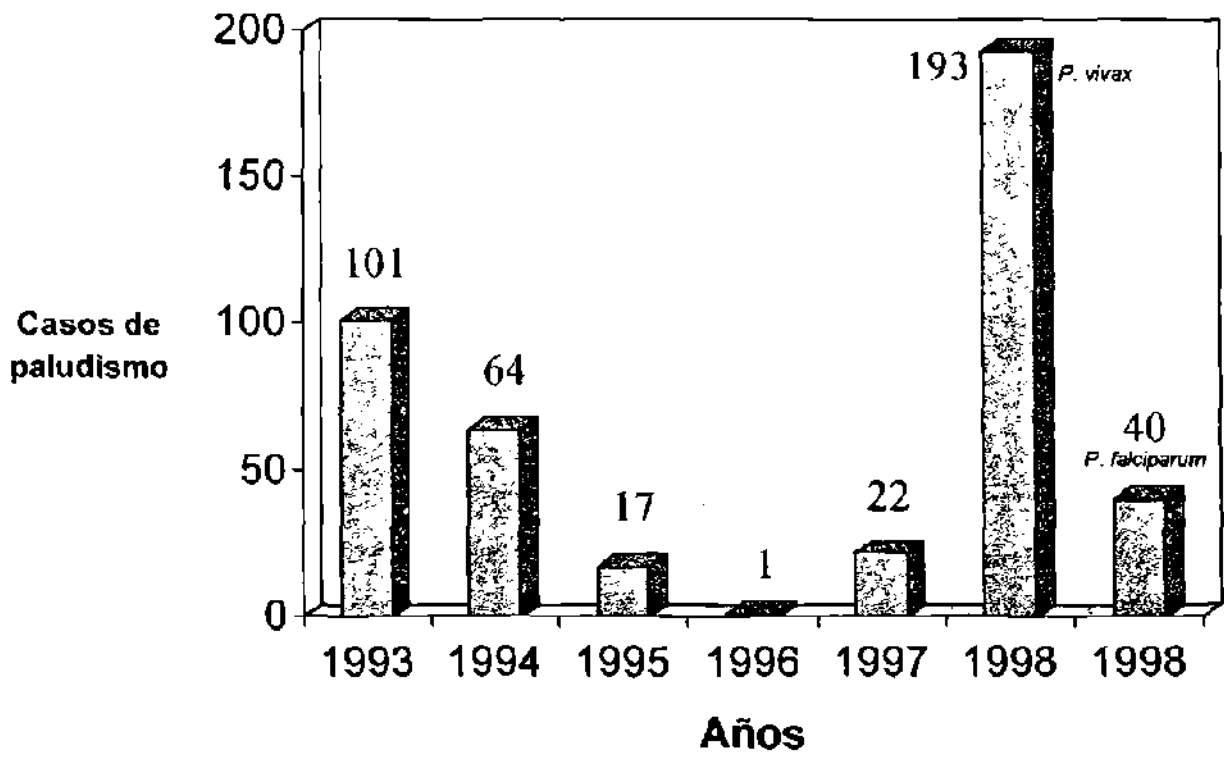


Figura 8.- Casos reportados de paludismo en la comunidad de Benemérito de las Américas, desde el año de 1993, diagnosticado por el hospital de seguro social de la comunidad.

CAPITULO 1

Estimación del ciclo gonotrófico y sobrevivencia de dos poblaciones simpátricas de *Anopheles vestitipennis* (Diptera: Culicidae)

RESUMEN.

La longitud del ciclo gonotrófico y sobrevivencia de 2 poblaciones simpátricas de *An. vestitipennis* fueron calculados mediante el método de análisis de series de tiempo de autocorrelaciones cruzadas y fórmula de Davidson respectivamente. Las estimaciones demostraron diferencias en el ciclo gonotrófico entre las 2 poblaciones estudiadas. Siendo de 3 días para mosquitos de la población zoofílica y de 4 días para mosquitos de la población antropofílica. Adicionalmente se encontraron diferencias en la tasa de sobrevivencia diaria en las dos poblaciones siendo ligeramente más alta en la población zoofílica. Por último, se encontraron diferencias en el tiempo requerido para el desarrollo oogénico entre las dos poblaciones, siendo de 54 horas para hembras de la población zoofílica y de 60 horas para hembras de la población antropofílica.

INTRODUCCION.

Anopheles vestitipennis es el anofelino más prevalente y la única especie infectada con *Plasmodium vivax* Grassi y Feletti en la Selva Lacandona, Chiapas (Loyola *et al.* 1991, Arredondo-Jiménez 1995). Padilla *et al.* (1992) reportaron a *An. vestitipennis* infectado con *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* Welch en Alta Verapaz departamento de Guatemala. En algunas comunidades del plano costero de Chiapas, se ha reportado que *An. vestitipennis* es una especie prevalente durante todo el año. Sin embargo, su participación en la transmisión de paludismo aún no ha sido confirmada (Arredondo-Jiménez 1995).

Recientemente, se ha sugerido que poblaciones de *An. vestitipennis* capturados en hospederos humanos y hospederos animales presentan diferencias en su conducta de alimentación, una que prefiere alimentarse de humanos (población antropofílica) y otra que prefiere alimentarse de animales (población zoofílica). Por medio de análisis isoenzimáticos se demostró la existencia de diferencias genéticas significativas entre mosquitos capturados con los dos métodos (Arredondo-Jiménez 1996, Murillo 2001). Estas observaciones sugirieron la posible existencia de dos subpoblaciones genéticamente diferentes con específica preferencia de hospederos.

La existencia de subpoblaciones que prefieren alimentarse sobre humanos, provee una importante implicación sobre la participación de esta especie en la transmisión de paludismo y su control (Mutero y Birley 1987, Rodríguez *et al.* 1999).

Estas dos formas conductuales de *An. vestitipennis* han puesto en duda su estatus taxonómico como una sola especie. Históricamente, la demostración de diferencias biológicas, ecológicas y etológicas entre poblaciones de mosquitos, proporcionan la base para la identificación de especies sibilinas en mosquitos vectores (Apperson y Lanzaro 1991, Charlwood 1996).

Aunque a la fecha *An. vestitipennis* no se incrimina como vector potencial de paludismo en el área de la zona del plano costero de Chiapas, es importante evaluar los factores ecológicos y epidemiológicos que pudieran determinar en su momento la transmisión local del paludismo. Una evaluación cuantitativa de aquellos parámetros es crucial para planificar apropiadas estrategias de control (Aniedu et al. 1989).

ANTECEDENTES

Dos de los más importantes componentes de la capacidad vectorial y factores en la determinación de la transmisión de paludismo en cualquier localidad, es el ciclo gonotrófico y tasa de sobrevivencia de los vectores locales (Birley y Boorman 1982, Birley 1984, Mutero y Birley 1987). El primer factor determina la frecuencia del contacto vector-hospedero (Rodríguez *et al.* 1992), mientras que el segundo factor determina la estabilidad de las poblaciones de mosquitos y su total producción de huevos (Miller *et al.* 1973). Este factor también es considerado el más importante en el cálculo de la esperanza media de vida infectiva del vector (Macdonald 1957; Bruce-Chwatt 1985).

El parámetro que normalmente se usa para estimar la tasa de sobrevivencia en el curso de cada ciclo gonotrófico en una población con una estructura de edad estable es la tasa de paridad (mosquitos con al menos un evento de oviposición en su vida), (Davidson 1954, Macdonald 1957). Mientras, que la longitud del ciclo gonotrófico puede ser estimada mediante la longevidad fisiológica del vector (Detinova 1962, Rodríguez *et al.* 1992).

HIPÓTESIS

Diferencias en algunos parámetros entomológicos entre las dos poblaciones propuestas de *Anopheles vestitipennis* será una evidencia de una posible formación de un complejo de al menos dos especies, con diferentes preferencias alimenticias.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la longitud del ciclo gonotrófico y sobrevivencia de las dos poblaciones de *An. vestitipennis* como una evidencia de la existencia de divergencias biológicas entre las dos poblaciones.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Determinar el tiempo de desarrollo de la vitelogénesis de hembras de *An. vestitipennis* colectadas sobre hospedero humano y animal.

Determinar la tasa de pregravidéz en hembras de *An. vestitipennis* colectadas sobre hospederos y animal.

METODOLOGIA

Descripción del área de estudio.

Los estudios de campo fueron realizados en una comunidad cercana a la Ciudad de Tapachula, denominada Nueva Independencia municipio de Suchiate, a una altitud de 0-50 msnm y latitud de 14°37'30'' N 92 ° 16'14''W (Figura 1.1). Nueva Independencia tiene una población de 107 personas viviendo en 23 casas (53% de las personas adultas y 47% de las personas menores de 18 años), es un poblado que no cuenta con luz eléctrica. Las casas están construidas con material de la región, techo de palma y paredes de otate. Es un clima cálido subhúmedo con una temperatura media anual de 27 °C, con una precipitación de 2100 mm y humedad relativa de 61-100%. Los estudios de laboratorio se realizaron en el insectario del Centro de Investigación de Paludismo, ubicado en la Ciudad de Tapachula, Chiapas.

Estimación de la longitud del ciclo gonotrófico.

Se realizaron colectas de mosquitos usando dos trampas modificadas tipo Magoon colocadas a 5 m de distancia entre cada una (Service 1993, Fernández-Salas *et al.* 1993). En una de ellas se expuso a un caballo y en la otra se expuso a dos hospederos humanos (la diferencia en el número de humanos fue para igualar el área corporal del animal). Cada trampa estaba levantada aproximadamente 30 cm del suelo para permitir la entrada de los mosquitos. Las colecciones de mosquitos en las trampas cebadas con el hospedero animal y humanos, fueron realizadas por voluntarios, quienes colectaron a todas las hembras de *An. vestitipennis* sin alimentar, que se encontraban reposando sobre la pared interna de la trampa, con la ayuda de aspiradores bucales (World Health Organization 1975, Bown *et al.*, 1987). En las trampas con el animal las capturas fueron realizadas durante los últimos 15 minutos de cada hora. Mientras que en las trampas con humanos las capturas fueron realizadas durante 45 minutos de cada hora, ambas colectas fueron realizadas por periodos de 6 horas (18:00-24:00 h).

En cada día se colectaron un máximo de 50 hembras sin alimentar, los cuales fueron transportados al Centro de Investigación de Paludismo (CIP), en donde fueron disectados para observar la condición de las traqueolas ováricas mediante la técnica de Detinova (1962). Al término de los quince días de colecta se determinaron los cambios diarios en la estructura de edad (paridos-nulíparos).

Con los datos de paridad diaria obtenida en ambas poblaciones se estimó la longitud del ciclo gonotrófico mediante el análisis de correlaciones cruzadas (Birley y Rajagopalan 1981) descrita con la fórmula $M_t = P_u T_{(t-u)}$ donde M es el número de mosquitos paridos capturados en el día t; $T_{(t-u)}$ es el número total de hembras (nulíparos y paridos) capturados en el día t-u; u es la longitud del ciclo gonotrófico; y P es la tasa de sobrevivencia por ciclo gonotrófico, calculada de la pendiente de un modelo de regresión. Los datos fueron filtrados para eliminar correlaciones cruzadas significativas falsas por usar un proceso autoregresivo con un tiempo de retraso de un día (log u) con $z_t = x_t - \alpha \cdot x_{t-1}$, donde x_t es la serie de tiempo a ser filtrada y α es el parámetro autoregresivo estimado (Holmes y Birley 1987). Una correlación cruzada entre 2 series de tiempo filtrados M_t y $X_{(t-u)}$ con una correlación r significativa, correspondió a un log u equivalente al ciclo gonotrófico, con pico regular en el inicio de cada ciclo.

Estimación de la sobrevivencia.

Se estimó la tasa de sobrevivencia diaria de *Anopheles vestitipennis* de cada población con la fórmula de Davidson (1954), la raíz de la tasa de paridad elevada al valor de la longitud del ciclo gonotrófico ($\sqrt[\text{ciclo}]{\text{paridad}}$). Para la población zoofilca se tomó la raíz cúbica del promedio de paridad (82) debido a que el ciclo gonotrófico fue completado en 3 días. Mientras que para la población antropofilca se tomó la raíz cuarta del promedio de paridad (64) debido a que el ciclo gonotrófico de esta población se completo en 4 días.

Estimación del tiempo del desarrollo de la vitelogénesis.

La duración del desarrollo oogénico fue obtenida en mosquitos que fueron colectados en campo. Se realizaron colectas de mosquitos usando dos trampas modificadas tipo Magoon colocadas a 5 m de distancia entre cada una (Service 1993, Fernández-Salas *et al.* 1993). En una de ellas se expuso a un caballo y en la otra se expuso a dos hospederos humanos (la diferencia en el número de humanos fue para igualar el área corporal del animal). Cada trampa estaba levantada aproximadamente 30 cm del suelo para permitir la entrada de los mosquitos.

Las colecciones de mosquitos en las trampas cebadas con el hospedero animal y humanos, fueron realizadas por voluntarios, quienes colectaron con la ayuda de aspiradores bucales a todas las hembras de *An. vestitipennis* sin alimentar, que se encontraban reposando sobre la pared interna de la trampa, (World Health Organization 1975, Bown *et al.* 1987). En las trampas con el animal las capturas fueron realizadas durante los últimos 15 minutos de cada hora. Mientras que en las trampas con humanos las capturas fueron realizadas durante 45 minutos de cada hora, ambas colectas fueron realizadas por periodos de 6 horas (18:00-24:00 h). Los mosquitos colectados en cada trampa fueron colocados por separados en contenedores individuales. Al término del periodo de colecta los mosquitos de cada lote fueron alimentados simultáneamente con sangre del hospedero respectivo y fueron transportados del centro de investigación de paludismo, en donde se colocaron bajo condiciones de insectario con una temperatura promedio de 23.5°C (rango=22-25 °C) y humedad promedio de 79% (rango=78-80%). A cada lote de mosquitos se les proveyó una solución de sacarosa al 10% a través de un algodón húmedo.

Antes de iniciar el experimento (correspondiente a la hora cero), se disectó una muestra de 10 hembras no alimentadas de cada población para conocer la condición del desarrollo de los huevos (Estados de Christopher) (Detinova 1962). Posteriormente, a partir de las 12 horas después de la alimentación y continuando

por periodos de 6 horas, una muestra de 10 mosquitos fueron examinados visualmente registrando la fase de la digestión sanguínea mediante la técnica de Sella (OMS 1975). Después los mismos mosquitos se le disectó para registrar los estados de Christopher (Christopher 1960, Detinova 1962), el proceso de examinación y disección se desarrolló hasta que las hembras presentaron estados de Sella 6 y Christopher 5 (estado grávido).

Para determinar el efecto de la fuente sanguínea sobre el tiempo de desarrollo oogénico, se realizó un experimento por separado en donde a los mosquitos de cada población se les cambió la fuente sanguínea, es decir, a los mosquitos colectados en humanos se les proporcionó sangre animal y a los colectados en animal sangre humana, el seguimiento de desarrolló oogénico fue con la metodología antes descrita.

Cálculo de la tasa de pregravidéz.

De las muestras de mosquitos que se disectaron durante la determinación de la oogénesis, se registraron aquellas hembras que no se desarrollaron más allá de los estados de Christopher 2 ó 2^o después de las 18 horas, a estos mosquitos se les reportó como mosquitos pregrávidas (Gillies 1954).

Análisis de datos

El ciclo gonotrófico fue estimado mediante el análisis de series de tiempo de autocorrelaciones (Birley y Rajagopalan 1981), mientras que la tasa de sobrevivencia diaria se estimó mediante el método vertical de Davidson (1954). Diferencias en las proporciones de capturas fueron analizadas mediante una prueba de Chi cuadrada con corrección (Zar 1999).

RESULTADOS

Tasa de paridad.

Las tasas de paridad diaria de *An. vestitipennis* en las dos poblaciones estudiadas se exponen en la tabla 1.1 y figura 1.2. En la población zoofílica, la tasa de paridad más baja fue de 47% registrada en el último día de colecta siendo significativamente diferente a la más alta de 97% reportada en el día once de colecta ($X^2 = 57.282$ $P = 0.0001$). En la población antropofílica también hubo diferencias significativas entre la tasa de paridad más baja de 28% registrada en el último día de colecta y la tasa de paridad más alta de 89% presentada en el día ocho de colecta ($X^2 = 74.143$ $P = 0.0001$)

Durante el estudio, la tasa de paridad promedio para la población zoofílica fue de 82 ± 13.52 %; rango 47-97%, mientras que para la población antropofílica fue de 64 ± 19.82 %; rango 28-89%, encontrándose diferencias significativas ($X^2 = 7.331$ $P = 0.0068$).

Longitud del ciclo gonotrófico.

En la tabla 1.2, se presentan los coeficientes de correlación que estimaron los ciclos gonotróficos y tasa de sobrevivencia en cada población. Para la población zoofílica se observó un coeficiente de correlación de 0.167 en el día 3, pero éste no fue estadísticamente significativo. Al someter los datos originales a un proceso de filtración mediante la incorporación de una regresión lineal (Holmes y Birley 1987), el coeficiente de correlación se incrementó a 0.292 pero sin ser estadísticamente significativo. Sin embargo, los coeficientes de correlación presentaron un incremento cada tercer día, por lo que la duración del ciclo gonotrófico fue estimado en 3 días (Figura 1.3). En el análisis de correlación con datos originales sin filtrar de la población antropofílica, ningún coeficiente resultó ser significativo. Sin embargo, cuando los datos fueron filtrados, los nuevos valores de los coeficientes fueron más altos, de los cuales el valor obtenido al día 4 fue el más alto y más significativo (0.918), repitiéndose esta observación a los

siguientes 4 días. Por tanto, esta observación sugirió que la longitud del ciclo gonotrófico para la población antropofílica fue de 4 días (Figura 1.3).

Tasa de sobrevivencia.

Los resultados de las disecciones diarias de *An. vestitipennis* de las dos poblaciones se exponen en las tablas 1.3 y 1.4 respectivamente. En la tabla 1.3 y figura 2.5 se observa que hembras nulíparas de la población zoofílica presentaron fluctuaciones mínimas indicando poca pero constante retroalimentación de mosquitos jóvenes hacia esta población. Mientras que en la tabla 1.4 y figura 1.6 se observó que las fluctuaciones de la estructura de edad de las hembras nulíparas en la población antropofílicas fueron más elevadas indicando una mayor y constante retroalimentación de hembras recién emergidas hacia esta población. La estimación de la sobrevivencia para mosquitos de la población zoofílica se calculó en 0.93. Mientras que para mosquitos de la población antropofílica fue calculada en 0.88, sin observarse diferencias significativas (>0.05) (Tabla 1.5).

Vitelogénesis.

Un total de 120 hembras de cada población fueron mantenidas en condiciones de laboratorio y examinadas en intervalos de 6 horas para registrar la progresión del desarrollo oogénico. El desarrollo oogénico en la población antropofílica generalmente tomó más tiempo que la población zoofílica. En la población zoofílica el 70% de las hembras fueron clasificadas en Christopher 5 a las 54 horas posalimentación, completándose el 100% a las 60 horas (Tabla 1.6). Mientras que en la población antropofílica, sólo el 20% de las hembras fueron clasificadas en Christopher 5 a las 60 horas, incrementándose a 30%, 90% y 100% a las 66, 72 y 78 horas, respectivamente

El desarrollo oogénico con mosquitos alimentados con sangre diferente, presentaron los mismos tiempos mínimos reportados en poblaciones alimentadas con sangre del hospedero en donde fueron colectados. Sin embargo, las proporciones de mosquitos que complementaron la oogénesis fueron variables. En

mosquitos zoofílicos alimentados con sangre humana, sólo el 10% de las hembras fueron clasificadas en Christopher 5 a las 54 horas posalimentación, completándose el 100% hasta las 78 horas (Tabla 1.8). Mientras, que en mosquitos antropofílicos alimentadas con sangre animal, el 30% fueron clasificadas en Christopher 5, a las 60 horas, completándose el 100% a las 72 horas (Tablas 1.9).

Tasa de pregravidéz.

En el seguimiento del desarrollo oogénico de las hembras zoofílicas se observó que sus ovarias avanzaron más allá del estado de Christopher 2, por lo que de los 120 mosquitos usados, ninguno presentó estado de pregravidéz (Tabla 1.6). Sin embargo, en las hembras de la población antropofílica después de las 18 horas y hasta las 72 horas, 19 mosquitos no avanzaron después de Christopher 2 ó 2'', por lo que la tasa de pregravidéz fue calculada en 16% (19/120) para esta población (Tabla 1.7). Este mismo evento fue observado en mosquitos de cada población alimentadas con sangre diferente, la población zoofílica no presentó pregravidéz (Tabla 1.8), mientras que la población antropofílica presentó el 19% (23/120) de pregravidéz (Tabla 1.9).

DISCUSIÓN

Las dos poblaciones de *An. vestitipennis* con diferentes preferencias alimenticias, demostraron heterogeneidad en la estructura de edad (tasa de paridad). En Tailandia, en estudios con la especie *An. minimus* se encontraron que dos poblaciones con diferentes preferencias alimenticias presentaron heterogeneidad en la estructura de edad, con este criterio se sugirió que dentro de esta especie, existe una mezcla de dos o más especies crípticas (Suthas *et al.* 1986 a,b). Esta heterogeneidad puede ser resultado de la existencia de un polimorfismo genético asociado a la selección de hospederos (Suthas *et al.* 1986 b).

En el cálculo del ciclo gonotrófico de la población zoofílica, se observó que en ningún coeficiente de correlación resultó ser significativo con datos sin filtrar y datos filtrados (Mutero y Birley 1987). En estas circunstancias, el criterio de Bockarie *et al.* (1995), considera que la evidencia más clara de la duración de la longitud del ciclo gonotrófico es la existencia de picos pronunciados (altos coeficientes de correlación) seguidos de otros picos en el mismo intervalo de tiempo en que se presentó el primero. Por lo que siguiendo este criterio el ciclo gonotrófico de la población zoofílica fue sugerido en 3 días. El cálculo del ciclo gonotrófico de la población antropofílica se ajustó perfectamente al criterio de Mutero y Birley (1987), en el que sugiere que la longitud del ciclo gonotrófico es el valor más alto y significativo del coeficiente de correlación, sugiriéndose así que la longitud del ciclo gonotrófico en la población antropofílica fue de 4 días.

El ciclo gonotrófico y tasa de sobrevivencia diaria fueron previamente estudiados en *An. vestitipennis* mediante el método de series de tiempo, cuando esta especie se consideraba como una población uniforme. En estos estudios, el ciclo gonotrófico fue reportado en 3 días para una población nulípara colectada en animales (Arredondo-Jiménez 1998). Lo mismo en la República Dominicana, Mekuria *et al.* (1991) reportaron un ciclo gonotrófico de 3 días para una población

zoofílica de *An. vestitipennis*. Estos resultados son similares a los que se reportan en este estudio, pero para una población parida, que fue la más prevalente en este estudio (84%).

La tasa de sobrevivencia de los mosquitos vectores se considera como uno de los factores más importantes en la determinación de la transmisión del paludismo (Mutero y Birley 1987), la cual estima la estabilidad de una población de mosquitos y su producción total de huevos (Miller *et al.* 1973). El método vertical (Davidson 1954), se basa en la tasa de paridad de la población y la duración del ciclo gonotrófico. La suposición básica de este método es que la población tiene una distribución de edad estacionaria y que la mortalidad es constante con la edad (McHugh 1989). En este estudio la población zoofílica registró una tasa de sobrevivencia ligeramente más alta (0.93) que la población antropofílica (0.88), sin ser significativamente diferentes ($P > 0.05$). Las diferencias encontradas en la paridad y ciclo gonotrófico en cada población influyeron directamente en el cálculo de la sobrevivencia. En la población zoofílica una alta tasa de paridad fue afectada por un bajo ciclo gonotrófico, mientras que en la población antropofílica una baja tasa de paridad fue favorecida por un ciclo gonotrófico más alto.

Adicionalmente se encontraron diferencias en el tiempo de desarrollo oogénico entre las dos poblaciones. En la población zoofílica se registró un desarrollo oogénico de 54 horas, mientras que para la población antropofílica el desarrollo oogénico se registró 6 horas más tarde (hasta las 60 horas), en comparación al tiempo de desarrollo de la población zoofílica. Mekuria *et al.* (1991) sugirieron que el ciclo gonotrófico de mosquitos vectores puede ser calculado indirectamente, adicionando al tiempo de desarrollo oogénico un tiempo de 24 horas considerado como el tiempo requerido para localizar un sitio de oviposición, puesta de huevos y obtención de otra alimentación sanguínea. Al aplicar este criterio a nuestros datos, la estimación de la longitud del ciclo gonotrófico fueron de 3.25 días y 3.50 días para la población zoofílica y antropofílica

respectivamente, estimaciones muy similares a los obtenidos aquí con los métodos de Mutero y Birley (1987) y Bockarie *et al.* (1995).

