

## RESUMEN GENERAL

El conocimiento del flujo de genes, como indicación del intercambio genético de individuos entre poblaciones de *Anopheles albimanus*, principal vector de paludismo en la planicie costera del Pacífico y del Atlántico en México y Centro América, es importante para entender sus patrones de dispersión en relación con variaciones geográficas en sus niveles de resistencia a insecticidas, susceptibilidad a los fenotipos VK 210 y VK 247 de *Plasmodium vivax* y contribución a la transmisión local de paludismo. El conocimiento del flujo de genes de *An albimanus*, es fundamental si se implementa una estrategia de control genético utilizando mosquitos transgénicos refractarios a la infección con *Plasmodium vivax*.

En el presente trabajo se estudió el nivel del flujo de genes en el ámbito microgeográfico en el sur de Chiapas y macrogeográfico en México. El estudio microgeográfico comprendió la zona costera del estado de Chiapas desde la frontera con Guatemala hasta aproximadamente 250 Km al nordeste. Para ello se utilizaron como marcadores fenotípicos los niveles de resistencia a insecticidas y como marcadores genotípicos, marcadores de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR). En el plano costero de Chiapas, se incluyeron mosquitos provenientes de cinco agroecosistemas: banano, cultivos mixtos, caña de azúcar, reserva ecológica y ganado. Estos fueron examinados mediante pruebas de susceptibilidad a insecticidas (DDT, deltametrina, y ciflutrina) y pruebas bioquímicas que incluyeron acetilcolinesterasa insensible, glutatión S-transferasa, prueba de pNPA,

esterasas  $\alpha$ , esterasas  $\beta$  y monooxygenasas dependientes del citocromo P450. Además los mosquitos fueron ensayados por la técnica molecular RAPD-PCR.

Las pruebas de susceptibilidad a insecticidas y pruebas bioquímicas, resultaron en variabilidad geográfica en los niveles de insecticidas en *An. albimanus* procedentes de los cinco agroecosistemas. El DDT presentó un porcentaje de mortalidad promedio de 21, 50, 31, 31 y 24%, la deltametrina de 75, 85, 89, 85, y 92% y la ciflutrina de 50, 71, 69, 69 y 84% en el área bananera, cultivos mixtos, caña de azúcar, reserva ecológica y ganadera, respectivamente. Las enzimas de resistencia a insecticidas glutatión S-transferasa, esterasas  $\alpha$  y  $\beta$ , esterasas en general (pNPA) y monooxygenasas mostraron un patrón similar de resistencia con un incremento significativo en los títulos enzimáticos en el área de banano que fue disminuyendo con la distancia hasta el área de ganado. En el análisis RAPD-PCR, después de un tamizado de 60 iniciadores aleatorios, se seleccionaron cinco (A05, A20, B04, B11 y B18) que produjeron 46 marcadores genéticos, encontrándose que el flujo de genes en Chiapas es moderadamente bajo con un valor de  $Nm = 1.9$  entre las 20 localidades analizadas. El rango de  $Nm$  entre las cinco áreas agroecológicas fue de 1.8 a 2.4. El valor promedio de  $F_{st}$  en el sur de Chiapas fue 0.117 ( $\pm 0.073$ ). El dendrograma entre áreas agroecológicas unió a las áreas de banano y caña de azúcar con 87 % de consistencia mediante el análisis de bootstrap.

El estudio macrogeográfico comprendió: Chiapas [(Río Arriba, plano costero) y Selva Lacandona,] Tabasco, Oaxaca, Guerrero, Colima, Jalisco, Nayarit y Sinaloa. Con el análisis de RAPD-PCR, se seleccionaron 7 iniciadores (A05, A08, A12, A19, A20, B04 y

B11) que produjeron 51 marcadores genéticos. La tasa efectiva de migración  $Nm$  fue de = 1.2. El dendrograma, basado en el análisis de bootstrap resultante, presentó dos principales ramas de similitud genética, una con los estados del norte – Pacífico: Sinaloa, Nayarit, Colima, Guerrero (86 % consistencia) y otra con sur de Chiapas, Tabasco, Selva Lacandona y Guatemala. Los mosquitos procedentes de Chiapas y Tabasco se agruparon con 100 % de consistencia en el análisis de bootstrap. El estado de Jalisco se agrupó aparte de las dos ramas de similitud genética principales con 63 % de consistencia. El valor promedio de  $F_{ST}$  en el ámbito nacional fue 0.169 ( $\pm 0.122$ ), lo cual indica baja variabilidad.

En conclusión, el flujo de genes de *Anopheles albimanus* en Chiapas depende del agroecosistema, uso del suelo y aplicación de insecticidas en la agricultura. Mientras que en el ámbito nacional, las poblaciones de esta especie del norte de México están segregadas de las del sur probablemente como resultado de la distancia geográfica. Estos resultados indican que el flujo de genes entre poblaciones vecinas no es continuo y está temporalmente limitado a menos de 2 individuos por generación, por lo que cualquier estrategia de control genético requerirá intervenir cada una de las poblaciones de este vector.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Especies del género *Anopheles* (Diptera: Culicidae) son los únicos vectores obligados de malaria humana, enfermedad infecciosa que mata alrededor de 1.5 a 2 millones de personas en ciudades tropicales y subtropicales del mundo (Catteruccia et al.; 2000; WHO, 1998). En México, los principales vectores de malaria son *An. (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, *An. (Anopheles) pseudopunctipennis* Theobald y *An. (Anopheles) vestitipennis* Dyar & Knab (Rodríguez & Loyola, 1989, Loyola et al., 1991; Ramsey, 1994; Fernández-Salas et al., 1994; Arredondo-Jiménez, 1995; Villarreal et al., 1998). Como estos vectores son problemas en otros países de la región, al menos los dos primeros podrían ser considerados como candidatos a ser alterados genéticamente para conferirles refractariedad a la malaria.

Con la selección de mosquitos multiresistentes a insecticidas (Organización Mundial de la Salud, 1986) y *Plasmodium* Marchiafava y Celli resistentes a los medicamentos antimaláricos, actualmente se encuentran en investigación nuevas estrategias de control, utilizando la manipulación genética de vectores (Rodríguez et al., 1998). La posibilidad de producir mosquitos transgénicos refractarios al parásito *Plasmodium* y su eventual liberación en campo para sustituir las poblaciones nativas susceptibles, demanda el conocimiento potencial del destino de los genes refractarios, en función del número de liberaciones necesarias para que los genes de refractariedad se establezcan exitosamente.

Dentro de las líneas de investigación que se exploran, está la transformación de genes ya existentes o la introducción de genes externos que confieran refractariedad a la

infección con *Plasmodium*. Dichos genes podrían bloquear alguna fase del desarrollo del parásito por ejemplo: durante la exflagelación, fertilización, desarrollo del oocineto, al momento que el oocineto atraviesa la pared del intestino medio, o cuando se introducen los esporozoítos en las glándulas salivales (Rodríguez et al., 1998).

Para realizar un control efectivo del paludismo es necesario identificar correctamente la especie o especies vectoras. Los complejos de especies o especies hermanas, son grupos cercanamente relacionados de especies que son difícil o imposible de separar por características morfológicas convencionales. Estos complejos son conocidos en una amplia variedad de artrópodos y son comunes en los insectos de importancia médica. Por ejemplo, muchos de los anofelinos vectoras de parásitos de la malaria son miembros de complejos de especies. Dentro de las especies que componen un complejo se presentan especies que son vectoras y otras no. Un clásico ejemplo es el descubrimiento en los años 1920's del complejo *An. maculipennis* Meigen en Europa, sobre la base de la morfología, textura de la superficie y color de huevos (Kettle, 1995). Posteriores estudios de cópula y variación citogenética mostraron la existencia de 7 diferentes especies, de las cuales sólo 2 transmiten malaria: *An. labrachiae* Falleroni y *An. sacharovi* Fabre (Black y Munstermann, 1994). Otro ejemplo es el descubrimiento en África del complejo *An. gambiae* Giles constituido por 6 especies, pero sólo dos de ellas son las principales transmisoras, *An. gambiae* ss. y *An. arabiensis* Patton. Actualmente se conoce una docena de complejos de especies crípticas y según las evidencias acumuladas, se sugiere que la mayor parte de los vectoras de malaria son miembros de tales complejos (Collins y Paskewitz, 1996).

Se han desarrollado una amplia variedad de métodos para identificar las especies a pertenecientes a estos complejos, por ejemplo polimorfismo de inversión cromosomal (Dia, 2000), variaciones en loci microsatellite y genoma mitocondrial (Fonseca et al., 2000; Schlotterer, 2000; Donnelly et al., 2001; Walton et al., 2001).

La técnica molecular que emplea iniciadores aleatorios y que amplifica regiones del DNA aleatoriamente (siglas en ingles RAPD) ha sido utilizada exitosamente en la identificación de miembros de especies pertenecientes a varios complejos. Desde sus inicios se empleó exitosamente para diferenciar especies del complejo *An. gambiae* (Wilkerson et al., 1993; Favia et al., 1994a; Favia et al., 1994b). Esta técnica se ha empleado para diferenciar especies, subespecies e incluso subpoblaciones, tanto en aedinos como en anofelinos (Ballinger-Crabtree et al., 1992; Wilkerson et al., 1993). Este éxito sirvió de modelo en subsecuentes protocolos y se usó la técnica de RAPD en el reconocimiento de miembros del reciente complejo de especies reconocido *An. (Nyssorhynchus) albitarsis-marajoara* en América (Wilkerson et al., 1995).

*Anopheles albimanus* es una especie neotropical considerada como vector primario de malaria, especialmente en las costas de ambos océanos en México, Centroamérica, el norte de Sur América y el Caribe (Rodríguez y Loyola, 1989; Frederickson, 1993).

La posible existencia de especies crípticas en *An. albimanus* no ha sido descartada, porque a través de su amplio rango de distribución geográfica se encuentra presente diferentes fenotipos pupales, las cuales muestran variabilidad en la susceptibilidad a la infección con *Plasmodium vivax* Grassi y Feletti, el fenotipo "franja blanca" fue más

susceptible que el "café claro" y éste es más susceptible que el "verde" (Chan et al., 1994). Las larvas se desarrollan en una diversidad de hábitat con considerable variación de la salinidad (desde agua dulce a salobre), temperatura, tipo de hábitat y en lo referente a la altitud desde el nivel del mar hasta el piedemonte a 200 msnm (Arredondo-Jiménez, 1990; Savage et al., 1990; Rodríguez et al., 1993). Los hábitos alimenticios de la hembra adulta varían de acuerdo a la temporada y localización geográfica, también muestran diferente comportamiento de picadura (Frederickson, 1993; Arredondo-Jiménez et al., 1993; Arredondo-Jiménez, 1995).

A pesar de que *An. albimanus* es el principal vector de malaria en las costas mexicanas, es un vector poco eficiente en la transmisión de malaria. En el sur de Chiapas se encontró con una tasa de infección de esporozoítos de 0.9% en mosquitos colectados en el intradomicilio, mientras que en el peridomicilio de 0.1% (Ramsey 1986), no es un mosquito longevo, aproximadamente el 2 % llega a tener edad suficiente para transmitir la malaria (Rodríguez et al., 1992). Transmite principalmente *Plasmodium vivax* variante VK210, ya que es poco susceptible a la variante VK247 (González-Cerón et al., 1999; González-Cerón et al., 2001).

Estudios sobre la genética de poblaciones de un vector de enfermedades en el humano, permiten conocer la estructura poblacional y el intercambio genético interpoblacional, brindando la oportunidad de entender si las diferencias observadas en la transmisión de la enfermedad tienen bases genéticas, lo cual obligaría a desarrollar métodos de control más eficientes, dirigidos en especial a la población de mayor importancia como vector.

De identificarse un intenso flujo de genes y aunado a una elevada tasa de dispersión indicaría la necesidad de un tratamiento a gran escala, mientras que una migración limitada, ilustrada por flujo de genes interpoblacional restringido, podría indicar la necesidad de tratamientos más focalizados (Tabachnick y Black, 1994).

En el presente trabajo se determinó el nivel del flujo de genes en poblaciones vecinas y separadas geográficamente de *An. albimanus*, utilizando como marcador fenotípico la resistencia a insecticidas en la zona de estudio y como marcadores genotípicos secuencias aleatorias polimórficas de DNA, utilizando la técnica molecular denominada RAPD-PCR (siglas en inglés de Random Amplified Polymorphic DNA). La variabilidad geográfica de la resistencia a insecticidas se determinó mediante pruebas de susceptibilidad y pruebas bioquímicas, determinando los niveles de las enzimas responsables de la resistencia a insecticidas. El estudio se realizó en dos etapas, primero en un ámbito microgeográfico en el plano costero de Chiapas, desde la frontera con Guatemala hasta aproximadamente 200 km al noreste y segundo en un ámbito macrogeográfico comprendiendo los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Colima, Nayarit y Sinaloa en la vertiente del pacífico y por la vertiente del Atlántico, el estado de Tabasco. Se escogió una localidad de la Selva Lacandona en el estado de Chiapas por ser una región con alta incidencia de paludismo y una localidad de Guatemala CA llamada La Palmilla.

## La malaria en el mundo.

La malaria es una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* Marchiafava y Celli (Sporozoa: Plasmodiidae) y que se transmite por la picadura de hembras infectadas de mosquitos del género *Anopheles* Meigen (Diptera: Culicidae). Cuatro especies son reconocidas en el humano: *Plasmodium* (*Plasmodium*) *vivax* (Grassi y Feletti), *P.* (*Laverania*) *falciparum* (Welch), *P.* (*Plasmodium*) *malariae* Laveran y *P.* (*Plasmodium*) *ovale* Stephens (Service, 1985).

La malaria es la enfermedad transmitida por vectores más importante en el mundo y mata más personas que cualquier otra enfermedad infecciosa, excepto la tuberculosis. Es endémica en más de 101 países estimándose una prevalencia de la enfermedad entre 300 a 500 millones de casos clínicos anualmente, con una mortalidad anual entre 1.5 y 2 millones de personas, es decir, alrededor de 3,000 decesos en niños por día (menores de 5 años) (WHO, 1998). Mas del 90 % de los casos y decesos ocurren en África subsahariana y del 10 % restante 2/3 partes ocurren en 6 países (India, Indonesia, Brasil, Colombia, Perú Islas Salvación) (WHO, 1999).

La malaria se ha circunscrito a los países del cinturón tropical con áreas originalmente palúdicas ubicadas entre los paralelos 40° norte y 60° sur, habitadas por más de 2,000 millones de personas (Fig. 1). Desde el punto de vista epidemiológico, se pueden distinguir 12 zonas en el mundo en las que están involucradas de 3 a 13 diferentes especies de *Anopheles* por zona como vectores primarios de malaria (Fig. 2) (Anexo 1) (White, 1987; Bown y Nelson, 1993; Kettle, 1995).

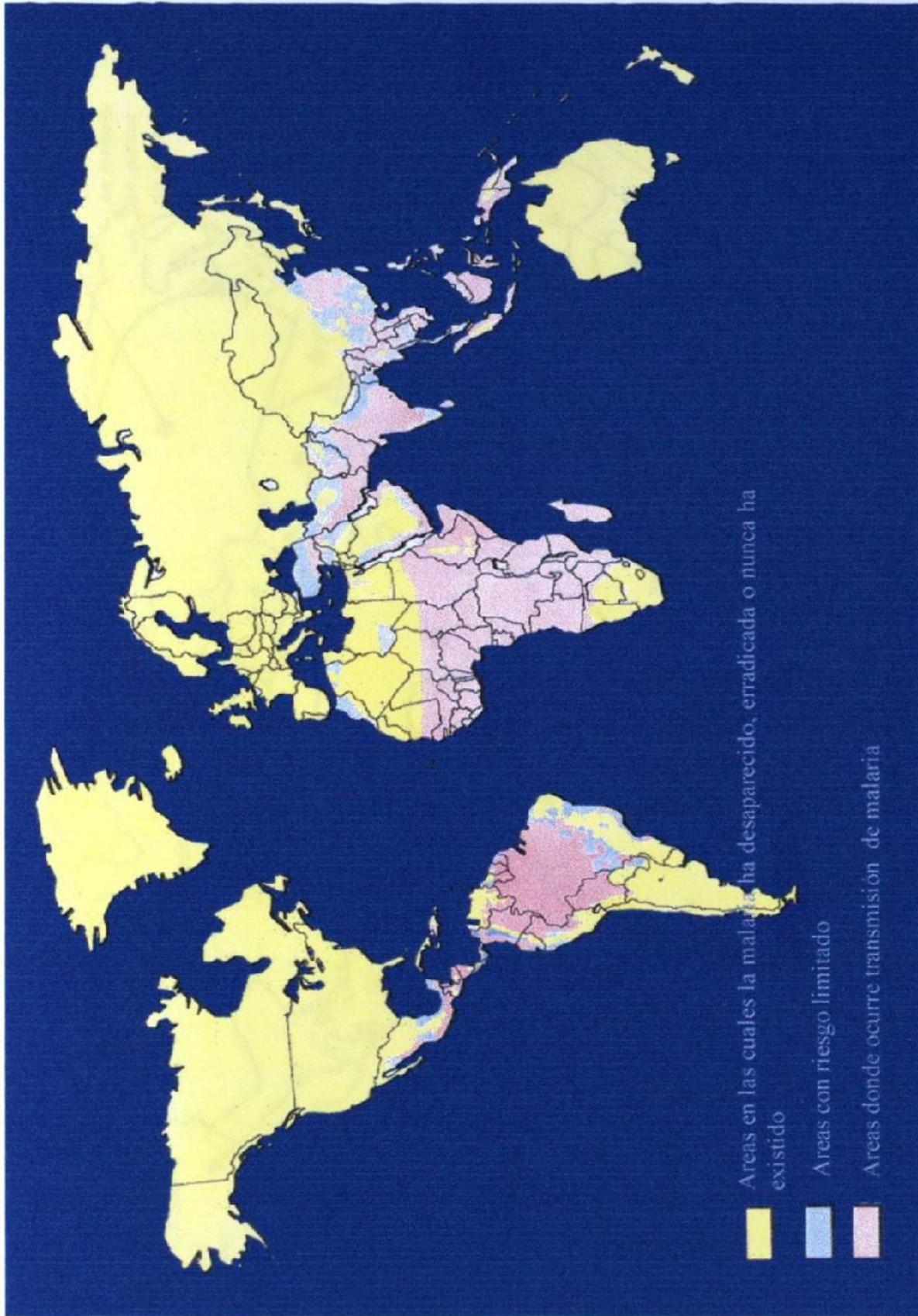


Fig. 1. Distribución de la malaria a fines de los 1980's. Trustees of the Wellcome Trust ( Knell, 1991)

