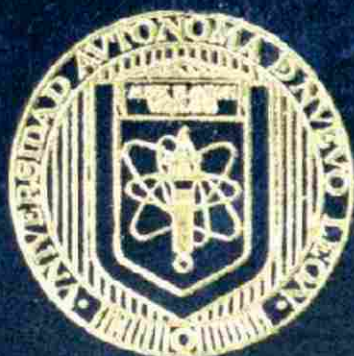


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SUBDIRECCION DE POSTGRADO**



**FLUJO DE GENES DE LA METAPOBLACION DE *ANOPHELES*  
*ALBINEANUS* (DIPTERA: CULICIDAE) A PEQUEÑA ESCALA  
EN EL AMBITO MICROGEOGRAFICO DE CHIAPAS  
Y A GRAN ESCALA EN EL AMBITO  
MACROGEOGRAFICO DE MEXICO.**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGIA MEDICA**

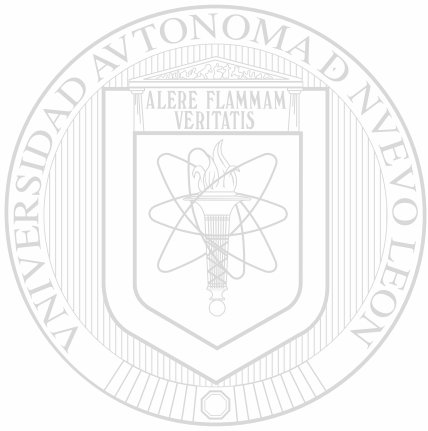
**PRESENTA**

**M. EN C. CUAUHTEMOC VILLARREAL TREVIÑO**

**SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.      DICIEMBRE DE 2001**

C.V.T.

FLUJO DE GENES DE ANOPHELES ALBIMANUS  
EN CHIAPAS Y MEXICO



UNIVERSIDAD AUT  
DIRECCIÓN GEN

ANL

DE NUEVO LEÓN  
BIBLIOTECAS

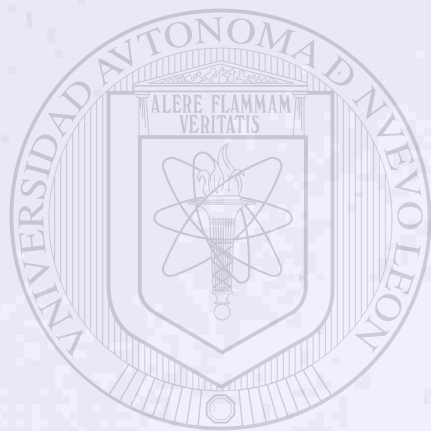
®

TD  
RA644  
.M2  
V5  
2001  
c.1





1080124454



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

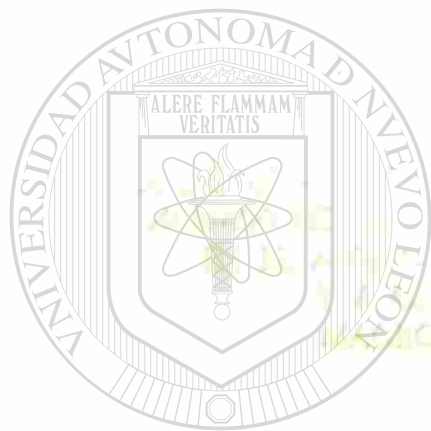
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES



TESIS  
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

DR. FN C. CUAUHEMOC VILLARREAL TREVIÑO

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

DICIEMBRE DE 2001





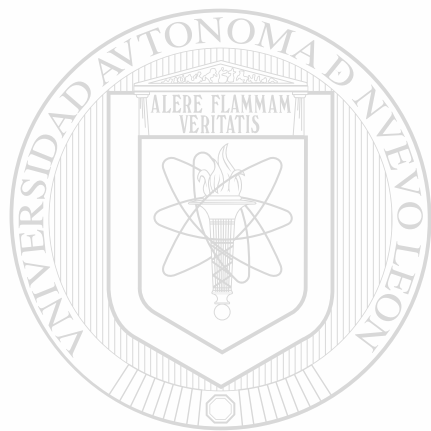
TD

RA644

•M2

VS

,



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**FLUJO DE GENES DE LA METAPOBLACIÓN DE *ANOPHELES ALBIMANUS* (DIPTERA: CULICIDAE) A PEQUEÑA ESCALA EN EL AMBITO MICROGEOGRÁFICO DE CHIAPAS Y A GRAN ESCALA EN EL AMBITO MACROGEOGRÁFICO DE MEXICO.**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA MÉDICA  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

**PRESENTA**

**M. EN C. CUAUHTÉMOC VILLARREAL TREVIÑO.**

San Nicolás de los Garza, Nuevo León

DICIEMBRE 2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



FLUJO DE GENES DE LA METAPOBLACIÓN DE *ANOPHELES ALBIMANUS* (DIPTERA: CULICIDAE) A PEQUEÑA ESCALA EN EL AMBITO MICROGEOGRÁFICO DE CHIAPAS Y A GRAN ESCALA EN EL AMBITO MACROGEOGRÁFICO DE MÉXICO.

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA MEDICA

PRESENTA

M. EN C. CUAUHTÉMOC VILLARREAL TREVIÑO.


EL COMISIÓN DE TESIS


  
DR. ILDEFONSO FERNÁNDEZ SALAS  
DIRECTOR DE TESIS

  
DR. MOHAMMED BADDI.  
SECRETARIO

  
DRA. ADRIANA FLORES SUÁREZ.  
VOCAL

  
DR. JUAN I. ARREDONDO JIMÉNEZ.  
DIRECTOR EXTERNO

  
DR. ROBERTO MERCADO HERNÁNDEZ.  
VOCAL

  
DRA. MARÍA LUISA RODRÍGUEZ TOVAR.  
VOCAL

  
DR. MARIO HENRY RODRÍGUEZ LÓPEZ.  
CODIRECTOR EXTERNO.

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, NUEVO LEÓN

DICIEMBRE 2001.



**“Cristo es el Hijo de Dios quién murió por la redención de los pecadores y resucitó después de tres días. Esta es la verdad mas grande en el universo. Muero por causa de mi creer en Cristo”**

**—Watchman Nee**



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AGRADECIMIENTOS

**AL Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo dentro del proyecto 3318 P-M.**



# UANL

---

**Por el apoyo con una beca para la realización de estudio doctoral otorgada al suscrito.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **AGRADECIMIENTOS A:**

**Dr. Mario H. Rodríguez L. Por ser mi guía en la ciencia, con respeto y agradecimiento.**

**Dr. Juan I. Arredondo-Jiménez. Por la confianza y apoyo durante la realización de este trabajo**

**Dr. Ildelfonso Fernández Salas, Por su ayuda y colaboración durante mis estudios.**

**Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, Por su colaboración y orientación en la realización de las pruebas moleculares.**

**Dr. Américo D. Rodríguez Ramírez y Dra. Patricia Penilla N. Por la colaboración prestada en la realización de las pruebas bioquímicas del presente trabajo.**