Al cambiar la fuente sanguínea a cada población de mosquitos, se demostró que las diferencias en el tiempo de desarrollo oogénico encontradas en cada una de las dos poblaciones no fueron debido a la fuente sanguínea ingerida por los mosquitos, sino a características inherentes de cada población de mosquitos. Sugiriéndose también que las diferencias entre la longitud del ciclo gonotrófico de cada población de *An. vestitipennis*, puede ser debido al tiempo que dura la digestión sanguínea. De aquí que la población zoofílica demuestre un ciclo más corto debido a que presentan una digestión sanguínea más rápida, lo que hace que los mosquitos retornen por una nueva alimentación sanguínea en menor lapso de tiempo. Esta observación fue reportada también por Arredondo-Jiménez *et al.* (1998), quienes encontraron que el tiempo de duración del desarrollo oogénico en una población zoofílica de *An. vestitipennis* fue 42 horas

Solamente hembras de la población antropofílica presentaron el estado de pregravidéz, este evento fue observado en mosquitos que se alimentaron de sangre humana, así como cuando se les cambio el tipo de fuente sanguínea. Esta observación también sugirió que la pregravidéz se debe a factores inherentes de la población antropofílica. Desde el punto de vista de transmisión, los mosquitos que presentan el estado de pregravidéz proveen más de una vez la oportunidad infectarse durante el primer ciclo gonotrófico, incrementándose de esta manera su capacidad vectorial (Boreham y Garrett-Jones 1973).

CONCLUSIÓN

De acuerdo a nuestros resultados las dos poblaciones de *An. vestitipennis* presentan divergencias consistentes en todos los parámetros biológicos estudiados. Estos hallazgos apoyan aún más las evidencias hasta ahora encontradas que sugieren la existencia de dos poblaciones con diferencias alimenticias dentro de *An. vestitipennis*.

LITERATURA CITADA

- Aniedu I, Mutinga MJ, Mutero CM. 1989. Age composition and survival rate of *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera:Culicidae) in Baringo district, Kenya. *J. Appl. Ent.* 107:387-394.
- Apperson CS, Lanzaro GC. 1991. Comparison of host-feeding patterns between *Anopheles quadrimaculatus* sibling species A and B. *J. of the American Mosquito Control Association* 7:507-508.
- Arredondo-Jiménez JI. 1995. Comparative ecology of alipatric populations of *Anopheles* (*Anopheles*) *vestitipennis* (Diptera:Culicidae). *PhD. Dissertation, University of California, Davis.*
- Arredondo-Jiménez JI, Gimnig J, Rodríguez MH, Washino RK. 1996. Genetic differences among *Anopheles vestitipennis* subpopulations collected using different methods in Chiapas State, Southern México. *J. of the American Mosquito control Association* 12:396-401.
- Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH, Washino RK. 1998. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae) in two different ecological areas of Southern Mexico. *J. of Medical Entomology* 35:938-942.
- Birley MH, Boorman JPT. (1982). Estimating the survival and biting rates of haematophagous insects with particular references to *Culicoides obsoletos* group (Diptera:Ceratopogonidae) in southern England. *Journal of Animal Ecology.* 51:135-148.
- Birley MH, Rajagopalan PK. 1981. Estimation of the survival and biting rates of *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol.* 18:181-186.

- Birley MH. 1984. Estimation, tactics and disease transmission. Pest and Pathogen Control Strategic, Tactical and Policy Models (Ed. By G. R. Conway). Pp. 488. *Wiley ISASA International Series on Applied Systems Analysis*. 13. Chichester.
- Bockarie MJ, Service MW, Barnish G, Toure YT. 1995. Vectorial capacity and entomological inoculation rates of *Anopheles gambiae* in a high rainfall forested area of southern Sierra Leone. *Trop. Med. Parasitol.* 46:164-171.
- Boreham PFL, Garrett-Jones C. 1973. Prevalence of mixed bloodmeal and double feeding in a malaria vector (*Anopheles sacharovi* Fabre). *Bull. W.H.O.* 54:155-158.
- Bown DN, Frederickson CE, Angel-Cabañas G, Méndez J. 1987. An evaluation of bendiocarb and deltamethrin and their impact on populations of *Anopheles albimanus*. *PAHO Bull.* 22:121-135.
- Bruce-Whwatt LJ. 1985. Essential Malariology. 2nd. Ed. London. *Heineman Medical Books*.
- Charlwood JD. 1996. Biological variation in *Anopheles darlingi* Root. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 91:391-398.
- Cristopher SR. 1960. *Aedes aegypti* (L): The Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics, and structure. *Cambridge University Press, Cambridge*.
- Davidson G. 1954. Estimation of the survival rate of anopheline mosquitoes in nature. *Nature* 174:792-793.
- Delinova, TS. 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*.

- Fernández-Salas I, Roberts DR, Rodríguez MH, Rodríguez MC, Marina-Fernández CF. 1993. Host selection patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* under insecticide spraying situations in southern Mexico. *J. of the American Mosquito Control Association* 9, 375-384.
- Gillies MT. 1954. The recognition of age-groups within populations of *Anopheles gambiae* by the pre-gravid rate and sporozoite rate. 1954. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 48:58-74.
- Holmes PR, Birley MH. 1987. An improved method for survival rate analysis for time series of haematophagous dipteran population. *J. of Animal Ecology.* 56:427-440.
- Loyola GE, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH, Bown DN, Vaca-Marín MA. 1991. *Anopheles vestitipennis*, the probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon forest of Chiapas, México. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85:171-174.
- McHugh CP. 1989. Ecology of a semiisolated population of adult *Anopheles freeborni*: abundance, trophic status, parity, survivorship, gonotrophic cycle length, and host selection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:169-176.
- Macdonald G. 1957. The epidemiology and control of Malaria. London: Oxford University Press.
- Mekuria Y, Granados R, Tidwell MA, Williams DC, Wirtz RA, Roberts DR. 1991. Malaria Transmisión potential by *Anopheles* mosquitoes of Dajabon, Dominican Republic. *J. of the American Mosquito Control Association.* 7:456-461.

- Miller DR, Weildhass DE, Hall RC. 1973. Parameter sensitivity in insect population modelling. *J. Theoretical Biol.* 42:263-274.
- Mutero CM, Birley HM. 1987. Estimation of the survival rate and oviposition cycle of field populations of malaria vectors in Kenya. *J. Appl. Ecol.* 24, 853-863.
- Murillo Sánchez MH. 2001. Variabilidad genética de subpoblaciones *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae) mediante el uso de RAPD-PCR. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León. 100p.
- OMS 1975. Manual on Practical Entomology in Malaria. Part I. Vector bionomic and organization of antimalaria activities. OMS. Geneva 160 p.
- Padilla N., Molina P, Juárez J, Bown D, Cordon-Rosales 1992. Potential malaria vectors in northern Guatemala. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 8:307-308.
- Rodríguez MH, Loyola E. G. 1989. Situación epidemiológica actual y perspectivas de la investigación entomológica en México, pp. 15-40. In. *Memoria del IV Simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria*. Oaxtepec, Mor., México. Sociedad Mexicana de Entomología.
- Rodríguez MH, Bown D, Arredondo-Jiménez JI, Villarreal C, Loyola GE, Frederickson 1992. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) in Southern México. *J. Med. Entomol.* 29:395-399.
- Rodríguez MH., Chavez B, Hernández-Avila JE, Orozco A, Arredondo-Jiménez JI. 1999. Description and morphometric analysis of the eggs of *Anopheles (Anopheles) vestitipennis* (Diptera:Culicidae) from Southern México. *J. Med. Entomol.* 36:78-87.

Service MW. 1993. Mosquito Ecology: *Field Sampling Methods*. 2nd edn. Elsevier Applied Science, London.

Suthas Nutsathapana, Phorn Sawasdiwongphorn, Udom Chitprarop & Cullen, J. R. 1986a. The behavior of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera:Culicidae) subjected to differing levels of DDT selection pressure in northern Thailand. *Bull. Ent. Res.* 76, 303-312.

Suthas Nutsathapana, Phorn Sawasdiwongphorn, Udom Chitprarop & Cullen, J. R. 1986b. A mark-release-recapture demonstration of host-preference heterogeneity in *Anopheles minimus* Theobald (Diptera:Culicidae) in a Thai village: *Bull. Ent. Res.* 76, 313-320.

World Health Organization. 1975. *Manual on practical entomology Part I and II. World Health Organization, Geneva, Switzerland.*

Zar, J. H. 1999. *Bioestatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs,*

Tabla 1.1.- Paridad diaria de las dos poblaciones de *An. vestitipennis*

Días	Población zoofilica			Población antropofilica		
	Total disectados	Paridos	% paridad.	Total disectados	Paridos	% paridad.
1	26	22	84	46	28	60
2	34	30	88	45	28	62
3	26	24	92	48	29	60
4	54	34	62	43	26	60
5	50	35	70	50	43	86
6	52	49	94	46	39	84
7	49	43	87	44	37	84
8	50	43	86	47	42	89
9	50	47	94	50	31	62
10	30	23	77	28	22	78
11	34	33	97	30	19	63
12	50	45	90	48	37	77
13	50	40	80	50	18	36
14	50	40	80	48	15	31
15	36	17	47	40	11	28
Media ± DS			82 ± 13.52			64 ± 19.82

Tabla 1.2.- Valores de los coeficientes de correlación (r) que estimaron el ciclo gonotrófico de dos poblaciones simpátricas de *Anopheles vestitipennis* en Nueva Independencia, Chiapas, usando correlaciones cruzadas de series de tiempo.

Días	Población zoofílica		Población antropofílica	
	Sin filtrar	Filtrados	Sin filtrar	Filtrados
0	0.827	0.792	0.383	0.427
1	0.223	0.015	0.087	0.293
2	0.149	0.021	0.011	0.619
3	0.167	0.292	0.675	0.820
4	0.036	0.019	0.372	0.918
5	0.023	0.415	0.481	0.478
6	0.564	0.581	0.115	0.267
7	0.044	0.248	0.497	0.706
8	0.024	0.371	0.681	0.512
9	0.072	0.439	0.178	0.193
10	0.365	0.191	0.024	0.77

Tabla 1.3.- Tasa promedio de paridad diaria de *An. vestitipennis* en la población zooflílica

Días	No. Disec.	Nul.	Par.	% Paridad	T*	M*	Tasa media (M/T)
1	26	4	22	84	26	22	84
2	34	4	30	88	60	52	87
3	26	2	24	92	86	76	88
4	54	20	34	62	140	110	78
5	50	15	35	70	190	145	76
6	52	3	49	94	242	194	80
7	49	6	43	87	291	237	81
8	50	7	43	86	341	280	82
9	50	3	47	94	391	327	84
10	30	7	23	77	421	350	83
11	34	1	33	97	455	383	84
12	50	5	45	90	505	428	85
13	50	10	40	80	555	468	84
14	50	10	40	80	605	508	84
15	36	19	17	47	641	525	82

No. disec= Total diseccionado; Nul= No. nuparos; Par= No. paridos;

T*= Total disectados acumulados; M*= Total paridos acumulados

Tabla 1.4.- Tasa promedio de paridad diaria de *An. vestitipennis* en la población antropofílica.

Días	No. Disec.	Nul.	Par.	% Paridad	T*	M*	Tasa media (M/T)
1	46	18	28	60	46	28	60
2	45	17	28	62	91	56	61
3	48	19	29	60	139	85	61
4	43	17	26	60	182	111	61
5	50	7	43	86	232	154	66
6	46	7	39	84	278	193	69
7	44	7	37	84	322	230	71
8	47	5	42	89	369	272	74
9	50	19	31	62	419	303	72
10	28	6	22	78	447	325	73
11	30	11	19	63	477	344	72
12	48	11	37	77	525	381	72
13	50	32	18	36	575	399	69
14	48	33	15	31	623	414	66
15	40	29	11	28	663	425	64

No disec= Total disectado; Nul= No. Nuliparas; Par= No. paridos;

T*= Total disectado acumulados; M*=Total peridos acumulados.

Tabla 1.5. Tasa de sobrevivencia de la población zoofilica y antropofilica de *An. vestitipennis*, calculada con la formula de Davidson (1954).

Población	Tasa de paridad	Ciclo gonotrófico	TASA DE SOBREVIDA
Zoofilica	0.82	3 días	0.93
Antropofilica	0.64	4 días	0.88

Tabla 1.6. Desarrollo de la vitelogénesis de mosquitos colectados en la población zoofílica de *An. vestitipennis*.

Hora.	n	Estados de Sella						Estados de Christopher					
		1	2	3	4	5	6	I	II	III	IV	V	
0	10	100							100				
12	10		100						100				
18	10			100						100			
24	10			10	90					100			
30	10			20	40	40				50	50		
36	10				20	70	10				100		
42	10					60	40				100		
48	10						100				100		
54**	10							100				30	70
60	10							100					100
66	10							100					100
72	10							100					100
78	10							100					100

**Tiempo mínimo a Christopher V.

Tabla 1.7.- Desarrollo de la vitelogénesis de mosquitos colectados en la población antropofílica de *An. vestitipennis*.

Hora.	n	Estados de S e I I a						Estados de Christopher					
		1	2	3	4	5	6	I	II	III	IV	V	
Posalimentación													
0	10	100							100				
12	10		100						100				
18	10		90	10					100				
24	10		40	40	20				80*	20			
30	10		30	60	10				60*	40			
36	10				100					70	30		
42	10				60	40			10*	60	30		
48	10				60	30	10			20	80		
54	10		10			30	60		10*		90		
60**	10					20	80				80	20	
66	10		20			20	60		20*		50	30	
72	10		10				90		10*			90	
78	10						100						100

*Mosquitos pregrávidos.

**Tiempo mínimo a Christopher V.

Tabla 1.8.- Desarrollo de la vitelogénesis de mosquitos colectados en la población zoofílica de *An. vestitipennis* alimentados con sangre humana

Hora.	n	Estados de S e II a						Estados de Christopher					
		1	2	3	4	5	6	I	II	III	IV	V	
Posalimentación													
0	10	100							100				
12	10		100						100				
18	10		50	50					70	30			
24	10			90	10					100			
30	10			40	60					40	60		
36	10		10	10	80					10	90		
42	10			10	20	40	30					100	
48	10			10	20	70						100	
54**	10			10	40	20	30					90	10
60	10						100					90	10
66	10						100					60	40
72	10						100					20	80
78	10						100						100

**Tiempo mínimo a Christopher V.

Tabla 1.9.- Desarrollo de la vitelogénesis de mosquitos colectados en la población antropofílica de *An. vestitipennis* alimentados con sangre animal.

Hora.	n	Estados de S e I I a						Estados de Christopher					
		1	2	3	4	5	6	I	II	III	IV	V	
Posalimentación													
0	10	100							100				
12	10	20	80						100				
18	10		100						90	10			
24	10		40	60					40*	60			
30	10		30	70					20*	30	50		
36	10			70	30			10*	10*	20	60		
42	10		30			30	40		40*		60		
48	10	10	40			20	30	10*	40*		60		
54	10		30		30	10	30		30*	10	60		
60**	10		20				80	10*	20*		40	30	
66	10						100				90	10	
72	10						100					100	
78	10						100					100	

*Mosquitos pregrávidos.

**Tiempo mínimo a Christopher V.

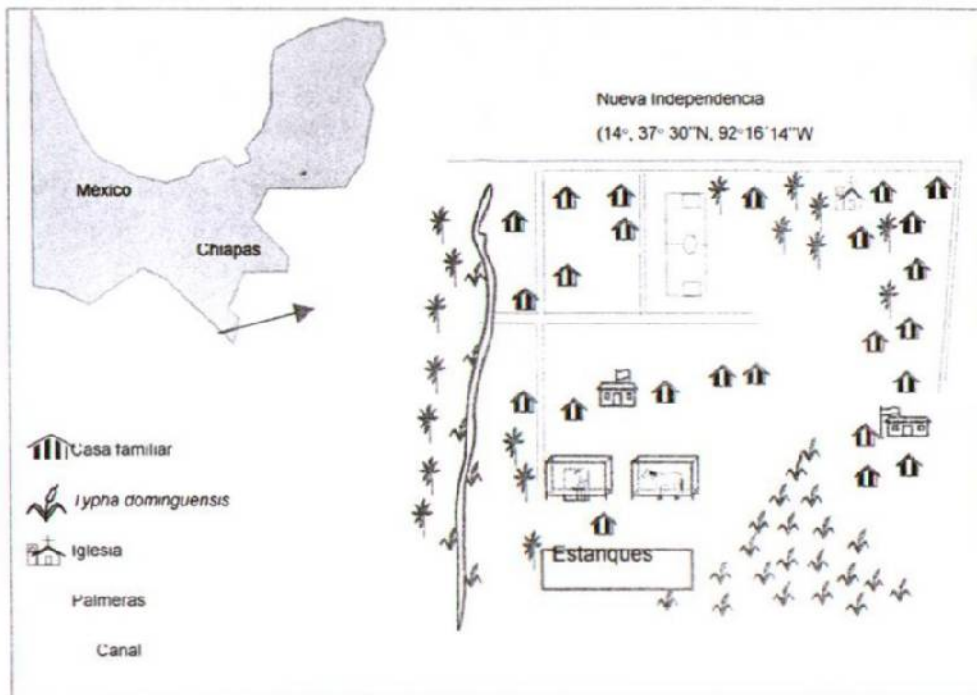


Figura 1.1.- Area de estudio, describe algunas características fisiográficas de la comunidad y la posición de las trampas cortinas.

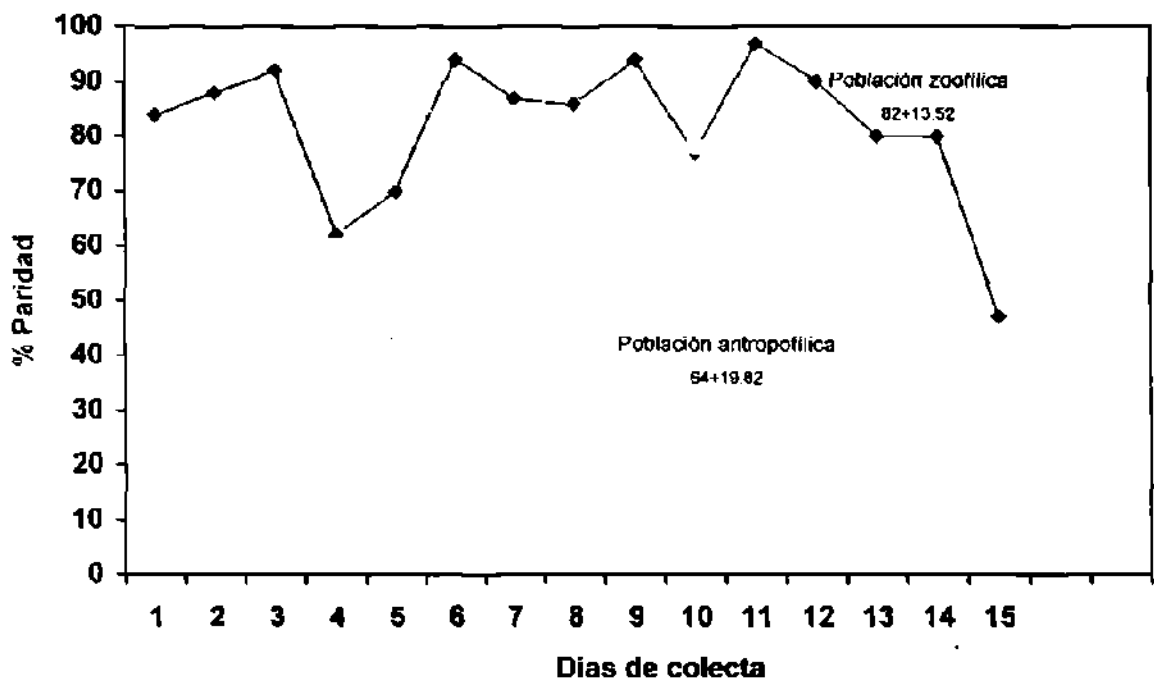


Figura 1.2.- Fluctuación de la paridad en las dos poblaciones de *An. vestitipennis*

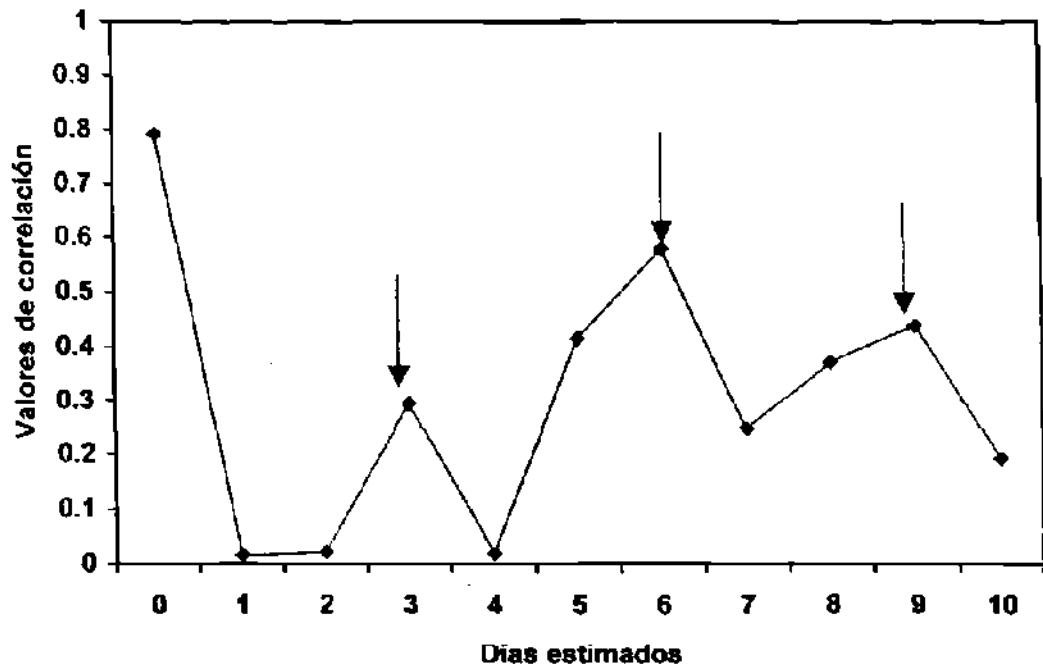


Figura 1.3.- Valores de los coeficientes de correlación que estimaron el ciclo gonotrófico en la población zoofílica

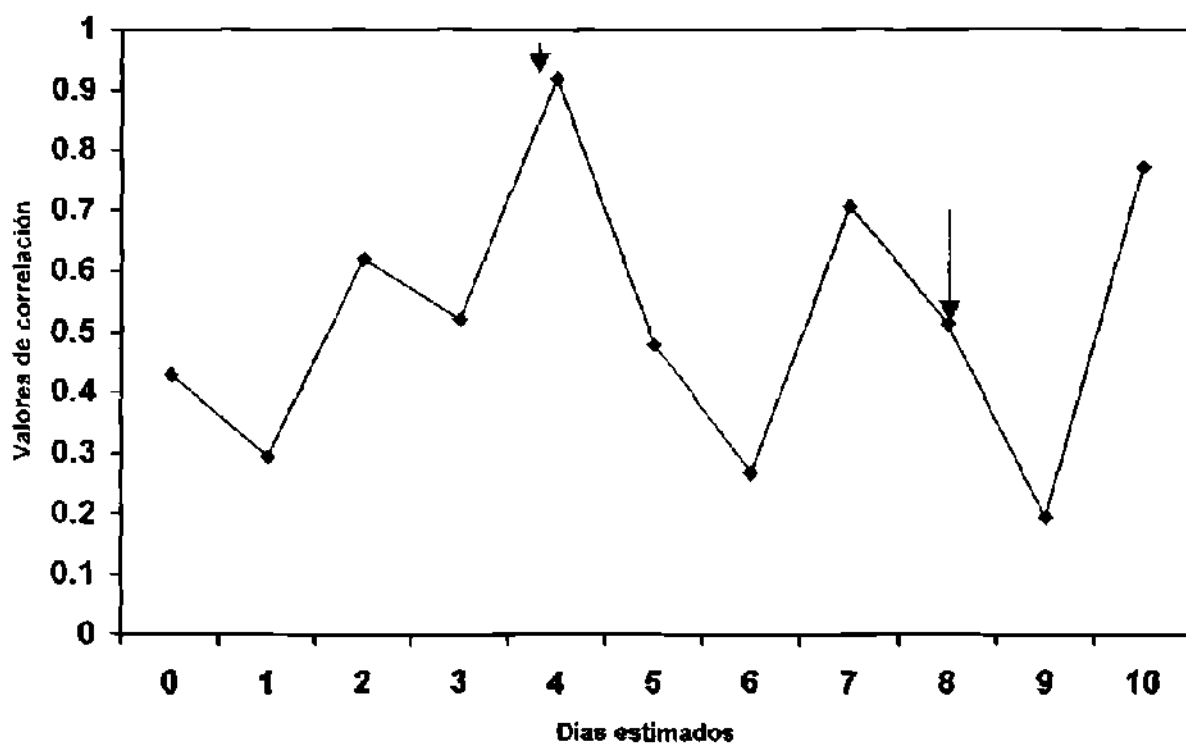


Figura 1.4.- Valores de los coeficientes de correlación que estimaron el ciclo gonotrófico en la población antropofílica.