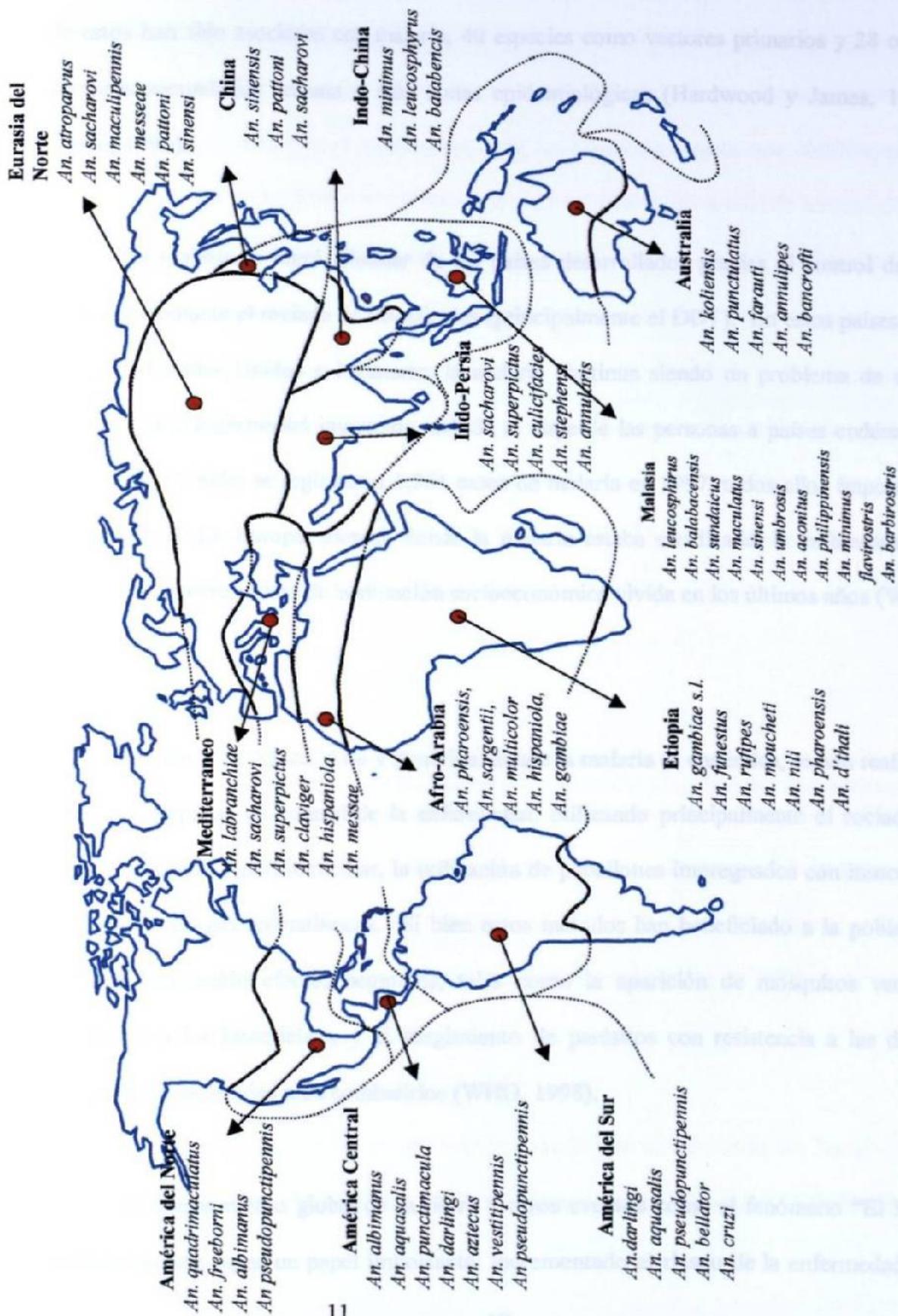


Figura 2. Zonas de acuerdo a la distribución geográficas de las principales especies vectoras de *Anopheles* (Macdonald, 1957)

Se han registrado más de 400 especies de anofelinos (Service, 1985), pero sólo 68 de estos han sido asociadas con malaria, 40 especies como vectores primarios y 28 como vectores secundarios en una o más zonas epidemiológicas (Hardwood y James, 1979; Kettle, 1995).

La malaria se logró eliminar de los países desarrollados gracias al control de los vectores mediante el rociado de insecticidas (principalmente el DDT). En estos países, por ejemplo, Estados Unidos e Inglaterra, la malaria continúa siendo un problema de salud pública como enfermedad importada, debido al viaje de las personas a países endémicos. En el Reino Unido, se registraron 2,364 casos de malaria en 1997, todos ellos importados por viajeros. En Europa oriental, donde la malaria estaba erradicada, la enfermedad ha resurgido como resultado de la situación socioeconómica vivida en los últimos años (WHO, 1998).

En países de África, Asia y América, donde la malaria es endémica, se han realizado intensas campañas de control de la enfermedad, utilizando principalmente el rociado de insecticidas intra y peridomiciliar, la utilización de pabellones impregnados con insecticida y el uso de drogas antimaláricas. Si bien estos métodos han beneficiado a la población, también han tenido efectos negativos, tales como la aparición de mosquitos vectores resistentes a los insecticidas, y el surgimiento de parásitos con resistencia a las drogas normalmente utilizadas para combatirlos (WHO, 1998).

El calentamiento global de la tierra y otros eventos como el fenómeno "El Niño" podrían también jugar un papel importante, incrementando el riesgo de la enfermedad. La

enfermedad actualmente se ha extendido a áreas de mayor altitud en África. El fenómeno "El Niño" tiene un impacto debido a los disturbios ambientales los cuales influyen en la reversión del patrón normal de lluvias, lloviendo menos donde llueve mucho y viceversa. Esto modifica la distribución y abundancia de los cuerpos de agua que constituyen los hábitats larvarios de los insectos vectores y de ahí modifican la dinámica de transmisión de la enfermedad. Muchas ciudades han experimentado un incremento en la incidencia de malaria después de aumento en la temperatura promedio. Más aún las epidemias podrían no únicamente ocurrir en mayores áreas, sino ser más severas debido a que la población afectada podría no tener inmunidad. Estos eventos de aumento en la incidencia de malaria en correlación con eventos provocados por "El Niño" pueden ser registrados en diversas regiones del mundo: en Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela en Sur América; Rwanda en África; Pakistán y Sri Lanka en Asia (WHO, 1998).

### **La malaria en México.**

Se han reportado 26 especies de *Anopheles* en nuestro país (Anexo 2) (Vargas y Martínez Palacios, 1956; Wilkerson y Strickman, 1990; Arredondo-Jiménez, 1995), pero solo tres son los principales transmisores de malaria: *An. albimanus* Wiedemann, *An. pseudopunctipennis*, Theobald y *An. vestitipennis* Dyar & Knab (Rodríguez y Loyola, 1989; Loyola et al., 1991; Ramsey, 1994; Fernández-Salas et al., 1994; Arredondo-Jiménez, 1995, Villarreal et al., 1998).

El paludismo en México se presenta principalmente en las costas del Pacífico desde Chiapas hasta Sonora y del Atlántico en Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y la Península de

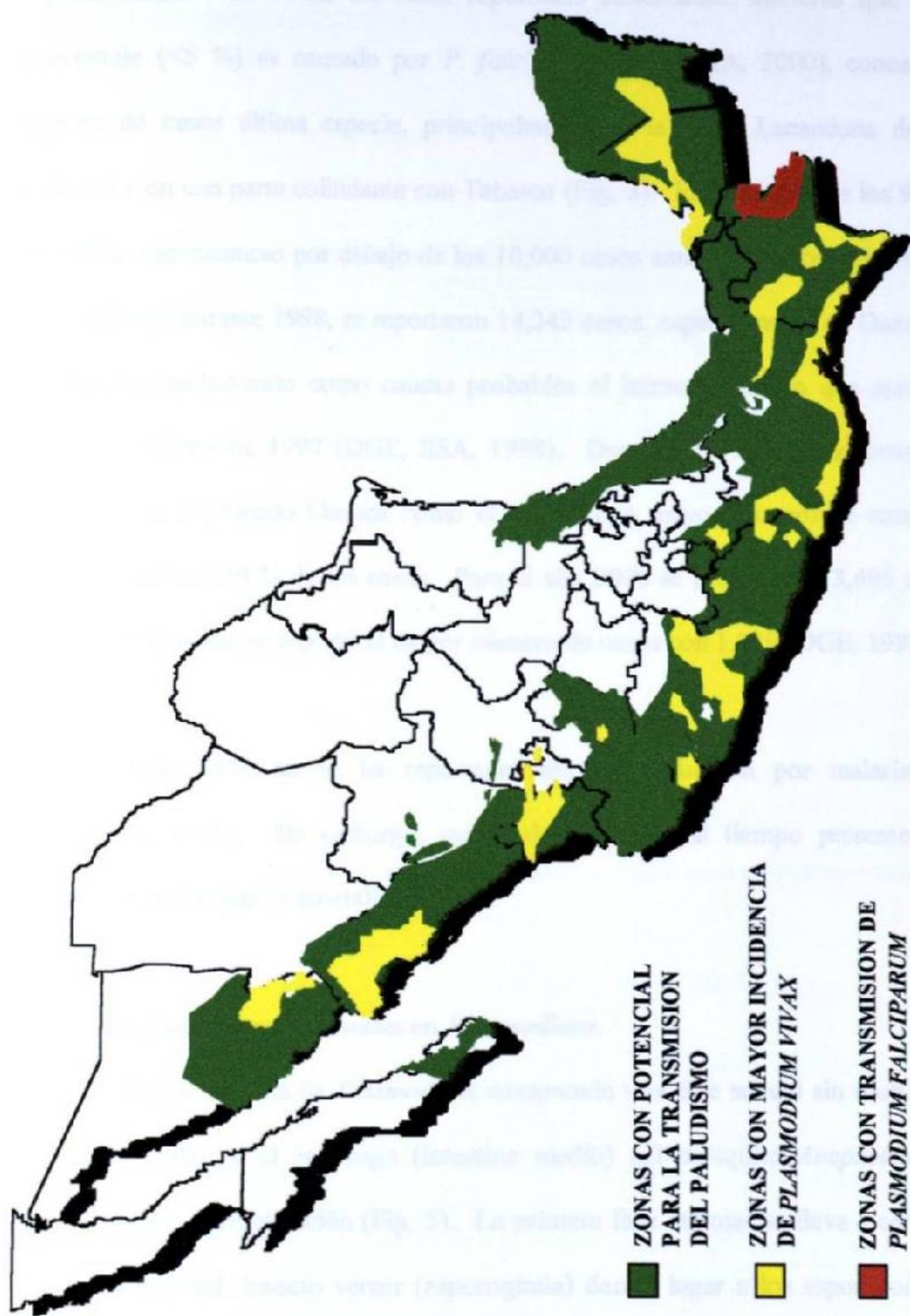


Figura 3. Areas palúdicas de México mostrando las diferentes zonas de riesgo (fuente: DGE/SSA, 1998-2000).

Yucatán. *Plasmodium vivax* es el principal causante de morbilidad por malaria, representando > 95 % de los casos reportados anualmente, mientras que un pequeño porcentaje (<5 %) es causado por *P. falciparum* (DGE/SSA, 2000), concentrándose el reporte de casos última especie, principalmente en la Selva Lacandona del estado de Chiapas y en una parte colindante con Tabasco (Fig. 3). En la década de los 90, la malaria en México se mantuvo por debajo de los 10,000 casos anuales casi todos los años (Fig. 4). Sin embargo durante 1998, se reportaron 14,343 casos, especialmente en Oaxaca (79 % de los casos), atribuyendo como causas probables el huracán Paulina que azotó Oaxaca y Guerrero a fines de 1997 (DGE, SSA, 1998). Durante 1999, disminuyeron los casos a 5,031 casos, repitiendo Oaxaca como el estado con mayor número de casos con 2,498 representando el 50 % de los casos. Para el año 2000 se presentaron 3,695 casos y desde ese año en Chiapas se reportó el mayor número de casos con 1,239 (DGE, 1998, 2000).

Desde 1982 no se ha reportado ninguna defunción por malaria en México (Tellaache, 1998). Sin embargo, no se descarta que al tiempo presente o futuro se presenten problemas de mortalidad.

#### **Una fase sexual y tres asexuales en *Plasmodium*.**

El ciclo de vida de *Plasmodium* comprende una fase sexual sin multiplicación que se lleva a cabo en el estómago (intestino medio) del mosquito *Anopheles*, y tres fases asexuales con multiplicación (Fig. 5). La primera fase asexual se lleva a cabo en la pared del estómago del insecto vector (esporogonia) dando lugar a los esporozoítos, y las dos últimas fases en el huésped vertebrado, dando lugar a los trofozoítos. La segunda fase

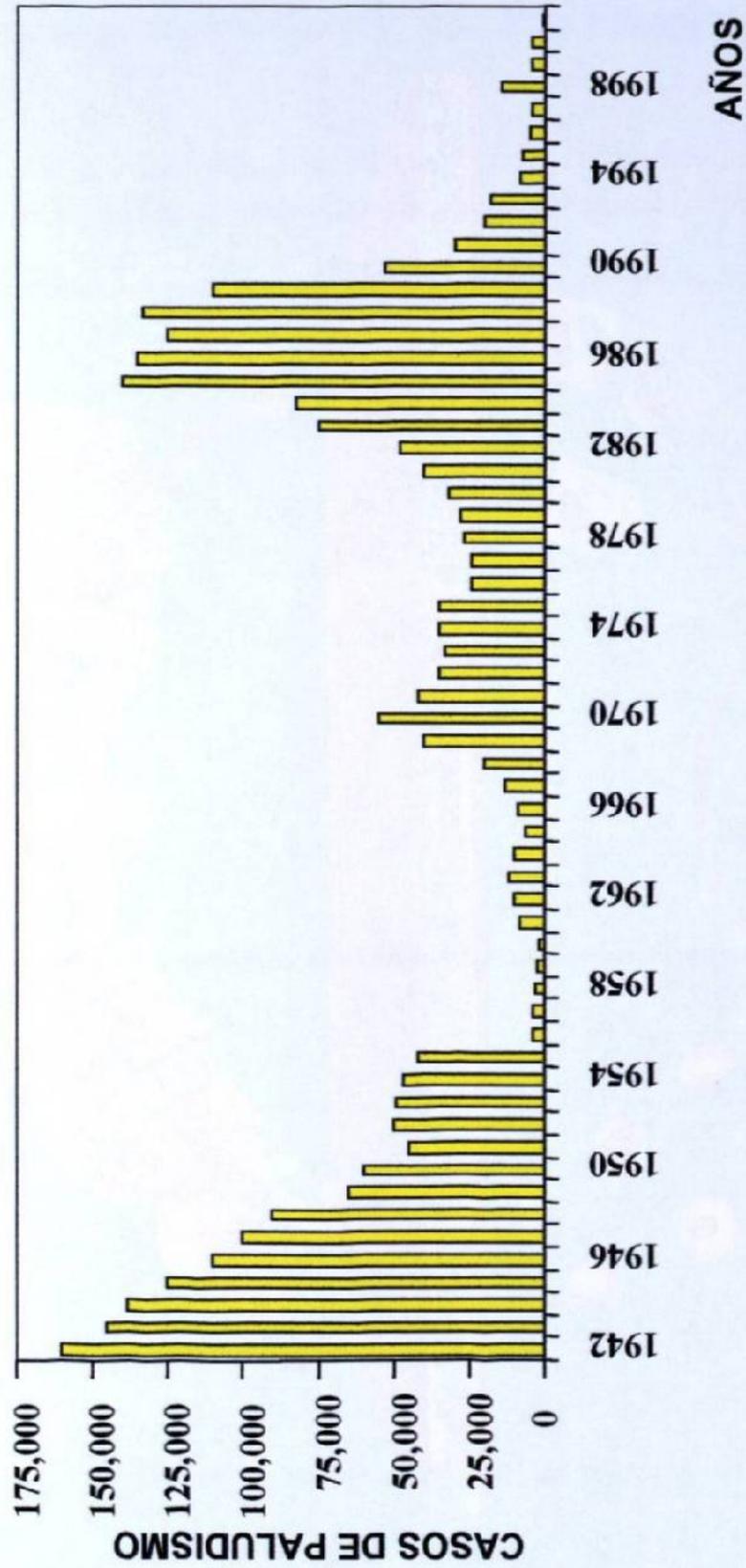


Figura 4. Numero de casos de paludismo desde 1942 a 2000 en México (DGE/SSA).

Fig. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* en el humano y en el mosquito (Kneil, 1994)

sexual se lleva a cabo en las células prequimostomas del hígado (esquizogonia hepática o

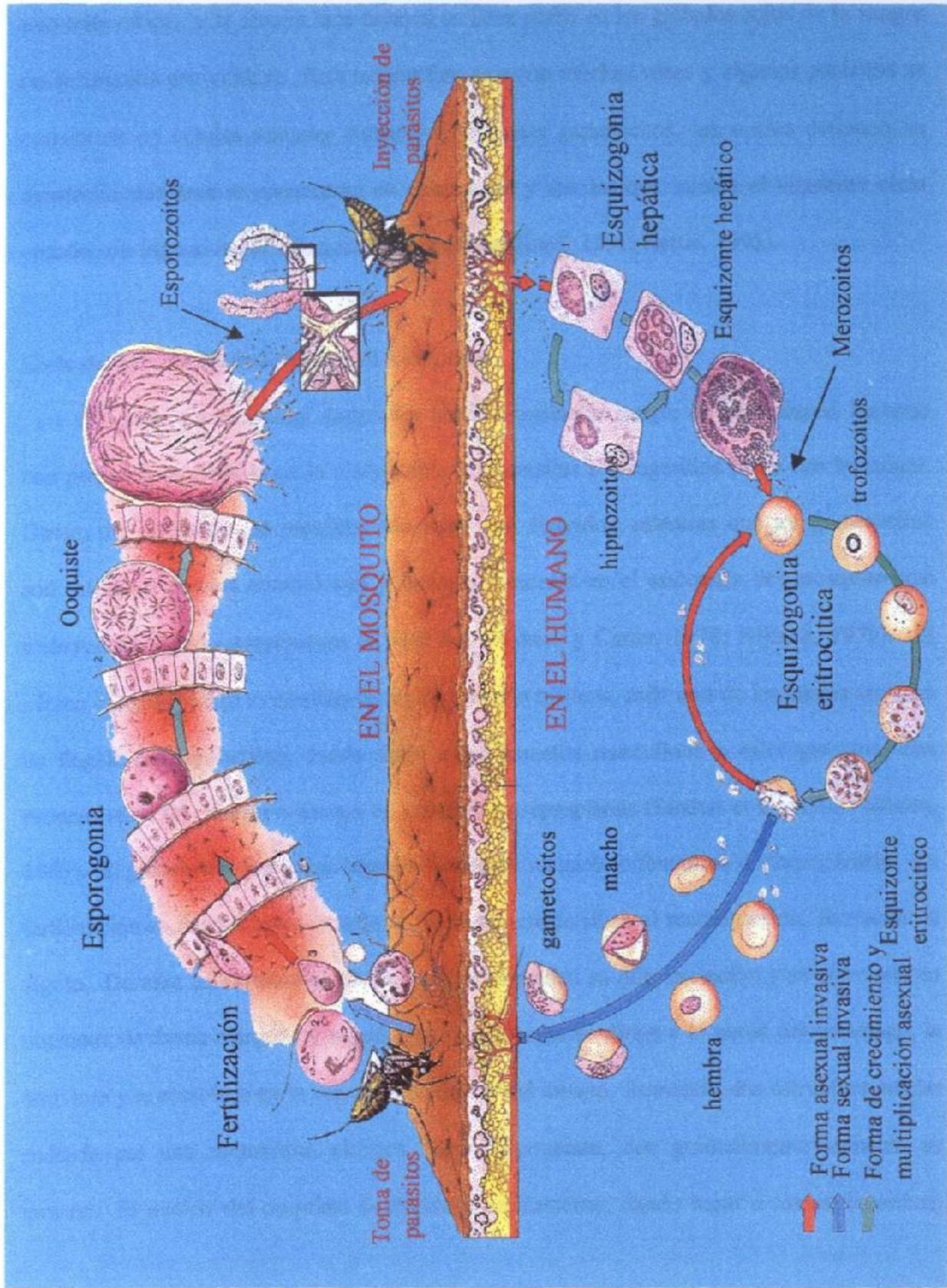


Fig 5. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* en el humano y en el mosquito (Knell, 1991)

asexual se lleva a cabo en las células parenquimatosas del hígado (esquizogonia hepática o exo-eritrocítica), y la tercera fase asexual se lleva a cabo en los glóbulos rojos de la sangre (esquizogonia eritrocítica). Esta tercera fase se repite muchas veces y algunos parásitos se convierten en células sexuales inmaduras llamadas gametocitos, las cuales detienen su desarrollo mientras se encuentran en circulación y son los que inician el siguiente ciclo cuando son ingeridos por mosquitos anofelinos (Knell, 1991; Kettle, 1995).