**Dra. Lilia González Cerón. Por los trabajos en conjunto que hemos realizado y por su amistad.**

**C. Secretaria Jana Celina Ríos Delgado. Por su apoyo y amistad.**

**Ing. Salvador Partida Pérez. Por administrar los recursos financieros y por su amistad.**

**Dr. Armando Ulloa García. Por el apoyo proporcionado en las labores de campo y laboratorio, y por ser mi cuñado.**

**Dr. Humberto Cuauhtémoc Lanz Mendoza. Por los estudios colaborativos y por ser mi tocayo.**

**Al personal del Insectario del CIP. M en C. Arnoldo Orozco Bonilla, QFB. José A. Nettel,**

**A los técnicos: Abel Alfaro, Martín Vázquez, Daniel A. Ramírez y Luis Orduña y Fernando Cano.**



## DEDICATORIA

**A mis padres:**

**Dr. Juan Emilio Villarreal Stille y Mtra. Margarita Treviño de Villarreal**

**Con profundo agradecimiento por orientarme en la vida y por servirme de ejemplo,  
con cariño.**

**A mi Esposa**

**QFB. Iliana Rosalía Malo García**

**Por ser la pareja ideal. Con mucho amor**

**A mis Hijos: Israel Cuauhtémoc, Abraham David e Isaac Leví. Con mucho amor**

**A mis Hermanos:**

**Hernán, Leonardo, Margil, Margarita y Juan Emilio. Con aprecio.**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

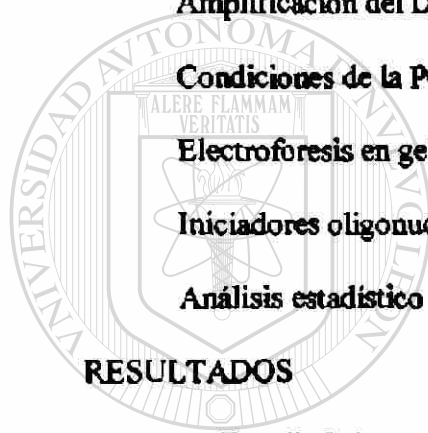
<b>INDICE GENERAL</b>	<b>PAGINA</b>
Indice de Cuadros	
Indice de Figuras	
<b>RESUMEN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>4</b>
La malaria en el mundo.	9
La malaria en México.	13
Una fase sexual y tres asexuales en <i>Plasmodium</i> .	15
Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> en el mosquito.	18
Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> en el humano.	19
Signos y síntomas de la enfermedad.	20
Clase Insecta	21
Orden Díptera	21
Familia Culicidae	22
Biología del vector: <i>Anopheles</i> sp.	23
<i>Anopheles albimanus</i>	32
El Concepto de metapoblación	34
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>37</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCIAS CITADA</b>	<b>38</b>
<b>CAPITULO 1</b>	<b>49</b>
<b>FLUJO DE GENES DE <i>ANOPHELES ALBIMANUS</i> EN CHIAPAS UTILIZANDO COMO MARCADOR FENOTÍPICO LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS.</b>	<b>50</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>51</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>52</b>
<b>IMPORTANCIA DEL ESTUDIO</b>	<b>54</b>

<b>ANTECEDENTES</b>	<b>57</b>
<b>Clasificación de los insecticidas por uso en salud pública y ejemplos.</b>	<b>58</b>
<b>Organoclorados</b>	<b>58</b>
<b>Organofosforados</b>	<b>59</b>
<b>Carbamatos</b>	<b>60</b>
<b>Piretroides</b>	<b>61</b>
<b>Uso intradomiciliar del DDT para el control del paludismo.</b>	<b>62</b>
<b>Modo de acción de los insecticidas.</b>	<b>63</b>
<b>Mecanismos de resistencia a insecticidas</b>	<b>65</b>
<b>Alteración del sitio de acción</b>	<b>66</b>
<b>Acetilcolinesterasa insensible (AChE)</b>	<b>66</b>
<b>Proteína del canal Na<sup>+</sup> alterada.</b>	<b>66</b>
<b>Insensibilidad nerviosa, resistencia al derribo "Kdr".</b>	<b>67</b>
<b>Alteración en los receptores GABA.</b>	<b>67</b>
<b>Metabolismo incrementado</b>	<b>68</b>
<b>Esterasas</b>	<b>68</b>
<b>Glutación S-Transferasa</b>	<b>69</b>
<b>Oxidasaas dependientes del Citocromo P450</b>	<b>69</b>
<b>Penetración reducida</b>	<b>69</b>
<b>Manejo de Resistencia</b>	<b>70</b>
<b>Detección de la resistencia</b>	<b>71</b>
<b>Pruebas de Susceptibilidad</b>	<b>71</b>
<b>Pruebas Bioquímicas</b>	<b>72</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>74</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>76</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>83</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>86</b>