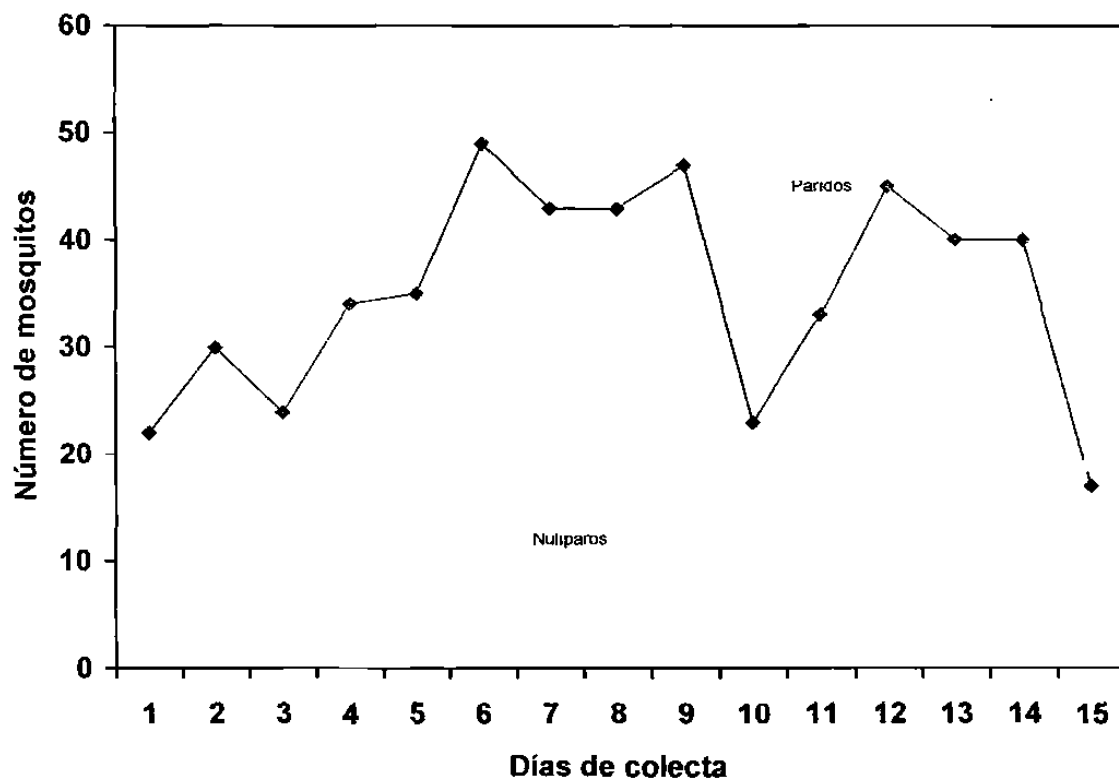


Figura 1.5.- Dinámica de la estructura de edad (paridos-nuliparos) en los mosquitos colectados en la población zoofílica

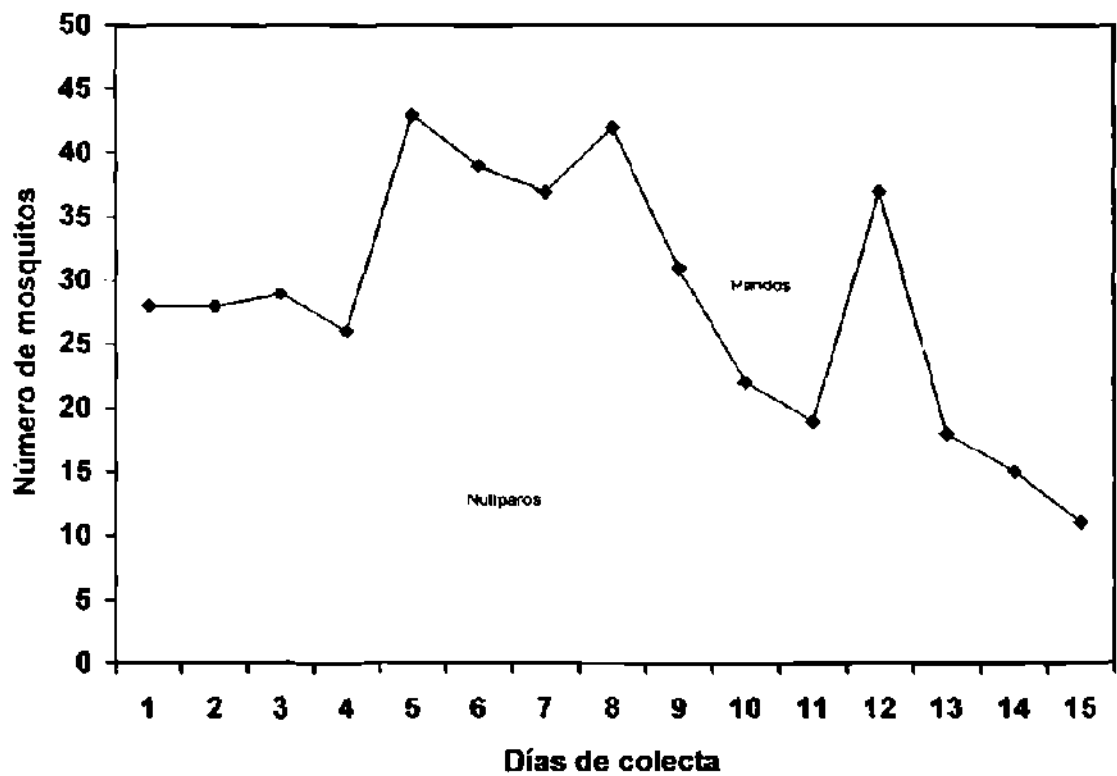


Figura 1.6.- Dinámica de la estructura de edad (pandos-nuliparos) en los mosquitos colectados en la población antropofílica

CAPITULO 2

Estudios de seleccion de hospederos en dos poblaciones de *Anopheles vestitipennis* (Diptera: Culicidae)

RESUMEN.

Una serie de experimentos fueron realizados con *Anopheles vestitipennis* en dos áreas del Estado de Chiapas: Zona Costa y Zona Selva Lacandona. En ambas zonas, se realizaron una serie de estudios de selección de hospederos mediante colectas directas en diferentes tipos de hospederos (humanos, caballo, vaca y cerdos) expuestos en trampas cortinas tipo Magoon. Adicionalmente, se realizaron experimentos de marcaje y recaptura para determinar si la selección de hospederos es una conducta repetitiva en ambas poblaciones de *An. vestitipennis*. Los resultados obtenidos sugieren que en ambas zonas existen dos poblaciones de *An. vestitipennis*, siendo la población antropofílica la más prevalente. Mientras que los estudios de marcaje y recaptura demostraron que más del 50% de los mosquitos liberados retornan a su hospedero original en donde fueron colectados, por una nueva alimentación sanguínea. En este estudio se presenta la primera evidencia conductual entre las dos poblaciones de *An. vestitipennis*, coincidiendo con resultados de estudios previos en la que se demostraron diferencias genéticas por isoenzimas y RAPD-PCR, diferencias morfológicas de huevos y longitud alar, entre las dos poblaciones propuestas de *An. vestitipennis*.

INTRODUCCIÓN

Anopheles vestitipennis Dyar y Knab, es uno de los principales vectores de paludismo en la Selva Lacandona (Loyola *et al.* 1991). Estudios recientes con *An. vestitipennis* han demostrado la posible existencia de dos poblaciones simpátricas con diferentes preferencias alimenticias. Una población que se alimenta en humanos (población antropofílica) y otra población que se alimenta en animales (población zoofílica). Al comparar estas dos poblaciones con diferentes preferencias alimenticias se demostraron también diferencias genéticas y diferencias morfológicas en huevos y alas (Arredondo-Jiménez *et al.* 1996, Rodríguez *et al.* 1999, Murillo *et al.* 2001, Orozco-Bonilla *et al.* 2001). Sin embargo, a pesar de estos hallazgos se desconoce cuál es el grado de selección y especificidad de hospederos de cada una de las poblaciones propuesta de *An. vestitipennis*.

Poblaciones de mosquitos con un alto grado de selección por hospederos humanos presentan una importante implicación en la dinámica de transmisión del paludismo (Rodríguez *et al.* 1999), puesto que la eficiencia y dinámica con la cual los mosquitos vectores transmiten el paludismo está directamente relacionada con la existencia de un alto grado de contacto con el humano (Hess *et al.* 1968, Fernández-Salas *et al.* 1993, Bown y Nelson 1993, Rodríguez *et al.* 1999). La capacidad vectorial de dos especies de anofelinos puede ser determinada por tener diferencias en el grado de la preferencia por humanos o por el grado de la preferencia por alimentarse dentro o fuera de las casas (Gibson 1996, Koella 1999).

ANTECEDENTES

En investigaciones de campo se ha observado que un vector presenta una conducta de discriminación entre un tipo de hospedero y otro. El entendimiento de este tipo de conducta se complica cuando se observa que algunas especies *exponen un amplio rango de hospederos cuando estos se presentan por separado*. Pero cuando un número de ellos se encuentran igualmente disponibles, los vectores demuestran una *tendencia de concentración sobre un sólo tipo de hospedero* (Gillies 1972, Lehane 1996). Las conductas de discriminación entre un tipo de hospedero y otro, parecen estar directamente relacionadas con factores como el tamaño y disponibilidad de hospederos, existencia de una preferencia innata por hospederos y hábitos y ecología del hospedero (Gillies 1972).

En otros estudios de campo se han usado una serie de técnicas que intentan dar respuestas a aquellas conductas de selección de hospederos en mosquitos vectores (Fernández-Salas 1993). La selección de hospederos ha sido *cuantificada mediante la determinación de la fuente sanguínea en muestras de mosquitos alimentados en un lugar (localidad o biotopo) y tiempo (diferentes estaciones del año)* (Boreham y Garrett-Jones 1973). Uno de los métodos que estima la frecuencia relativa de la fuente sanguínea es el índice de forrajeo (Hess *et al.* 1968). Este método cuantifica la proporción de mosquitos alimentados con patrones de alimentaciones oportunistas sobre un tipo de hospedero, relacionando el porcentaje de mosquitos alimentados sobre un tipo de hospedero dividido por el porcentaje del total de la población de hospederos disponibles en el área o hábitat de los mosquitos, para ello se requiere un censo de los hospederos existentes en un área determinada (Hess 1968). Con esta información, cuando el valor de la tasa de forrajeo es de 1.0 o aproximadamente de 1.0, se sugiere que los ~~mosquitos no tienen preferencia o evasión por cualquiera de los hospederos~~ (alimentación oportunista), cuando el valor es mayor de 1.0 se sugiere una preferencia selectiva por un hospedero; y un valor menor de 1.0 indica evasión a favor de otros hospederos (Hess 1968). A pesar de que este método puede

detectar los cambios estacionales en los patrones de alimentación en las poblaciones de mosquitos (Hayes *et al.* 1973), éste presenta algunos inconvenientes en su uso, puesto que no considera las diferencias conductuales y ecológicas de los vectores y hospederos, la disponibilidad de hospederos y la accesibilidad a los mosquitos. Otra de las desventajas de esta técnica es que requiere un censo numérico de la población animal lo cual con frecuencia es muy difícil o a veces imposible. (Edman 1971). Uno de los índices propuestos que no están sujetos a esos requerimientos, es el índice de alimentación que se obtiene de la proporción de mosquitos alimentados sobre un hospedero con respecto a otro, dividido por la proporción esperada de mosquitos alimentados sobre 2 hospederos, basados sobre factores que afectan la alimentación (Kay *et al.* 1979). Entre estos factores se incluyen la abundancia y tamaño del hospedero, la ocurrencia del hospedero en el tiempo y espacio con el mosquito. Cuando el índice de alimentación es de 1.0 se sugiere una alimentación igual sobre los dos hospederos comparados, mientras un valor menor o mayor de 1.0 indica una reducción o aumento en la alimentación sobre el primer hospedero con relación al segundo (Kay *et al.* 1979). Una de las aplicaciones más directas de este método es la identificación de mosquitos alimentados con sangre humana estimado mediante el índice de sangre humana (World Health Organization 1963, Garrett-Jones 1964, Garrett-Jones y Shidrawi 1969, Kay *et al.* 1979). Este índice es un componente importante en la capacidad vectorial (Garrett-Jones y Shidrawi 1969) y es usado para el manejo epidemiológico de los programas de control de paludismo (Garrett-Jones 1964). La técnica consiste en la colección de mosquitos alimentados reposando sobre paredes internas de las casas o en sitios peridomiciliarios. La fuente sanguínea en los mosquitos es identificada en ensayos de laboratorio con la técnica de ELISA (Washino y Tempelis 1983). Sin embargo, uno de los problemas en el uso de esta técnica es la dificultad de obtener una muestra adecuada de mosquitos en reposo, especialmente en áreas donde los insecticidas son aplicados continuamente para el control de paludismo (Fernández-Salas *et al.* 1993). Esta condición ha ejercido un dramático cambio en la conducta de reposo de los mosquitos, buscando sitios más protegidos donde no

sean afectados por los insecticidas (Martínez-Palacios 1959, Nutsathapana *et al.* 1986, Loyola *et al.* 1990, Fernández-Salas *et al.* 1993). El área de estudio en que se desarrolló este estudio ha estado influenciada por el uso indiscriminado de insecticidas o en su caso de plaguicidas agrícolas, en virtud a los frecuentes cambios en el uso del suelo. Para evitar aquellas desventajas de los métodos, en este estudio se investigó el grado de selección de hospederos de las dos poblaciones de *An. vestitipennis* mediante experimentos de marcaje y recapturas de mosquitos usando trampas cortinas tipo Magoon (Service 1993, Fernández-Salas *et al.* 1993). El grado de selección de hospederos de cada población fue registrado con las recapturas de mosquitos que retornaron por una segunda alimentación a su hospedero original (fidelidad a hospederos). Con esta metodología de marcaje y recaptura se pudo demostrar que *Anopheles minimus* Theobald y *An. maculipennis* Meigen pertenecen a una mezcla de dos o más especies crípticas morfológicamente similares que difieren al menos en la preferencia por hospederos (Nutsathapana *et al.* 1986, Joshi 1988).

HIPÓTESIS

Sí las dos poblaciones propuestas de *An. vestitipennis* presentan diferentes preferencias alimenticias, entonces hembras de cada población demostraran un grado específico de selección hacia un tipo de hospedero a lo largo de diferentes ciclos gonotróficos.

OBJETIVO GENERAL

Investigar sí hembras de *An. vestitipennis* seleccionan hospederos específicos y si esta selección es una conducta repetitiva (fidelidad a hospederos).

OBJETIVOS SPECIFICOS

Determinar sí *An. vestitipennis* presenta una conducta de discriminación entre un tipo de hospedero y otro, mediante la exposición de hospederos dentro de trampas cortinas

Determinar sí hembras de *An. vestitipennis* con conocida historia alimenticia retoman por una segunda alimentación al mismo tipo de hospedero en donde se alimentaron por primera vez, mediante experimentos de marcaje y recaptura.

METODOLOGIA

Descripción del área de estudio.

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron dos comunidades con alta abundancia de *An. vestitipennis* siendo 1) Nueva Independencia municipio de Suchiate ubicado en el Plano Costero del Pacífico de Chiapas, México (14°37'30" N, 92°16'14"W, 50 msnm), es una localidad con una población de 112 habitantes viviendo en 23 casas. En general, las casas en esta población se encuentran bien ventiladas, con techo de palma y pared discontinua hecha con madera o palo de bambú. El clima en esta área es caliente subhúmedo (García, 1973), con 2 estaciones bien definidas: Una estación de lluvias que se extiende a partir del mes de mayo hasta octubre, y el resto de los meses con una estación de secas bien definida. El promedio anual de lluvias en el área es 2,100 mm, con un promedio mensual de temperatura de 27°C y con un rango de humedad de 61 a 100% (Arredondo-Jiménez 1990). Aunque la vegetación primaria alrededor de Nueva Independencia ha sido reemplazada en su mayor parte por cultivos (mango, banano y maíz) y pastura para ganado, varios manchones de bosques y formaciones de pastos inundados favorecen la abundancia de poblaciones larvarias y adultos de *An. vestitipennis* (Rejmankova *et al.* 1998, Arredondo-Jiménez *et al.* datos no publicados). 2) Benemérito de las Américas (16°31'08"N, 90°39'02"W, 150 msnm) localizada en la Selva Lacandona con una población de 2142 personas viviendo en 670 casas localizadas frente a la frontera con Guatemala. Esta zona se considera un área de alta transmisión de paludismo por *P. vivax* y *P. falciparum* influenciada por la migración de personas enfermas desde Guatemala (Arredondo-Jiménez *et al.* 1996). La vegetación primaria alrededor de Benemérito de las Américas esta siendo reemplazada en su mayor parte por pastura para ganado y cultivos (Chile y Maíz). Estas dos comunidades se encuentran separadas por aproximadamente 280 kilómetros (Figura 2.1).

Colección de mosquitos.

Para definir si las poblaciones de campo de ambas zonas de estudio, seleccionan hospederos específicos para alimentarse, se realizaron tres experimentos separados de 20 días cada uno (en la estación de lluvias y de secas), usando trampas modificadas tipo Magoon (Service 1993, Fernández-Salas *et al.* 1993), colocadas una frente a otra (separadas 5 m de distancia). Durante el primer y segundo experimento, hembras de *An. vestitipennis* fueron colectadas cada noche por periodos de 12 horas (1800-0600 h) en cebos estacionarios, un tipo en cada trampa (Dos hombres y un caballo; Dos hombres y dos cerdos en el primer y segundo experimento, respectivamente). El tercer experimento fue realizado exponiendo los cebos solamente por periodos de 6 horas (1800-2400 h), esta vez con 2 series de trampas, un par colocada en la esquina norte del poblado y la otra colocada al sur, en cada par de trampas se compararon 2 hombres contra una vaca.

En las trampas cebadas con humanos las capturas de mosquitos fueron realizadas durante 45 minutos de cada hora, colectando mosquitos que llegaban a picar sobre los hospederos voluntarios, usando aspiradores bucales y colocados en contenedores individuales (World Health Organization 1975, Bown *et al.* 1987). En las trampas con cebo animal, las colecciones de mosquitos fueron realizadas durante los últimos 15 minutos de cada hora por los mismos hombres, colectando hembras alimentadas de sangre. Los mosquitos fueron colocados en dos contenedores de plásticos (uno para cada población) cubiertos interiormente con papel dextrasa polvoreado previamente con polvo fluorescente, un color para cada población (Day-Glo® Bast New Holland MI), lo que permitió que los mosquitos al ser depositados en el interior del recipiente se marcaran por sí solos al reposar sobre las paredes internas del recipiente,

Experimentos de marcaje y recaptura.

En cada trampa se colectaron mosquitos alimentados y no alimentados, posteriormente fueron marcados y liberados por 16 noches consecutivas y

recapturados hasta los 20 días. Los mosquitos recapturados según el color fueron identificados como "fieles" o "infieles", los primeros fueron aquellos mosquitos recapturados retornando a la trampa y hospedero donde originalmente fueron colectados, mientras los infieles fueron aquellos mosquitos recapturados retornando en la trampa y hospedero diferente de donde fueron originalmente colectados. La tasa de recaptura de cada población fue reportado como la sumatoria de fieles e infieles

El tercer experimento fue diseñado para evaluar la dispersión de mosquitos dentro de la comunidad y determinar si la fidelidad pudiese ser observada recapturando mosquitos que retornaron al mismo tipo de hospedero en trampas colocadas en otros sitios del poblado.

Análisis de datos.

Diferencias entre colecciones de mosquitos en cada experimento fueron analizadas usando una prueba t no paramétrica de Wilcoxon. Las diferencias en proporciones de mosquitos recapturados fueron examinadas usando una prueba de Chi-cuadrada (Zar 1999).

RESULTADOS

Colecciones de mosquitos en la estación de lluvia, zona costa.

Durante los 20 días de estudio *An. vestitipennis* Dyar y Knab fue la especie predominante capturada en trampas conteniendo cebo humano (76.69%, n=14,833), seguido de *An. albimanus* Wiedemann (21.56%, n=4,170) y *An. punctimacula* Dyar y Knab (1.73%, n=336), mientras que en trampas con cebo animal, *An. albimanus* fue la especie predominante (50.00%, n=10,962), seguido por *An. vestitipennis* (44.59%, n=9,775) y *An. punctimacula* (5.39%, n=1,183). (Tabla 2.1 y figura 2.2).

Las proporciones de capturas en hospedero humano respecto a capturas en hospedero animal fueron 1.51:1 (n = 24,608), 1:2.62 (n = 15,132), y 1:3.52 (n = 1,519) para *An. vestitipennis*, *An. albimanus* y *An. punctimacula*, respectivamente (Tabla 2.1).

Selección de hospederos por Anopheles vestitipennis en la estación de lluvia, zona costa:

En el primer experimento, 1,663 *An. vestitipennis* seleccionaron a hospederos humanos, mientras 1,351 seleccionaron al hospedero animal. La proporciones de captura humano:caballo fue 1.23:1, sin observarse diferencias significativas en la preferencia por cualquier hospedero ($t = -1.88$, $d.f. = 1$, $P = .0591$) (Tabla 3.2). En el segundo experimento 5,170 mosquitos fueron colectados en la trampa cebada con humano, mientras solamente 1,487 seleccionaron la trampa cebada con hospedero animal (cerdo), la proporción humano: cerdo fue 3.48:1 ($t = -3.5185$, $d.f. = 1$, $P = 0.0004$). Durante el tercer experimento 1,160 mosquitos seleccionaron a humanos y 1,005 al cebo animal (vaca) en la trampa ubicado en la parte norte de la comunidad, la proporción human-vaca fue 1.15:1; $t = -1.411$, $d.f. = 1$, $P = 0.1579$, mientras en la trampa ubicada en la parte sur de la comunidad un total de 4,034 mosquitos seleccionaron a humano y 3,045 a

hospedero vaca (proporción de captura = 1.32:1; $t = -0.568$, $d.f. = 1$, $P = 0.5701$). (Tabla 2.2).

Al agrupar los datos, se observó que más mosquitos *An. vestitipennis* seleccionaron hospederos humanos (12,027) que hospederos animales (6,888), la proporción de captura fue de 1.74:1, observándose diferencias significativas ($t = 0.6040$ $df=1$ $P = 0.003$). (Tabla 2.2).

Colecciones de mosquitos en la estación de secas, zona costa.

Durante los 20 días de estudio *An. vestitipennis* fue la especie predominante capturada en trampas conteniendo cebo humano (62%, $n = 391$), seguido de *An. punctimacula* (32%, $n=201$) y *An. albimanus* (6%, $n=39$), mientras que en trampas con cebo animal, *An. punctimacula* fue la especie predominante (82%, $n=1,752$) seguido por *An. vestitipennis* (11%, $n=240$) y *An. albimanus* (7%, $n=161$) (Tabla 3.3). Las proporciones de capturas en cebo humano respecto a capturas en cebo animal fueron 1.62:1 ($n=631$), 1:4.12 ($n=200$), y 1:8.71 ($n=1,953$) para *An. vestitipennis*, *An. albimanus* y *An. punctimacula*, respectivamente (Tabla 2.3).

Selección de hospederos por Anopheles vestitipennis en la estación de secas, zona costa:

En el primer experimento, un total de 246 mosquitos *An. vestitipennis* seleccionaron a humanos, mientras que 129 seleccionaron a hospedero caballo. La proporción de captura humano:animal fue de 1.90:1, estas proporciones no fueron significativamente diferentes ($t = -2.0922$ $P = 0.0364$) (Tabla 2.3).

En el segundo experimento, un total de 145 mosquitos fueron colectados en ~~las trampas conteniendo humanos, mientras que un total de 111 fueron colectados~~ en trampas conteniendo vaca, las proporciones de captura humano: animal fue 1.30:1, sin presentarse diferencias significativas ($t = -1.763$ $P = 0.077$).

Al agrupar las colectas por tipo de hospedero se observó mayor selección por cebos humanos (391) que por cebos animales (240), resultando proporciones de humano:animal de 1.62:1, relación significativamente diferentes $t = -2.560$ $P = 0.0104$. (Tabla 2.3).

Colecciones de mosquitos en la estación de lluvias, zona Selva Lacandona.

Durante los 20 días de estudio *An. vestitipennis* fue la especie predominante capturada en trampas conteniendo cebo humano (90.81%, $n=4,035$), seguido de *An. albimanus* (6.90%, $n=307$) y *An. punctimacula* (1.52%, $n=101$), mientras que en trampas con cebo animal también *An. vestitipennis* fue la predominante especie (72.85%, $n=2,926$) seguido por *An. albimanus* (17.90%, $n=719$), y *An. punctimacula* (9.23% $n=371$) (Tabla 3.4). Las proporciones de capturas en cebo humano respecto a capturas en cebo animal fueron 1.71:1 ($n=4,035$), 1:2.34 ($n=1,026$), y 1:3.67 ($n=472$) para *An. vestitipennis*, *An. albimanus* y *An. punctimacula*, respectivamente.