### **Ciclo de vida de *Plasmodium* en el mosquito.**

Cuando un mosquito *Anopheles* hembra ingiere la sangre de un huésped humano con parásitos de malaria en la circulación, los parásitos son ingeridos junto con la sangre. Dentro del estómago los parásitos asexuales son digeridos, mientras que los gametocitos son activados por las condiciones y factores presentes en el estómago del mosquito que incluyen pH 8, una temperatura de  $\approx 27^{\circ} \text{C}$  (Nijhout y Carter, 1978; Nijhout, 1979). El núcleo del gametocito masculino se divide en ocho núcleos, cada uno de los cuales se une a un flagelo (exflagelación), dando lugar a los gametos masculinos o microgametos, este proceso toma un minuto o menos en condiciones apropiadas (Sinden et al., 1978; Sinden, 1983). El gametocito femenino madura formando un gameto femenino o macrogameto. La fertilización se lleva a cabo cuando el microgameto fertiliza al macrogameto, formando el cigoto. Durante las siguientes 18-24 h el cigoto realiza su diferenciación y se convierte en oocineto, de forma alargada y móvil, que rápidamente se dirige a la pared del estómago, la atraviesa y se establece en la superficie exterior del mismo, formando una estructura celular rodeada por una membrana elástica llamada ooquiste, que gradualmente aumenta su tamaño. El núcleo del ooquiste se divide repetidamente, dando lugar a los esporozoítos,

que son de forma alargada con un núcleo central. Los esporozoitos maduran, adquieren movilidad, rompen la pared del ooquiste e invaden la cavidad hemocélica del cuerpo del mosquito (en este momento no son infectivos), se dirigen a las glándulas salivales e invaden preferentemente las regiones distales de los lóbulos laterales y mediales. En las glándulas salivales, los esporozoitos adquieren su virulencia, o se activan para producir la enfermedad en el humano, provocando que el mosquito sea infectivo. Cuando el mosquito se alimenta de sangre humana, los esporozoitos son inyectados a través de la hipofaringe del insecto junto con la saliva, pasando a la corriente sanguínea del huésped vertebrado en cuestión de minutos, iniciando así el desarrollo en este huésped. Se ha calculado que un sólo ooquiste de *P. falciparum* puede producir y liberar cerca de 10,000 esporozoitos (Kettle, 1995).

#### **Ciclo de vida de *Plasmodium* en el humano.**

Los esporozoitos que llegan a la corriente sanguínea del huésped humano entran al hígado en pocos minutos, a través de las células de Kupffer, invadiendo las células parenquimatosas, donde rápidamente se convierten en trofozoitos hepáticos, que crecen aceleradamente, destruyen a su célula huésped, se dividen y forman esquizontes hepáticos multinucleados, en los cuales se desarrollan varios miles de merozoitos invasivos, que maduran, rompen su célula huésped y son liberados a los capilares hepáticos. Los merozoitos en la sangre invaden a los eritrocitos en unos cuantos minutos. En la infección por *P. vivax*, algunos esporozoitos que entran al hígado no se desarrollan inmediatamente, sino que se convierten en parásitos “en estado latente” llamados hipozoitos. Estos permanecen por meses o incluso años en este estadio hasta que empiezan a activarse y causan las recaídas típicas de la malaria producida por *P. vivax*. En el eritrocito, los

merozoítos se convierten en trofozoítos eritrocíticos que ingieren y digieren hemoglobina acumulando pigmento. Al continuar su desarrollo, el núcleo de los trofozoítos se divide pero sin que ocurra división celular, produciéndose esquizontes multinucleados, los cuales finalmente generan de 8-16 merozoítos y en este punto el eritrocito infectado se rompe y libera los parásitos. Los merozoítos liberados invaden otros glóbulos rojos y se inicia un nuevo ciclo en la sangre. Estos ciclos de multiplicación en la sangre son los que causan las crisis periódicas de la malaria ya que, cuando los esquizontes se rompen sincrónicamente, se liberan pirógenos en la sangre, los cuales causan las crisis febriles. Después de varios ciclos sanguíneos, una proporción de trofozoítos se transforma en gametocitos, los cuales permanecen dentro del eritrocito en circulación en la sangre, hasta que son ingeridos por un mosquito (Knell, 1991; López- Antuñaño y Schmunis, 1993).

#### **Signos y síntomas de la enfermedad.**

Los síntomas en *P. vivax* incluyen fiebres, sudoración, dolor en las coyunturas, dolor de cabeza, repetidos vómitos, y escalofríos. Los síntomas en *P. falciparum* son más severos cuando se presenta los síntomas son acompañados de una severa anemia, convulsiones y coma. La anemia severa es una de las causas de muertes en áreas de intensa transmisión, principalmente en mujeres embarazadas. La UNICEF reconoce que la malaria es una de las cinco mayores causas de mortalidad en niños menores de cinco años, la agencia a hecho de la enfermedad una prioridad con apoyo a 32 países, 27 de los cuales están en África.

## **Clase Insecta**

El phylum más grande en el reino animal es el arthropoda, el cual contiene cerca del 80 % de las especies animales conocidas. Entre los miembros del phylum Arthropoda están los insectos, el grupo más diverso entre todos los animales, con al menos 1 millón de especies. Desde una perspectiva humana, la mayoría de los insectos son benéficos en la naturaleza, aunque existen cientos que son dañinos para el hombre, por transmitir enfermedades mecánica o biológicamente (Kettle, 1995).

Además de sus características como artrópodo, es decir cuerpo segmentado y patas articuladas, los insectos tienen otras características específicas que los diferencian de otros grupos como son: su cuerpo de tres regiones cabeza, tórax y abdomen, poseen un sólo par de antenas en la cabeza, los ojos son compuestos algunos poseen ojos simples además de los compuestos y ambos pueden estar presentes. En el tórax se encuentran tres pares de patas y normalmente dos pares de alas, con la excepción del orden Díptera que posee sólo un par funcional. Los adultos poseen alas, que son extensiones primitivas del exoesqueleto y están localizadas en meso- y metatórax. Las partes bucales son muy variadas dependiendo de su adaptación al ambiente en que viven y del grado de evolución. El sistema respiratorio consiste de una red traqueal que se ramifica, se inicia desde las pleuras hacia el interior del cuerpo del insecto donde se ramifica y llega a los diferentes órganos a través del cuerpo. La mayoría de los insectos tienen sexos separados, presentándose en algunos grupos generaciones partenogenéticas, por ejemplo en los pulgones. El crecimiento y mudas están controlados por hormonas (Sharp, 1970).

## **Orden Díptera**

Entre los dípteros están muchos insectos de importancia médica y veterinaria, tales como los mosquitos (Familia: Culicidae), moscas de la arena (Familia: Psychodidae), moscas negras (Familia: Simuliidae). Los dípteros tienen sólo dos alas membranosas, el segundo par de alas es reducido a unas estructuras parecidas a una protuberancia, los balancines, que son usados para el equilibrio durante el vuelo. El aparato bucal en los dípteros hematófagos como *Anopheles*, ha evolucionado hasta llegar a ser alimentadores capilares, que penetran la piel (Lehane, 1991).

En el orden de los Dípteros existen tres subórdenes: Nematocera, Brachycera y Cyclorrhapha. El suborden Nematocera se encuentran las familias de importancia médica Culicidae, Simuliidae, Ceratopogonidae y Psychodidae (Lehane, 1991).

### **Familia Culicidae**

Aproximadamente 3200 especies de Culicidae han sido descritas, y cada año se reconocen nuevas especies. Muchos de los miembros de la familia Culicidae, son succionadores de sangre como los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*. Son generalmente de 3-6 mm de largo y algunos pueden llegar hasta los 9 mm. Las alas tienen escamas sobre las venas. Poseen probóscide larga adaptada para succionar sangre y jugos de plantas. El tórax es más amplio que la cabeza y el abdomen es alargado. Las antenas son largas y plumosas en los machos y cortas y con pocos pelos en las hembras. La larva es acuática con cabeza, tórax y abdomen bien definidos, y en el octavo segmento abdominal se presenta el aparato respiratorio. Existen tres subfamilias en la familia Culicidae: Toxorhynchitinae, que no se alimentan de sangre; Culicinae, hematófagos, cuyos miembros transmiten muchos arbovirus, como el dengue y nemátodos filarioides y la tercer

subfamilia, Anophelinae, hematófagos, cuyos miembros transmiten malaria y filarias (Kettle, 1995; White, 1987).

### **Biología del vector: *Anopheles*.**

La morfología externa es el criterio principal para reconocer el género y la especie de éstos mosquitos (Fig. 6). Diversas estructuras y manchas de las alas o patas son comúnmente utilizados para determinar la especie, aunque no son las únicas características (Wilkerson y Strickman, 1990). Las hembras de *Anopheles* depositan sus huevos en la superficie del agua y las larvas eclosionan de 36 a 48 hr. dependiendo de la temperatura. El número de huevos depende de la especie y el tamaño corporal de la hembra. En un estudio con *Anopheles albimanus* se presentó un promedio de  $70.6 \pm 20.7$  huevos/hembra con un rango de 28 a 121, mientras que *An. pseudopunctipennis* fue en promedio  $90 \pm 50.3$  huevos/hembra con rango de 15 a 290 en su primer ciclo gonotrófico (Sumuhano, 2001). El tamaño del mosquito es importante en la fecundidad, en hembras chicas de *An. albimanus* con tamaño alar de  $2.74 \pm 0.053$  mm, el promedio de huevos/hembra fue de  $45 \pm 7.7$ , pero las hembras grandes con longitud alar de  $3.054 \pm 0.52$  mm, ovipusieron significativamente mas huevos con un promedio de  $92 \pm 9.9$  huevos/hembra (Sumuhano, 2001).

Mosquitos *Anopheles* puede diferenciarse de otros géneros desde la etapa de huevo.

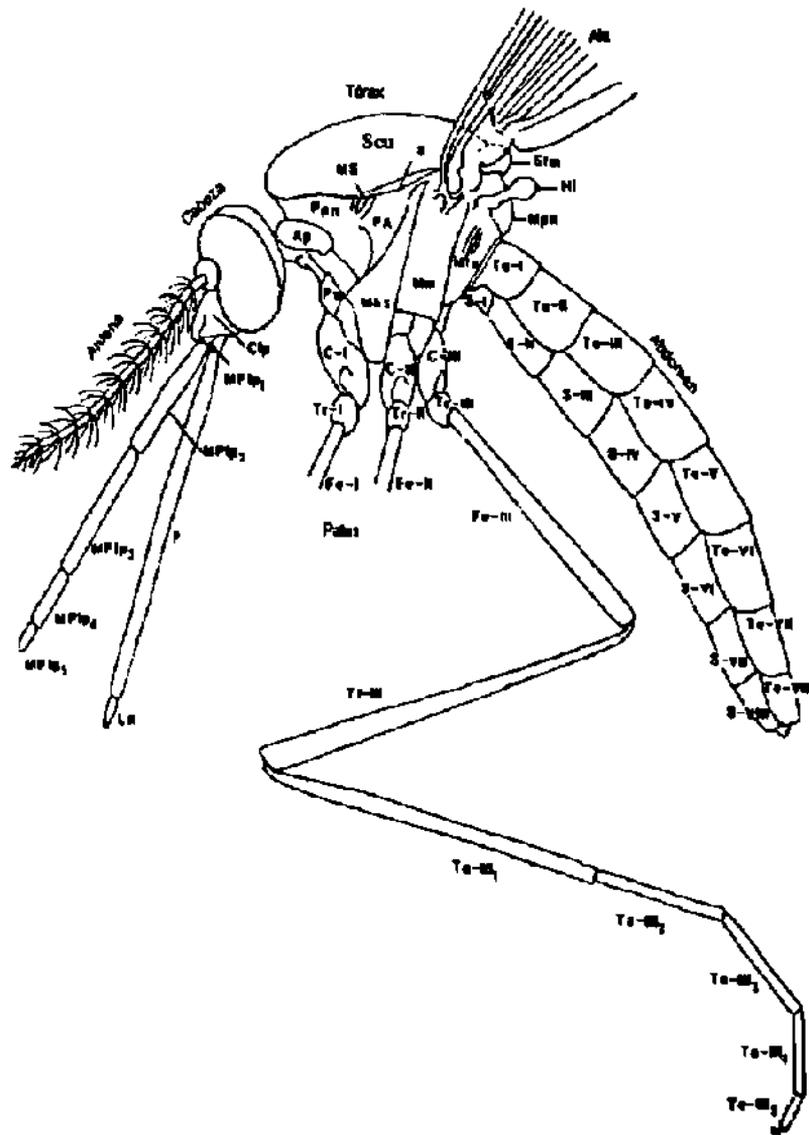


Figura 6. Mosquito anophelino hembra, vista lateral. AP: antepronoto; C- I, C-II y C-III : coxa de la pata anterior, media y posterior, respectivamente; Tr-I, Tr-II y Tr-III trocánter de la pata anterior, media y posterior respectivamente, Fe-I, Fe-II y Fe-III fémur de la pata anterior, media y posterior respectivamente; Hl: balancín; La: labelo; P: proboscide; Mks: mesacatepisternón; Mn: mesopostnoto, MS: estigma mesotorácico; Mts: metapisternon; Ppn: postpronoto; Ps: proepisternón; S-I-VIII: esternitos 1-VIII; Scu: escudo; Stm: escudete; Ta-III 1-5: tarsómeros 1-5 de la pata posterior; Tr-I: trocánter de la pata anterior, Tr-II: trocánter de la pata media; Tr-III: trocánter de la pata posterior (Wilkerson et al 1990).

Los anofelinos depositan sus huevos individualmente y cada uno de ellos tiene sus propios flotadores, los huevos de *Aedes* son depositados individualmente pero carecen de flotadores y los de *Culex* son depositados en grupo llamada "barquilla". Las larvas de *Anopheles* eclosionan del huevo utilizando una pequeña estructura parecido a "espina" que se encuentra en la parte frontal de la larva, la cual junto con movimientos de cuerpo y la cabeza producen la ruptura del huevo (Rodríguez et al., 1992). Una vez en el agua, las larvas de *Anopheles* se posan paralelas justo debajo de la superficie del agua y respiran aire atmosférico a través de un par de espiráculos en la parte posterior del abdomen, mientras que los *Aedes* y *Culex* poseen un sifón respiratorio largo que les permite mantener su cuerpo en una posición aproximada de 45 ° con respecto a la superficie del agua. Los adultos anofelinos poseen palpos maxilares largos y están situados a ambos lados de la probóscide y son casi de la misma longitud que ésta última, tanto en machos como en las hembras, mientras que en los mosquitos culicinos y aedinos la hembra posee palpos maxilares cortos además los mosquitos anofelinos adultos descansan o se alimentan con el abdomen casi perpendicular a la superficie, a diferencia de los culícidos y aedinos que mantienen el abdomen en posición paralela a la superficie cuando reposan o alimentan (Fig. 7) (Service, 1985; Kettle, 1995).

La probóscide de la hembra presenta estructuras que incluyen un labium que termina en un par de labelas, un labrum-epifaríngeo, una hipofaringe (con una bomba faríngeal), dos pares dentadas: las mandíbulas y las maxilas (Fig 8). Todos estos componentes, excepto el labio, penetran la piel del huésped del que se alimenta. El tórax de los mosquitos adultos, tiene un par de alas, un par de balancines y seis patas. En la parte delantera del tórax se encuentran las dos glándulas salivales que poseen los mosquitos

anofelinos, cada glándula consiste de tres lóbulos, dos laterales largos y uno central más corto, unidos por conductos que forman el ducto salival principal (Service, 1985).

El canal alimentario del mosquito adulto consiste de tres partes principales: intestino anterior, intestino medio e intestino posterior. Cuando el mosquito se alimenta de sangre ésta pasa directamente a la porción expandida del intestino medio, en donde se lleva a cabo la digestión. Es el intestino medio el órgano en el cual se desarrolla el *Plasmodium*. Los tubulos de Malpighi se localizan en la unión del intestino medio con el intestino posterior, su función es excretora. El recto se encuentra en el extremo distal del intestino posterior. En los mosquitos, el abdomen tiene ocho segmentos funcionales, y alberga los órganos sexuales, en el macho los dos testículos; en la hembra recién emergida los ovarios ocupan una pequeña parte de la cavidad abdominal, mientras que en las hembras grávidas los ovarios ocupan una gran parte de esta cavidad. De cada ovario sale un oviducto, estos se unen a un oviducto común, cuya porción distal se expande para formar el *atrium*, dentro del cual se abre el conducto espermático. Este conducto está unido a la espermateca, que es el lugar donde se guardan los espermatozoides introducidos por el macho durante la cópula. Estos son suficientes para la fertilización de los huevos durante toda la vida de la hembra (Fig. 9) (White, 1987).