CONCLUSIONES	91
REFERENCIAS CITADAS	92
CAPITULO 2	121
FLUJO DE GENES DE <i>ANOPHELES ALBIMANUS</i> EN EL AMBITO MICROGEOGRÁFICO EN EL SUR DE CHIAPAS Y MACROGEOGRÁFICO: EN MÉXICO UTILIZANDO RAPD-PCR	122
RESUMEN	123
INTRODUCCIÓN	126
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	128
ANTECEDENTES	130
Genética de poblaciones.	130
Mecanismos de microevolución.	132
Mutación	132
Migración (Flujo de genes)	133
Deriva génica	135
Apareamiento aleatorio	136
Selección natural	136
Selección direccional	136
Selección estabilizadora	136
Selección disruptiva	137
Propiedades del los marcadores RAPD-PCR	137
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	143
HIPÓTESIS	143

<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>144</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>144</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>145</b>
<b>Colecta de mosquito en Chiapas</b>	<b>145</b>
<b>Área de estudio</b>	<b>145</b>
<b>Colecta de mosquitos en México</b>	<b>145</b>
<b>Extracción de DNA</b>	<b>149</b>
<b>Amplificación del DNA</b>	<b>150</b>
<b>Condiciones de la PCR</b>	<b>151</b>
<b>Electroforesis en gel de agarosa</b>	<b>151</b>
<b>Iniciadores oligonucleotidos</b>	<b>151</b>
<b>Análisis estadístico</b>	<b>152</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>154</b>
<b>A. Estudio Microgeográfico en Chiapas</b>	<b>154</b>
<b>A. Estudio Macrogeográfico en México</b>	<b>156</b>
<b>DISCUSIONES</b>	<b>158</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>166</b>
<b>REFERENCIAS CITADAS</b>	<b>167</b>



**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## INDICE DE CUADROS

Pag.

### CAPITULO 1

- Cuadro 1.1 Localidades de colecta de *Anopheles albimanus* por agroecosistemas y sus coordenadas 102
- Cuadro 1.2 Porcentaje de mortalidad de *Anopheles albimanus* por agroecosistemas con tres insecticidas en el sur de Chiapas, México. Hembras + machos F1 de un día de edad. 104
- Cuadro 1.3 Susceptibilidad de *Anopheles albimanus* (machos + hembras) F1 de 1 día de edad, a los insecticidas DDT, deltametrina y ciflutrina por tipo de captura, en el sur de Chiapas, México. 105
- 
- Cuadro 1.4 Susceptibilidad de *Anopheles albimanus* al DDT, deltametrina y ciflutrina, por sexo y agroecosistemas en Chiapas, México. 106
- Cuadro 1.5 Titulos de enzimas responsables de la resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus* entre cuatro agro-ecosistemas del sur de Chiapas, México. 107
- Cuadro 1.6 Inhibición de la actividad del AchE por propoxur en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad por tipo de captura en los diferentes agro-ecosistemas en el sur de Chiapas.

Media  $\pm$  Desv. 108

Cuadro 1.7 Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad:  
 $\mu$ mol de  $\alpha$  esterasas por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media  $\pm$  Desv. estandar nmol de producto/min/mg/proteína. 109

Cuadro 1.8 Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad:  
 $\mu$ mol de  $\beta$  esterasas por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media  $\pm$  Desv. estandar nmol de producto/min/mg/proteína. 110

Cuadro 1.9 Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad, actividad del sustrato pNPA por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media  $\pm$  Desv. estandar  $\mu$ mol/min/mg/proteína. 111

Cuadro 1.10 Actividad de GST en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad, en cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media  $\pm$  Desv. estandar nmol de producto/min/mg/proteína. 112