Selección de hospederos por Anopheles vestitipennis en la estación de lluvia, zona Selva Lacandona:

En esta zona y esta estación sólo un experimento fue desarrollado, en donde se compararon dos humanos contra un hospedero animal (caballo), en este un total de 4,035 mosquitos *An. vestitipennis* seleccionaron a humanos, mientras que 2,926 seleccionaron a hospedero caballo. La proporción de captura en humano versus caballo fue de 1.37:1, estas proporciones fueron significativamente diferentes ($t = -3.723$ $P = 0.0002$) (Tabla 2.4).

Colecciones de mosquitos en la estación de secas, zona Selva Lacandona.

Durante los 20 días de estudio *An. albimanus* (81.28%, $n=682$) fue la especie predominante capturada en trampas conteniendo cebo humano seguido de *An. vestitipennis* (10.25%, $n=86$); *An. darlingi* (8.10% $n=68$); *An. pseudopunctipennis* (0.35%, $n=3$). En las colectas con las trampas conteniendo al cebo animal, *An. albimanus* (94%, $n=2,819$) siguió siendo la especie predominante

seguido por *An. vestitipennis* (3.53%, n=106); *An. darlingi* (2.09% n=63); *An. pseudopunctipennis* (0.29% n=9); *An. punctimacula* (0.16% n=5) (Tabla 2.5). Las proporciones de capturas en cebo humano respecto a capturas en cebo animal fueron, 1:1.19 (n=192), 1:4.13 (n=3,501), 0:1 (n=5), 1.07:1 (n=71), 1:3 (n=12) para *An. vestitipennis*, *An. albimanus*, *An. punctimacula*, *An. darlingi* y *An. pseudopunctipennis*, respectivamente.

Selección de hospederos por Anopheles vestitipennis en la estación de seca, zona Selva Lacandona:

Las colecciones directas demostraron que en el primer experimento, un total de 64 mosquitos *An. vestitipennis* seleccionaron a cebos humanos, mientras que 78 seleccionaron a cebo animal. La proporción de captura en humano respecto a capturas en animal fue de 1:1.21, estas proporciones no fueron significativamente diferentes ($t = -0.351$ $P = 0.7253$) (Tabla 2.5).

En el segundo experimento, un total de 22 mosquitos fueron colectados en las trampas conteniendo humanos, mientras que un total de 28 fueron colectados en trampas conteniendo vaca, las diferencias entre las proporciones de captura humano-vaca (1:1.27) no fueron significativas ($t = -0.355$ $P = 0.722$). Al agrupar las colectas por tipo de hospedero se observó mayor selección por hospedero animal (106) que por hospedero humano (86); 1.23:1, observándose no diferencias significativas $t = -0.487$ $P = 0.625$. (Tabla 2.5).

Estudios de marcaje y recaptura zona costa.

La fidelidad de mosquitos fue determinada, a través de las recapturas de mosquitos marcados sobre el mismo tipo de hospedero en donde originalmente fueron colectados. Durante el primero y segundo experimento las tasas de recaptura fueron 1.38% y 0.29% sobre cebos humanos, mientras 1.62% y 0.06% de mosquitos fueron recapturados sobre cebo caballo y/o cerdo, respectivamente. En el tercer experimento las tasas de recapturas en las trampas norte y sur fueron

0.34% y 0.40% sobre cebos humanos y 0% y 0.47% sobre animal, respectivamente (Tabla 2.6)

Durante el primer experimento, el 66% (23/35) de mosquitos colectados sobre humanos retornaron a este mismo tipo de hospedero, mientras el 85% (22/26) de mosquitos colectados sobre el hospedero animal (caballo) retornaron al mismo hospedero. Al comparar ambas tasas de fidelidad no se observaron diferencias significativas ($\chi^2 = 1.86$, $P = 0.172$). En el segundo experimento, el 60% (15/25) de mosquitos demostraron fidelidad al hospedero humano, mientras que el 33% (1/3) fueron fieles al hospedero animal (cerdo). Estas tasas de fidelidad no fueron significativamente diferentes ($\chi^2 = 0.07$ $P = 0.791$). Durante el tercer experimento, en la trampa norte el 100% (4/4) demostraron fidelidad a humanos, sin reportarse retomo (0/2) en aquellos mosquitos colectados originalmente en hospedero animal ($\chi^2 = 2.34$ $P = 0.126$). En la trampa sur el 50% (7/14) de los mosquitos demostraron fidelidad a humanos, y el 100% (10/10) al hospedero animal (vaca) ($\chi^2 = 4.85$ $P = 0.027$). (Tabla 2.6).

Después de agrupar los datos de fidelidad, se observó que los mosquitos colectados originalmente en hospederos animales fueron más fieles (80.48%; 33/41) que mosquitos colectados en hospederos humanos (63%; 49/78), observándose diferencias significativas entre las tasas de fidelidad ($\chi^2 = 4.90$, $P = 0.027$) (Tabla 2.6).

Los movimientos de mosquitos entre las trampas norte y sur fueron observados solamente en 12 mosquitos, de los cuales 10 retomaron y seleccionaron al mismo tipo de hospedero (fueron fieles). Colecciones simultaneas alrededor del poblado de estudio, revelaron que 2 mosquitos colectados en humanos y marcados fueron colectados en el mismo tipo de hospederos a 0.8 y 2 Km. respectivamente.

Estudios de marcaje y recaptura zona Selva Lacandona.

En la estación de lluvia se liberaron un total de 4,035 y 2,926 mosquitos colectados en la trampa con hospedero humano y animal respectivamente. De estos no se reportó ningún mosquito marcado en ninguno de los dos tipos de hospederos..

En la estación de secas sólo se liberaron un total de 86 y 106 mosquitos colectados en la trampa con hospedero humano y animal respectivamente. Sin reportarse ningún mosquito marcado.

DISCUSIÓN

Los anofelinos colectados mostraron una dinámica poblacional de acuerdo al tipo de hospedero, estación y área de muestreo. En las colectas con hospederos humanos realizadas en la estación de lluvia en la zona costa, *An. vestitipennis* fue el anofelino prevalente, seguido por *An. albimanus* y *An. punctimacula*, mientras que en hospederos animales se colectaron más mosquitos *An. albimanus*, seguido por *An. vestitipennis* y *An. punctimacula*.

En las colectas con cebos humanos realizadas en la estación de seca en la zona costa, también se demostró que *An. vestitipennis* fue la especie más prevalente, seguida de *An. punctimacula* y *An. albimanus*. Mientras que en las colectas con cebo animal la especie más prevalente fue *An. punctimacula* el cual se incrementó 7 veces más que *An. vestitipennis* y 11 veces más que *An. albimanus* segunda y tercera especie más prevalente respectivamente.

En la Selva Lacandona un sólo experimento fue desarrollado en la estación de lluvias, las precipitaciones inundaron el área seleccionada para el estudio lo cual fue necesario sacar todo animal doméstico y, por tanto, no fue posible el acceso al sitio en donde se había seleccionado para realizar los experimentos. En el único experimento se observó que *An. vestitipennis* fue la especie más prevalente seguido de *An. albimanus* y *An. punctimacula*. Esta dinámica poblacional fue muy similar a lo reportado para la zona costa en esta estación.

En los experimentos desarrollados en la misma área de la Selva y en la estación de secas. En hospederos humanos, se colectaron un total de 4 especies siendo *An. albimanus* la especie más abundante, seguida de *An. vestitipennis*, *An. darlingi* y *An. pseudopunctipennis*, en colectas con hospedero animal se observó la misma dinámica poblacional de las mismas especies de anofelinos sólo que en estas colectas se reportó otra especie que fue *An. punctimacula*.

En ambas zonas de estudio y para ambas estaciones, las proporciones de capturas humano-animal entre los anofelinos colectados sugirieron la ocurrencia de diferencias en las preferencias de hospederos, reportándose en *An. vestitipennis* un alto grado de antropofagia, mientras que *An. albimanus* y *An. punctimacula* demostraron un alto grado de zoofagia. De las dos especies colectadas en la Selva Lacandona *An. darlingi* presentó una conducta más antropofágica, mientras *An. pseudopunctipennis* presentó una tendencia más zoofágica.

Estos diferentes hábitos de alimentación de las especies de anofelinos encontrados han sido previamente reportados en otros estudios, para *An. vestitipennis* (Loyola 1991, Arredondo-Jiménez 1995, 1996), para *An. albimanus* (Breeland 1972, Loyola et al. 1991, 1993; Arredondo-Jiménez 1995, Ulloa et al. 1997), para *An. punctimacula* (Levi-Castillo 1949, Arredondo-Jiménez 1995, Ulloa et al. 1999), para *An. darlingi* (Rozendaal 1987, Loyola et al. 1991, Arredondo-Jiménez 1995). Los resultados de la preferencia por animales observadas en *An. pseudopunctipennis* no concuerdan con la alta antropofilia reportada previamente en el sur de México (Fernández-Salas 1992, Casas-Martínez 1994, Arredondo-Jiménez 1995). Sin embargo, en esta zona esta especie sólo ha sido colectada en muy bajas proporciones lo cual pudiera indicar que esta preferencia es el resultado de una conducta oportunista de alimentación.

Respecto a *An. vestitipennis* la aparente segregación de la conducta de alimentación entre las dos supuestas poblaciones, fue sugerida también en los experimentos de marcaje y recaptura, indicando que más del 50% de los mosquitos de cada población demuestran fidelidad al hospedero original, significando una tendencia de especificidad de hospedero en *An. vestitipennis*.

En otros estudios con especies Anofelinas, se han observado diferencias en las preferencias de alimentación y han sido relacionadas a la existencia de diversas especies biológicas dentro de especies similares morfológicamente

(Hackett 1937, Joshi 1988). Por ejemplo en *An. gambiae* s.s. Giles y *An. arabiensis* Patton, dos miembros del complejo *An. gambiae* s.l. fueron reportados con diferencias en sus índices antropofágicos; *An. gambiae* s.s. demostró un alto grado de antropofagia (Coluzzi *et al.* 1975, Mollineaux y Gramiccia 1980, Githeko 1996, Shililu *et al.* 1998), las mismas diferencias fueron reportadas entre especies A y B de *An. culicifacies* Giles, donde la especie A fue más antropofágica (Sugana *et al.* 1983).

Estas conductas de alimentación han sido manejadas en otros estudios como una evidencia de la existencia de factores de orientación localizadas en algunas partes del insecto, algunas formas de conducta de aprendizaje y/o bases genéticas (Chapman 1982, Charlwood *et al.* 1988, Hii *et al.* 1991, Arredondo-Jiménez *et al.* 1992).

En otros estudios se ha sugerido la posible asociación de genes con la selección de hospederos (animales o humanos), se ha pensado que proteínas y genes están involucrados en el reconocimiento del olor humano, y por ello su importancia como factores de búsqueda de hospederos. En *An. gambiae* Giles, se ha iniciado la caracterización y la posibilidad de clonar algunos genes olfatorios (Catteruccia 2000).

Dentro de los factores importantes relacionados a la capacidad de un mosquito para transmitir el paludismo, se encuentran 1) abundancia; 2) nivel de antropofagia; 3) susceptibilidad a la infección y 4) longevidad (Gillies 1988, Kettle 1992, Gibson 1996). De estos factores las poblaciones *An. vestitipennis* presentaron un alto nivel de antropofagia y densidades altas, por tanto, esta especie podría ser importante en la dinámica de transmisión de paludismo junto con *An. albimanus* en la zona costera del estado. Sin embargo, se requieren de estudios de incriminación de vectores en el área, con el fin de establecer el papel que juega esta especie como vector de paludismo. Otros vectores como *An. albimanus* a pesar de su marcada preferencia por animales (Breeland 1972,

Rodríguez y Loyola 1989), baja tasa de esporozoítos (Ramsey 1994), bajas densidades en época de secas y transmisión específica del fenotipo VK210 de *Plasmodium vivax* (González-Ceron et al. 1999), continúa siendo un serio problema de salud pública en ambos litorales de nuestro país. Se sospecha que esta eficiencia de *An. albimanus* puede ser debido a la posible existencia de subpoblaciones con diferentes preferencia alimenticia (Arredondo-Jiménez, et al 1990), o a las altas densidades poblaciones que alcanzan durante la estación de lluvias (Bown et al. 1991, Ulloa et al. 1997).

La técnica de marcaje y recaptura fue un buen estimador para determinar la selección de hospederos en *An. vestitipennis*. En todos los experimentos realizados en la zona costa, la tasa de recaptura fue muy baja, debido a la pérdida de mosquitos por la existencia de dispersión dentro y fuera de ella. La evidencia de este evento fue demostrada con el diseño del tercer experimento, en donde se colectaron mosquitos a 800 m y 2 kilómetros del sitio de liberación. Las tasas de recapturas en todos los experimentos sugirieron la existencia de heterogeneidad conductual entre las dos poblaciones de *An. vestitipennis*, demostrándose que más del 50 % de los mosquitos de cada población retornaron por una segunda alimentación sanguínea sobre el mismo hospedero (fidelidad de hospederos) de donde fueron originalmente colectados, sugiriéndose una cierta tendencia de especificidad de selección de hospederos en *An. vestitipennis*. Resultados similares fueron obtenidos con *An. balabalencis* (Hii y Vun 1987).

En la zona Lacandona en la estación de secas no se recapturó ningún mosquito, quizás debido a la poca cantidad de mosquitos liberados y a una dispersión a otros sitios de la zona. En la estación de lluvias no hubo recapturas a pesar de la liberación de una cantidad mayor de mosquitos, esto fue influido a una mayor disponibilidad de hospederos animales que fueron trasladados a la comunidad por la inundación de las zonas de pastoreo.

CONCLUSIÓN

En nuestro estudio se demostró heterogeneidad conductual entre las dos poblaciones de *An. vestitipennis*, es decir, que poblaciones de *An. vestitipennis* que seleccionan a humanos o en su caso a animales para alimentarse por primera vez presentan una conducta de retorno al mismo tipo de hospedero para un segundo evento de alimentación.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren la primera evidencia conductual de la existencia de dos poblaciones con preferencias específicas de hospederos en *An. vestitipennis*, siendo consistente con otros hallazgos encontrados en otros estudios, sugiriendo la posible formación de un complejo en *An. vestitipennis* de al menos dos especies.

LITERATURA CITADA

- Arredondo-Jiménez JI. 1990. Larval ecology of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) in southern Chiapas, México. M. S. Thesis. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza. N. L., México. 70 p.
- Arredondo-Jiménez JI, Bown DN, Rodríguez MH, Villarreal C, Loyola EG, Frederickson CE. 1992. Test for the existence of genetic determination or conditioning in host selection by *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae). *J. of Medical Entomology*. 29:894-897.
- Arredondo-Jiménez JI. 1995. Comparative ecology of allopatric populations of *Anopheles* (*Anopheles*) *vestitipennis* (Diptera:Culicidae). Ph. D. Dissertation. University of California, Davis, CA.
- Arredondo-Jiménez JI, Gimnig J, Rodríguez MH, Washino RK. 1996. Genetic differences among *Anopheles vestitipennis* subpopulations collected using different methods in Chiapas State, Southern México. *J. of the American Mosquito Control association*. 12:396-401.
- Boreham PFL, Garrett-Jones C. 1973. Prevalence of mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (*Anopheles sacharovi* Favre). *Bull. W.H.O.* 48:605-614.
- Bown D. N, Rodríguez MH, Arredondo-Jiménez JI, Loyola EG, Rodríguez MC. 1991. Age structure and abundance levels in the entomological evaluation of an insecticide used in the control of *Anopheles albimanus*. *Pan Am. Hlth. Organ. Bull.* 21:121-135.
- Bown NB, Michael N. 1993. Parasitic Protozoa. Edited by Julius P. Kreier. Academic Press, Inc. 327 pp.

- Bown DN, Frederickson EC, Angel-Cabañas G, Méndez J. 1987. An evaluation of bendiocarb and deltamethrin applications in the same Mexicana village and their impact on populations of *Anopheles albimanus*. *PAHO Bull.* 22:121-135.
- Breeland SG. 1972. Studies on the ecology of *Anopheles albimanus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21:751-754.
- Casas M, Bown DN, Rodríguez MH. 1994^a. Intradomicillary pre- and postfeeding behavior of *Anopheles pseudopunctipennis* of southern Mexico: implications for malaria control. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 10:348-354.
- Catteruccia et al. 2000. Transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405:959-962.
- Chapman RF. 1982. Chemoreception: The significance of receptor numbers. *Advances in Insect Physiology* 16, 274-356.
- Charlwood JD, Graves PM, Marshall TF. de C. 1988. Evidence for a "memorized" home range in *Anopheles farauti* females from Papua New Guinea. *Medical and Veterinary Entomology* 2: 101-108.
- Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V. 1975. Chromosomal investigations on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex in the Garki District (Kano State, Nigeria). Results of species identifications from 1971-1974, MPD/TN75.1 *WHO Tech. Note* 24:16-25.
- Edman JD. 1971. Host-feeding patterns of Florida mosquitoes. 1. *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Mansonia* and *Psorophora*. *Journal of Medical Entomology* 8:687-695.

- Fernández-Salas I. 1992. Bionomic of the primary malaria vector *Anopheles pseudopunctipennis*, in the Tapachula foothills area of southern Mexico. *PhD. Disertation, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD.*
- Fernández-Salas I, Roberts DR, Rodríguez MH, Rodríguez MC, Marina-Fernández CF. 1993. Host selection patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* under insecticide spraying situations in southern Mexico. *J. of the American Mosquito Control Association* 9, 375-384.
- García E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. *Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México.*
- Garrett-Jones C. 1964. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull. W.H.O.* 30:241-261.
- Garrett-Jones C, Shidrawi GR. 1969. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*. *Bull. W.H.O.* 40:531-545.
- Gibson G. 1996. Genetics, ecology and behavior of anophelines. *Ciba Found Symp.* 200:22-37; discussion 37-47.
- Gillies 1972. Some aspects of mosquito behavior in relation to the transmission of parasites. *Zool. J. Linn. Soc.* 51 (Suppl 1). 69-81.
- Gillies MT. 1988. Anopheline mosquitoes: Vector behavior and bionomics. In: Wernsdorfer W.H, Mc Gregor I. (eds). *Malaria: principles and practice of malariology*, Volume 69-81. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York.

- Githeko AK, Adungo NI, Karanja DM, Hawley WA, Vulule JM, Seroney IK. et al. 1996. Some observations on the biting behavior of *Anopheles gambiae* s.s. *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus* and their implications for Malaria Control. 82:306-315.
- González-Ceron L, Rodríguez MH, Nettel JC, Villarreal C, Kain KC, Hernández JE. 1999. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern México. *Infection and Immunity* 67:410-412.
- Hackett, L. 1937. *Malaria in Europe, and ecological study*. Oxford University Press, London.
- Hayes RO, Tempelis CH, Hess AD, Reeves WC. 1973. Mosquito hosts preference studies in Hale county. *Texas, Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 22:270-277.
- Hess AD, Hayes RO, Tempelis CH. 1968. The use of the forage ratio technique in mosquito host preference studies. *Mosquito News* 28, 386-389.
- Hii JLK, Vun YS. 1987. The influence of a heterogeneous environment on host feeding behavior by *Anopheles balabacensis* (Diptera:Culicidae). *Trop. Biomed.* 4:173-183.
- Hii JLK, Chew M, Sang VY, Munstermann LE, Tan SG, Panyim S, Yasothornsrikul S. 1991. Population genetic analysis and host seeking and resting behavior in the malaria-vector, *Anopheles balabencis* (Diptera:Culicidae). *J. Medical Entomology.* 28:675-684.

- Joshi HK, Vasantha S, Subbarao K, Sharma VP. 1988. Host feeding patterns of *Anopheles culicifacies* species A and B. *J. of the American Mosquito Control Association* 4:248-251.
- Kay BH, Boreham PFL, Edman JD. 1979. Application of the "Feeding index" concept to studies of mosquito host-feeding patterns. *Mosquito News*. 39:68-72.
- Kettle DS. 1992. Malaria (*Plasmodium*) and other haemosporina (Sporozoa)Species complexes, and variation in *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology* pp. 658.
- Koella J.C. 1999. Evolutionary ecology and epidemiology of interactions between *Anopheles* mosquitoes and malaria. *Schweiz Med Wochnschr* 129:31-32.
- Lehane MJ. 1996. Vector insects and their control. In: Olfaction in mosquito-host interactions. *John Wiley & Sons. Ciba Foundation Symposium* 200.
- Levi-Castillo R. 1949. Los vectores de paludismo de los países de la costa pacífica de América del Sur y su control. *Revista Kuba de Med. Tropical* 5:101-104.
- Loyola GE, Rodríguez MH, González-Ceron L, Arredondo-Jiménez JI, Bown DN, Vaca MA. 1990. Effect on indoor residual spraying of DDT and Bendiocarb on the feeding patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* in México. *J. American Mosquito Control Association* 4:635-640.
- Loyola GE, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH, Bown DN, Vaca-Marín MA. 1991. *Anopheles vestitipennis*, the probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon forest of Chiapas, México. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85:171-174.

- Martínez-Palacios A. 1959. Resistencia fisiológica a Dieldrin y DDT de *Anopheles quadrimaculatus* Say en México. *Mosquito News* 27(1) 55-56.
- Mollineaux L, Gramiccia G. 1980. The Garki Project: Research on Epidemiology and Control of Malaria in Sudan Savanna of West Africa. Geneva: *World Health Organization*.
- Murillo-Sánchez MH 2001. Variabilidad genética de subpoblaciones de *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae) mediante el uso de RAPD-PCR. Tesis. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. 100 p.
- Nutsathapana S, Sawasdiwongphorn P, Chitrapop & Cullen JR. 1986. The behavior of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera:Culicidae) subjected to differing levels of DDT selection pressure in northern Thailand. *Bull. Entomol. Res.* 76:303-312.
- Orozco-Bonilla A, Ulloa A, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH. 2001. Morphological differences among *Anopheles vestitipennis* populations. *The 67th Annual Meeting of the AMCA*, Dallas, Texas.
- Padilla N, Molina P, Juárez J, Bown D, Cordón-Rosales C. 1992. Potential malaria vectors in northern Guatemala. *J. of the American Mosquito Control Association* 8: 307-308.
- Ramsey JM, Salinas E, Rodríguez MH, Beaudoin RL. 1994. Effects of transmisión-blocking immunity on *Plasmodium vivax* infections in *Anopheles albimanus* populations. *J. Parasitol.* 80:88-92.
- Rejmankova E, Pope KO, Roberts DR, Lege MG, Andre R, Greico J, Alonzo Y. 1998. Characterization and detection of *Anopheles vestitipennis* and

Anopheles punctimacula (Diptera:Culicidae) larval habitats in Belize with field survey and SPOT Satellite Imagery. *J. of Vector Ecology* :74-87

Rodríguez MH, Chavez B, Hernández-Avila JE, Orozco A, Arredondo-Jiménez JI. 1999. Description and morphometric analysis of the eggs of *Anopheles* (*Anopheles*) *vestitipennis* (Diptera:Culicidae) from Southern México. *J. Med. Entomol.* 36:78-87.

Rodríguez MH, Loyola EG. 1989. Situación epidemiológica actual y perspectivas de la investigación entomológica en México, pp. 15-40. In. Memoria del IV Simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria. Oaxtepec, Mor., México. *Sociedad Mexicana de Entomología*.

Rozendaal JA. 1989. Biting and resting behavior of *Anopheles darlingi* in the Suriname rainforest. *Journal of the American Mosquito Control Association* 5:351-358.

Service MW. 1993. Mosquito Ecology: Field Sampling Methods. 2nd ed. Elsevier Applied Science, London.

Shililu JI, Maier WA, Seitz HM, Orago AS. 1998. Seasonal density, sporozoite rates and entomological inoculation rates of *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* in a high-altitude sugarcane growing zone in Western Kenya. *Trop. Med. Int. Health.* 3:706-710.

Sugana SG, Tewari SC, Mani TR, Hiriyan J, Reuben R. 1983. *Anopheles culicifacies* species complex in Thenpenniyar riverine tract, Tamil Nadu. *Indian. J. Med. Res.* 77:455-459.

Ulloa A, Rodríguez MH, Rodríguez AD, Roberts DR 1997. Comparison of two methods for estimating abundance and parity of *Anopheles albimanus* in

breeding site and village of southern Mexico. *J. of the American Mosquito Control Association* 13:238-244.

Ulloa A, Malo-Garcia I, Villarreal CT, Arredondo-Jiménez JI. 1999. Comportamiento de picadura y nivel de resistencia de *Anopheles punctimacula* en el Sur de Chiapas. *Primer Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Medicina Tropical*. 31 p.

Washino RK, Tempelis CH. 1983. Mosquito host blood meal identification: Methodology and data analysis. *Ann. Rev. Entomol.* 28:179-201.

World Health Organization 1963. Terminology of malaria and of malaria eradication. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization. 1975. Manual on practical entomology Part I and II. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Zar JH. 1999. *Bioestatistical analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Tabla 2.1.- Especies de Anofelinos colectados durante veinte días consecutivos en cada experimento, durante la estación de lluvia en la zona costa.