Al nadar, las larvas de los anofelinos mantienen el cuerpo paralelo a la superficie del agua en contraste a otros géneros que nadan inclinados con el sifón caudal hacia arriba. La cabeza de la larva puede moverse 180° cuando busca su alimento, el cual toma con

ANOPHELES

AEDES

CULEX

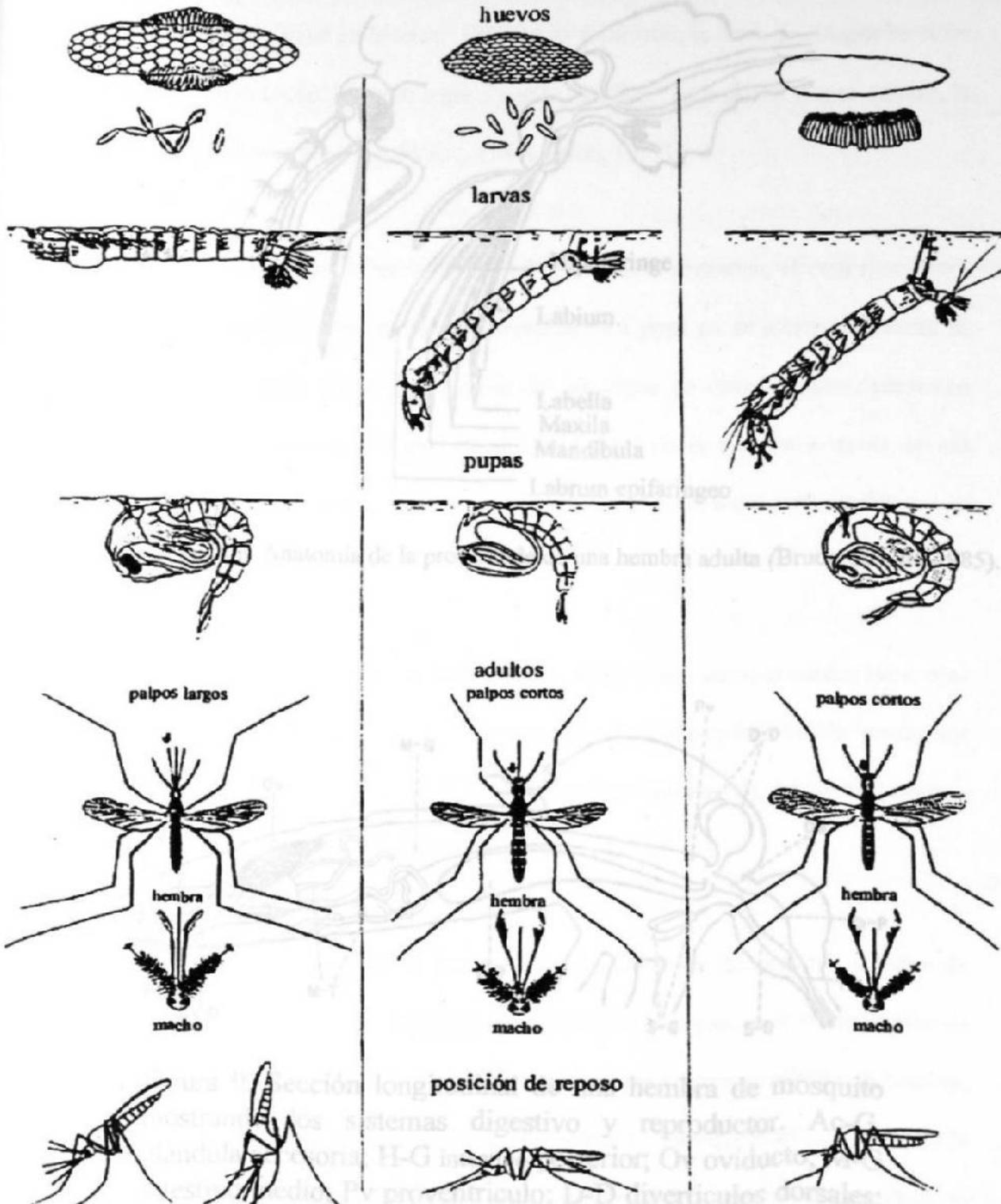


Figura 7. Diferencias entre los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes*. (Bruce-Chwatt, 1985)

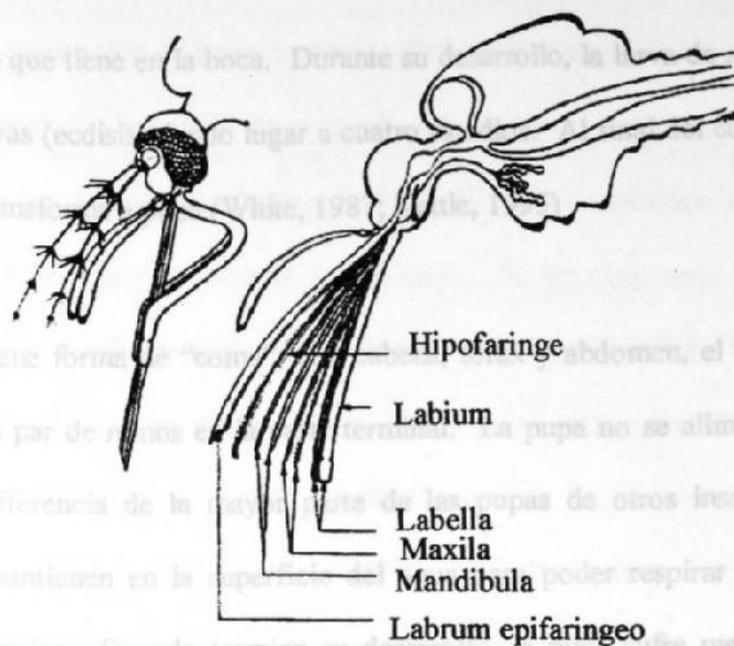


Figura 8. Anatomía de la proboscide de una hembra adulta (Bruce-Chwatt, 1985).

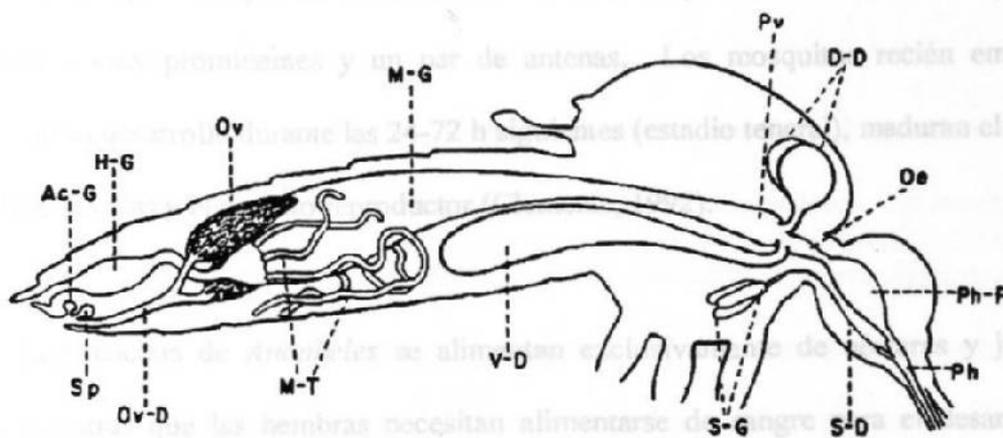


Figura 9. Sección longitudinal de una hembra de mosquito mostrando los sistemas digestivo y reproductor. Ac-G, glándula accesoria; H-G intestino posterior; Ov oviducto; M-G intestino medio; Pv proventriculo; D-D divertículos dorsales; Oe esófago; Ph-P bomba faringeal; Ph faringe; S-D ducto salival; S-G glándulas salivales; V-D divertículo dorsal; M-T tubos de malpighi; Ov-D oviducto común; Sp espermateca (Bruce-Chwatt, 1985).

ayuda de los pelos que tiene en la boca. Durante su desarrollo, la larva de *Anopheles* sufre tres mudas sucesivas (ecdisis) dando lugar a cuatro estadios. Al final del cuarto estadio, la larva muda y se transforma a pupa (White, 1987; Kettle, 1995)

La pupa tiene forma de "coma", con cabeza, tórax y abdomen, el cual tiene ocho segmentos con un par de remos en la parte terminal. La pupa no se alimenta durante su vida, aunque a diferencia de la mayor parte de las pupas de otros insectos, presentan movilidad y se mantienen en la superficie del agua para poder respirar a través de sus trompetas respiratorias. Cuando termina su desarrollo, la pupa sufre metamorfosis y se convierte en adulto o imago (Service, 1985).

Un mosquito *Anopheles* adulto tiene cabeza, tórax y abdomen; la cabeza tiene ojos compuestos muy prominentes y un par de antenas. Los mosquitos recién emergidos completan su desarrollo durante las 24-72 h siguientes (estadio teneral), maduran el aparato digestivo, sus alas y el aparato reproductor (Clements, 1992).

Los machos de *Anopheles* se alimentan exclusivamente de néctares y jugos de frutas, mientras que las hembras necesitan alimentarse de sangre para el desarrollo de huevos. Cuando se realiza la cópula el macho transfiere los espermatozoides a la hembra, la cual los almacena en una estructura llamada espermateca. Inmediatamente después de la cópula, las glándulas accesorias del macho producen una secreción que es depositada al momento de la inseminación, en la cámara genital de la hembra, que evita posteriores inseminaciones (Knell, 1991). Las hembras necesitan alimentarse de sangre, debido a que contiene factores indispensables para el desarrollo de sus huevos. La sangre en el estómago

se concentra por eliminación de agua durante la diuresis y es digerida en aproximadamente tres días, dependiendo de la especie de mosquito y temperatura ambiental, lo que lleva a la producción de huevos maduros (ciclo gonotrófico). El ciclo gonotrófico se define desde el tiempo de que ingiere sangre hasta la oviposición. Se ha observado que las hembras oviponen entrando el atardecer y que posteriormente se ven estimuladas a ingerir sangre esa misma noche. En *Anopheles albimanus* se encontró un ciclo gonotrófico de dos días determinado en condiciones de campo mediante estudios de marcado, liberación y recaptura (Rodríguez et al., 1992). Estudios de laboratorio han demostrado que *An. albimanus* oviposita alrededor 70 ( $\pm$  20) huevos (rango de 28 a 121) en su primer ciclo gonotrófico. La mayor cantidad de huevos ovipuestos por una hembra de *An. albimanus* se registró en un tercer ciclo con 147 (Sumuhano, 2001). En la fig 10 se muestra el ciclo de vida de una hembra anophelina.

Una característica muy importante que determina el papel que juegan los mosquitos anofelinos como vectores de la malaria es la preferencia por hospederos. La mayoría de los vectores más importantes son aquellos que presentan hábitos antropofágicos, esto es, prefieren alimentarse sobre humanos. La selección de hospederos pudiera tener una base genéticamente determinada, aunque debido a la naturaleza de la conducta hematofágica la selección natural favorece la no-especialización por un solo tipo de hospedero, sino un comportamiento oportunístico que dependa de la disponibilidad de los mismos. La mayoría de los mosquitos se alimentan sobre huéspedes alternativos si la preferencia primaria es inaccesible (Arredondo-Jiménez et al., 1992).

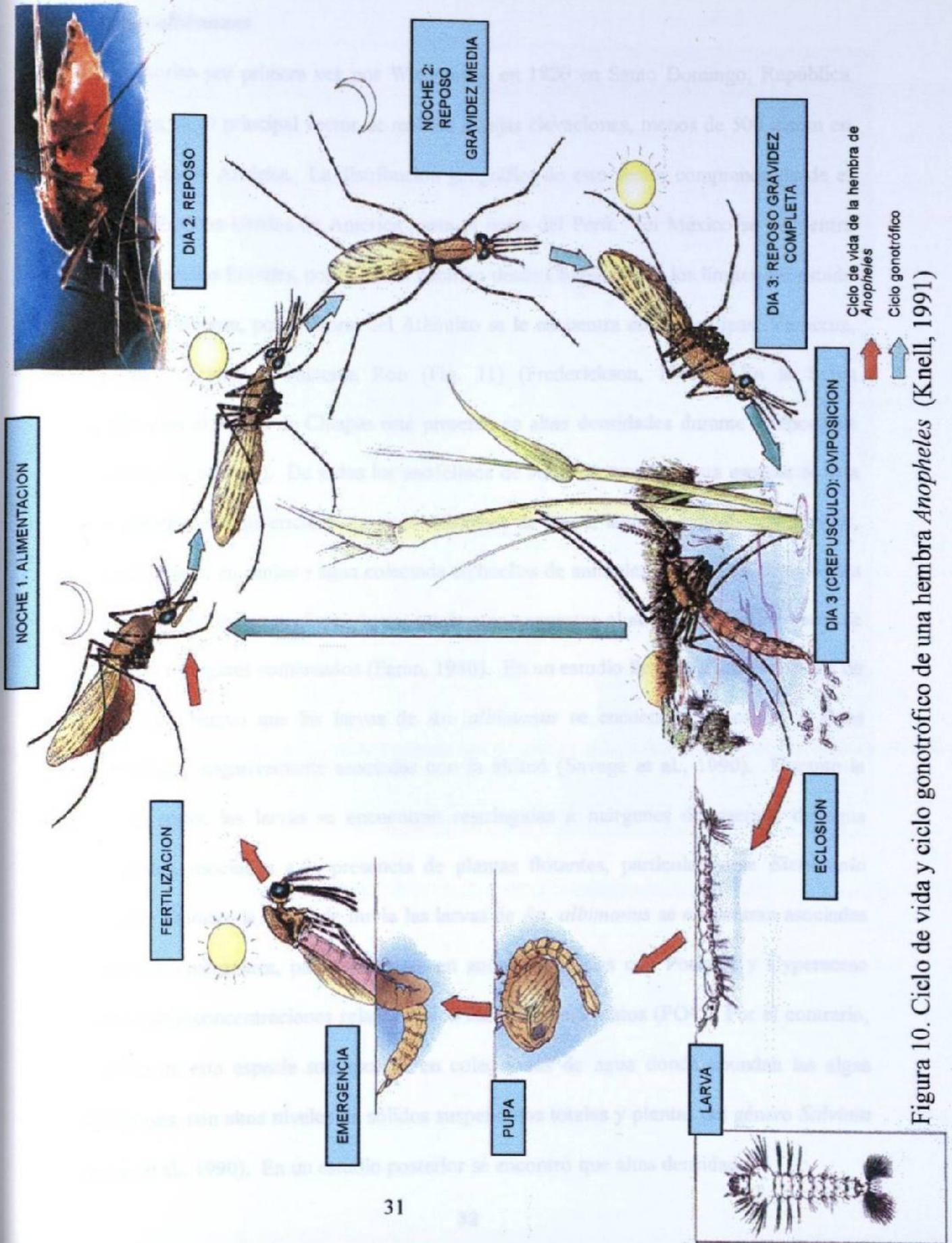


Figura 10. Ciclo de vida y ciclo gonotrófico de una hembra *Anopheles* (Kneill, 1991)

### *Anopheles albimanus*

Descrito por primera vez por Wiedemann en 1820 en Santo Domingo, República Dominicana, es el principal vector de malaria a bajas elevaciones, menos de 500 msnm en México y Centro América. La distribución geográfica de este vector comprende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el norte del Perú. En México se encuentra presente en ambos litorales, por el litoral Pacífico desde Chiapas hasta los límites del estado de Sinaloa y Sonora, por el litoral del Atlántico se le encuentra en Tamaulipas, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Fig. 11) (Frederickson, 1993). En la Selva Lacandona en el estado de Chiapas está presente en altas densidades durante la época de lluvia (mayo a octubre). De todos los anofelinos de América tropical, esta especie se cría en los hábitats más diversos, como son: márgenes de lagos, lagunas y pequeños arroyos, zonas de drenaje, en zanjas y agua colectada en huellas de animales y pequeñas depresiones del terreno. Las larvas prefieren zonas totalmente expuestas al sol, pero algunas veces se encuentran en lugares sombreados (Faran, 1980). En un estudio llevado a cabo en el sur de Chiapas, se observó que las larvas de *An. albimanus* se encuentran asociadas a algas planctónicas y negativamente asociadas con la altitud (Savage et al., 1990). Durante la época de secas, las larvas se encuentran restringidas a márgenes de cuerpos de agua permanentes, asociados a la presencia de plantas flotantes, particularmente *Eichhornia crassipes*. Durante la época de lluvia las larvas de *An. albimanus* se encuentran asociadas con plantas emergentes, particularmente en zonas inundadas con Poaceae y Cyperaceae donde existen concentraciones relativamente elevadas de fosfatos (PO<sub>4</sub>). Por el contrario, las larvas de esta especie son escasas en colecciones de agua donde abundan las algas filamentosas, con altos niveles de sólidos suspendidos totales y plantas del género *Salvinia* (Savage et al., 1990). En un estudio posterior se encontró que altas densidades

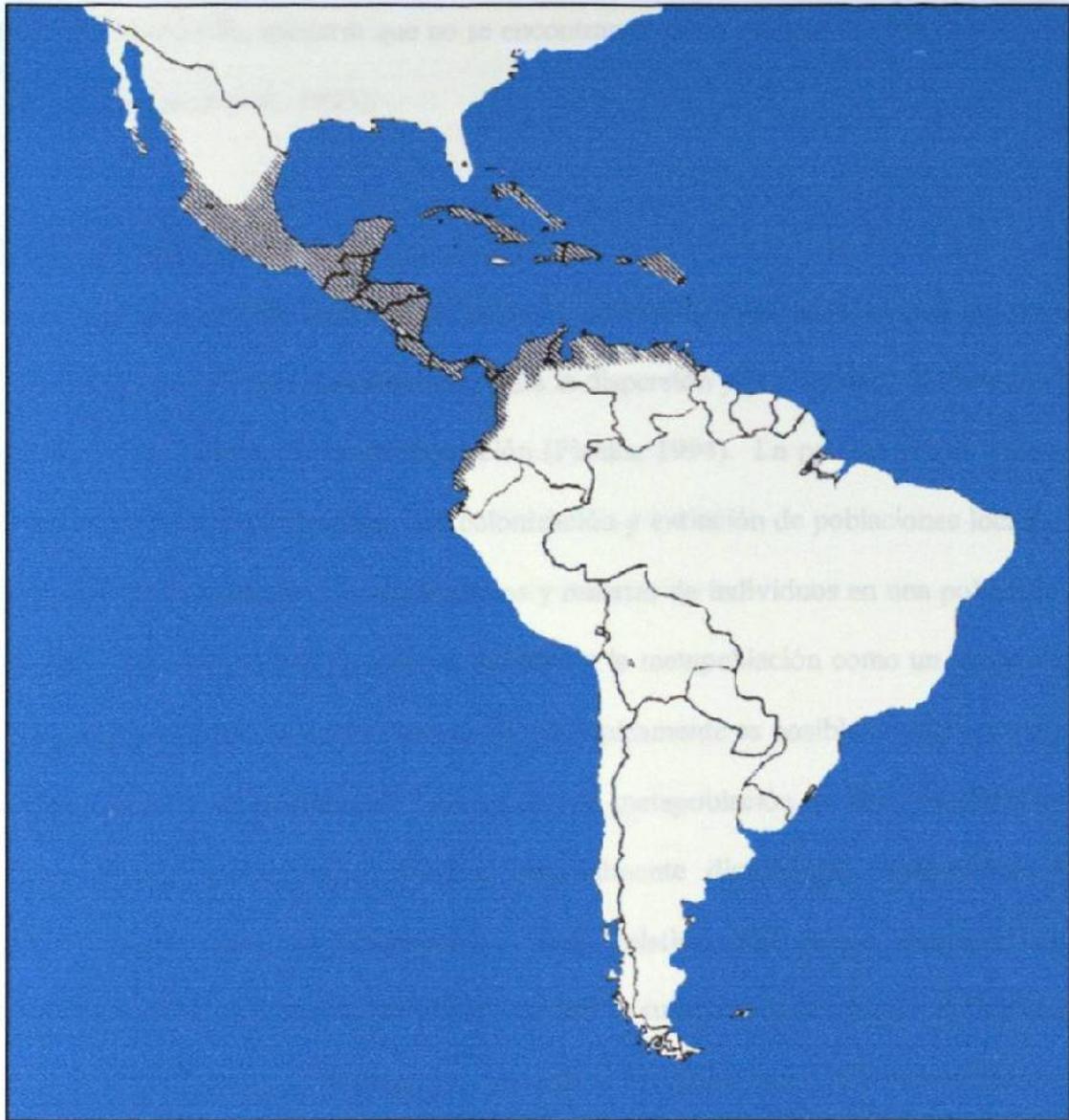


Figura 11. Distribución geográfica de *Anopheles albimanus* en México y Centro América (Fleming, 1991).

poblacionales larvarias estaban relacionadas a tres géneros de plantas: *Cynodon*, *Echinochloa* y *Fimbristylis*, mientras que no se encontraron larvas en hábitats con *Salvinia* y *Rhizophora* (Rodríguez et al., 1993).