Tipo de hospedero	An. <i>vestitipennis</i>	An. <i>albimanus</i>	An. <i>punctimacula</i>	Total
Humano	2,088 (77.73%)	557 (20.73%)	41 (1.52%)	2,686
vs				
Caballo	1,712 (49.73%)	1,577 (45.81%)	153 (4.44%)	3,442
Humano	6,634 (87.10%)	869 (11.41%)	113 (1.48%)	7,616
vs				
Cerdos	1,709 (70.82%)	692 (28.67%)	12 (0.49%)	2,413
Humano	4,332 (74.48%)	1,351 (23.22%)	133 (2.28%)	5,816
vs				
Vaca	4,840 (43.06%)	5,719 (50.88%)	680 (6.05%)	11,239
Humano	1,779 (55.23%)	1,393 (43.24%)	49 (1.52%)	3,221
vs				
Vaca	1,514 (31.37%)	2,974 (61.62%)	338 (7.00%)	4,826
Total en humanos	14,833 (76.69%)	4,170 (21.56%)	336 (1.73%)	19,339
Total en animales	9,775 (44.59%)	10,962 (50.00%)	1,183 (5.39%)	21,920
(humano:animal)	1.51:1	1:2.62	1:3.52	
Total global	24,608	15,132	1,519	41,259

Tabla 2.2.- Selección de hospederos en *Anopheles vestitipennis* colectados en Nueva Independencia, Chiapas.

Tipo de hospedero	# Mosquitos colectados	P =
Humano	1,663	
vs		0.0591
Caballo	1,351	
Humano	5,170	
vs		0.0004
Cerdos	1,487	
Humano	4,034	
vs		0.5701
Vaca	3,045	
Humano	1,160	
vs		0.1579
Vaca	1,005	
Total en humanos	12,027	
		0.003
Total en animales	6,888	
(humano:animal	1.51:1	1:2.62

Tabla 2.3.- Especies de Anofelinos colectados durante veinte días consecutivos en cada experimento, durante la estación de secas, en la zona costa.

Hospedero	An. <i>vestitipennis</i>	An. <i>albimanus</i>	An. <i>punctimacula</i>	Total
Humano vs Caballo	246 (68%)	24 (7%)	90 (25%)	360
Humano vs Vaca	129 (22%)	55 (9%)	403 (69%)	587
Humano	145 (53%)	15 (6%)	111 (41%)	271
Vaca	111 (7%)	106 (7%)	1,349 (86%)	1,566
Total humanos	391 (62%)	39 (6%)	201(32%)	631
Total animales	240(11%)	161 (7%)	1,752 (82%)	2,153
(humano-animal)	1.62:1	1:4.12	1:8.71	
Total	631	200	1,953	2,784

Tabla 2.4.- Especies de Anofelinos colectados durante veinte días consecutivos en un sólo experimento, durante la estación de lluvia, en la zona Selva Lacandona

Hospedero	An. <i>vestitipennis</i>	An. <i>albimanus</i>	An. <i>punctimacula</i>	Total
Humano	4,035 (90.81%)	307 (6.90%)	101 (1.52%)	4,443
vs				
Caballo	2,926 (72.85%)	719 (17.90%)	371 (9.23%)	4,016
Total	6,961	1,026	472	8,459

**Tabla 2.5.- Especies de Anofelinos colectados durante veinte días consecutivos en
en cada experimento, durante la estación de secas, en la zona Selva Lacandona**

Hospedero	An. <i>vestitipennis</i>	An. <i>albimanus</i>	An. <i>punctimacula</i>	An <i>darlingi</i>	An. <i>pseudopunctipennis</i>	Total
Humano	64 (9.55%)	545 (81.34%)	0	61 (9.10%)	0	670
vs						
Caballo	78 (4.26%)	1,706 (93.22%)	1 (0.054%)	45 (2.45%)	0	1,830
Humano	22 (13.01%)	137 (81.06%)	0	7 (4.14%)	3 (1.77%)	169
vs						
Vaca	28 (2.38%)	1,113 (95%)	4 (0.34%)	18 (1.53%)	9 (0.76%)	1,172
Total Humano vs Total Animales	86 (10.25%)	682 (81.28%)	0	68 (8.10%)	3 (0.35%)	839
	106 (3.53%)	2,819 (94%)	5 (0.16%)	63 (2.09%)	9 (0.29%)	3,002
(H:A)	1.23:1	1:4.13	-	1.07:1	1:3	
Total global	192	3,501	5	131	12	3,841

Tabla 2.6.- Fidelidad de hospederos en *Anopheles vestitipennis* determinado con la técnica de marcaje-recaptura.

Tipo de hospedero	# Mosquitos liberados	Tasas de recapturas* (%)	Fidelidad de hospedero** (%)	P =
Humanos vs Caballo	1,663 1,351	1.38 1.62	66 (23/35) 85 (22/26)	0.1722
Humanos vs Cerdos	5,170 1,487	0.29 0.06	60 (15/25) 33 (1/3)	0.7913
Humanos vs Vaca (sur)	4,034 3,045	0.17 0.32	50 (7/14) 100 (10/10)	0.0277
Humanos vs Vaca (norte)	1,160 1,005	0.34 0.0	100 (4/4) 0 (0/2)	0.1258
Total humano	12,027	0.40	63 (49/78)	0.0269
Total animal	6,888	0.47	80.5(33/41)	

*Recaptura total entre los dos hospederos.

**No. de mosquitos recaptados en su hospedero original.

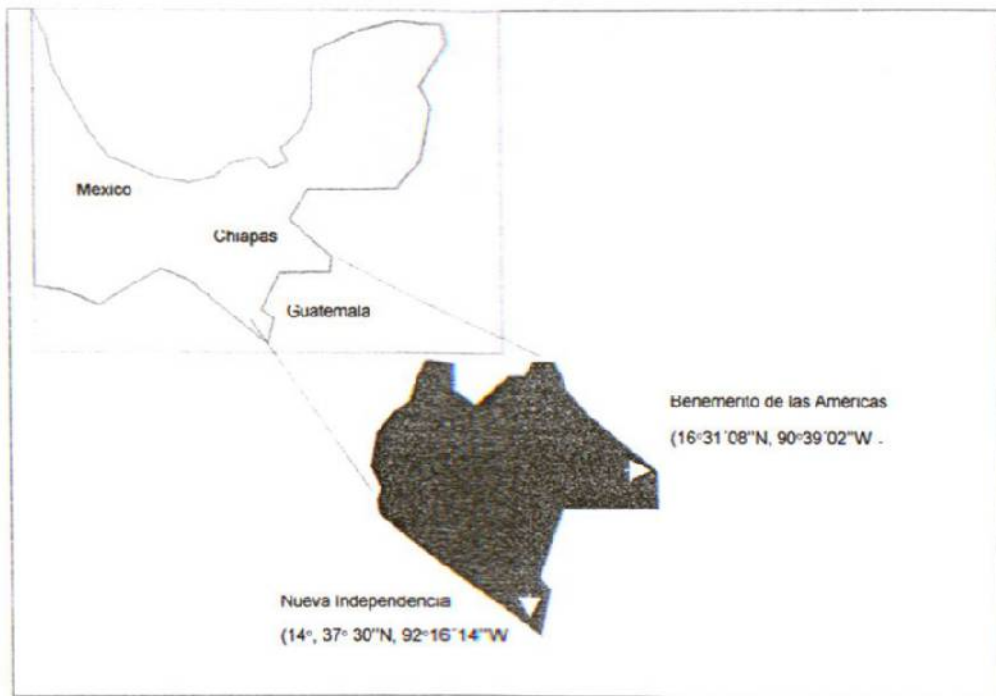


Figura 2.1.- Area de Estudio

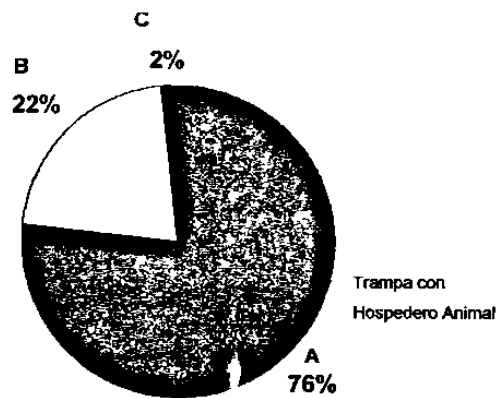
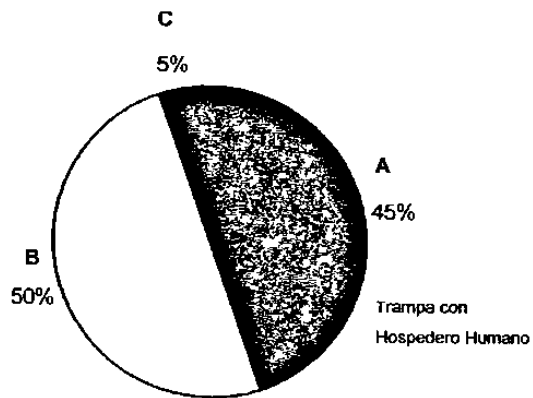


Figura 2.2.- Prevalencia de A) *An. vestitipennis*; B) *An. albimanus* y C) *An. punctimacula* colectadas en la estación de lluvia, zona costa

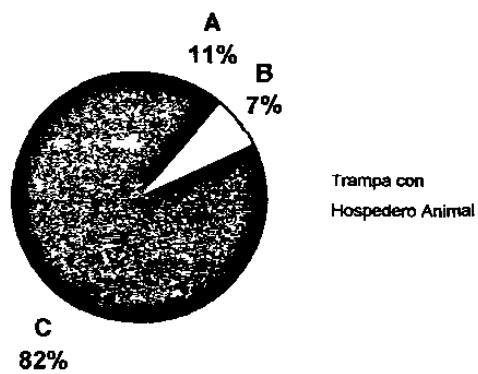
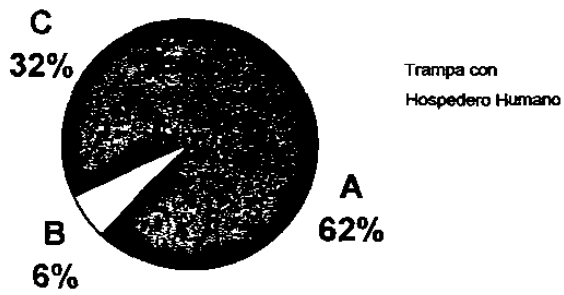


Figura 2.3.- Prevalencia de A) *An. vestitipennis*; B) *An. albimanus* y C) *An. punctimacula* colectadas en la estación de seca, zona costa

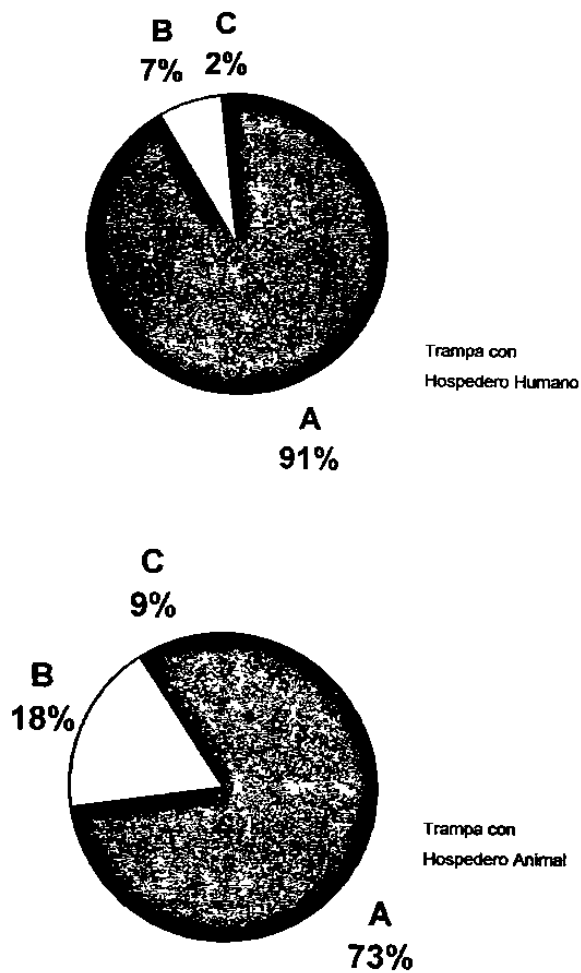


Figura 2.4.- Prevalencia de A) *An. vestitipennis*; B) *An. albimanus* y C) *An. punctimacula* colectadas en la estación de lluvia, zona Selva Lacandona

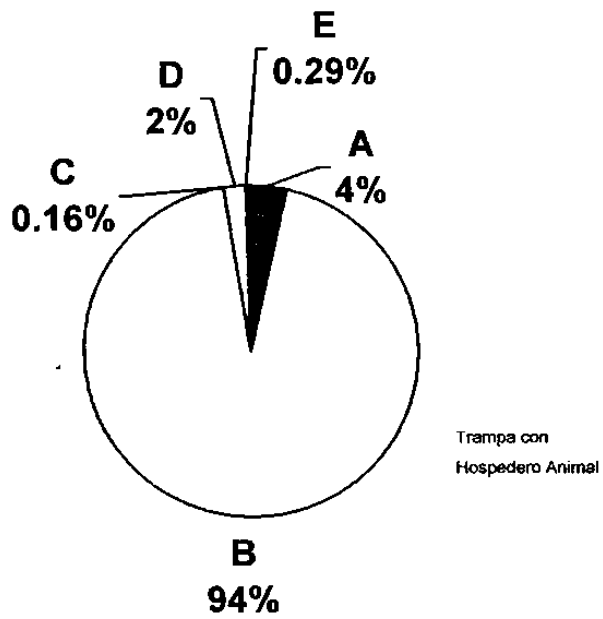
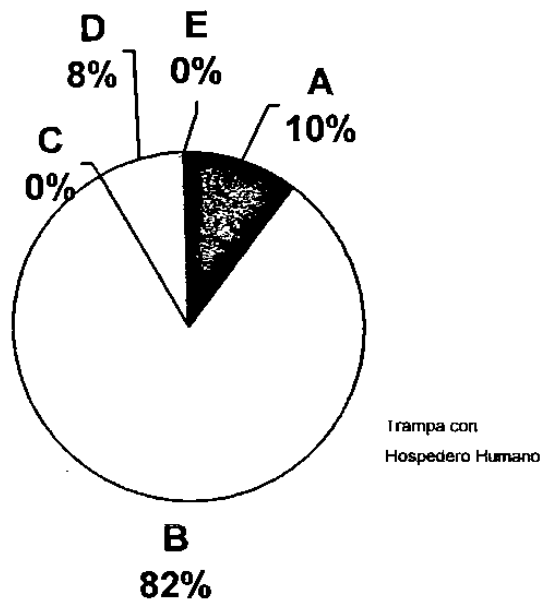


Figura 2.5.- Prevalencia de A) *An. vestitipennis*; B) *An. albimanus*, C) *An. punctimacula*, D) *An. darlingi*, E) *An. pseudopunctipennis* colectadas en la estación de seca, zona Selva Lacandona

CAPITULO 3

Estudios de fidelidad a hospederos por *Anopheles vestitipennis* (Diptera: Culicidae)

RESUMEN

El estudio fue realizado en una comunidad ubicada en el plano costero del pacífico de Chiapas, México, denominada Nueva Independencia y otra comunidad ubicada en la Selva Lacandona denominada Benemérito de las Américas. El objetivo fue manejar si el proceso conductual de la fidelidad a hospederos en ambas poblaciones es determinada por una preferencia innata o condicionante. Para ello en cada una de las zonas, se construyó una casa experimental. En donde se realizaron tres experimentos en la zona costa (en la zona Selva se realizaron los experimentos dos y tres). 1. Selección de hospederos con hembras colectadas en campo y liberadas en una casa sin compartimiento. 2. Selección de hospederos con hembras colectadas en campo y liberadas en la casa experimental con compartimiento. 3. Selección de hospederos con hembras F1 liberadas en la casa con compartimiento. En la zona costa, la prueba de ELISA detectó el 30% y el 73% de mosquitos con sangre de humano y animal respectivamente, en donde originalmente fueron colectados. En el segundo experimento, se encontraron similares resultados 76% de los mosquitos seleccionaron nuevamente al animal y solo el 24% seleccionaron a humanos. En el tercer experimento las tasas de fidelidad por humanos se incrementaron hasta un 34% mientras que solamente 5% de incremento fue observado en animales. En la Selva Lacandona, en el experimento en donde se colectaron hembras de campo y liberadas en la casa experimental con compartimiento, se encontró que el 38% y 71% seleccionaron a humanos y animales respectivamente, en donde fueron originalmente colectados. En el experimento en donde se usaron mosquitos de originados de la población humana F1, se observó un incremento del 28% con respecto a los mosquitos parentales, mientras un 18% de incremento fue observado en la fidelidad en mosquitos de origen animal F1. Nuestros resultados demostraron la existencia de un componente hereditario en ambas poblaciones, demostrando un incremento de fidelidad en la progenie F1 respecto a las poblaciones progenitoras.

INTRODUCCIÓN

Anopheles (Anopheles) vestitipennis Dyar y Knab (1906) es considerado el principal vector de paludismo en la Selva Lacandona (Loyola *et al.* 1991, Arredondo-Jiménez 1995). Es un mosquito neotropical distribuido desde el norte de México a través de Centro América, al norte de Colombia y Venezuela. En el Caribe ha sido reportado en Cuba, Jamaica, Puerto Rico y las Antillas menores (Vargas 1958, Foote y Cooke 1959, Belkin *et al.* 1970, Wilkerson y Strickman 1990).

Existen razones importantes para investigar las bases genéticas y conductuales de la preferencia por hospederos en mosquitos vectores. Una razón es la de proveer evidencias de la existencia de subpoblaciones las cuales pueden diferir en la conducta de búsqueda de hospederos, este aspecto es de particular interés en las estrategias de control. Una segunda razón y que ha estado en continuo debate es aquella que busca la posibilidad de alterar la capacidad vectorial de mosquitos mediante la manipulación genética, integrando genes con extremada zoofilia a mosquitos con un alto grado de antropofilia con el objetivo de que los mosquitos puedan desviarse del contacto con el humano (Catteruccia 2000). Otra razón importante es el análisis de la evolución de la preferencia de hospederos, con el cual se podrían complementar diversas investigaciones en curso sobre la evolución de la ecología y conducta de especies vectoras (Gibson 1996, Catteruccia 2000).

ANTECEDENTES

En general las especies de mosquitos vectores son categorizadas como antropofágicos/zoofágicos o endofágicos/esofágicos. Estos términos describen al menos un complejo de patrones conductuales y están basados sobre la evidencia del origen de la alimentación sanguínea y al número de mosquitos colectados dentro o fuera de las casas (Gibson 1996, Elliot 1972). Estas conductas de los mosquitos vectores se encuentran relacionadas a una serie de factores evolutivos de las estrategias de alimentación (Gibson 1996), así como a la frecuencia de la interacción mosquito-hospedero en el tiempo y el espacio. Por ejemplo, en las Américas el hombre ha estado presente desde hace 40,000 años (Bruce-Chwatt 1988), por tanto las poblaciones antropofílicas de mosquitos son de más reciente origen que las poblaciones zoofílicas (Arredondo-Jiménez 1995). Entre las estrategias de alimentación de las poblaciones de mosquitos están aquellas que les permite responder a los diferentes estímulos de atracción de los hospederos como el olor, color y tamaño corporal. Según el grado de respuesta a los diferentes estímulos los mosquitos pueden también categorizarse como alimentadores generalistas y/o específicos, los primeros demuestran tener un amplio rango de hospederos, mientras que los segundos demuestran una especificidad hacia un tipo de hospedero, ya sean humano o animal.

En estudios recientes con *An. vestitipennis* se han identificado dos poblaciones con diferentes preferencias alimenticias, una antropofílica y otra zoofílica. Al comparar estas dos poblaciones también se han sugerido la existencia de diferencias genéticas, morfológicas y ecológicas entre ambas poblaciones (Arredondo-Jiménez *et al.* 1996, Rodríguez *et al.* 1999, Murillo *et al.* 2001). Este tipo de hallazgos observados en otras especies de anofelinos morfológicamente idénticas han sido razones importantes para sugerir la posible existencia de diversas especies biológicas (Hackett 1937, Coluzzi *et al.* 1975, Mollineaux y Gramiccia 1980).

Sin embargo, en *An. vestitipennis* se requieren aportar más datos comparativos de la existencia de divergencias biológicas entre las dos supuestas poblaciones. En un estudio de marcaje y recaptura, encontramos que más del 50% de *An vestitipennis* tienen contacto con hospederos humanos y animales (=población antropofílica y zoofílica) demostrando fidelidad para retornar al mismo hospedero para alimentarse. Sin embargo, desde que los mosquitos fueron colectados, marcados, liberados y recapturados en el campo, no fue posible establecer en qué hospedero (s) se había alimentado el mosquito previamente o cuantos contactos tuvieron con estos hospederos. Por ello, no fue posible presentar una conclusión acerca del grado de especificidad de las poblaciones antropofílicas y zoofílicas que tienen por un tipo de hospedero en particular y si la especificidad hacia un tipo de hospedero es modificada.

HIPOTESIS

Si la selección de hospederos en *An. vestitipennis* presenta una base genética, entonces hembras de esta especie podrían presentar una conducta innata hacia un tipo de hospedero ya sea humano o animal.

OBJETIVO GENERAL.

Investigar si el proceso conductual de la fidelidad por hospederos humanos o animales en ambas poblaciones, es determinada por una conducta innata o si esta es aprendida.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

Determinar si hembras de campo sin alimentar presentan una conducta de fidelidad al mismo tipo de hospedero en que originalmente fueron colectados, después de ser liberados en una casa experimental.

Determinar el grado de fidelidad de las hembras F1 criadas en laboratorio originadas de hembras fieles a humanos o animales.

METODOLOGIA

Descripción del área de estudio.

El estudio fue realizado en el plano costero del Océano Pacífico de Chiapas, México, en Nueva Independencia (14°37'30"N, 92°16'14"W, elevación 50 m), una localidad con una población de 112 habitantes viviendo en 23 casas (Figura 4.1). En general, las casas en esta población se encuentran bien ventiladas, construidas con techo de palma y pared discontinua hecha de madera o palo de bambú. El clima en esta área es caliente subhúmedo (García, 1973), con 2 estaciones bien definidas: una estación de lluvias que se extiende a partir del mes de mayo hasta octubre, y el resto de los meses con una estación de secas. El promedio anual de lluvias en el área es 2,100 mm, con un promedio mensual de temperatura de 27°C y con un rango de humedad de 61 a 100% (Verhoef 1986, Arredondo-Jiménez 1990). La selección de la localidad obedeció a la existencia de una alta abundancia de mosquitos. Aunque la vegetación primaria alrededor del Nueva Independencia ha sido reemplazada en su mayor parte por cultivos de mango, banano maíz y pastura para ganado, existen aún varios manchones de bosques y formaciones de pastos altos inundados que favorecen la abundancia de poblaciones larvarias y adultos de *An. vestitipennis* (Rejmankova et al. 1998, Arredondo-Jiménez et al. Datos no publicados).

2) Benemérito de las Américas (16°31'08"N, 90°39'02"W, 150 msnm) localizado en la Selva Lacandona con una población de 2142 personas viviendo en 670 casas localizadas frente a la frontera con Guatemala, esta zona se considera un área de alta transmisión de paludismo por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* influenciada por la migración de personas enfermas desde Guatemala (Arredondo-Jiménez et al. 1996). La vegetación primaria alrededor de Benemérito de las Américas esta siendo reemplazada en su mayor parte por pastura para ganado y cultivos (Chile y Maíz). Estas dos comunidades se encuentran separadas por aproximadamente 280 kilómetros (Figura 3.1).

Experimentos de fidelidad a hospederos por hembras de An. vestitipennis.

En cada una de las zonas, se construyó una casa experimental (6 x 4 m) con techo de palma y paredes discontinuas con palo de palma o bambú (características de las casas de la región) ubicada a 800 m fuera de la comunidad, a ésta se le cubrió interiormente (techo y paredes) con una malla tricot de las mismas dimensiones de la casa para evitar que los mosquitos al ser liberados dentro de la casa pudieran escaparse.

Una vez construida la casa experimental, se realizaron tres experimentos en la zona costa (en la zona selva se realizaron los experimentos dos y tres).

1. *Fidelidad a hospederos por hembras colectadas en campo y liberadas en una casa sin compartimiento:* Se colectaron mosquitos sin alimentar sobre voluntarios humanos y sobre un hospedero animal (caballo) entre las 18:00 y 22:00 horas. Los mosquitos fueron marcados con polvo fluorescente (Day-Glo® Bast New Holland MI) de diferentes colores de acuerdo al sitio de colección y posteriormente fueron liberados dentro de la casa experimental (conteniendo 2 voluntarios humanos y un caballo amarrado) a las 22:30 horas y recapturados por los mismos voluntarios humanos a las 05:00 horas. Los mosquitos recapturados fueron identificados por el color fluorescente y aplastados sobre papel filtro Whatman No. 2, posteriormente fueron analizados con una prueba indirecta de ELISA para identificar la fuente de alimentación sanguínea. Para ello, las muestras fueron eluidas durante toda la noche a 4°C con 200 ml de una solución salina de buffer de fosfato (pH 7.2 PBS). De cada muestra eluida fueron colocadas en un baño con 50 ml de buffer bloqueador (bicarbonato de sodio de 35 mM, pH 9.6) en seis pozos de una placa de polietileno (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria Virginia) e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Después de bloquear sitios sin reaccionar con 2.5% de leche en polvo en PBS de pH 7.2, los pozos fueron tamizados contra un banco de anticuerpos (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri) para identificar sangre de humanos y caballo, y este fue seguido de un conjugado de peroxidasa de rabano de suero de camero anti-conejo IgG. El color

fue desarrollado usando 2,2´azino-bis (3 etilbenzeno, tiazoline, 6 acido sulfonico ABTS) (Sigma Co.) como un sustrato. Muestras de sangre de las especies hospederas fueron secados sobre papel y usados durante pruebas del control positivo. Una prueba fue positiva cuando su valor de absorbancia fue más alta que dos veces la media de 5 controles negativos (consistiendo de machos y hembras de mosquitos de *An. vestitipennis*. Las alimentaciones mixtas representaron 2 o más hospederas diferentes (Loyola *et al.* 1990)

2. *Fidelidad a hospederas por hembras colectadas en campo y liberadas en la casa experimental con compartimiento.* Se colectaron mosquitos sin alimentar sobre voluntarios humanos y diferentes cebos animales, caballo, vaca y cerdo según el caso, entre las 18:00 y 22:00 horas. Los mosquitos fueron marcados con polvo fluorescente (Day-Glo® Holland New DI) de diferentes colores de acuerdo al cebo de colección y posteriormente se liberaron dentro de una casa experimental. En este experimento, la casa fue dividida con una malla fina hasta tres compartimientos (Gillies 1967, Arredondo-Jiménez *et al.* 1992). (Figura 3.2). En experimentos separados, los compartimientos de los lados fueron ocupados por voluntarios humanos o en su caso por un caballo, una vaca o dos cerdos. Los compartimientos de los lados fueron conectados a la parte central de la casa donde los mosquitos fueron liberados, con una abertura de 2 cm de diámetro, desde el piso hasta la parte superior de la cortina. El pequeño tamaño de la abertura evitó que los mosquitos retornaran a la cámara central después de seleccionar al cualquier hospedero.

En cada experimento, el hospedero fue ubicado en la casa experimental a las 19:00 horas, y los mosquitos fueron liberados a las 22:30 horas en la parte central de la casa. La recaptura de los mosquitos en cada compartimiento se realizó a las 05:00 horas por los mismos voluntarios. Los mosquitos recapturados que fueron fieles a humanos o animales fueron transportados al insectario del CIP para obtener mosquitos de la progenie F1.

3. *Fidelidad a hospederos por hembras F1 liberadas en la casa con compartimiento.* De los mosquitos recapturados con conocida fidelidad, resultaron hembras grávidas, a las que se les permitió ovipositar mediante la técnica de oviposición forzada, consistente en la inmovilización de los mosquitos exponiéndolos a una temperatura de 4°C por 1 minuto. A cada mosquito inmovilizado se le cortó una de las alas con la ayuda de una aguja de disección y posteriormente los mosquitos recuperados fueron colocados en pequeñas cámaras de oviposición consistente en vasitos de plástico de 40 ml de capacidad, los cuales en cada uno fue colocado un anillo de papel filtro Watman #2 y 20 ml de agua como soporte de oviposición. Al cuarto día de oviposición a los huevecillos se les indujo a eclosionar mediante lavados con agua filtrada a presión. Para ello los huevecillos se colocaron sobre un embudo conteniendo un papel filtro y con una piseta se les roció agua a presión para estimular la eclosión, al término de los lavados los huevecillos se colocaron en charolas de plástico conteniendo el agua que sirvió en el filtrado en donde finalizaba el proceso de eclosión. Las larvas fueron distribuidas en lotes de 500 en otras charolas de plástico. A partir de las 24 horas de eclosión las larvas fueron alimentadas con alimento estéril para ratón hasta la obtención de adultos F1. Los mosquitos machos y hembras fueron colocados en jaulas de 30 x 30 x 30 cm y se les proveyó solución de sacarosa al 10% mediante algodones impregnados. Después de 4 días de edad, las hembras de cada población fueron colocadas en contenedores de plástico cubiertos con papel dextransa previamente polvoreados con polvo fluorescente, para que los mosquitos al posarse sobre la pared interna del recipiente se colorearan por sí solos, y poder así identificarlos.

Los mosquitos F1 fueron transportados a la comunidad en donde fueron marcados con polvo fluorescente según el origen de los mosquitos y así poder identificarlos al ser recapturados en la casa experimental. Al término de las recapturas se obtuvo el porcentaje de fidelidad de mosquitos F1.

Análisis de datos.

Diferencias entre las proporciones de mosquitos recapturados fueron analizados usando una prueba de Chi cuadrada con corrección de continuidad (Zar 1999).

RESULTADOS

Fidelidad a hospederos por hembras colectadas en campo y liberadas en una casa sin compartimiento. Un total de 247 y 158 hembras de *An. vestitipennis* colectadas originalmente sobre cebos humanos y cebo animal, fueron liberados respectivamente. De acuerdo al análisis de sangre con la prueba de ELISA, el 30% (73/247) de los mosquitos colectados originalmente de cebo humano fueron identificados con sangre humana. Mientras que el 73% (116/158) de los mosquitos originados de cebo caballo fueron identificados con sangre de éste animal. Por lo que, las hembras colectadas originalmente sobre cebo animal demostraron 2.43 veces más de fidelidad que hembras colectadas sobre humanos ($\chi^2 = 72.737$, $df = 1$, $P = 0.0001$). (Tabla 3.1).

De los mosquitos analizados se detectaron hembras con alimentaciones mixtas (caballo y humano), 3 en mosquitos colectados originalmente en caballo y 4 mosquitos colectados originalmente en humanos.

Fidelidad a hospederos por hembras colectadas en campo y liberadas en la casa experimental con compartimiento. En el primer experimento, se liberaron un total de 259 y 273 hembras de *An. vestitipennis* colectadas originalmente sobre cebos humanos y cebo caballo, respectivamente. De los mosquitos de origen humano, se recapturó el 25% (65/259) en el compartimiento con cebos humanos. Mientras que de los mosquitos de origen animal se recapturó el 70% (189/273) en el compartimiento con cebo caballo. Por lo que, las hembras colectadas originalmente sobre cebo animal demostraron 2.80 veces más de fidelidad que hembras colectadas sobre humanos ($\chi^2 = 102.003$ $d.f. = 1$ $P = 0.0001$).

En el segundo experimento en donde se liberaron mosquitos colectados originalmente en humanos y en una vaca, el 15% (35/228) y 84% (399/476) fueron recapturados en humanos y en la vaca respectivamente. Por lo que, las hembras colectadas originalmente sobre cebo animal demostraron 5.6 veces más de

fidelidad que hembras colectadas sobre humanos ($\chi^2 = 302.81$, $d.f. = 1$ $P = 0.0001$).

En el tercer experimento en donde se liberaron mosquitos colectados originalmente de humanos y un cerdo, la fidelidad a humanos fue del 34% (66/261), mientras que la fidelidad a cerdos fue del 68% (131/194). Por lo que, las hembras colectadas originalmente sobre cebo animal demostraron 2 veces más de fidelidad que hembras colectadas sobre humanos ($\chi^2 = 79.158$ $d.f. = 1$ $P = 0.0001$).

Entre todos los experimentos se liberaron un total de 748 y 943 hembras de *An. vestitipennis* colectadas originalmente sobre cebos humanos y cebos animales, respectivamente. De los mosquitos de origen humano, se recapturó el 25% (187/748) en el compartimiento con cebos humanos. Mientras que de los mosquitos de origen animal se recapturó el 76% (719/943) en el compartimiento con cebos animales. Por lo que, las hembras colectadas originalmente sobre cebos animales demostraron 3.04 veces más de fidelidad que hembras colectadas sobre humanos ($\chi^2 = 102.003$ $d.f. = 1$ $P = 0.0001$). (Tabla 3.2).

Fidelidad de hospederos con hembras F1 liberadas en la casa con compartimiento. Durante el primer experimento, se observó un incremento de más del 40% en la fidelidad por humanos con respecto a las hembras parentales ($\chi^2 = 89.69$, $df = 1$, $P < 0.0001$), mientras que solamente el 16% de incremento se observó en la fidelidad por el caballo con respecto a las hembras parentales ($\chi^2 = 14.79$, $df = 1$, $P = 0.0001$) (Tabla 3.2). De igual manera, en el segundo experimento, se observó un incremento del 40% en la fidelidad en mosquitos F1 con respecto a los mosquitos parentales colectados sobre humano ($\chi^2 = 88.83$, $df = 1$, $P < 0.0001$); en contraste se observó un decremento del 5% en la fidelidad hacia la vaca respecto a los mosquitos parentales, sin embargo este decremento no fue estadísticamente significativo ($\chi^2 = 2.28$ $df = 1$, $P = 0.13$). Durante el tercer

experimento, se observó un 20% de incremento en la fidelidad de los mosquitos F1 con respecto a los mosquitos parentales originados de humanos ($X^2 = 17.40$, $df = 1$, $P < 0.0001$), mientras que no se observó incremento de la fidelidad de los mosquitos F1 con respecto a los mosquitos parentales originados de cerdos ($X^2 = 0.62$, $df = 1$, $P = 0.597$).

En general se observó que las hembras F1 presentaron un incremento de 34% de la fidelidad con respecto a los mosquitos parentales originados de cebos humanos, este incremento fue significativo ($X^2 = 178.59$, $df = 1$, $P < 0.0001$), mientras que las hembras F1 solamente demostraron un incremento del 4% de la fidelidad con respecto a los mosquitos parentales originados de cebos animales, este incremento fue marginalmente significativo ($X^2 = 4.145$, $df = 1$, $P = 0.041$).

Fidelidad a hospederos por hembras colectadas en campo y liberadas en la casa experimental con compartimiento zona Selva Lacandona. En el único experimento, se liberaron un total de 405 y 156 hembras de *An. vestitipennis* colectadas originalmente sobre cebos humanos y cebo caballo, respectivamente. De los mosquitos de origen humano, se recapturó el 38% (154/405) en el compartimiento con cebos humanos. Mientras que de los mosquitos de origen animal se recapturó el 71% (111/156) en el compartimiento con cebo caballo. Por lo que, las hembras colectadas originalmente sobre cebo animal demostraron 1.86 veces más de fidelidad que hembras colectadas sobre humanos ($X^2 = 48.273$ $df = 1$, $P < 0.0001$) (Tabla 3.3).

Fidelidad a hospederos por hembras F1 liberadas en la casa con compartimiento en la Selva Lacandona. En el único experimento, se observó un incremento de más del 28% en la fidelidad por humanos con respecto a las hembras parentales ($X^2 = 48.245$, $df = 1$, $P < 0.0001$), mientras que solamente el 18% de incremento se observó en la fidelidad por el caballo con respecto a las hembras parentales ($X^2 = 15.69$, $df = 1$, $P = 0.0001$) (Tabla 3.3)

DISCUSIÓN

La fidelidad a hospederos de mosquitos de campo y de hembras de la progenie F1 fueron evaluadas reportando el número de mosquitos recapturados exponiendo fidelidad o retorno al mismo hospedero para un nuevo evento de alimentación sanguínea.

Los experimentos de fidelidad con mosquitos de campo analizados con la prueba de ELISA en la casa sin compartimiento y en los experimentos de liberación y recaptura en la casa con compartimiento, se observó que las poblaciones colectadas originalmente sobre animales presentan un grado de retorno o fidelidad mayor con respecto a aquellos mosquitos colectados originalmente sobre humanos. Estas tendencias también fueron observadas en el tercer experimento con mosquitos F1 colectadas en animales, las cuales presentan el grado de fidelidad es mayor en las poblaciones originadas de animales. Sin embargo, se observó que el rango de incremento de la fidelidad en las hembras F1 con respecto a sus progenitores fue mayor en las poblaciones originadas de cebos humanos (>40%), mientras que el incremento de la fidelidad en la población originada de cebo animal fue de solo un 5% en las hembras F1 con respecto a la generación parental. Los resultados del grado de retorno o fidelidad fueron también observadas en los experimentos de liberación y recaptura, usando trampas tipo Magoon en la misma área, en donde la población animal mostró mayor grado de retorno con respecto de aquellos mosquitos colectados en humanos (ver capítulo 2). Estas diferencias en el grado de fidelidad a hospederos, puede ser un criterio de separación de ambas poblaciones de *An. vestitipennis*, las cuales podrían estar asociadas a las diferencias genéticas encontradas previamente en estas dos poblaciones. El incremento de la fidelidad mostrada por cada población puede ser una evidencia de la existencia de un componente hereditario en la selección de hospederos (Gilles 1972). Este tipo de conducta, ha sido reportado en *An. albimanus*, especie que demuestra preferencia por alimentarse de animales (Breeland 1972, Garret-Jones *et al.* 1980). Cuando

mosquitos de esta especie se colectaron sobre animales y fueron alimentados con sangre de humanos y viceversa, se criaron y se liberaron, demostraron preferencia por el mismo tipo de hospederos en donde fueron colectados (Arredondo-Jiménez *et al* 1992). Se ha reportado que cuando una especie presenta una conducta de alimentación sobre un sólo tipo de hospedero es un reflejo de una preferencia innata por ese tipo de hospedero (Shalaby 1969a, b). Mientras que poblaciones de mosquitos que muestran un rango amplio de hospederos es un reflejo de una conducta oportunista de la especie (Gillies 1988).

La existencia de un componente hereditario en *An. vestitipennis* para seleccionar a hospederos ya sea humanos o animales, podría dar la posibilidad de obtener una selección en el laboratorio de una población con un alto grado de preferencia por humanos o animales en pocas generaciones, esta alternativa fue demostrada en *An. gambiae* Giles, donde en muy pocas generaciones de laboratorio fue posible seleccionar una cepa que difería significativamente en la preferencia por un hospedero, alimentándose más de humanos que por animales (Gillies 1964).

Epidemiológicamente, las poblaciones de mosquitos que presentan una fidelidad innata por alimentarse de hospederos humanos podrían tener un potencial más alto en su capacidad vectorial, mientras que aquellos que presentan una fidelidad innata para alimentarse de animales podrían tener un alto valor zoonosológico contra mosquitos vectores de paludismo (Hess y Hayes 1970).

Modelos teóricos han indicado que mosquitos con selección dirigida (no al azar) de hospederos, pueden tener un importante efecto cuantitativo y cualitativo sobre la dinámica de infección de paludismo (Kingsolver 1987), más que aquellos que presentan una selección oportunística de hospederos (Hess y Hayes 1970).

Los resultados demostraron que en *An. vestitipennis* existen dos poblaciones separadas con un grado específico de fidelidad a hospedero. Aquellas

diferencias conductuales entre las poblaciones podrían sugerir una mezcla de dos o más especies morfológicamente crípticas (Nutsathapana 1986). Una posible explicación de aquellas divergencias puede ser la existencia de un componente hereditario en la fidelidad de hospedero evidenciado por el incremento de la fidelidad a hospederos (Hii *et al.* 1991).

CONCLUSIÓN.

Ambas poblaciones de *Anopheles vestitipennis* demostraron una conducta innata de fidelidad a hospederos, evidenciados por un incremento de la fidelidad de las hembras F1 respecto a la fidelidad de las hembras progenitoras.

LITERATURA CITADA

- Aitkin THG. 1945. Studies on the anopheline complex of western America. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* 7:273-364.
- Arredondo-Jiménez JI, Bown DN, Rodríguez MH, Villarreal C, Loyola EG, Frederickson CE. 1992. Test for the existence of genetic determination or conditioning in host selection by *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae). *J. of Medical Entomology.* 29:894-897.
- Arredondo-Jiménez JI. 1990. Larval ecology of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) in southern Chiapas, México. M. S. Thesis. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza. N. L., México. 70 p.
- Arredondo-Jiménez JI. 1995. Comparative ecology of allopatric populations of *Anopheles (Anopheles) vestitipennis* (Diptera:Culicidae). Ph. D. Dissertation. University of California, Davis, CA.
- Arredondo-Jiménez JI, Gimnig J, Rodríguez MH, Washino RK. 1996. Genetic differences among *Anopheles vestitipennis* subpopulations collected using different methods in Chiapas State, Southern México. *J. of the American Mosquito Control association.* 12:396-401.
- Belkin JN, Heinemann SJ, Page WA. 1970. The Culicidae of Jamaica. *Contributions of the American Entomological Institute* 6, 1-458.
- Breeland S. 1972. Studies on the diurnal resting habits of *Anopheles albimanus* and *An. pseudopunctipennis* in El Salvador. *Mosquito News* 32, 99-106.
- Bruce-Chwatt LJ. 1988. History of malaria from prehistory to eradication. In: Wernsdorfer WH, McGregor I. (eds) *Malaria. Principles and practice of*

malariaology, Vol. 1:1-59. Churchill-Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York.

Catteruccia F. 2000. Transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* 405:959-962.

Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V. 1975. Chromosomal investigations on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex in the Garki District (Kano State, Nigeria). Results of species identifications from 1971-1974, MPD/TN75.1 *WHO Tech. Note* 24:16-25.

Edman JD, Webber & Kale HW. 1972. Host-feeding patterns of Florida mosquitoes. II. *Culiseta*. *J. Med. Entomol.* 9:429-434.

Elliot R. 1972. The influence of vector behavior on malaria transmission. *The American J. of Tropical Medicine and Hygiene* 21:755-763.

Foote RH, Cook DR. 1959. Mosquitoes of medical importance. *Agriculture Handbook 152, United States Department of Agriculture, Washington.*

García E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. *Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, México.*

Garret-Jones CP, Borehan FL, Pant CP. 1980. Feeding habits of anophelines (Diptera: Culicidae) in 1971-78, with reference to the human blood index: A review. *Bull. Ent. Res.* 70:165-180.

Gibson G. 1996. Genetics, ecology and behavior of anophelines. *Ciba Found Symp.* 200:22-37.

- Gillies MT. 1964. Selection for host preference in *Anopheles gambiae*. *Nature*, Lond. 203:852.
- Gillies MT. 1967. Experiments on host selection in the *Anopheles gambiae* complex. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 61:68-75.
- Gillies MT. 1988. Anopheline mosquitoes: vector behavior and bionomics. In: Wersdorfer WH, McGregor I. (eds). *Malaria: principles and practice of malariology*, volume 1. pp. 453-485. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York.
- Hackett LW. 1937. Anophelism without malaria, pp. 47-84. In: *Malaria in Europe: An ecological study*. Oxford University Press, London.
- Hess AD, Hayes RO. 1970. Relative potentials of domestic animals for zoonophylaxis against mosquito vectors of encephalitis. *The American J. of Tropical Medicine and Hygiene*. 19:327-334.
- Hii JJK, Chew M, Sang VY, Munstermann LE, Tan SG, Panyim S, & Yasothornsrikul S. 1991. Population genetic analysis and host seeking and resting behavior in the malaria vector, *Anopheles balabencis*. (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomology*. 28:675-684.
- Kingsolver KG. 1987. Mosquito host choice and the epidemiology of malaria. *Am. Nat.* 130:811-827.
- Loyola GE, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH, Bown DN, Vaca-Marin MA. 1991. *Anopheles vestitipennis*, the probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon forest of Chiapas, México. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85:171-174.

the Lacandon forest of Chiapas, México. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85:171-174.

Loyola EG, González-Ceron L, Rodríguez MH, Arredondo JI, Bennett S, and Bown DN. 1993. *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) Host Selection Patterns in Three Ecological Areas of the Coastal Plains of Chiapas, Southern México. *J. Medical Entomology*. 30: 518-523.

Mollineaux L, Gramiccia G. 1980. The Garki Project: Research on epidemiology and control of malaria in Sudan Savanna of West Africa. Geneva: *World Health Organization*.

Murillo-Sánchez MH 2001. Variabilidad genética de subpoblaciones de *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae) mediante el uso de RAPD-PCR. Tesis. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. 100 p.

Nutsathapana SP, Sawasdiwongphorn U, Chitprarop & Cullen JR. 1986. The behavior of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera:Culicidae) subjected to differing levels of DDT selection pressure in northern Thailand. *Bull. Ent. Res.* 76: 303-312.

Orozco-Bonilla A, Ulloa A, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH. 2001. Morphological differences among *Anopheles vestitipennis* populations. *The 67th Annual Meeting of the AMCA*, Dallas, Texas.

Rejmankova E, Pope KO, Roberts DR, Lege MG, Andre R, Greico J, Alonzo Y. 1998. Characterization and detection of *Anopheles vestitipennis* and *Anopheles punctimacula* (Diptera:Culicidae). Larval habitats in Belize with field survey and SPOT Satellite Imagery. *J. of Vector Ecology* :74-87.

- Rodríguez MH, Chávez B, Hernández-Ávila JE, Orozco A, Arredondo-Jiménez JI. 1999. Description and morphometric analysis of the eggs of *Anopheles (Anopheles) vestitipennis* (Diptera:Culicidae) from Southern México. *J. Med. Entomol.* 36:78-87.
- Shalaby AM. 1969a. Host-preference observation on *Anopheles culicifacies* (Diptera:Culicifacies) in Gujarat State, India. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 62:1270-1273.
- Shalaby AM. 1969b. Observation on the blood feeding pattern of three *Anopheles* species in Gujarat State, India. *Mosquito News* 29:626-634.
- Vargas L. 1958. Nuevos datos de la distribución de anofelinos mexicanos. *Bol. Epidemiol. (Mex)* 32:33-56.
- Verhoef JCM. 1986. Ecology of mosquito breeding during the transition from dry to wet season in a rural coastal area of Chiapas, Mexico, with special reference to *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae). Centro de Investigación de Paludismo, Tapachula, Chiapas México.
- Wilkerson RC, Strickman D. 1990. Illustrated key to the female anophelinae mosquitoes of Central America and Mexico. *J. of the American Mosquito Control Association* 6:7-34.
- Zar JH. 1999. Bioestatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Tabla 3.1. Fidelidad a hospedero de hembras de *An. vestitipennis* colectadas en campo y liberadas en una casa experimental sin compartimientos, la fuente sanguínea fue determinada por una prueba de Elisa en Nueva Independencia, Chiapas.

Hospedero original	Mosquitos liberados	Fieles ¹	Infieles ²	Fidelidad (%)	χ^2
Humano	247	73	174	30	72.737
Caballo	158	116	42	73	$P = 0.001$

¹ Fieles: mosquitos alimentados sobre su hospedero original

² Infieles: mosquitos alimentados en un hospedero alternativo

Tabla 3.2.- Fidelidad a hospederos de hembras de *An. vestitipennis* colectadas en campo y hembras F1 resultantes, liberadas en la casa experimental en donde hospederos humanos y animales permanecieron en los compartimientos en Nueva Independencia, Chiapas.

Tipo de hospedero	Hembras parentales (%)	Hembras F1 (%)	Tipo de hospedero	Hembras Parentales (%)	Hembras F1 (%)
Humanos	25 a (n=259)	67 b (n=260)	Caballo	70 (n=273)	86 b (n=180)
Humanos	15 a (n=228)	55 b (n=320)	Vaca	84 (n=476)	79 c (n=240)
Humanos	34 a (n=261)	54 b (n=193)	Cerdo	68 (n=194)	72 b (n=102)
Humanos	25 a (n=748)	59 b (773)	Animales	74 (n=943)	79 b (n=522)

a indica significativamente más baja fidelidad a hospederos ($P < 0.05$) en hembras parentales colectadas originalmente en humanos con respecto a hembras parentales colectadas sobre animales.

b indica significativamente más alta fidelidad a hospederos en mosquitos hembras F1 con respecto a la fidelidad de hospedero de hembras parentales.

c indica decremento no significativo de fidelidad en F1 con respecto a mosquitos parentales colectados en animales.

Tabla 3.3.- Fidelidad a hospederos de hembras de *An. vestitipennis* colectadas en campo y hembras F1 resultantes, liberadas en la casa experimental en donde hospederos humanos y animales permanecieron en los compartimientos en la Selva Lacandón, Chiapas.

Tipo de hospedero	Hembras parentales (%)	Hembras F1 (%)	Tipo de hospedero	Hembras parentales (%)	Hembras F1 (%)
Humano	38 a (n=405)	66 b (n=261)	Caballo	53 (n=586)	71 b (n=156)

a indica significativamente más baja fidelidad a hospederos en hembras parentales originalmente colectadas en humanos con respecto a hembras parentales colectadas sobre animales.

b indica significativamente más alta fidelidad a hospederos ($P < 0.05$) en mosquitos hembras F1 con respecto a la fidelidad de hospedero de hembras parentales (mosquitos en contacto con humanos o animales).