### **El Concepto de metapoblación**

Muchas especies están segmentadas en varias subpoblaciones, aisladas unas de otras en varios grados, dependiendo de las barreras para la dispersión y proximidad. En términos generales esto se le conoce como metapoblación (Pianka, 1994). La palabra por sí misma sugiere una población de poblaciones, con colonización y extinción de poblaciones locales, una metapoblación se asemeja a los nacimientos y muertes de individuos en una población local (Hanski y Simberloff, 1997), quienes definieron la metapoblación como un grupo de poblaciones locales dentro de un área grande, donde típicamente es posible la migración de una población local a otros parches". Entonces una metapoblación es una colección de poblaciones locales relativamente aisladas, espacialmente distribuidas, unidas por la dispersión ocasional entre las poblaciones. Estas relativamente largas distancias de dispersión pueden ser infrecuentes, pero deben ocurrir lo suficiente para proveer individuos para la recolonización de la población, que ha sufrido extinción local. La metapoblación regional persiste ante la extinción local precisamente debido a la suficiente dispersión entre las poblaciones. Si la dispersión entre las poblaciones es muy frecuente que la extinción local de la población no ocurre, el concepto de la metapoblación es superfluo, y la población regional es mejor entendida como una simple y única población espacialmente distribuida. Por otro lado, si la dispersión es poco frecuente, la metapoblación regional no puede persistir y se extinguirá.

Wright (1943) define al modelo infinito isla como un modelo de "paisaje neutral" que asume igual tamaño poblacional e igual intercambio de migrantes entre todas las poblaciones. El modelo metapoblacion en su inicial definición (Levins 1970), fue un modelo demográfico que describe a un grupo de poblaciones que exhibe eventos de extinción y que se coloniza nuevamente por nuevos colonizadores. Un tercer modelo es el modelo paisaje que describe o toma en consideración el mosaico de habitats que describen al paisaje. Este modelo puede ser descrito como un modelo de metapoblacion en el cual se describen poblaciones conectadas dentro de un área determinada. Este modelo podría utilizar información espacial para estimar la probabilidad de migración y/o flujo génico asociado con cambios dentro y entre diferentes tipos de habitats (Harrison and Taylor 1997, Wiens 1997).

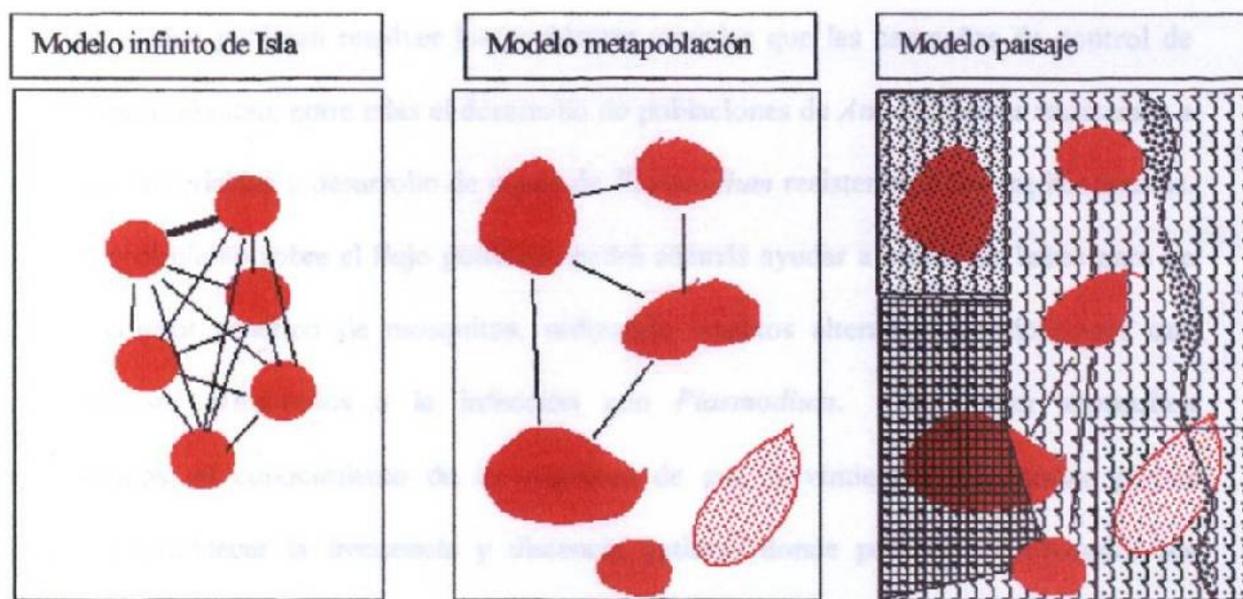


Fig. 12. Tres diferentes clases de modelos que podría ser utilizado para describir el flujo génico entre poblaciones (Sork et al., 1998).

## JUSTIFICACIÓN

En la mayoría de las especies existen variaciones geográficas tanto en la morfología como en la constitución genética. El grado de la variación geográfica es el resultado del balance de fuerzas que tienden a producir diferenciación genética local y respecto a la migración de los individuos, fuerzas que tienden producir homogeneidad genética. Estudios sobre la estructura genética poblacional en anofelinos son cada vez más abundantes, con el desarrollo de la nueva tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y avances en el conocimiento del DNA combinante. Mediante métodos indirectos, es posible calcular ahora el nivel del flujo de genes en poblaciones naturales de cualquier especie, incluyendo a *An. albimanus*. El conocimiento de los movimientos migratorios de mosquitos entre poblaciones, podría ser útil en la planeación de estrategias de control que pudieran resolver los problemas actuales que las campañas de control de paludismo enfrentan, entre ellas el desarrollo de poblaciones de *An. albimanus* resistentes a diversos insecticidas y desarrollo de cepas de *Plasmodium* resistentes a los medicamentos. Este conocimiento sobre el flujo genético, podrá además ayudar a sentar las bases para un futuro control genético de mosquitos, utilizando insectos alterados genéticamente que pudieran ser refractarios a la infección con *Plasmodium*. De liberar mosquitos transgénicos, el conocimiento de la magnitud de sus movimientos migratorios podría ayudar a establecer la frecuencia y distancia óptimas donde podrían ser liberados los mosquitos transgénicos e implantar esta característica en la población. También se podrá entender la dinámica de transmisión de paludismo en el plano costero, donde *An. albimanus* es abundante y el movimiento de poblaciones o individuos resistentes a insecticidas.

## **OBJETIVO GENERAL:**

Establecer el nivel del flujo de genes en poblaciones vecinas y separadas geográficamente de *An. albimanus* asociadas a diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas y en México, mediante marcadores fenotípicos: Resistencia a insecticidas y genotípicos: DNA polimórfico amplificados aleatoriamente por la reacción en cadena de la polimerasa (siglas en ingles: RAPD-PCR).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer la variación fenotípica intra e interpoblacional de *An. albimanus* usando niveles de resistencia a insecticidas.
2. Establecer la distancia genética intra e Interpoblacional de *An. albimanus* usando marcadores RAPD-PCR.
3. Establecer la magnitud del flujo de genes en poblaciones vecinas y aisladas geográficamente.
4. Establecer la distancia geográfica mínima en la que el flujo de genes es restringido/interrumpido en *An. albimanus*.

## REFERENCIAS CITADAS

- Arredondo-Jiménez, J.I. 1990. Ecología larvaria de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae) en el sur de Chiapas, México, M. S. Thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, N.L. México.
- Arredondo-Jimenez J.I., D.N. Bown, M.H. Rodriguez, C. Villarreal, E.G. Loyolan, C.E. Frederickson. 1992. Test for the existence of genetic determination or coditioning in host selection by *Anopheles albimanus* (Diptera : Culicidae). J Med Entomol. 29 :894-897.
- Arredondo-Jiménez, J.I., M.H. Rodriguez, D.N. Bown, E.G. Loyola. 1993. Indoor low-volume insecticide spray for the control of *Anopheles albimanus* in southern Mexico. Village-scale trials of bendiocarb, deltamethrin and cyfluthrin. J Am Mosq Control Assoc. 9: 210-220.
- Arredondo-Jiménez, J.I. 1995. Comparative ecology of allopatric populations of *Anopheles (Anopheles) vestitipennis* (Diptera:Culicidae). Ph. Dissertation, University of California, Davis.
- Ballinger-Crabtree, M.E., W.C. Black, B.R. Miller. 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the Random Amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. Am. J. Trop. Med. Hyg. 47 : 893-901.

- Black, W.C. IV, Munstermann, L.M. 1994. Molecular taxonomy and systematics of arthropod vectors. In: *The Biology of Disease Vectors* (Beatty J.B, and Marquardt, W.C. eds). University of Colorado Press, Boulder, Co. p 438-470.
- Bown D. N. M. Nelson. 1993. Anopheline vectors of human plasmodia. Ed. Julius P. Kreier. 2da. edición, *Parasitic Protozoa*. p 267-328. vol. 5, Academic Press, New York.
- Bruce-Chwatt, L. J. 1985. *Essential Malariology*. John Wiley and Sons, New York.
- Catteruccia F, T. Nolan, T.G. Loukeris, C. Blass, C. Savakis, F.C. Kafatos, A. Crisanti. 2000. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature*. 405(6789): 959- 962.
- Chan, A. T., M.H. Rodríguez, J.A. Torres, M.C. Rodríguez, C. Villarreal. 1994. Susceptibility of three laboratory strain of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* southern México. *J. Med. Entomol.* 31: 239 – 253.
- Clements, A.N. 1992. *The Biology of Mosquitoes*. Vol 1. Development, nutrition and reproduction. Chapman & Hall. 505 p.
- Collins, F.H. S.M. Paskewitz. 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol* 5: 1-9.
- DGE/SSA, 1998, 2000. *Bol. Epidemiol. Sem.* 17 (2). México.

- Dia I, D. Boccolini, C. Antonio-Nkondjio, C. Costantini, D. Fontenille. 2000. Chromosomal inversion polymorphism of *Anopheles funestus* from forest villages of South Cameroon. *Parassitologia*.42:227-229
- Donnelly M.J., M.C. Licht, T. Lehmann. 2001. Evidence for recent population expansion in the evolutionary history of the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae*. *Mol Biol Evol*. 18(7): 1353-1364.
- Faran, M. 1980. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* 15: 35-49.
- Favia, G., G. Dimopoulos, C. Louis. 1994a. Analysis of the *Anopheles gambiae* using RAPD markers. *Insect Mol Biol*. 3(3): 149-157.
- Favia, G., G. Dimopoulos, A. della Torre, Y.T. Toure, M. Coluzzi, C. Louis. 1994b. Polymorphisms detected by random PCR distinguish between different chromosomal forms of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22):10315-10319
- Fernández-Salas, I., M.H. Rodríguez, D. R. Roberts, M. C. Rodríguez, R. A. Wirtz. 1994. Bionomics of adult *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera : Culicidae) in the Tapachula foothill area of southern México. *J. Med. Entomol.* 31:663 – 670.

Fleming, G. 1991. Los vectores de la malaria, biología y ecología. Secretaria de Salud y Organización Panamericana de la Salud, México. 201-240.

Fonseca D.M., D.A. LaPointe, R.C. Fleischer. 2000. Bottlenecks and multiple introductions: population genetics of the vector of avian malaria in Hawaii. *Mol Ecol.* 9 (11):1803-1814.

Frederickson, E. C. 1993. Bionomía y control de *Anopheles albimanus*. Organización Panamericana de la Salud. Cuaderno Técnico.

Gonzalez-Cerón, L., M.H. Rodriguez, J.C. Nettel, C. Villarreal, K.C. Kain, J.E. Hernández-Avila. 1999. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. *Infect Immun.* 67:410-412.

González-Cerón, L., M.H. Rodriguez, F. Santillan, B. Chavez, J.A. Nettel, J.E. Hernandez-Avila, K.C. Kain. 2001. *Plasmodium vivax*: ookinete destruction and oocyst development arrest are responsible for *Anopheles albimanus* resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites. *Exp. Parasitol.* 98:152-161.

- Hanski, I., D. Simberloff. 1997. *Metapopulation biology : ecology, genetics, and evolution*. Academic Press. P 1-50.
- Harrison, S. and A. D. Taylor. 1997. Empirical evidence for metapopulation dynamics. Pp. 27-42 in I. A. Hanski and M. E. Gilpin, Eds. *Metapopulation Biology*. San Diego, Academic Press, Inc.
- Kettle, D. S. 1995. *Medical and veterinary entomology*. C.A.B. International. 3ra. ed.
- Knell, A.J. 1991. *Malaria*. A publication of the tropical programme of the wellcome trust. Oxford University Press.
- Lehane, M.J. 1991. *Biology of blood-sucking insects*. Harper Collins Academic. London UK 280 pp.
- Levins, R. 1970. Extinction Pp. 75-107 in M. Gerstenhaber, ed. *Some mathematical problems in biology*. American Mathematical Society, Providence.
- López-Antuñano, F.J. G.A. Schmunis. 1993. *Plasmodia of Humans*. Edited by J.P. Kreier *Parasitic Protozoa*. vol 5.135-266. Academic Press, New York. 2ª ed.
- Loyola, E.G., J.I. Arredondo-Jiménez, M.H. Rodríguez, D.N. Bown, M.A. Vaca-Marín. 1991. *Anopheles vestitipennis*, the probable vector of *Plasmodium vivax* in the Lacandon forest of Chiapas, México. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85:171-174.

- Macdonald, G. 1957. The epidemiology and control of malaria. London, New York, Toronto: Oxford University Press.
- Nijhout, M. M., R. Carter. 1978. Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro. *Parasitology* 76:39-53.
- Nijhout, M.M. 1979. *Plasmodium gallinaceum*: exflagellation stimulated by a mosquito factor. *Exp. Parasitol.* 48: 75-80.
- Organización Mundial de la Salud. 1986. Resistencia de los vectores y reservorios de enfermedades a los plaguicidas. Ginebra: Tec. Rep. Ser. 737.
- Pianka, E.R. 1994. Evolutionary Ecology. Fifth edition. Harper Collins Collage Publishers. Pp199-201.
- Ramsey, J. M., D.N. Bown, J. Aron, R. L. Beaudoin, J. Mendez. 1986. Field trial of a rapid detection method for malaria in anopheline vectors with low infection rates in México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 234- 238.
- Ramsey JM, E. Salinas, D.N. Bown, M.H. Rodríguez. 1994. *Plasmodium vivax* sporozoite rates from *Anopheles albimanus* in southern Chiapas, Mexico. *J. Parasitology.* J Parasitol. 80:489-493.

- Rodríguez M.H., E.G. Loyola. 1989. Situación epidemiológica actual y perspectivas de la investigación entomológica en México, p. 15-40. In S. Ibáñez (ed.), Memorias del IV Simposio Nacional de Entomología Médica y Veterinaria. Sociedad Mexicana de Entomología, México DF.
- Rodríguez, M.H., A. Orozco, B. Chávez, A. Martínez-Palomo. 1992. Scanning electron microscopy of egg hatching of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 29 : 887-890.
- Rodríguez, M.H., D.N. Bown, J.L. Arredondo-Jiménez, C. Villarreal, E.G. Loyola, C.E. Frederickson. 1992. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) in southern México. J. Med. Entomol. 29: 395-399.
- Rodríguez, A. D., M.H. Rodríguez, R.A. Meza, J.E. Hernández, E. Rejmankova, H. M. Savage, D.R. Roberts, K.O. Pope, L. Legters. 1993. Dynamics of population densities and vegetation associations of *Anopheles albimanus* larvae in a coastal area of southern, Chiapas, México. J Am Mosq Control Assoc. 9: 46-58.
- Rodríguez, M.H., F.C. Hernández, L.D. Possani., M.E. Zurita. 1998. Nuevas estrategias para la manipulación genética de vectores de paludismo. A cien años del descubrimiento de Ross. El paludismo en México. Ed. Jesús Kumate y A. M. Palomo. El Colegio Nacional. 167 - 180.

- Savage, H. M., E. Rejmankova, J.I. Arredondo-Jiménez, D.R. Roberts, M.H. Rodríguez. 1990. Limnological and botanical characterization of larval habitats for two primary malarial vectors, *Anopheles albimanus* y *An. pseudopunctipennis*, in costal areas of Chiapas State, México. *J Am Mosq Control Assoc.* 6: 612-620.
- Schlotterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma.* 109(6):365-71.
- Service, M. W. 1985. The *Anopheles* vector. In *Essential Malariology*. Bruce-Chwatt (ed). 3a edition.
- Sharp, D. 1970. *Insects. The Cambridge Natural History. Vol 1.* Dover Publications, Inc. New York.
- Sinden, R.E. E.U. Canning, R.S. Bray, M.E. Smalley. 1978. Gametocyte and gamete development in *P. falciparum*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 201: 375-99.
- Sinden, R.E. 1983. Sexual development of malaria parasites. *Adv. Parasitol.* 22: 153-216.
- Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. DGE/SSA 1998. [www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx).

Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. DGE / SSA. 2000.  
[www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx).

Sork, V. L. D. Cambell, R. Dyer, J. Fernandez, J. Nason, R. Petit, P. Simouse, E. Steinberg.  
1998. Proceedings from a workshop on gene flow in fragmented, managed, and  
continuos populations. National Center for Ecological Analysis and Synthesis  
University of California-Santa Barbara.

Sumuhano, R.O. 2001. Relación de tamaño corporal con la fecundidad y ovogénesis en  
*Anopheles albimanus* y *An. pseudopunctipennis* en condiciones de laboratorio. Tesis de  
licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas.

Tabachnick, W.J., W.C. Black IV. 1994. Populations genetics of disease vectors. In  
Biology of Disease Vectors (W.C. Marquardt and B. Beaty, eds), Univ. of Colorado  
Press, Boulder, Co. USA.

Tellaeche, A.M. 1998. Bionomía de los principales vectores del paludismo en México. . En:  
(Ed. Jesús Kumate y A. M. Palomo.) A cien años del descubrimiento de Ross. El  
paludismo en México 209-218. El Colegio Nacional. México, D.F.

Vargas, L., A. Martínez Palacios. 1956. Anofelinos mexicanos taxonomía y distribución.  
Secretaria de Salubridad y Asistencia, CNEP. México.

- Villarreal, T.C., J. I. Arredondo, M.H. Rodríguez. 1998. Bionomía de los principales vectores del paludismo en México. . En: (Ed. Jesús Kumate y A. M. Palomo.) A cien años del descubrimiento de Ross. El paludismo en México 149 – 161. El Colegio Nacional. México, D.F.
- Walton, C., J.M. Handley, F.H. Collins, V. Baimai, R.E. Harbach, V. Deesin, R.K. Butlin. 2001. Genetic population structure and introgression in *Anopheles dirus* mosquitoes in South-east Asia. *Mol Ecol.* 10 (3):569-80.
- White, G.B. 1987. Mosquitoes. In: Eds Manson-Bahr & D.R. Bell. *Manson's Tropical Disease*. 19 edition. English Language Book Society. p1404-34.
- Wiens, J. 1997. Metapopulation dynamics and landscape ecology Pp. 43-62 in I. Hanski, and M. E. Gilpin, eds. *Metapopulation biology. Ecology, genetics, and evolution*. Academic Press, San Diego.
- Wilkerson, R.C., D. Strickman. 1990. Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of central América and México. *J Am Mosq Control Assoc.* 6:7-34.
- Wilkerson R.C., Parsons T.J., Albright D.G., Klein T.A, Braun M.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: Anopheles). *Insect Mol Biol.* 1:205-211.

Wilkerson, R.C. T.J. Parsons, T.A. Klein, T.V. Gaffican, E.Bergo, y J. Consolim. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polimerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina, and Brazil. J. Med. Entomol. 32(5): 697-704.

World Health Organization. 1998. Fact Sheets. No 94. <http://www.who.ch/>

Wright, S. 1943. Isolation by distance. Genetics 28: 114-138.

## **CAPITULO 1**

**FLUJO DE GENES DE *ANOPHELES ALBIMANUS* EN CHIAPAS, UTILIZANDO  
COMO MARCADOR FENOTÍPICO: RESISTENCIA A INSECTICIDAS.**

**RESUMEN.** Se determinó la susceptibilidad a insecticidas en *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera:Culicidae), mediante pruebas estándar de la Organización Mundial de la Salud y por los ensayos bioquímicos de acetilcolinesterasa insensible (AChE),  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas, paranitrofenilacetato (pNPA), glutatión s-transferasa (GST) y monooxigenasas, en cinco agroecosistemas del sur de Chiapas (banano, cultivos mixtos, caña de azúcar, reserva ecológica y ganado). Se realizaron capturas en cebo humano intra y peridomicilio, corral de ganado vacuno y trampa animal. Los insecticidas probados fueron el organoclorado DDT y los piretroides sintéticos deltametrina y ciflutrina. *Anopheles albimanus* presentó elevada resistencia al DDT en todas las áreas de estudio, con mortalidad promedio del 21 al 50 %. La susceptibilidad de *An. albimanus* hacia la deltametrina fue variable, presentando la menor mortalidad en la zona de banano 75%, mientras que en las otras zonas la mortalidad fue mayor al 85 %, la mayor susceptibilidad fue en el área de ganado (92 % de mortalidad). La menor susceptibilidad de *An. albimanus* a la ciflutrina se presentó en la zona de banano (50 % de mortalidad) y mayor susceptibilidad en la de ganado (84 % de mortalidad). Las pruebas bioquímicas mostraron elevados títulos enzimáticos en la zona de banano, pero disminuyeron significativamente a partir de la zona de cultivos mixtos hasta la zona de ganado. Tanto las pruebas de susceptibilidad como las pruebas bioquímicas muestran una elevada resistencia al DDT, deltametrina y ciflutrina en la zona de banano en *An. albimanus*. Como la susceptibilidad es discontinua dependiendo del agroecosistema se deduce que el movimiento de individuos resistentes a los insecticidas es limitado.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a insecticidas en los grupos de insectos vectores de enfermedades, ha sido un problema creciente (Brogdon y McAllister, 1998), debido a intensas y sostenidas aplicaciones de productos químicos en el ambiente, incluso de aquellos cuyo propósito de aplicación no ha sido el ataque a insectos vectores, aumentando la proporción de genes de resistencia en la población de insectos (Raymond et al., 1998).

El DDT fue introducido para el control de mosquitos en 1946, pero ya desde 1947 se habían reportado los primeros casos de resistencia en *Aedes tritaeniorhynchus* y *Ae. sollicitans* (Brown, 1986). Igualmente, en México el DDT se ha aplicado desde finales de la década de 1940, con reportes de resistencia al mismo a partir de los 1950. Sin embargo, su aplicación fue exitosa en el control del paludismo (Loyola et al. 1990) hasta que fue descontinuado en 1999. En el caso de otros insecticidas, como el malatión o propoxur, la aparición de resistencia a los mismos ha sido atribuida como uno de los problemas técnicos más importantes en los programas de control de paludismo de Centroamérica (Frederickson, 1993).

Con el uso ilimitado de insecticidas para el control de plagas en la agricultura, los vectores de enfermedades, aunque no son el blanco de aquellos insecticidas, han estado sujetos a presión de selección, donde sólo sobreviven aquellos individuos con genes favorables para las condiciones de su hábitat (Henao y Corey, 1991). Como consecuencia,

el espectro de resistencia en *An. albimanus* a los insecticidas ha sido ampliado a todos los grupos toxicológicos de insecticidas (OMS, 1986).

En estudios previos en *An. albimanus* realizados entre 1989 – 1990 en el Centro de Investigación de Paludismo, se encontró susceptibilidad completa (> 98 %) al carbamato bendiocarb, susceptibilidad intermedia (mortalidad 80 – 98%) al piretroide sintético deltametrina y resistencia (mortalidad < 80%) al DDT (Fuentes-Maldonado, 1992). En otro estudio más detallado se realizaron pruebas de susceptibilidad con los cuatro grupos de insecticidas, pero esta vez se agruparon los mosquitos por agroecosistemas, que fueron: banano, cultivos mixtos y ganado. Los resultados mostraron variabilidad geográfica en la susceptibilidad con mayor resistencia en el área de banano comparativamente con las áreas de cultivos mixtos y ganado, para los insecticidas DDT y deltametrina y ciflutrina (Malo-García, 2000).

En el presente estudio se determinó la resistencia a los insecticidas DDT, deltametrina y ciflutrina mediante pruebas de susceptibilidad. También se realizaron pruebas bioquímicas para determinar los niveles de las enzimas responsables de la resistencia y observar dónde se dan las discontinuidades de las poblaciones resistentes o susceptibles. Las variaciones en la resistencia nos proporcionaron información sobre la migración de individuos entre los diferentes agroecosistemas analizados.

## **IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

Los insecticidas han sido y continuarán siendo por mucho tiempo el arma principal de los programas globales de control del paludismo (Schoof y Taylor, 1972), por lo que el fenómeno de resistencia a insecticidas en los vectores de enfermedades ha tenido un importante impacto sobre los diferentes programas de salud, obligando a cambiar las estrategias de control de muchas especies (Organización Mundial de la Salud, 1986). Se define la resistencia como una característica heredada que otorga una mayor tolerancia a un plaguicida o grupo de plaguicidas, de tal modo que los individuos resistentes sobreviven a una concentración del compuesto (o compuestos) que normalmente sería mortal para la especie (Hemingway et al., 1992; WHO, 1992). Sobre la base de esta definición, se puede considerar que la proporción de sobrevivientes (en primer término heterocigotos, pero incluidos los homocigotos a medida que progresa la selección), refleja la frecuencia del gene o los genes que codifican para mecanismos particulares de la resistencia, y por consiguiente, confieren resistencia.

Los insecticidas han sido utilizados intensivamente para el control de la población de insectos durante los últimos 50 años y muchas especies de insectos han desarrollado resistencia a algunas familias de insecticidas. Esta resistencia es debida principalmente a dos mecanismos: la mutación de la proteína objetivo del insecticida (llevando a una disminución en su afinidad concerniente a la familia de insecticida), y por incremento en la detoxificación. Recientes estudios moleculares sugieren que las mutaciones que confieren resistencia son raras y algunas veces eventos únicos de cualquier especie dada. La amplia distribución geográfica de algunos de estos genes puede entonces únicamente ser explicado

por el balance entre migración y selección a nivel población (Pasteur y Raymond, 1996). Esto adquiere mayor relevancia cuando se considera que los insectos poseen la capacidad de desarrollar resistencia hacia compuestos relacionados entre sí, independientemente de que esté primariamente dirigido hacia ellos. De esta manera, muchas especies de mosquitos de importancia médica han desarrollado resistencia a insecticidas, al entrar en contacto con compuestos dirigidos contra insectos de importancia agrícola (Organización Mundial de la Salud, 1986; Hemingway et. al., 1987).

#### Resistencia a insecticidas y flujo de genes

El flujo de genes y la distribución geográfica de población, son factores utilizados predecir la tasa de desarrollo de resistencia. Estudios empíricos han proporcionado evidencia de que la migración contribuye a la dispersión de genes de resistencia a insecticidas. A pesar de las limitaciones prácticas del flujo de genes estimado en manejo de resistencia, la resistencia a insecticidas ofrece la oportunidad para explorar procesos de selección y adaptación en diferentes medio ambientes. Los patrones de variación de resistencia dentro y entre poblaciones de insectos son una función de parámetros poblacionales primarios, movimiento de insectos y régimen de aplicación de insecticidas. Para muchas especies, la variabilidad es mayor entre que dentro de poblaciones, lo cual puede ser atribuido a las diferentes presiones locales de selección como patrones de rociado, cantidades de insecticida vertidos, grupos químicos, etc. (Roderick, 1996). Otros estudios han revelado que la ecología del insecto influye en la exposición a los plaguicidas agrícolas; en consecuencia, hay que tener en cuenta estos aspectos al tomar decisiones

sobre estrategias nacionales para el empleo de plaguicidas en los programas de salud pública (WHO, 1992).

La determinación de la resistencia a insecticidas mediante pruebas de susceptibilidad y pruebas bioquímicas en diferentes condiciones de uso del suelo nos proporcionará información primeramente sobre los efectos locales de los insecticidas en áreas altamente tratadas en comparación con áreas con poca o nula aplicación de ellos, e indirectamente sobre la migración o flujo de genes de resistencia a insecticidas procedentes de áreas de resistencia hacia áreas susceptibles.

## ANTECEDENTES

El comité de expertos de la ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD en biología de los vectores y lucha antivectorial, se ha reunido por nueve ocasiones desde 1956. En estas reuniones se han examinado la evolución de la resistencia, sus consecuencias y las medidas apropiadas para contrarrestarla. Además de la resistencia, los problemas operativos y de gestión, junto con la modificación del medio y los desplazamientos de poblaciones, han contribuido a las tendencias desfavorables en la transmisión de las enfermedades. En la actualidad, más de 250 millones de personas están infectadas con paludismo. También está aumentando la importancia de otras enfermedades transmitidas por vectores como el dengue, tanto por su extensión geográfica como por el número de individuos infectados (WHO, 1992).

En general, el criterio para definir la presencia de resistencia, ha sido la supervivencia del 20% o más de los individuos sometidos a ensayos con las concentraciones de diagnóstico actualmente conocidas de los plaguicidas comúnmente disponibles, usando los estuches de ensayos de la ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (Fig. 6) (WHO, 1992).

El fenómeno de resistencia no es exclusivo de los países en desarrollo, sino que se ha generalizado en todo el mundo. En América Latina, el efecto de la resistencia en *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis* Theobald ha sido sumamente grave y ha creado la necesidad de efectuar frecuentes cambios de insecticidas, causando serios problemas en las operaciones que se realizan en diversos países (Organización Mundial de la Salud, 1980).

Se ha comprobado la resistencia a uno o más insecticidas en los cuatro vectores de paludismo en las Américas: *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. darlingi* Root y *An. vestitipennis* Dyar & Knab, especialmente en zonas muy tratadas con insecticidas (Suarez, 1990; Brown, 1986; Loyola et al., 1991). En algunos países se ha abandonado el uso de los organoclorados. En México se han evaluado insecticidas como la ciflurina, bendiocarb, y deltametrina (Arredondo-Jiménez et al., 1993a) y lambdacialotrina (Villarreal et al., 1995), como nuevas alternativas al uso del DDT y con el fin de que sean redituables, se aplicaron mediante la técnica de bajo volumen (Arredondo-Jiménez et al., 1993b)

#### **Clasificación de los insecticidas por uso en salud pública y ejemplos.**

Por su estructura química y al uso en salud pública, los insecticidas se clasifican en cuatro grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Pant, 1988).

**Organoclorados: ejemplo: DDT, lindano, dieldrin.**

**Propiedades: baja volatilidad, químicamente estables, solubles en lípidos, lento grado de biotransformación y degradación. Todos los compuestos que pertenecen a este grupo se caracterizan por:**

- 1) La presencia de carbono, cloro, hidrógeno y algunas veces oxígeno, incluyendo un número de enlaces C-Cl
- 2) La presencia de carbonos cíclicos (incluyendo anillos bencénicos)
- 3) La ausencia de sitios activos en la molécula
- 4) Son apolares y lipofílicos (se fijan en tejido graso)

**DDT [1,1,1-tricloro-2,2bis (paraclorofenil) etano] OMS16**

El DDT es el insecticida orgánico más conocido y ampliamente usado, fue primeramente sintetizado por Othmar Zeidler en 1874, un estudiante Austriaco, pero sus propiedades insecticidas las descubrió el Dr. Paul Muller entre 1940 – 1942. El DDT es un polvo blanco con un ligero olor. Insoluble en agua pero soluble en muchos solventes orgánicos. La principal vía de acceso al interior del insecto es a través de los lípidos de la cutícula.

Es un insecticida de acción neurotóxica, el cual afecta la función nerviosa por los mecanismos: (1) inactivación del cierre del canal de sodio iónico, (2) reducción del transporte de potasio iónico a través de los poros, (3) inhibición de las enzimas ATPasas dependientes de  $\text{Na}^+\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ , y (4) inhibe la habilidad de la calmodulina para regular cantidad de ión  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, esencial en la liberación de neurotransmisores. Todo esto ocasiona que el potencial de acción del impulso nervioso sea extendido de su duración normal, retrasando la repolarización post-potencial de la célula de 10 mseg hasta 30 mseg (Echobicon, 1996). El impulso nervioso espontáneo se transforma en una serie continua después de la aplicación del DDT (Lagunes y Rodriguez, 1989).

#### Organofosforados:

Ejemplos: Malatión, temefós, metil-pirimifos, fentión, clorpirifós, temefós.

Propiedades: Se llaman así porque químicamente son diferentes formas de fosfatos. El primer producto fue descubierto por el alemán Gerhard Schrader en 1934. Los insecticidas organofosforados, normalmente son ésteres derivados de los ácidos fosfóricos, fósforotico, fósforoditioico, fosfonoticoico, que a veces tienen grupos amidas o tiol. La mayor parte son sólo ligeramente solubles en agua y tienen un alto coeficiente de partición aceite / agua y baja presión de vapor. Con excepción del diclorvos, la mayoría de los

insecticidas organofosforados tienen baja volatilidad. La principal forma de degradación en el ambiente es la hidrólisis.

*Malatión* [S-éster con O, O-dimetilfosforoditioato de dietil mercaptosuccinato] (OMS 1)

Órgano fosforado con actividad insecticida y acaricida, de amplio espectro.

Es un líquido transparente amarillo claro, con un olor semejante al mercaptano, soluble en la mayor parte de los alcoholes, ésteres solventes aromáticos y cetonas. Ligeramente soluble en éter de petróleo. Es estable durante periodos muy prolongados de tiempo, siempre que las condiciones de almacenaje sean adecuadas. Se recomienda almacenar a temperaturas de 20 a 25 °C.

El malatión es uno de los insecticidas más seguros, con una  $DL_{50}$  de 900-5,800 mg / kg. Es detoxificado por el hígado en los mamíferos. Este insecticida mata por contacto, estomacal y por acción fumigante. Presenta selectividad debido a la presencia de grupos carboxilo, su función principal es inhibición de la acetilcolinesterasa, enzima esencial en la función del sistema nervioso, al actuar como sustratos falsos competidores del neurotransmisor acetilcolina, ocasionando que se perpetue el impulso nervioso por permanecer el neurotransmisor en el espacio sináptico, presentando la condición de neurotoxicidad retardada inducida por organofosforados. La forma más común de biotransformación es por hidrólisis en insectos y mamíferos.

Carbamatos:

Ejemplo: Propoxur, bendiocarb, carbaril.

El desarrollo de los insecticidas carbamatos se basó en la estructura de la fisostigmina (comúnmente llamada eserina). Esta sustancia es el principal alcaloide de la

planta *Physostigma venenosum* Balfour. El grupo de los carbamatos corresponde en su mayor parte a derivados del ácido N-metil-carbámico. Los carbamatos empleados como insecticidas tienen baja presión de vapor y baja solubilidad en agua; son moderadamente solubles en benceno y tolueno y lo son más en metanol y acetona. La biotransformación se realiza a través de tres mecanismos básicos: hidrólisis, oxidación y conjugación. La eliminación se hace principalmente por vía urinaria.

*Propoxur* [(2-isopropoxiphenyl N-metil carbamato)] (OMS 33)

Carbamato con acción insecticida.

Es un insecticida no sistémico de amplio espectro, con actividad por ingestión y contacto, efecto de choque y acción persistente (larga vida residual), soluble en todos los solventes orgánicos polares. Estable en condiciones normales de almacenamiento. Susceptible de hidrolizarse en medio alcalino fuerte. Es activo sobre numerosas plagas domésticas. Cabe destacar, además de su rapidez de acción, el efecto expulsivo (saca los insectos de sus escondrijos, cucarachas, chinches, grillos, etc.), interfiere la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa, al igual que los organofosforados, aunque la unión con la acetilcolinesterasa es menos duradera.

**Piretroides:**

Ejemplos: Deltametrina, permetrina, cipermetrina, ciflutrina, lambdacihalotrina.

Todos los insecticidas piretroides son ésteres de ácidos carboxílicos (excepto un grupo de ésteres de oximas, aún no explotados comercialmente) compuesto de tres partes (mitad carboxílicos, enlace éster y mitad alcohólica) y generalmente no tienen más de tres

centros quirales, localizados en los carbonos 1 y 3 del anillo del ciclopropano y en el carbono de la mitad alcohólica.

*Deltametrina* [(S)  $\alpha$ -Ciano (3-fenoxifenil) metil 3-(2,2-dibromoetenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] (OMS 1998)

Piretroide sintético con actividad insecticida muy superior a las piretrinas naturales, no sistémico que actúa a dosis muy bajas por contacto e ingestión, es poco residual y tiene cierta actividad repelente. Es un sólido blanco, inoloro, es poco polar lo que le confiere baja solubilidad en agua y en otros solventes hidróxilo, esteáricamente estable en condiciones normales de almacenamiento, no se observa degradación a los 2 años a 40 °C, es más estable en medio ácido que en alcalino y afecta al sistema nervioso.

El modo de acción de la deltametrina es similar al del DDT aunque la afectación del potencial de acción puede durar hasta 30 seg. Específicamente, la exposición a piretroides afecta (1) el cierre del canal de sodio, (2) inactivación de la ATPasa dependiente de  $Ca^{2+}Mg^{2+}$ , (3) enlace a los receptores GABA en el canal de  $Cl^-$ , y (4) inhibición de la calmodulina que captura los iones  $Ca^{2+}$  libre, provocando que aumente su concentración e induzca la liberación constante de neurotransmisores (Echobicon, 1996).