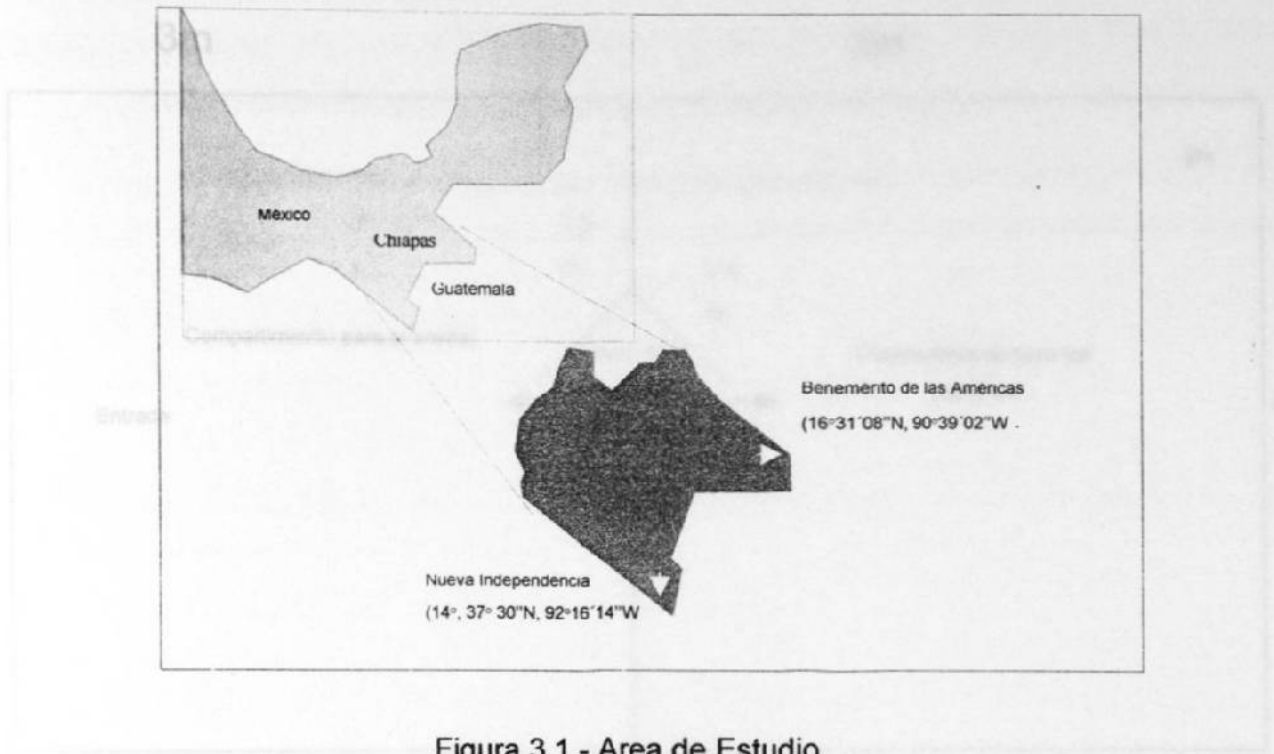


Figura 3.1.- Area de Estudio

Figura 3.2.- Diseño de la casa experimental mostrando los tres compartimientos.

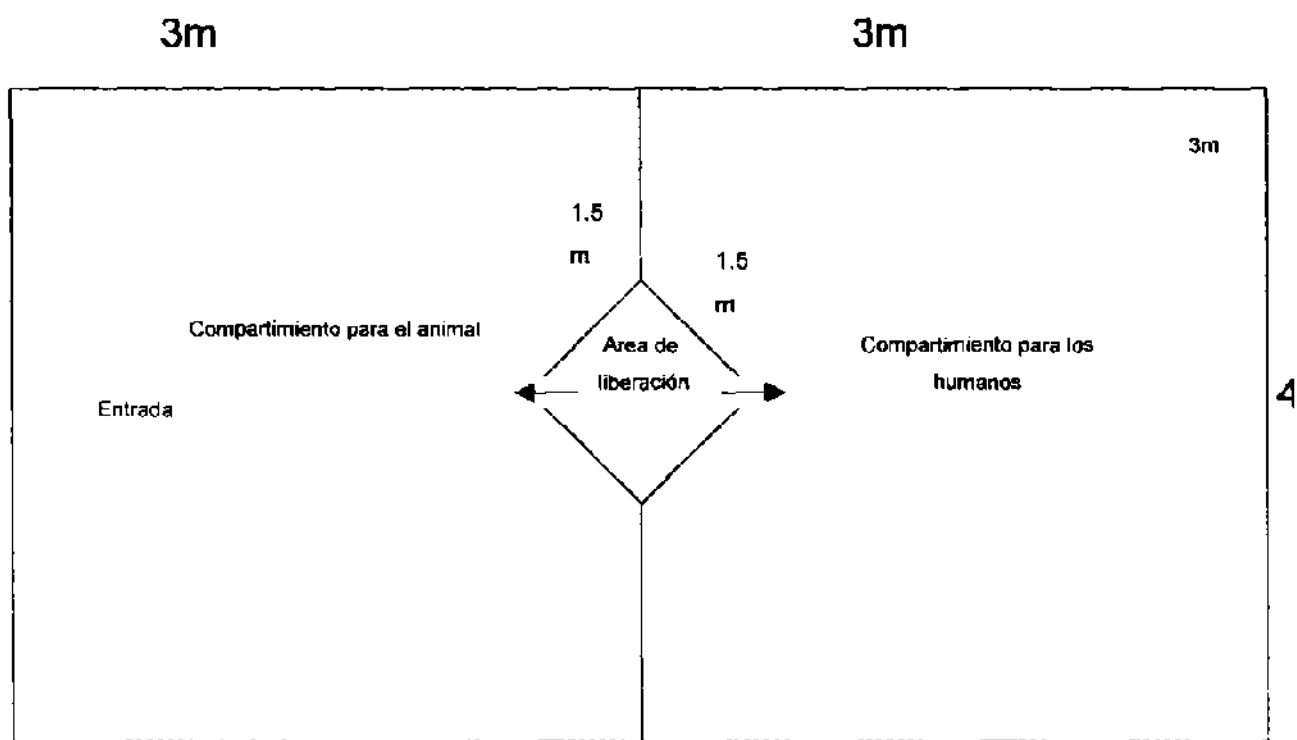


Figura 3.2.- Diseño de la casa experimental mostrando los tres compartimientos.

CAPITULO 4

Compatibilidad reproductiva entre dos poblaciones de

***Anopheles vestitipennis* (Diptera: Culicidae).**

RESUMEN.

Experimentos de hibridación involucrando hembras y machos de *An. vestitipennis* originados de una población que se alimenta de humanos (PA) y de otra que se alimenta de animales (PZ) fueron realizados mediante inducción de cópulas en el laboratorio. En los híbridos producidos se investigó el porcentaje de inseminación, número de hembras que ovipositaron, total de huevos obtenidos, fecundidad por hembras, tasa de eclosión de huevos, proporción de sexos y éxito de cría. Los híbridos obtenidos en las cruzas recíprocas, no demostraron efectos en las variables estudiadas, en algunos de ellos como la fecundidad y éxito de cría fueron más exitosos que los controles. Este hallazgo sugiere que al menos en laboratorio las dos poblaciones de *An. vestitipennis* pueden aún demostrar compatibilidad reproductiva.

INTRODUCCIÓN

Anopheles (Anopheles) vestitipennis Dyar y Knab (1906), pertenece a la serie *Arribalzagia* (Reid y Knight 1961, Wilkerson y Peyton 1990) y está relacionado al complejo *Maculipennis* (Chowdaiah *et al.* 1966, Kitzmiller *et al.* 1967). Es un mosquito Neotropical y se encuentra distribuido desde San Luis Potosí en México hasta el norte de América del Sur (Vargas 1958, Foote y Cooke 1959, Belkin *et al.* 1970, Wilkerson y Strickman 1990). En el estado de Chiapas *An. vestitipennis* ocurre en altitudes debajo de 200 m, y está asociado con bosques semidecíduos cerca de los manglares a lo largo del plano costero y en el bosque tropical lluvioso en la Selva Lacandona (Arredondo-Jiménez 1998). *Anopheles vestitipennis* es considerado el principal vector de paludismo en la Selva Lacandona (Loyola *et al.* 1991, Arredondo-Jiménez 1995), y parte de Guatemala (Padilla *et al.* 1992)

Muchos mosquitos vectores de paludismo son miembros de complejos de especies (según White 1977: especies hermanas que presentan diferencias morfológicas ocultas) por ejemplo el complejo *An. gambiae* (Davidson 1964, Davidson *et al.* 1967; Davidson y Hunt, 1973), *An. dirus* (Peyton 1990), y *An. maculipennis* (Hacker 1939; Stegnyy 1982). Miembros de un mismo grupo pueden variar en su eficiencia de transmitir paludismo (Mattingly 1977). Esta eficiencia está determinada por diferentes atributos tales como mayor grado de contacto con hospederos humanos, mayor susceptibilidad al parásito que presentan algunos miembros de complejos (Kettle 1992).

Especies hermanas son reproductivamente distintas pero no pueden ser distinguidas solamente por las características morfológicas, por tanto requieren de métodos alternativos para la identificación. Esto es importante para distinguir las diferentes especies en los programas de control, así como las diferentes especies dentro de un complejo que pueden exhibir diferencias en ecología, capacidad vectorial y respuesta a las medidas de control (White 1982).

ANTECEDENTES

Dentro de las técnicas para la identificación de especies de mosquitos vectores están aquellas que se basan en los estudios de citotaxonomía en la que se describen las bandas de cromosomas politénicos (Coluzzi y Sabatini 1967, Davidson y Hunt 1973, Coluzzi *et al.* 1979). Diversos estudios con cromosomas politénicos obtenidos de larvas de cuarto estadio, de ovarios de hembras semigrávidas y/o hembras alimentadas fueron de particular importancia en la identificación de especies (Coluzzi 1968). Otra técnica exitosa en la identificación de especies es la caracterización bioquímica basados en reconocimiento de secuencias complementarias específicas de ADN, para ello se cuentan con el uso de pruebas específicas de hibridización con ADN o la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR). Este tipo de pruebas, se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por el ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso (Barrera *et al.* 1993, Beebe y Saul 1995).

Finalmente los estudios de identificación de especies también han sido realizados mediante las técnicas de hibridización. Esta técnica, en mosquitos anofelinos fue primeramente introducida en estudios con el complejo *An. maculipennis* (de Buck *et al.* 1934; Corradetti 1934). Posteriormente en otros complejos de especies de las zonas Paleártica y Neártica, las cruza entre especies estrechamente relacionadas *An. labranchiae* y *An. atroparvus* en la región Paleártica; *An. freeborni*, *An. aztecus* y *An. occidentales* en la región Neártica, produjeron adultos con proporción sexual normal generalmente heteróticos y con limitada esterilidad del macho. La esterilidad es expresada solamente por una espermiogénesis anormal, como en el caso de una cruza entre

An. labranchiae y *An. atroparvus* de Italia (Coluzzi y Coluzzi 1969). Sin embargo, cuando *An. atroparvus* de Italia fue cruzado con una población Morocana de *An. labranchiae* se observaron importantes anomalías (de Zulueta *et al* 1983), involucrando atrofia de testículos y de glándulas accesorias. Otras cruces en el complejo de *An. maculipennis* entre taxas menos relacionados demostraron incompatibilidad tales como esterilidad en ambos sexos híbridos, pronunciada inviabilidad híbrida y distorsión de la proporción de sexos.

Los estudios de hibridización han contribuido al conocimiento del complejo de *An. gambiae*, los experimentos de cruces con especies hermanas de este complejo fueron producto de estudios sobre la genética de resistencia a insecticidas (Davidson y Jackson 1962). Subsecuentemente, pruebas de esterilidad cruzada fueron empleadas, descubriendo la existencia de varios miembros del complejo (*An. gambiae*, *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus* y *An. bwambiae*) y también la confirmación del estatus específico de las formas de *An. melas* y *An. merus* que se desarrollan en aguas saladas (Paterson *et al* 1963; Davidson 1964; Davidson y Hunt 1973). Todas las posibles cruces entre las seis especies hermanas han sido realizadas en el laboratorio. Generalmente, los híbridos producidos son heteróticos y fértiles, nombrados machos de *An. gambiae* o *An. bwambiae* y hembras de *An. quadriannulatus*. Todas las otras cruces, incluyendo la retrocruzas de las especies mencionadas, demostraron esterilidad de los machos F1 híbridos. El grado de esterilidad varía con la especie parental involucrada, desde un grado completo de atrofia en ambos testículos y glándulas accesorias hasta cerca de una apariencia normal del sistema reproductivo con la presencia de pocos espermatozoides. Las hembras híbridas son siempre fértiles y en algunos casos exponen una alta fertilidad en condiciones de laboratorio que las hembras parentales. Una distorsión en favor del sexo macho ha sido reportada particularmente en las cruces entre hembras de *An. melas* o *An. merus* y machos de *An. gambiae* o *An. arabiensis*.

Estudios de hibridación fueron también usadas exitosamente en el reconocimiento o validación de especies hermanas en los complejos *An. claviger* (Coluzzi 1962b), *An. farauti* (Bryan 1970), *An. hyrcanus* (Kanda *et al.* 1982), *An. coustani* (Coetzee 1983) y otros.

En Chiapas, México, estudios recientes basados en análisis de la ultraestructura de huevos, estudios genéticos usando isoenzimas, marcadores RAPD, estudios de ecología, comportamiento de búsqueda de hospederos y análisis del patrón alar en adultos (Arredondo-Jiménez *et al.* 1996, Rodríguez *et al.* 1999, Orozco *et al.* 2001, Murillo 2001), han sugerido que dentro del taxón *An. vestitipennis* existe un complejo de especies tentativamente identificadas por diferencias en sus preferencias alimenticias. Este hallazgo ha puesto en duda el estatus taxonómico de *An. vestitipennis* como especie monotípica. En base a ello se realizaron experimentos de cruzas, entre hembras de cada población bajo condiciones de laboratorio, mediante las cuales se puedan tomar parcialmente una decisión taxonómica en *An. vestitipennis*.

HIPÓTESIS

El desarrollo normal de híbridos originados de las cruzas entre hembras de cada población será una evidencia de la existencia de relaciones genéticas entre las dos poblaciones de *Anopheles vestitipennis*.

OBJETIVO GENERAL

Investigar las posibles relaciones genéticas y el grado de compatibilidad reproductiva entre las dos poblaciones de *Anopheles vestitipennis*.

METODOLOGIA

Definición de las poblaciones.

Se colectaron mosquitos de dos poblaciones una denominada *Población Zoofilica* (PZ) que fue colectada directamente sobre un hospedero animal (caballo), y otra denominada *Población Antropofilica* (PA) directamente de hospederos humanos.

Descripción del área de colecta.

Las colectas de mosquitos fueron realizadas en el plano costero del Océano Pacífico de Chiapas, México, en Nueva Independencia (14°37'30"N, 92°16'14"W, elevación 50 m), una localidad con una población de 112 habitantes viviendo en 23 casas. En general, las casas en esta población se encuentran bien ventiladas, construidas con techo de palma y pared discontinua hecha de madera o palo de bambú. El clima en esta área es caliente subhúmedo (García, 1973), con 2 estaciones bien definidas: una estación de lluvias que se extiende a partir del mes de mayo hasta octubre, y el resto de los meses con una estación de secas. El promedio anual de lluvias en el área es 2,100 mm, con un promedio mensual de temperatura de 27°C y con un rango de humedad de 61 a 100% (Arredondo-Jiménez 1990). (Figura 4.1)

Colecciones de mosquitos.

Se realizaron colectas de mosquitos usando dos trampas modificadas tipo Magoon colocadas a 5 m de distancia entre cada una (Service 1993), en una se expuso a un caballo y en la otra se expusieron a dos hospederos humanos. Las colecciones de mosquitos en las trampas cebadas con el caballo, fueron realizadas por voluntarios que colectaron hembras alimentadas reposando sobre la pared interna de la trampa con la ayuda de aspiradores bucales (World Health Organization 1975, Bown *et al.* 1987) durante los últimos 15 minutos de cada hora, por periodos de 6 horas (18:00-24:00 h). Las colecciones de mosquitos en las

trampas cebadas con humanos fueron realizadas durante 45 minutos de cada hora por los mismos voluntarios colectando hembras alimentadas reposando sobre la pared interna de la trampa con la ayuda de aspiradores bucales por periodos de 6 horas (18:00-24:00 h).

Procedimiento de laboratorio. Al cuarto día de alimentación sanguínea las hembras grávidas de cada población fueron estimuladas a ovipositar mediante la técnica de oviposición forzada, consistente en inmovilizar al mosquito a 4°C por 1 minuto y en esa condición con una pinza de disección se le cortó una de las alas (Oguma 1978), el mosquito una vez recuperado se colocó en pequeñas cámaras de oviposición consistente en vasos de plástico de 40 ml de capacidad, en el que se colocó un anillo de papel filtro y 20 ml de agua como soporte de oviposición. Al quinto día de oviposición, los huevos de cada cámara fueron inducidos a eclosionar, para ello los huevos de cada vaso fueron pasados a un cono de papel filtro soportado sobre un embudo de plástico en donde fueron lavados a presión con una piseta con agua filtrada, el agua que se filtró se colocó en una charola de plástico conteniendo papel Whatman # 2 sobre sus paredes internas en donde los huevos fueron colocados para su eclosión final. Las larvas eclosionadas se dejaron en el mismo recipiente por 48 horas sin proporcionarles alimento y posteriormente en lotes de 100 larvas se sembraron en charolas que contenían agua colectada de los criaderos en donde se han encontrado larvas de *An. vestitipennis*, adicionando alimento estéril para conejo tres veces al día hasta el estadio pupal. Las pupas obtenidas de cada población fueron extraídas diariamente y colocadas en recipientes para la emergencia de los adultos F1.

Los adultos F1 de ambos sexos de cada población fueron mantenidos por separados en jaulas de 30 x 30 x 30 cm y con dieta a base de una solución de sucrosa al 10%, a los 7 días de edad se procedió a inducir la cópula en el área de adultos del insectario del CIP a una temperatura constante de 23.5°C (22-25°C) y humedad relativa de 79% (78-80%), para ello se usó la técnica desarrollada por Villarreal et al. (1998) modificada por el autor, en la que después de que las luces

artificiales del insectario se apagaron, en la parte superior de cada jaula se colocó un foco de mano portando un bulbo incandescente de 1.2 W incidiendo una luz de color roja verticalmente sobre el interior de la jaula (simulando el crepúsculo). Las inducciones de las cópulas fueron realizadas por 8 días consecutivos entre las 20:00 a 21:30 h. La técnica permitió observar la actividad de cópula de los mosquitos, se consideraron cópulas exitosas aquellos mosquitos (hembra y macho) que al caer al piso de la jaula permanecían unidos. Después de la inducción de la cópula se procedió alimentar a los mosquitos con sangre del mismo tipo de hospedero según el origen de la población (sangre de humano y de conejo para la población antropofílica y población animal, respectivamente), después del cuarto día de alimentación sanguínea las hembras grávidas de cada población fueron estimuladas a ovipositar mediante la técnica de oviposición forzada siguiendo el procedimiento antes explicado para sí obtener los adultos de la F2.

Experimentos de hibridización.

Con los mosquitos de la progenie F2 obtenidos de cada población, se realizaron los siguientes experimentos de cruza. En una jaula identificada control PA de 30 x 30 x 30 se mezclaron 22 hembras vírgenes y 33 machos de mosquitos de origen humano, mientras que en otra jaula control PZ, de las mismas dimensiones se mezclaron 30 hembras vírgenes y 24 machos de mosquitos de origen animal. En otra jaula identificada como Cruza 1, se mezclaron 28 hembras vírgenes de mosquitos PA y 31 machos de mosquitos PZ. Mientras tanto en otra jaula identificada como Cruza 2, se mezclaron 14 hembras vírgenes de mosquitos PZ y 52 machos de mosquitos PA. La cantidad de hembras y machos que se mezclaron dependió de la cantidad de adultos producidos en la cría de laboratorio.

Las 4 jaulas con mosquitos se mantuvieron con dieta a base de una solución de sucrosa al 10%, a una temperatura de 23.5°C (22-25°C) y humedad relativa de 79% (78-80%). Los procedimientos de cópula, oviposición forzada, y desarrollo larvario fueron de acuerdo a los procedimientos antes mencionados.

Los adultos híbridos obtenidos de los controles correspondieron a la F3 y de las cruzas 1 y 2 se originaron los híbridos F1.

Los parámetros registrados en las hembras fueron: porcentaje de inseminación, porcentaje de hembras con oviposición y fecundidad. En machos, se registró la presencia y movilidad de espermatozoides en testículos y vasos deferentes. Además de la búsqueda de anomalías en testículos, vasos deferentes. Otros parámetros fueron registrados como el porcentaje de eclosión, proporción de sexos y producción de adultos (Lanzaro *et al.* 1988).

Las hembras de cada cruce después de ovipositar se disectaron, a cada una se les extrajo las espermatecas y se colocaron en un portaobjeto con agua salina cubiertos por un cubreobjeto, las espermatecas se rompieron ejerciendo presión sobre el cubreobjeto, se colocaron en un microscopio compuesto para observar la presencia de espermatozoides. Las espermatecas con espermatozoides se consideraron hembras inseminadas.

De las hembras que ovipositaron, se cuantificó el número de huevos y se calculó la fecundidad por hembras relacionando el número de huevos por el número de hembras que ovipositaron.

La posible esterilidad de los machos híbridos de cada cruce fue determinada por la examinación microscópica de los testículos. Los testículos y porción distal del vaso deferente fueron disectados y transferidos a una pequeña gota de solución salina sobre un portaobjetos y cubierto por un cubreobjeto, la apariencia de los testículos y vasos deferentes fue observado. Posteriormente se ejerció presión sobre el cubreobjeto para permitir la examinación del contenido de los testículos. La viabilidad de los espermatozoides fue determinada basada sobre la movilidad de espermatozoides en testículos y vasos deferentes, comparándolas con las muestras obtenidas de machos de los controles, adicionalmente se

compararon con un diagrama de una genitalia anormal de un macho de *An. pseudopunctipennis* (Estrada-Franco *et al.* 1993) .

RESULTADOS

La tabla 4.1, resume los resultados de los experimentos de hibridización. En todos los tratamientos, la tasa de inseminación de las hembras fue mayor del 50%, observándose la menor y mayor tasa de inseminación en hembras del control PZ y hembras de la crusa 1, respectivamente. La tasa de inseminación en las hembras de la jaula control PA y PZ fueron del 54% (12/22) y 50% (15/30), respectivamente. Mientras que en las hembras obtenidas de las Cruzas 1 y 2 se encontró una tasa de inseminación del 60% (17/28) y 57% (8/14), respectivamente. En todos los tratamientos se registró similar inseminación de las hembras. ($\chi^2 = 0.697$ $df = 3$ $P = 0.8738$) (Tabla 4.1).

De las hembras inseminadas en todos los tratamientos más del 50% presentaron oviposición. La mayor tasa de oviposición fue encontrada en las hembras de la crusa 2 con 100% (8/8), seguida de las hembras del control PA con una tasa de oviposición de 83% (10/12), mientras que las hembras del control PZ y crusa 1 ovipositaron solamente el 53% de ellas. Estas tasas de oviposición no fueron significativamente diferente ($\chi^2 = 3.901$ $df = 3$ $P = 0.2724$).

La fecundidad de las hembras originadas de la Crusa 1 fue la más alta, cada hembra puso un promedio de 147.88 huevos por hembra, seguidos de la fecundidad de las hembras del control PZ con un promedio de 116.5 huevos por hembra, la fecundidad de las hembras de la crusa 2 y el control PA demostraron la fecundidad más baja con 102 y 77.8 huevos por hembra, respectivamente.

No se detectaron diferencias significativas entre el porcentaje de eclosión entre los cuatro tratamientos ($p > 0.05$). En la proporción de sexos se observó que los controles produjeron una alta proporción de machos con relación a las cruzas 1 y 2.

El éxito de cría (producción de adultos) más alta fue obtenido en la crusa 1 con un total de 52 adultos (30 machos y 22 hembras), seguida del control PA con un total de 26 adultos (21 macho y solamente 5 hembras), en tercer lugar la crusa 2 con un total de 25 adultos (16 machos y 9 hembras), por último el control PZ en el que se solamente se obtuvieron un total de 22 adultos (14 machos y 6 hembras).

El sistema reproductivo de los machos de las cruzas 1 y 2 se observaron normales. La apariencia en grosor de los testículos y vasos deferentes no presentaros diferencias con respecto de la apariencia de las muestras de los controles. Los testículos contenían gran cantidad de espermatozoides con movilidad.

DISCUSIÓN

Mayr (1963) sugirió una lista con un número de características que facilitan el reconocimiento de especies hermanas. Varios aspectos de la conducta—selección de la presa, conducta de migración, preferencia de hospederos, construcción de nidos, cría estacional, diferencias en despliegue visual y vocal—han permitido quizás el descubrimiento de más especies sibilinas que cualquier otras características. Sin embargo, una serie de métodos son disponibles para confirmar la existencia de especies sibilinas. Una de las técnicas más exitosas ha sido la técnica de hibridación, la cual ha resultado ser de gran importancia en elucidar las relaciones genéticas entre las especies a través de la observación de la existencia de viabilidad y fertilidad de los híbridos resultantes (Davidson *et al.* 1964, Kitzmiller *et al.* 1967, Templeton 1981).