### **Uso intradomiciliar del DDT para el control del Paludismo**

El DDT es una herramienta, para el control de algunos vectores de paludismo, pero no es útil en todas las condiciones. Por ejemplo, el DDT fue notablemente efectivo contra anofelinos de todo el mundo, tanto en Europa, Norteamérica, Asia, Africa, como Centro y Sudamérica. Por ejemplo, *An. darlingi* en Sudamérica y *An. funestus* Giles en Africa, como dichas especies pican en el intradomicilio y reposan en las paredes antes y después de picar

y de paso aún no presentan resistencia al DDT, su control por el uso del DDT es posible. Por otro lado, algunos vectores como *An. nuneztovari* Gabaldon son exofilicos y generalmente pican en el exterior de las casas. Ningún tratamiento con insecticidas aplicado a las paredes es efectivo si el vector es exofilico y exofágico. Antes de que las autoridades responsables del control de paludismo consideren el uso de un tratamiento residual en las paredes de las casas (con DDT, piretroides o algún otro), se necesita realizar estudios sobre los hábitos del vector responsable de la transmisión (Rozendaal, et al., 1989).

El DDT tiene un efecto de éxito-repelencia sobre algunas especies de *Anopheles*, característica que se cree es una de las razones que lo hace efectivo en romper el ciclo de transmisión de la malaria, si la transmisión se realiza en el intra-domicilio. Esto fue observado en los inicios del uso del DDT por Metcalf et al. (1945) en *An. quadrimaculatus* Say. Recientemente, Loyola et al. (1990) y Arredondo-Jiménez et al. (1993a), encontraron que el DDT es efectivo para controlar el paludismo, a pesar de que ha sido aplicado en zonas en donde aparentemente los anofelinos son muy resistentes a dicho insecticida.

Los compromisos contraídos por los acuerdos paralelos al tratado de libre comercio para Noretamérica, específicamente el acuerdo para la cooperación ambiental, enlistó entre sus sustancias peligrosas al DDT, por lo que el gobierno de México se comprometió a discontinuar su uso en programas de salud pública para el 2006. No obstante, a partir de 2000, no se usa más dicho insecticida en México.

**Modo de Acción de los Insecticidas.**

Una vasta mayoría de los insecticidas químicos ejercen acción neurotóxica al actuar sobre uno o varios sitios del sistema nervioso de los insectos, dañando la función normal de las neuronas. La magnitud de tales daños en el insecto u otro sistema biológico depende de la dosis de insecticida a la que es expuesto. El sistema nervioso es una de las porciones más susceptibles y vulnerable del cuerpo de los organismos superiores. Los insectos poseen un sistema nervioso central bien desarrollado, parecido en organización con el de los mamíferos. Afortunadamente se han inventado compuestos que pueden actuar selectivamente sobre los insectos sin dañar a los animales benéficos, ni al hombre. Los insectos poseen ciertos aspectos de su sistema nervioso que los hacen diferentes a los mamíferos, por ejemplo los insectos no presentan una cubierta protectora en las terminaciones nerviosas, lo que los hace sitios vulnerables a la acción de químicos, mientras que los mamíferos presentan relativamente muy pocos sitios vulnerables. Las diferencias son de gran interés no sólo desde el punto de vista económico y de control sino bioquímico (Matsunura, 1985).

Los insecticidas organoclorados y los piretroides sintéticos son venenos axónicos, mientras que los organofosforados y los carbamatos son venenos sinápticos. El DDT afecta la permeabilidad de los iones  $K^+$  reduciendo el transporte de  $K^+$  a través de la membrana. El DDT altera los canales poro a través del cual pasan los iones de  $Na^+$ , estos canales se activan normalmente (se abren) pero una vez abiertos son inactivados (cerrados) lentamente, por eso interfieren con el transporte activo de  $Na^+$  fuera del axón nervioso durante la repolarización. El DDT inhibe a la adenosin trifosfatasa (ATPasa), particularmente al  $Na^+$ ,  $K^+$  -ATPasa y  $Ca^{2+}$  -ATPasa que juega un papel vital en la repolarización neuronal. El DDT también inhibe a la calmodulina, un mediador de calcio

Las rutas primarias de resistencia a insecticidas en todos los insectos son la alteración en el sitio de acción del insecticida o cambios en la tasa en la cual el insecticida es detoxificado (metabolismo incrementado), y penetración reducida (OMS, 1986; Pant, 1988; Hemingway et al., 1998).

### **Alteración en el sitio de acción**

También conocida como resistencia al sitio de acción, es cuando el insecticida no se une al sitio de acción. Se conocen al menos tres sitios los cuales desarrollan alteraciones, que resultan en resistencia a insecticidas: acetilcolinesterasa insensible (AChE), proteínas de canales de Na<sup>+</sup> alteradas y receptores GABA.

### **Acetilcolinesterasa insensible (AChE)**

La acetilcolinesterasa está bien establecida como un blanco primario para insecticidas, comenzando con los primeros organofosforados en los años 40s hasta los carbamatos. En Turquía, *An. sacharovi*, después de 30 años de exposición a diversos insecticidas como DDT, dieldrin, malatión, y pirimifos-metil, para el control de malaria, desarrolló resistencia basada en acetilcolinesterasa alterada, la cual confirió resistencia cruzada contra organofosforados y piretroides (Hemingway et al., 1992).

### **Proteína del canal de Na<sup>+</sup> alterada**

Los canales iónicos son los sitios primarios de acción de algunas clases de compuestos insecticidas naturales y sintéticos. El canal de sodio sensitivo al voltaje es el mayor sitio de acción del DDT y piretroides (Bloomquist, 1996). En *An. gambiae* se demostró la existencia de un importante mecanismo de resistencia a piretroides debido a la

modificación en la puerta de voltaje en la proteína de los canales sodio, recientemente asociada con mutaciones del tipo *para* en el gene del canal de sodio (Martínez- Torres et al., 1998), y en *Drosophila melanogaster* se asoció el gene *para* con la resistencia al DDT y piretroides (Pittendrigh et al., 1997). Como el DDT y los piretroides actúan sobre estos sitios, se puede desarrollar la resistencia cruzada (Williamson et al., 1996).

#### **Insensibilidad nerviosa, resistencia al derribo “kdr”.**

El canal de sodio sensible al voltaje es generalmente registrado como el sitio primario del DDT e insecticidas piretroides, y ha sido implicado ampliamente en los mecanismos reportados de insensibilidad nerviosa hacia estos compuestos. Este fenómeno ha sido expresado como resistencia al derribo (kdr) y ha sido mejor caracterizado en la mosca doméstica donde algunos alelos putativos, incluyendo el factor más potente super-kdr, han sido identificados (Williamson, et al., 1993).

#### **Alteración en los receptores GABA**

El complejo receptor ácido  $\gamma$  - amino butírico (GABA) es esencial para la toma de iones cloro por las neuronas. Los canales cloro han sido propuestos como el sitio blanco primario para insecticidas ciclodienos y aunque el uso de esta clase de insecticidas está en decadencia, este receptor permanece como un blanco importante para los nuevos insecticidas. La resistencia a ciclodienos se ha desarrollado en alrededor de 300 especies y en todos los casos estudiados detalladamente parece ser debido a un mecanismo genético individual confiriendo insensibilidad nerviosa. El bloqueo de GABA resulta únicamente en

un bloqueo parcial de la repolarización de la neurona y un estado de excitación incontrolable (Ecobichon, 1996).

### **Metabolismo incrementado**

Se le conoce también como mecanismos detoxificantes, son enzimas responsables de la detoxificación de xenobióticos en organismos vivos (Brogdon y McAllister, 1998). Estas enzimas son transcritas por miembros de largas familias multigénicas de esterasas, glutatión S- transferasa (GST) y oxidasas dependientes del Citocromo P450 y están involucradas en la detoxificación de los cuatro mayores grupos de insecticidas. Estas enzimas actúan metabolizando rápidamente el insecticida a productos no-tóxicos, o por un rápido enlace y ligera acción del insecticida (secuestración) (Hemingway et al., 1998).

### **Esterasas**

Por lo general las esterasas confieren resistencia a los organofosforados y carbamatos, aunque también actúan como mecanismo secundario hacia los piretroides. En Venezuela, se reportó un incremento en la resistencia debido a esterasas no específicas y enzimas oxidasas, en *Ae. aegypti* hacia los insecticidas: temefos, malatión y pirimifos-metil (Mazzarri y Georghiou, 1995). Los mecanismos de evolución, en respuesta a los fuertes cambios en el ambiente son mediados por la sobreproducción de esterasas, las cuales se han involucrado en resistencia a organofosforados en el mosquito *Culex pipiens*. A nivel del gene, se involucran dos mecanismos genéticos, que son: la amplificación del gene y la regulación del mismo (Raymond et al., 1998). El mayor mecanismo de resistencia a organofosforados en mosquitos del género *Culex* fue debido al incremento de una o más

esterasas. El mecanismo general de este tipo de resistencia es la amplificación de genes estructurales (Hemingway y Karunaratne, 1998).

### **Glutación S-transferasa**

Es la alta actividad de la enzima DDT deshidroclorinasa (glutación-S-transferasa, GST) la responsable de la conversión del DDT a DDE, el cual mucho menos tóxico (Brogdon y Barber, 1990; Prapanthadara et al., 1995).

### **Oxidasas dependientes del Citocromo P450**

Las monooxigenasas han sido descritas principalmente como responsables de la resistencia hacia los insecticidas piretroides. En *Cx. quinquefasciatus* Say del Oeste de África se encontró que la resistencia a la permetrina fue parcialmente debida a las monooxigenasas (Chandre et al., 1998). En *Boophilus microplus* colectadas en México se encontró que la resistencia a piretroides por una parte fue debido a una mutación tipo Kdr y por otro lado se involucraron esterasas y sistema de enzimas citocromo P450 (Miller et al., 1999). En otro estudio se observó en *Cx. quinquefasciatus* de Colombia una elevada resistencia hacia organofosforados y a los piretroides; deltametrina y permetrina, en este caso se involucró a las oxidasas de función múltiple como responsables de la resistencia a organofosforados y piretroides y a esterasas inespecíficas como las responsables de resistencia a organofosforados (Bisset et al., 1998).

### **PENETRACIÓN REDUCIDA**

La penetración reducida del insecticida ha sido mencionada como mecanismo de resistencia, ya que el grado de adsorción es un determinante importante en la toxicidad del

tal modo que se requiere la confirmación ya sea repitiendo el ensayo o sometiendo a los descendientes de los sobrevivientes. Otra ventaja de las pruebas bioquímicas es que los resultados se obtienen en unos minutos, además los ejemplares de insectos se pueden conservar en estado de congelación y procesarse juntos más tarde o en algún laboratorio alejado del lugar donde se obtuvieron.

Las principales limitaciones de los ensayos bioquímicos son:

-No se puede en la actualidad efectuar ensayos para todos los mecanismos de resistencia.

-El costo de los ensayos que implican la cuantificación de la resistencia es relativamente alto.

-Los procedimientos que implican cuantificación sólo pueden ser realizados por personal que posea ciertos conocimientos técnicos (WHO, 1992).

## **HIPOTESIS**

Los adultos de *Anopheles albimanus* presentan variabilidad geográfica en la susceptibilidad a insecticidas, debido al uso del suelo diferente y la aplicación de insecticidas en la agricultura. Existe libre flujo de genes, lo que posibilita la dispersión de individuos con genes de resistencia desde áreas con alta aplicación de insecticidas hacia áreas con poca o nula aplicación.

## **OBJETIVOS**

Identificación de fenotipos de *Anopheles albimanus* basados en la susceptibilidad diferencial a insecticidas: DDT, deltametrina y ciflutrina, en diversas situaciones de uso del suelo o agroecosistemas principales del sur de Chiapas: banano, cultivos mixtos, reserva ecológica, caña de azúcar y ganado.

Determinar mediante pruebas bioquímicas los niveles de enzimas acetilcolinesterasa insensible, glutatión S-transferasa (GST), para-nitrofenilacetato (pNPA),  $\alpha$  esterasas,  $\beta$  esterasas y monooxygenasas dependientes del Citocromo P450, en *An. albimanus* colectados en diferente entre agroecosistemas del sur de Chiapas.

Determinar si se dan discontinuidades entre las poblaciones de *An. albimanus*, sobre la base de diferencias entre las proporciones de distintos fenotipos de susceptibilidad en *An. albimanus* de las áreas de muestreo en Chiapas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Se seleccionaron 20 localidades del sur de Chiapas, separadas de 4 ó 20 Km entre sí, ubicadas desde la línea de costa hasta 25 Km tierra adentro a una altitud aproximada de 0-150 msnm. El área de estudio comprendió desde la frontera de México-Guatemala hasta 200 Km al noroeste, la cual comprendió cinco zonas agroecológicas o agroecosistemas con diferente patrón de uso de suelo y de aplicación de insecticidas: (1) región bananera, (2) región de cultivos mixtos (soya, maíz, ajonjolí, mango, palma de coco, entre otros), (3) reserva ecológica "La Encrucijada", (4) región azucarera y (5) ganadera (Fig 1.1).

### Captura de mosquitos

Las capturas de *An. albimanus* adultos, se realizaron mediante colectas de 1800 a 2400 horas en cebo humano intra y peri-domicilio, corral de ganado y trampa animal (World Health Organization, 1975), de enero a diciembre de 1997. Las hembras de campo se trasladaron al laboratorio donde se les proporcionó una alimentación sanguínea con conejo, para obtener la F1. Se utilizaron mosquitos de un día de edad para los experimentos de susceptibilidad, otra fracción fue inmediatamente preservada a  $-70^{\circ}\text{C}$  para realizar posteriormente las pruebas bioquímicas. Los mosquitos F1 fueron criados con técnicas estándar en el insectario (Ramsey et al., 1988, Gerberg et al., 1994).

### Pruebas de susceptibilidad a insecticidas:

Se realizaron pruebas de susceptibilidad, utilizando papeletas impregnadas con DDT al 4 %, ciflutrina al 0.05% y deltametrina al 0.025 % (WHO, 1992), insecticidas que en estudios previos, presentaron susceptibilidad variable de acuerdo al área agro-ecológica donde fueron colectados (Fuentes, 1992; Malo-García, 2000). Las papeletas se impregnaron siguiendo las especificaciones estándar de la Organización Mundial de la

Salud (World Health Organization, 1992), utilizando las dosis establecidas. El papel filtro Whatman # 1 de 12 x 15 cm. se impregnó con una solución preparada con aceite de oliva como solvente y alcohol n-butílico como co-solvente, en relación de 0.7 ml a 1.5 ml por papeleta respectivamente. Con la finalidad de obtener una completa distribución del ingrediente activo sobre la superficie del papel, éste se colocó sobre las cabezas de una serie de alfileres entomológicos, con el propósito de evitar la absorción de la solución en otra superficie. Se aplicó en el papel 2.2 ml de la solución de insecticida de las dosis recomendadas, con una jeringa volumétrica de 2 ml y aguja número 20; el cálculo se realizó para 10 papeletas. La técnica de exposición de los insecticidas, se realizó usando el equipo estándar para prueba de susceptibilidad (World Health Organization, 1975). El método consistió de dos tubos cilíndricos interconectados por medio de una base con roscas de ambos lados, el cual presenta una placa deslizante que conectó a cada uno de ellos por esta base, en sus extremos de cada tubo hay una tapadera de rosca con mallero. Cada equipo de tubos presentó un punto verde y rojo respectivamente. El tubo verde de observación llevó sostenido en su pared, papel bond de 12 x 15 cm. por medio de un aro de cobre, dentro del cual primeramente se metieron las hembras por un orificio circular pequeño localizado en la placa deslizante. El tubo de punto rojo fue de exposición, el cual llevó el papel impregnado de insecticida, sostenido por medio de un aro de cobre. Una vez que las hembras se introdujeron al tubo de observación, se conectó el tubo de exposición y se trasladaron a este tubo por la interconexión del agujero circular grande, también localizado en la placa deslizante, obstruyéndose la interconexión una vez que los mosquitos se colocaran en el tubo de exposición. El tiempo estándar de exposición fue de 1 hr. para los tres insecticidas. Los mosquitos vivos, caídos y aparentemente muertos durante la exposición, fueron transferidos al tubo de observación, donde se les proporcionaron

condiciones para la recuperación, adicionándose sobre la malla externa torundas de algodón saturado de una solución 10% de sacarosa, y se mantuvo en vigilancia durante 24 horas, tiempo después del cual se dio lectura final a la mortalidad observada en cada uno de los bioensayos. Para cada uno de los bioensayos realizados se estableció un grupo control, el cual consistió en someterlo a la misma técnica de exposición, excepto que el papel impregnado no contuvo ingrediente activo. Esto permitió realizar correcciones por la fórmula de Abbott en las tasas de mortalidad observadas en cada una de las dosis recomendadas, por efectos ajenos al tóxico (Abbott, 1925).

Formula de Abbott:

$$\frac{\text{Mortalidad \% en los expuestos} - \text{Mortalidad \% en los controles}}{100 - \text{Mortalidad \% en los controles}} \times 100$$

Pruebas bioquímicas para la determinación de resistencia a insecticidas:

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: acetilcolinesterasa insensible (Ache), esterasas  $\alpha$  y  $\beta$ , pNPA (para nitrofenil acetato), Glutación S-transferasa (GST), y monooxigenasas (dependientes del citocromo P450). Los procedimientos fueron tomados de Penilla et al (1998).

Mosquitos individuales fueron macerados en 200  $\mu$ l de agua destilada en placas de fondo plano. Todas las homogenizaciones se realizaron sobre hielo. Para la prueba de AChE, dos repeticiones de 25  $\mu$ l del homogenizado crudo, fueron transferidas a placas de microtitulación limpias. El homogenizado remanente fue transferido a tubos eppendorf de 0.5  $\mu$ l y centrifugados a una máxima velocidad de 14,000 rpm por 2 min. en una micro centrifuga eppendorf 5415. Replicas de 20  $\mu$ l del sobrenadante de cada una de las muestras fueron transferidas a placas de microtitulación limpias para las pruebas de  $\alpha$  y  $\beta$  naftil

acetato y monooxygenasas. Este procedimiento se repitió posteriormente tres veces para diferentes placas con alícuotas de 10 µl del homogenizado para la GST, pNPA y ensayo de proteínas.

#### Acetilcolinesterasa insensible (AChE):

La AChE en el homogenizado fue solubilizada por adición de 145 µl de buffer de fosfatos Triton (1% Triton X-100 en 0.1 M de buffer de fosfatos pH 7.8) para cada alícuota replica. 10 µl de solución de DTNB (0.01 M ácido ditiobis 2-nitrobenzoico en 0.1 M buffer de fosfatos pH 7.0) y 25 µl del sustrato ASCHI (0.01 M acetiltiocolina iodada) fue adicionada a una de las replica para iniciar la reacción. La última solución fue sustituida por 25 µl del sustrato ASCHI conteniendo 0.2% del inhibidor propoxur (0.1 M) para la segunda replica de prueba. Los pozos control contenían 25 µl de agua destilada, 145 µl de buffer Tritón, 10 µl de solución DTNB y 25 µl de solución ASCHI sin y con propoxur respectivamente. La cinética de la reacción enzimática fue monitoreada continuamente a 405 nm por 5 mins en un lector de placas. El porcentaje de inhibición enzimático por el propoxur a la actividad de acetilcolinesterasa en la prueba se calculó al comparar la lectura de pozos inhibidos entre la lectura de los pozos no inhibidos.