Durante los intentos de colonización en condiciones de laboratorio, *An. vestitipennis* ha mostrado poco éxito de cría en todas las fases, baja tasa de oviposición de las hembras, baja tasa de eclosión de los huevos, alta mortalidad larvaria y de pupas y al final muy poca producción de adultos (Ulloa datos no publicados), por éstas causas el número de mosquitos usados en los experimentos de cruzas fueron pocos. Sobre la base de que los mosquitos de ambas poblaciones demostraron que más del 50% presentan fidelidad a hospederos, y que esta selección se ve incrementada en generaciones subsecuentes (capítulo 3), en los experimentos de las cruzas se usaron mosquitos colectados directamente de cebo humano y cebo animal, los cuales se criaron hasta la F2 para realizar los experimentos.

Un número significativo de huevos no eclosionaron (más del 50% en todos los tratamientos), este fenómeno probablemente sea una característica inherentes de la especie, los huevos pueden permanecer mucho tiempo sin eclosionar. En el laboratorio este estado de no eclosión se pudo interrumpir mediante la inducción

de la eclosión, sometiendo los huevos a lavados con agua a presión (Ulloa dato no publicado) .

La comparación biológica de los adultos híbridos como se expone en la tabla 4.1, no se observan evidencias de que los híbridos originados de las cruzas 1 y 2, presenten divergencias consistentes con respecto a los resultados de los diferentes parámetros evaluados en las hembras y machos de los controles. Parámetros como, tasa de inseminación, porcentaje de oviposición, fecundidad, y éxito de cría de los mosquitos híbridos de las cruzas 1 y 2 fueron mejor representados que las hembras híbridas de los controles.

Los testículos y los vasos deferentes al observarse bajo el microscopio fueron traslucidos lo que permitió la observación formas como madejas entrelazadas de espermatozoides. La apariencia de un testículo normal mostró la apariencia de un cuerpo bulboso de color café relativamente más largo que las glándulas accesorias, los machos originados de las cruzas 1 y 2 mostraron esta forma. La ruptura de los testículos y vasos deferentes en solución salina resultó en la liberación de los espermatozoides los cuales mostraron movilidad a todas las direcciones del campo visual. El diagrama de un testículo anormal muestra reducción del tamaño adherido a un tubo deferente muy corto, sin embargo ninguna muestra mostró tal apariencia.

Las características biológicas que mantienen distinto pool genético en especies simpátricas son usualmente denominados mecanismos de aislamientos reproductivos (Futuyma 1986). En este estudio no se observó ninguno de los mecanismos de aislamiento precigóticos o poscigóticos. Puesto que se observaron encuentros de cópula con transferencia de espermatozoides (inseminación positiva), transferencia de espermas con la respectiva fertilización de los huevos resultando en viabilidad gamética, dando origen a viabilidad del cigoto con un completo desarrollo hasta los adultos híbridos completamente viables. Este hallazgo sugiere que al menos en laboratorio las dos poblaciones de *An.*

vestitipennis pueden aún presentar compatibilidad reproductiva. Sin embargo, el proceso de las cruzas de los mosquitos son eventos obligados, en los cuales se podrían eliminar un posible aislamiento precigótico de tipo conductual entre las dos poblaciones de *An. vestitipennis*. En condiciones de campo las diferencias en el horario de la actividad de picadura (Arredondo-Jiménez 1995) entre las dos poblaciones podría ser causa de un aislamiento reproductivo entre ambas poblaciones. En capturas de mosquitos con las trampas tipo magoon se observó que en horas con mayor actividad de picadura de las hembras anofelinas se observó la presencia de algunos machos, esto podría ser evidencia de que la actividad de picadura este asociada también a una actividad de cópula de las hembras (Ulloa, observación personal).

Se ha reportado que en otras especies de anofelinos ya elevados a la categoría de complejos de especies, existen al menos relaciones genéticas unidireccionales o bidireccionales entre sus miembros en donde al menos un sexo o en su caso los dos sexos son estériles o en su caso fértiles (Rutledge 1970, Kaiser *et al.* 1988, Estrada-Franco *et al.* 1993). Por ejemplo, en los miembros del complejo *Anopheles stephensi* existen divergencias biológicas notables, sin embargo en experimentos de cruzas aún pueden producirse híbridos viables y fértiles (Rutledge 1970). En estudios de cruzas con otros grupos de artrópodos considerados complejos de especies, han demostrado que sus miembros presentan divergencias biológicas y morfológicas consistentes pero sin evidencias de barreras reproductivas entre ellos (McMurthy *et al.* 1989), mientras que en otros grupos que demuestran divergencias genéticas presentan una relación genética unidireccional, en la que específicamente el macho es el sexo estéril, esta observación fue reportada en un estudio con *An. pseudopunctipennis* en la que al cruzar una población de hembras de México con machos de Perú, mostraron esterilidad híbrida de los machos (Lanzaro *et al.* 1993).

Derivado de la anterior información puede ser que *An. vestitipennis* se encuentre en un proceso incipiente de especiación con divergencias genéticas,

morfológicas y conductuales entre las dos poblaciones, pero sin presentar aislamiento reproductivo entre las dos poblaciones. Sin embargo, uno de los estudios que podrán explicar mejor aquellas divergencias podría los estudios de citogenética entre las dos poblaciones de *An. vestitipennis*, esta técnica permitirá identificar diferencias en el número o estructura de los cromosomas (Mayr 1963, Munstermann 1997, Subbarao *et al.* 2000), esta técnica ha permitido el reconocimiento de especies hermanas en miembros de complejos de especies como *An nuneztovari*, *An. Maculipennis* y *An. culicifacies* (Kitzmilller *et al.* 1973 Stegnni y Kabanova 1978, Green y Miles 1980).

CONCLUSIÓN

Las cruzas entre las dos poblaciones no demostraron tener ningún efecto sobre ninguno de los parámetros biológicos estudiados en *An. vestitipennis*. Por lo al menos en condiciones de laboratorio las dos poblaciones pueden presentar relaciones genéticas completas, evidenciadas por conductas de cópulas exitosas, transferencia de espermatozoides, fertilización de los huevos y producción de adultos viables.

LITERATURA CITADA

- Arredondo-Jiménez JI. 1990. Larval ecology of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) in southern Chiapas, Mexico. M. S. Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza. N. L., México. 70 p.
- Arredondo-Jiménez JI. 1995. Comparative ecology of allopatric populations of *Anopheles* (*Anopheles*) *vestitipennis* (Diptera:Culicidae). Ph. Dissertation. University of California, Davis CA.
- Arredondo-Jiménez JI, Gimnig J, Rodríguez MH, Washino RK. 1996. Genetic differences among *Anopheles vestitipennis* subpopulations collected using different methods in Chiapas State, Southern Mexico. *J. of the American Mosquito Control Association* 12:396-401.
- Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH, Washino RK. 1998. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae) in two different ecological areas of Southern Mexico. *J. Med. Entomol.* 35:937-042.
- Barrera SHA, Ortiz LR, Rojas MA, Resendez PD. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo.* 50-60.
- Beebe NW, Saul A. 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphis analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:478-481.
- Belkin JN, Heinemann SJ, Page WA. 1970. The Culicidae of Jamaica Contrib. *Am. Entomol. Inst.* 6:1-458.

Bown DN, Frederickson EC, Angel-Cabañas G, Méndez J. 1987. An evaluation of bendiocarb and deltamethrin applications in the same Mexicana village and their impact on populations of *Anopheles albimanus*. *PAHO Bull.* 22:121-135.

Bryan JH 1970. A new species of the *Anopheles punctulatus* complex. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 64:28.

Coetzee M. 1983. Chromosomal and cross-mating evidence for two species within *Anopheles coustani* (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology* 8:137-141.

Coluzzi M. 1962b. Le forme di *Anopheles claviger* Meigen indicate con I nomi missiroli e petragrani sono due specie riproduttivamente isolate. *Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei* 32:1025-1030.

Coluzzi M, Sabatini A. 1967. Cytogenetic studies on species A and B of the *Anopheles gambia* complex. *Parassitologia* 9:73-88.

Coluzzi M, Coluzzi A. 1969. Incroci tra popolazioni di *Anopheles labranchiae* e *Anopheles atroparvus*. *Parassitologia* 11:108-109.

Coluzzi M, Sabatini A, Petrarca V, Di Deco M A. 1979. Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73:483-497.

Corradetti A. 1934. Ricerche sugli incroci tra le varietà di *Anopheles maculipennis*. *Rivista di Malaria* 13:707-720.

- Chowdaiah BM, Baker RH, Kitzmiller JB. 1966. The salivary chromosomes of *Anopheles vestitipennis*. *Cytology* 31:154-162.
- Davidson G, Jackson CE. 1962. Incipient speciation in *Anopheles gambiae* Giles. *Bulletin of the World Health Organization* 27:303-305.
- Davidson G. 1964. The five mating types in the *Anopheles gambiae* complex. *Rev. Malarol.* 43:167-183.
- Davidson GH, Paterson E, Coluzzi M, Masson GF, Micks DW. 1967 The *Anopheles gambiae* complex, pp. 211-250. In J. W. Wright & R. Pal (eds), *Genetics of insect vectors of disease*. Elsevier, Amsterdam.
- Davidson G, Hunt RH. 1973. The crossing and chromosome characteristics of a new, sixth species in the *Anopheles gambiae* complex. *Parassitologia* 15:121-136.
- de Buck A, Schoute E, Swellengrebel NH. 1934. Cross-breeding experiments with Dutch and foreign races of *An. maculipennis*. *Rivista di Malarologia* 13:237-263.
- de Zulueta J, Ramsdale C, Cianchi R, Bullini L, Coluzzi M. 1983. Observations on the taxonomic status of *Anopheles sicaulti*. *Parassitologia* 25:73-92.
- Estrada-Franco JG, Lanzaro GC, Michael C, Walker-Abbey MA, Romans P, Galvan-Sanchez C, Cespedes JL, Vargas-Sagarnaga R, Laughinghouse A, Columbus I, Gwadz RW. 1993. Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis* sensu lato from three countries of neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:775-745.

Estrada-Franco JG, Michael C, Gwadz Ma. RW, Sakai R, Lanzaro GC, Laughinghouse A, Galvan-Sánchez C, Cespedes JL, Vargas-Sagamaga R. 1993. Evidence through crossmating experiments of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis sensu lato*: A primary malaria vector of the American continent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49:746-755.

Foote RH, Cook DR. 1959. Mosquitoes of medical importance. *Agriculture Handbook* 152. USDA, Washington DC.

Futuyma DJ. 1986. Evolutionary Biology. Second Edition. *Sinauer Associates, INC.* Publishers Sunderland, Massachusetts. pag 112.

García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. *Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).* México.

Green CA, Miles SJ. 1980. Chromosomal evidence for sibling species of the malaria vector *Anopheles (Cellia) culicifacies* Giles. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 83:75-78.

Kaiser PE, Seawright 1987. The ovarian nurse cell polytene chromosomes of *Anopheles quadrimaculatus* Say. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3:222-230.

Kanda T, Cheong WH, Oguma Y, Takia K, Chiang GL, Sucharit S. 1982. Systematics and cytogenetic of the Hyrcanus group, Leucosphyrus group and Pyrethophorus group in East Asia. In:Steiner WWM, Tabachnick WJ, Rai KS, Narang S (eds). Recent developments in the genetics of insect disease vectors. *Stipes Publisher.* Champaign, Illinois p. 506-522.

Kettle DS. 1992. Species complexes and variation in *Aedes aegypti*. *Medical and Veterinary Entomology.*658 pp.

- Kaiser PE, Mitchell S E, Lanzaro GC, Seawright 1988. Hibridization of laboratory strains of sibling species A and B of *Anopheles quadrimaculatus*. *J. of the Am. Mosquito Control Association*. 4:34-38.
- Kitzmiller JB, Frizzi G, Baker RH. 1967. Evolution and speciation within the Maculipennis complex of the genus *Anopheles*. In: Wright J. W. Pal R (eds) *Genetics of insect vectors of disease*. Elsevier, Amsterdam. p. 151.
- Kitzmiller JB, Kreutzer RD, Tallaferro E. 1973. Chromosomal differences in populations of *Anopheles nuneztovari*. *Bulletin of the World Health Organization* 48:435-445.
- Lanzaro GC, Narang SK, Mitchell SE, Kaiser PE, Seawright. 1988. Hybrid male sterility in crosses between field and laboratory strains of *Anopheles quadrimaculatus* (Say) (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol.* 25:248-255.
- Lanzaro GC, Ostrovska, Herrero MV, Lawyer PG, Warburg A. 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: Genetic divergence and interspecific sterility among three populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48:839-847.
- Loyola GE, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH, Bown DN, Vaca-Marin MA. 1991. *Anopheles vestitipennis*, the probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon Forest of Chiapas, México. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 85:171-174.
- Mayr E. 1963. Animal species and evolution. *Harvard University Press*. Cambridge. Massachussetts p. 797.
- Mattingly PF. 1977. Names of *Anopheles gambiae* complex. *Mosquito Systematics*. Vol. 9:323-328.

- McMurthy JA, Badii MH. 1989. Reproductive compatibility in widely separated populations of three species of Phytoseiid Mites (Acari:Phytoseiidae). *Pan-Pacific Entomologist* 65:397-402.
- Munstermann LE. 1997. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera:Culicidae): Impact of Molecular Biology and Cladistic Analysis. *Ann. Rev. Entomol.* 1997. 42:351-369.
- Murillo-Sánchez MH 2001. Variabilidad genética de *Anopheles vestitipennis* (Diptera:Culicidae) en poblaciones obtenidas por distintos métodos de captura. *VIII Congreso Nacional de Investigación en Salud Pública*. Cuernavaca Morelos, México.
- Oguma Y. 1978. Crossing studies among six strains of *Anopheles sinensis*. *Mosquito News* 38(3) 357-366.
- Orozco-Bonilla A, Ulloa A, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH. 2001. Morphological differences among *Anopheles vestitipennis* populations. *The 67th Annual Meeting of the AMCA*, Dallas, Texas.
- Padilla NP, Molina P, Juarea J, Bown D, Cordon-Rosales C. 1992. Potential malaria vectors in northern Guatemala. *J. of the American Mosquito Control Association*. Assoc. 8:307-308.
- Paterson HE, Paterson JS, Van Eeden GJ. 1963. A new member of the *Anopheles gambiae* in Guinea Bissau. *Parassitologia* 25:29-39.
- Peyton EL. 1990. A new classification for the leucosphyrus group of *Anopheles* (Cellia). *Mosquito Systematics*, 21, 197-205.

- Reid JA, Knight KL. 1961. Classification within the subgenera *Anopheles* (Diptera:Culicidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 55:474-488.
- Rodríguez MH, Chavez B, Hernández-Avila JE, Orozco A, Arredondo-Jiménez JI. 1999. Description and morphometric analysis of the eggs of *Anopheles* (*Anopheles*) *vestitipennis* (Diptera:Culicidae) from Southern México. *J. Med. Entomol.* 36:78-87.
- Rutledge LC, Ward RA, Bickley WE. 1970. Experimental hybridization of Geographic Strains of *Anopheles stephensi* (Diptera:Culicidae). *Ann. Ent. Soc. Am.* 63:1024-1030.
- StegniiVN, Kabanova VM. 1978. Cytoecological study of indigenous populations of the malaria mosquito in the territory of the USSR. I. Identification of a new species of *Anopheles* in the *Maculipennis* complex by the cytodiagnostic method. *Mosquito Systematics* 10:1-12.
- Service MW. 1993. Mosquito Ecology: *Field Sampling Methods*. 2nd edn. Elsevier Applied Science, London.
- Subbarao SK, Kumar VK, Nanda N, Nagpal BN, Dev V, Sharma VP. 2000. Cytotaxonomic evidence for the presence of *Anopheles nivipes* in India. *J. of the American Mosquito Control Association* 16:71:74.
- Templeton AR. 1981. Mechanisms of speciation- a population genetic approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 12:23-48.
- Vargas L. 1958. Nuevos datos sobre la distribución de anofelinos mexicanos. *Bol. Epidemiol.* 32:33-56.

- Villarreal C, Arredondo-Jiménez JI, Rodríguez MH, Ulloa A. 1998. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from México. *J. of the American Mosquito Control Association* 14:369-372.
- White GB. 1977. The place of morphological studies in the Investigation of *Anopheles* species complexes. *Mosquito Systematics*. 9:1-24.
- White GB. 1982. Malaria vector ecology and genetics. *British Medical Bulletin* 38:207-212.
- Wilkerson RC, Peyton EL. 1990. Standardized nomenclature for the costal wing spots of the genus *Anopheles* and other spotted-wing mosquitoes (Diptera:Culicidae). *J. Med. Entomol.* 27:207-224.
- Wilkerson RC, Strickman D. 1990. Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of Central America and Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc* 6:7-34.
- World Health Organization. 1975. Manual on practical entomology Part I and II. *World Health Organization, Geneva, Switzerland.*

Tabla 4.1.- Compatibilidad reproductiva de dos poblaciones de *Anopheles vestitipennis*

Los testículos, y pene

Cruzas		Inseminación	% hembras que	Total de	Fecundidad	(%)	Proporción	Total de adultos	Testículos
Hembras	Machos	(%)	ovipositaron (n)	huevos	por hembras	Eclósión	macho:hembra	(macho:hembra)	G. accesorias Pene
Control									
PA*	x PA	54	83	778	77.8	44	4.2: 1	28	Normales
(22)	x (35)	(12 / 22)	(10)			(342)		(21:5)	+Espermas
Control									
PZ**	x PZ	50	53	932	116.5	46	2.3:1	22	Normales
(30)	x (24)	(15/30)	(8)			(429)		(14:8)	+Espermas
Cruza 1									
Hembras Machos									
PA	x PZ	60	53	1,131	147.88	44	1.36 : 1	52	Normales
(28)	x (31)	(17 / 28)	(9)			(498)		(30:22)	+Espermas
Cruza 2									
CA	x CH	57	100	816	102	31	1.77 : 1	25	Normales
(14)	x (52)	(8 / 14)	(8)			(253)		(16:9)	+Espermas

*PA= Población antropofílica. **PZO=Población zoofílica.

+Espermas= Presencia y movilidad de espermatozoides.

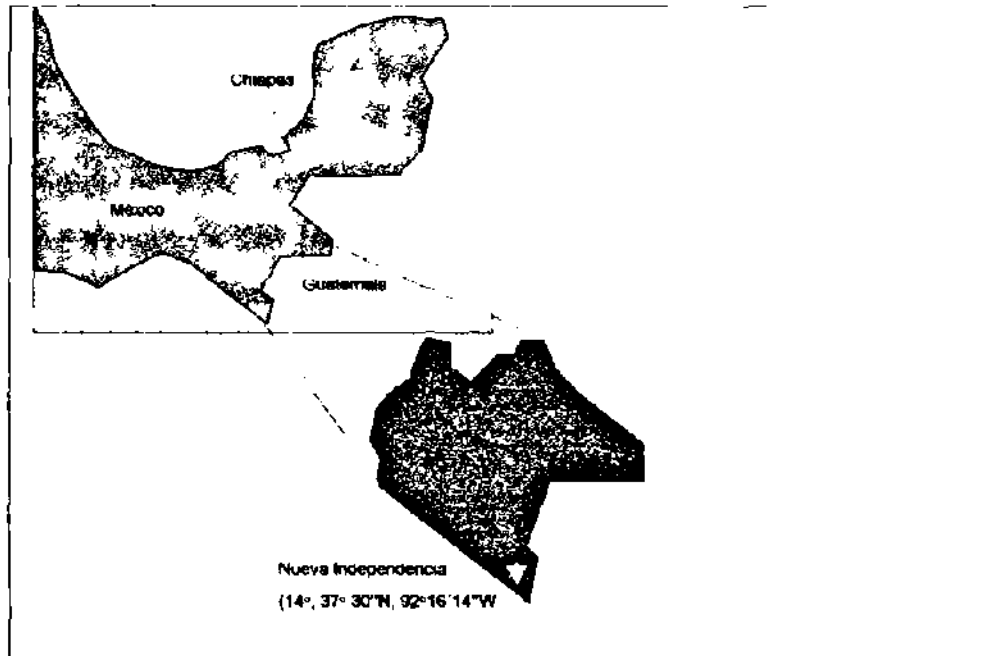


Figura 4.1. Area de colecta de *An. vestitipennis*

CONCLUSIONES FINALES

Los resultados obtenidos en 3 de los 4 estudios, sugieren evidencias adicionales que confirman la existencia de dos poblaciones de *An. vestitipennis* con diferentes preferencias alimenticias.

Evidencias biológicas.

- 1.- Existencia de heterogeneidad en la estructura de edad: la población zoofílica presentó un 82% de mosquitos paridos, mientras que la población antropofílica se reportó un 60% de estos mosquitos.
- 2.- Diferencias en la longitud del ciclo gonotrófico (proceso que incluye toma de sangre, búsqueda de un sitio de oviposición y puesta de huevos): las hembras de la población zoofílica presentaron un ciclo gonotrófico de 3 días, mientras que la población antropofílica de 4 días.
- 3.- Diferencias en el tiempo de desarrollo vitelogénico: la maduración de los huevos a partir de la digestión sanguínea hasta Christopher V por las hembras de la población zoofílica tomó un total de 54 horas, mientras que las hembras de la población antropofílica el desarrollo lo complementó 6 horas más tarde (60 horas). Al cambiar la fuente sanguínea en las hembras de cada población, la maduración de los huevos tomó el mismo tiempo en cada población, sugiriendo que esta es una característica intrínseca de cada población.
- 4.- La población zoofílica no presenta el estado de pregravidéz, indicando que para la maduración de los huevos solo requiere de una toma de sangre, mientras que las hembras de la población antropofílica el 16% presentaron este estado, indicando que requieren al menos 2 alimentaciones sanguíneas para complementar la maduración de los huevos.

Evidencias conductuales.

1.- Los experimentos de selección de hospederos demostraron que las hembras de la población antropofílica de *An. vestitipennis* es la más prevalente en ambas zonas de estudio, alcanzado sus máximas densidades en la estación de lluvia.

2.- En los experimentos de liberación y recaptura en campo abierto y la casa experimental, se encontró que ambas poblaciones presentan diferentes grados de fidelidad hacia los hospederos donde fueron originalmente colectados. En este caso, la población en contacto con animales (zoofílica) mostró un mayor grado de fidelidad que las hembras de la población en contacto con humanos (antropofílica). Una menor fidelidad de la población antropofílica de *An. vestitipennis* puede deberse a:

2.1 que ésta ha sido seleccionada sólo desde que el hombre colonizó el continente americano (hace 12,000 años), mientras que la zoofílica ha existido desde que se formó la especie, o a

2.2 que muchas de las hembras en contacto con humanos pudieron corresponder a la población zoofílica, pero tienen un comportamiento aún más oportunista en la selección de hospederos que la población antropofílica.

3.- Los estudios de liberación y recaptura usando hembras F1 originadas de progenitores con conocida historia alimenticia, se observó un incremento de la fidelidad en ambas poblaciones, observándose mayor grado de fidelidad en la población zoofílica. Esto le da más peso a la explicación 2.2, (ver arriba) indicando que originalmente se colectan más hembras oportunistas, pero una segunda selección de individuos a través de la generación F1, resultó una mayor fidelidad hacia humanos.

Evidencias conductuales.

1.- Los experimentos de selección de hospederos demostraron que las hembras de la población antropofílica de *An. vestitipennis* es la más prevalente en ambas zonas de estudio, alcanzado sus máximas densidades en la estación de lluvia.

2.- En los experimentos de liberación y recaptura en campo abierto y la casa experimental, se encontró que ambas poblaciones presentan diferentes grados de fidelidad hacia los hospederos donde fueron originalmente colectados. En este caso, la población en contacto con animales (zoofílica) mostró un mayor grado de fidelidad que las hembras de la población en contacto con humanos (antropofílica). Una menor fidelidad de la población antropofílica de *An. vestitipennis* puede deberse a:

2.1 que ésta ha sido seleccionada sólo desde que el hombre colonizó el continente americano (hace 12,000 años), mientras que la zoofílica ha existido desde que se formó la especie, o a

2.2 que muchas de las hembras en contacto con humanos pudieron corresponder a la población zoofílica, pero tienen un comportamiento aún más oportunista en la selección de hospederos que la población antropofílica.

3.- Los estudios de liberación y recaptura usando hembras F1 originadas de progenitores con conocida historia alimenticia, se observó un incremento de la fidelidad en ambas poblaciones, observándose mayor grado de fidelidad en la población zoofílica. Esto le da más peso a la explicación 2.2, (ver arriba) indicando que originalmente se colectan más hembras oportunistas, pero una segunda selección de individuos a través de la generación F1, resultó una mayor fidelidad hacia humanos.

Evidencias reproductivas.

1.- Los experimentos de cruces en el laboratorio no demostraron la existencia de un posible aislamiento reproductivo entre las dos poblaciones.

DECISIÓN TAXONOMICA

Anopheles vestitipennis presenta un proceso de especiación conformando un complejo de al menos dos especies con diferencias genéticas, preferencias alimenticias, morfológicas, biológicas y conductuales (Arredondo-Jiménez 1995, Rodríguez et al. 1999, Orozco-Bonilla 2000, Murillo-Sánchez 2001, Ulloa capitulos 1,2,3)

SE SUGIERE

Delimitar y describir la población antropofílica de *An. vestitipennis* en otras áreas geográficas en donde esta especie prevalece, con el fin de dirigir las medidas de control hacia esta población.



DONATIVO