#### Ensayo de Esterasas

Ensayo naftil acetato. 200 µl de solución de trabajo  $\alpha$ -naftil acetato (Stock: 10 ml de  $\alpha$ -NA 30 mM en acetona, se prepara la solución de trabajo tomando 100 µl del stock, y aforando a 10 ml con buffer de fosfatos 0.02M pH 7.2) y 200 µl de solución  $\beta$ -NA (preparada como para  $\alpha$ -NA) fue adicionado a cada una de las placas del homogenizado

(para  $\alpha$ -NA y para  $\beta$ -NA). La reacción enzimática se corrió por 30 min a temperatura ambiente, antes de la adición de 50  $\mu$ l de la solución de tinción azul rápido (22.5 mg de azul rápido en 2.25 ml de agua destilada, luego 5.25 ml de 5% lauril sulfato de sodio diluido en 0.1 M de buffer de fosfatos PH 7.0) fue adicionado a cada pozo para detener la reacción. Dos controles por placa contenían 20  $\mu$ l de agua destilada, 200  $\mu$ l de solución  $\alpha$ -NA o  $\beta$ -NA y 50  $\mu$ l de tinción. La actividad enzimática fue leída a 570 nm como un punto final. Los niveles de absorbancia para mosquitos individuales fueron comparados con curvas estándares de absorbancia para concentraciones conocidas de  $\alpha$ -naftol y  $\beta$ -naftol, respectivamente con un rango de 1.35 a 21.6  $\mu$ moles. Los resultados fueron reportados como  $\mu$ moles del producto formado /min/mg de proteína.

#### Ensayo de esterasas *p*- Nitrofenil acetato (*p*NPA)

200  $\mu$ l de solución de trabajo *p*NPA (100mM *p*NPA en acetonitrilo: 50mM de buffer de fosfato de sodio pH 7.4, 1:100) fue adicionado a cada repetición. Dos controles fueron preparados para cada placa con 10  $\mu$ l de agua destilada y 200  $\mu$ l de solución de trabajo *p*NPA. La tasa enzimática fue medida a 405 nm por 2 min. La actividad de *p*NPA por individuo fue reportada como  $\mu$ moles de producto/min/mg de proteína.

#### Ensayo de Glutación S-transferasa

200  $\mu$ l de solución de trabajo de GSH/CDNB (10mM de glutatión reducido preparado en 0.1 M de buffer de fosfatos pH 6.5 y 63 mM de clorodinitrobenzeno diluido en metanol) fue adicionado a dos replicas. Dos controles fueron preparados para cada placa con 10  $\mu$ l de agua destilada y 200  $\mu$ l solución de trabajo GSH/CDNB. La tasa enzimática fue medida a 340 nm por 5 min. La actividad de GST por individuo fue reportada como

mmol de CDNB conjugado/min/mg proteína, utilizando coeficientes de extinción corregidos por la vía de la longitud de luz a través la solución en el pozo de la microplaca en la cual la absorbancia obtenida de la cinética se dividió por el coeficiente de extinción de la enzima GST, la cual es constante en las condiciones de nuestro ensayo (Prapandhara et al., 1993). Los niveles de actividad de GST fueron ligados a la habilidad de metabolizar el DDT como se reportó anteriormente (Hemingway et al., 1997).

#### Ensayo de Monooxigenasas

La cantidad total de citocromo P450 en cada mosquito fue determinada utilizando el ensayo Hem-peroxidasa. Ocho  $\mu$ l de 0.625 M de buffer de fosfato de potasio pH 7.2 fue adicionado a las alícuotas de los homogenizados y 200  $\mu$ l de la solución 3,3', 5,5' - tetrametil benzidine diluida en metanol absoluto (0.01 g en 5 ml respectivamente) y luego mezclados con 15 ml de 0.25 M buffer acetato de sodio pH 5.0 (TMBZ). 25  $\mu$ l de 3% peróxido de hidrógeno fue adicionado y la mezcla mantenida por dos horas a temperatura ambiente. Las muestras y dos controles por placa, fueron preparados con 20  $\mu$ l de agua destilada, 200  $\mu$ l de la solución TMBZ y 25  $\mu$ l de 3% de  $H_2O_2$ . La absorbancia fue leída a 650 nm y los valores se compararon con una curva estándar de absorbancia para concentraciones conocidas de citocromo C con un rango de 0.65 a 2.6  $\mu$ moles. Los valores fueron reportados como unidades equivalentes de citocromo P450 /mg de proteína, corregido para el contenido Hem conocido del citocromo C y P450 (Brogdon et al., 1997).

#### Ensayo de Proteínas

300  $\mu$ l de la solución del reactivo para proteína BIO Rad, preparada con una dilución 1:4 en agua destilada, fue adicionada a 10  $\mu$ l del homogenizado crudo. Dos

controles fueron preparados para cada placa con 10  $\mu$ l de agua destilada y 300  $\mu$ l de la solución BIO Rad. La reacción fue leída a 570 nm después de 5 mins a temperatura ambiente. Los valores de proteína en mg/ml fueron calculados para mosquitos individuales a partir de una curva estándar de absorbancia de concentración conocida (rango de 1 a 5  $\mu$ g/ $\mu$ l) de suero albúmina de bovino.

**Análisis estadísticos:** Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para comparar los porcentajes de mortalidad a los diferentes insecticidas entre agroecosistemas, tipo de captura y sexo. También se utilizó esta misma prueba para determinar diferencias en los títulos enzimáticos responsables de la resistencia entre agroecosistemas y tipos de captura y por sexo. Para el análisis del porcentaje de mortalidad los datos se transformaron a proporciones y posteriormente a arco seno, se realizaron comparaciones múltiples de medias con la prueba de diferencia mínima significativa (PLSD) de Fisher (Zar, 1984).

## RESULTADOS

### Pruebas de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad a los insecticidas DDT, deltametrina y ciflutrina mostraron variabilidad geográfica en *An. albimanus* procedente de las cinco áreas agroecológicas. Los mosquitos presentaron, elevada resistencia al DDT en toda la zona de estudio, con mortalidad promedio entre 21 y 50 %. El área en la cual los mosquitos presentaron mayor susceptibilidad fue la de cultivos mixtos (50%) y la de mayor resistencia el área de banano (21%). La mortalidad promedio de los mosquitos al insecticida deltametrina fue variable, presentando menor mortalidad en la zona de banano (75 %), mientras que en las otras zonas la mortalidad fue mayor de 85 %, la mayor susceptibilidad presentada por los mosquitos fue en el área de ganado (92%). Los mosquitos expuestos al insecticida ciflutrina presentaron un patrón de mortalidad similar a la deltametrina con menor mortalidad en la zona de banano (50 %) y mayor mortalidad en la de ganado (84%) (Cuadro 1.2). Se analizó la susceptibilidad por tipos de captura y por insecticida, independientemente del agroecosistema (Cuadro 1.3). Para el DDT se encontró que los mosquitos capturados en trampa animal y alrededor de corral presentaron significativamente menor mortalidad ( $P < 0.05$ ) que los capturados en cebo humano intradomicilio y peridomicilio. Con los insecticidas deltametrina y ciflutrina no se encontraron diferencias significativas por tipo de captura, aunque los mosquitos fueron más susceptibles a la deltametrina, con mortalidad entre 81.4 a 87.5 % que a la ciflutrina, con mortalidad entre 64.7 a 67.4 % (Cuadro 1.3). Al separar por sexo se encontró que tanto las hembras como los machos presentaron significativamente mayor resistencia a deltametrina y ciflutrina ( $P < 0.05$ ) en el área de banano en comparación con las otras áreas (Cuadro 1.4). En el área de banano se presentó una mortalidad de 79.6 y 70.3% para machos y hembras

respectivamente con la deltametrina y 52.2 y 48.3% machos y hembras, respectivamente para la ciflutrina. Para el DDT, los machos presentaron una alta resistencia con mortalidad entre 23.4 y 32.7% a excepción del área de cultivos mixtos que presentó significativamente mayor susceptibilidad, con mortalidad de 54.3%. Las hembras presentaron también alta resistencia, siendo el área de banano y ganado las que significativamente mostraron mayor resistencia con 18.3 y 16.4%, respectivamente (Cuadro 1.4).

### Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas mostraron variabilidad en los títulos enzimáticos entre los mosquitos de los cuatro agroecosistemas analizados. Los niveles de los títulos enzimáticos mostraron variabilidad geográfica en los títulos, presentando mayor actividad en el área de banano con respecto a las otras áreas (Cuadro 1.5). En todas las pruebas realizadas, el área de banano presentó significativamente mayores títulos con la única excepción de las esterasas  $\alpha$  que no presentaron diferencias significativas entre banano (0.000929) y la zona de la reserva ecológica (0.000763). El porcentaje de inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) fue mayor en el área de banano (96.3%), indicando que esta población es significativamente ( $P < 0.05$ ) más susceptible que las de otras áreas. El agroecosistema con significativamente ( $P < 0.05$ ) menor AChE, fue la zona de reserva ecológica con 82.8% de inhibición (Cuadro 1.5).

Al comparar los niveles de enzimas responsables de la resistencia a insecticidas se encontró variabilidad al comparar los títulos enzimáticos entre los diferentes agroecosistemas por tipo de captura. La prueba de AChE presentó diferencias

## DISCUSION

Debido a que la población de *An. albimanus* prospera en claros de bosque expuestos a la luz del sol, en regiones de baja altitud y sin pendientes, siempre su desarrollo es más abundante asociado a regiones donde el suelo es usado con fines agrícolas y en la ganadería (Frederickson 1993, Arredondo-Jiménez 1995). La diversidad histórica de los cultivos agrícolas en la región del Soconusco, Chiapas, ha ocasionado el uso de los más variados plaguicidas químicos para el control de las plagas. Especies no blanco expuestas, tales como *An. albimanus* han resultado multi-resistentes a varios grupos toxicológicos de insecticidas conocidos (WHO, 1992). La elevada resistencia al DDT observada en las cinco áreas estudiadas, confirma evaluaciones previas del sur de Chiapas, realizadas en 1981-1983 (CIP datos no publicados) y durante 1988-1989 (Fuentes, 1992). Fuentes (1992), reportó susceptibilidad diferencial al DDT (40-60% de mortalidad) dependiente del área agroecológica, demostrando de mayor a menor resistencia de la zona bananera a la mixta y a la ganadera. Dichas observaciones fueron confirmadas por los resultados obtenidos aquí. Aunque en este estudio se presentó mayor resistencia (21 – 50 % de mortalidad). Seguramente, el desarrollo de la resistencia de *An. albimanus* al DDT, se debe principalmente a los residuos de este producto vertidos al ambiente desde fines de la década de los 40, con extensos cultivos de algodón, hasta la década de los 70 (cuando se prohibió el uso agrícola del DDT) (Ramsey, 1970). El área algodonera, ahora extinta, se convirtió a partir de los años 80, principalmente en zona bananera. Esta es la causa por la que los mosquitos de la zona bananera son menos susceptibles al DDT que los mosquitos del área mixta o ganadera. Probablemente el gen (es) de resistencia se desarrollaron en el área de banano y posteriormente se diseminaron a otras áreas con diferente uso del suelo y aplicación de insecticidas, hasta llegar a áreas donde este insecticida no se ha aplicado, o al

menos en cantidades muy bajas, como es en áreas de reserva ecológica “La Encrucijada”. El flujo de genes ha permitido el movimiento de individuos, con genes favorables (resistencia al insecticidas DDT) de un área a otra, esto se ha ocurrido en los últimos 50 años. Respecto a la resistencia a la deltametrina de *An. albimanus* encontrada en estudios anteriores realizados en el CIP, se encontró una susceptibilidad del 81.3 % de mortalidad en el área de banano, mientras que en la de cultivos mixtos y ganado fue de 82.5 % y 86.2 %, respectivamente (Fuentes, 1992). En este trabajo se encontró que el nivel de resistencia se incrementó en un 7.7 %, en el área de banano. Es importante mencionar que en el área de estudio no se ha utilizado este insecticida para el control de paludismo, sin embargo sí se ha utilizado desde los 70's y se sigue utilizando para el control de plagas agrícolas, especialmente en plagas del cultivo de maíz. Por lo que se deduce que las aplicaciones de insecticidas en la agricultura tienen un efecto directo en organismos no blanco y que ejercen una fuerte presión de selección, ocasionando que los organismos, en este caso los mosquitos Anofelinos, desarrollen uno o varios mecanismos de resistencia para poder sobrevivir al medio ambiente adverso. El insecticida ciflutrina presentó un patrón de resistencia similar a la deltametrina, aunque se presentó mayor resistencia con mortalidad de 50% en el área de banano y fue disminuyendo la resistencia hasta que llegar al área de banano (84%). Los anofelinos han desarrollado resistencia hacia estos insecticidas piretroides de reciente aplicación. El flujo de genes de resistencia a los piretroides se empieza a propagar, ya que encontramos una resistencia moderada en el área de cultivos mixtos, caña de azúcar y susceptibles en el área de ganado. Debido a que las diferencias más marcadas en los niveles de susceptibilidad de acuerdo al área agroecológica, fueron observadas con la deltametrina y ciflutrina, estos productos podrían utilizarse como

marcador fenotípico de área agroecológica, indicando una mayor resistencia en la región donde históricamente se ha utilizado más plaguicidas.

Mediante las pruebas bioquímicas de resistencia se observó un incremento significativo en los títulos enzimáticos en el área de banano comparado con las áreas restantes. Al comparar los niveles enzimáticos del área de banano con una colonia susceptible de Panamá (Penilla et al., 1998), se encontró que el glutatión S-transferasa presentó un incremento de 1.2 veces, mientras que los valores de las enzimas restantes fueron similares. Probablemente es la enzima glutatión S-transferasa (GST) la responsable de la resistencia a DDT (Pant, 1988). Está documentado que los organoclorados y piretroides comparten los mismos mecanismos bioquímicos como reducción de la sensibilidad del sistema nervioso gen "*Kdr*" (Devonshire et al., 1991; Casida, 1998) y como mecanismos secundarios, desoxificación por incremento en esterasas, y monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (Matsumura, 1991; Casida, 1998).

La notable estratificación geográfica en los niveles de susceptibilidad, indica que los procesos de selección de individuos resistentes por insecticidas ocurren a una velocidad mayor, que la migración de individuos entre poblaciones vecinas, probablemente en el tiempo de una generación de mosquitos.

Otro hecho notable es que la población de mosquitos procedente del área de banano, ha sido altamente seleccionada para el insecticida DDT y piretroides. Al analizar los títulos enzimáticos por tipo de captura, la de cebo humano intra, fue mayor significativamente en el área de banano, lo que podría indicar la presencia de una subpoblación con preferencias

en humanos que al entrar a las casas rociadas se seleccionen los resistentes, aunque los reportes indican la ausencia de subpoblaciones con preferencia por humanos (Arredondo-Jiménez et al., 1992).

Estudios previos demostraron que las poblaciones de *An albimanus* de las diferentes áreas de estudio, fueron susceptibles a los organofosforados y carbamatos, según datos de Fuentes (1992) y Malo-García (2000) quienes encontraron un promedio de mortalidad de 98.33 a 100 %, mediante pruebas de susceptibilidad, con los insecticidas clorfoxim, bendiocarb, propoxur, malation y fenitrotión, en las tres áreas agroecológicas analizadas (banano, cultivos mixtos y ganado). En nuestro estudio no se probaron estos grupos de insecticidas, porque no cumplía el objetivo de utilizarlo como marcador fenotípico, sin embargo si se realizaron las pruebas bioquímicas para determinar el mecanismo bioquímico responsable de la resistencia a estos dos grupos de insecticidas, que es la acetilcolinesterasa insensible (AChE), la cual mostró diferencias significativas entre las áreas, con mayor susceptibilidad en el área de banano, probablemente porque esta población ha sido seleccionada para los grupos organoclorados y piretroides.

Se ha comprobado que la aplicación inmoderada de insecticidas en la agricultura tiene un efecto en los vectores de paludismo, fenómeno que ha sido estudiado en muchos vectores a través del mundo (Georghiou et al., 1973; Chandree et al., 1998; Ocampo et al 2000). En este estudio también se encontró en mismo fenómeno de resistencia asociada a la aplicación de insecticidas en la agricultura.

La determinación de resistencia y el flujo de genes tiene implicaciones importantes en el manejo y aplicación de insecticidas para el control de *An. albimanus*, ya que se pueden rotar anualmente con insecticidas de diferentes grupos químicos o aplicaciones tipo mosaico, esperando que en varias generaciones las poblaciones se vuelvan susceptibles a los mecanismos bioquímicos presentes (Rodríguez, 2000).

Estos resultados también indican que las poblaciones se encuentran asociadas al uso del suelo y aplicación de insecticidas en la agricultura y el flujo de genes es el responsable de dispersar estos genes favorables de resistencia al insecticida DDT hacia todas las áreas de estudio, incluso en el área de reserva ecológica, pero este fenómeno se ha presentado durante los últimos 50 años desde que se aplicó por primera vez el DDT. Por otro lado, insecticidas piretroides de reciente aplicación, en los años 1970's, ya presentan resistencia, pero estas poblaciones resistentes se encuentran restringidas al área de banano, de tal forma que el flujo de genes no ha sido suficientemente alto para propagar dichos genes, aunado al aporte de insectos susceptibles procedente de las zonas contiguas principalmente de la zona de reserva ecológica "La encrucijada".

## CONCLUSIONES

Las pruebas de susceptibilidad a insecticidas presentaron variabilidad geográfica en la resistencia a insecticidas probados. Los mosquitos probados presentaron alta resistencia al DDT desde la zona de banano hasta la de ganado, sin embargo la mayor resistencia se presentó en el área de banano con 21 % y la zona de cultivos mixtos presentó la mayor susceptibilidad con 50 % de mortalidad.

El área agroecológica con mayor resistencia para los insecticidas deltametrina y ciflutrina fue la de banano, con porcentaje de 75 y 50 % de mortalidad y el área de ganado presentó la mayor susceptibilidad con 92 y 84 % respectivamente.

Las pruebas bioquímicas:  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas, *p*NPA, GST, y monooxygenasas mostraron un patrón de resistencia similar a las pruebas de susceptibilidad. Los mayores títulos de estas enzimas responsables de la resistencia a insecticidas se presentaron en el área de banano y la mayor susceptibilidad en el área de ganado.

Los resultados tanto de las pruebas de susceptibilidad como las bioquímicas demostraron que el flujo de genes es restringido, sobre la base de la alta variabilidad que existe entre agroecosistemas.

La resistencia a insecticidas se encontró asociada al uso del suelo y aplicación de insecticidas en la agricultura.

## REFERENCIAS CITADAS

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- Arredondo-Jiménez, J. I., D. N. Bown, M.H. Rodríguez, C. Villarreal, E.G. Loyola, C.E. Frederickson. 1992. Test for the existence of genetic determination or conditioning in host selection by *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 29: 894-897.
- Arredondo-Jiménez, J.I., M.H. Rodríguez, D.N. Bown, E.G. Loyola. 1993a. Indoor low-volume insecticide spray for the control of *Anopheles albimanus* in southern México. Village-scale trials of bendiocarb, deltamethrin and cyfluthrin. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 9: 210-220.
- Arredondo-Jiménez, J. I., Loyola E.G., Rodríguez M.H. Danis-Lozano R., Fuentes G., Villarreal C. 1993b. Efectividad de un insecticida carbamato en rociado intradomiciliar a bajo volumen para el control del paludismo. *Salud Pub. Mex.* 35: 27-38.
- Arredondo Jimenez, J. I. 1995. Comparative ecology of Allopatric populations Of *Anopheles (Anopheles) vestitipennis* (Diptera: Culicidae). Ph. dissertations, University of California, Davis.