Cuadro 1.11	<b>Monooxigenasas dependientes de citocromo P450 en <i>Anopheles albimanus</i> de 1 día de edad, por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas.</b>	
	<b>Media <math>\pm</math> Desv. estandar nmol unidades equivalentes de citocromo P450/mg/proteína.</b>	<b>113</b>

## CAPITULO 2

Cuadro 2.1	<b>Localidades de colecta de <i>Anopheles albimanus</i> en el ámbito nacional y sus coordenadas.</b>	<b>148</b>
Cuadro 2.2	<b>Número de marcadores genéticos y la secuencia de los iniciadores seleccionado en <i>Anopheles albimanus</i> procedentes de Chiapas, México.</b>	<b>178</b>
Cuadro 2.3	<b>Distancia genética de Nei (1972) (abajo) y distancia geográfica (arriba) en <i>Anopheles albimanus</i> entre agroecosistemas.</b>	<b>179</b>
Cuadro 2.4	<b>Matriz de y distancia genética de Nei (abajo) y distancia geográfica (arriba) en <i>Anopheles albimanus</i> por localidades del sur de Chiapas, México.</b>	<b>180</b>
Cuadro 2.5	<b><math>F_{ST}</math> estadística y tasa efectiva de migración (<math>Nm</math>) dentro de agroecosistemas y entre localidades, por tres métodos en</b>	

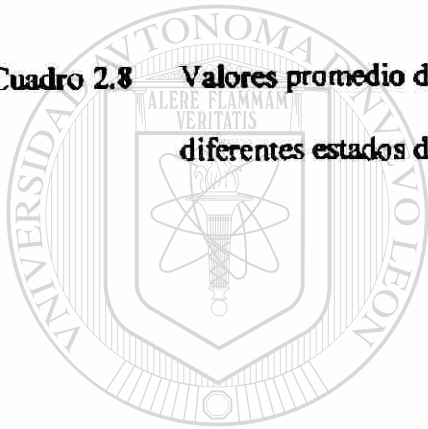


*Anophels albimanus* de Chiapas, México. 181

Cuadro 2.6 Tasa efectiva de migración ( $Nm$ ), entre agroecosistemas en  
*Anopheles albimanus* de Chiapas, Mexico. 182

Cuadro 2.7 Matriz de distancia genética de Nei (1972) (abajo) y distancia geográfica  
(arriba) de *Anopheles albimanus* en República Mexicana. 185

Cuadro 2.8 Valores promedio de  $F_{st}$  y  $Nm$  en *Anopheles albimanus* entre  
diferentes estados de la República Mexicana. 186



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

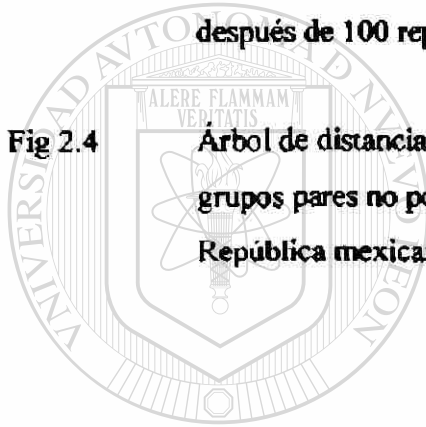


## INDICE DE FIGURAS

ANTECEDENTES		PAGINA
Fig. 1.	Distribución geográfica de la Malaria en el mundo (Knell, 1991)	10
Fig. 2.	Zonas de acuerdo a la distribución geográficas de las principales especies vectoras de <i>Anopheles</i> (Macdonald, 1957)	11
Fig. 3.	Areas palúdicas de México mostrando las diferentes zonas de riesgo (fuente: DGE/SSA, 1998-2000).	14
Fig. 4.	Numero de casos de paludismo desde 1942 a 2000 en México (DGE/SSA, 1998-2000)	16
Fig. 5.	Ciclo de vida de <i>Plasmodium vivax</i> en el humano y en el mosquito (Knell, 1991)	17
Fig. 6.	Mosquito anophelino hembra, vista lateral (Wilkerson, 1990)	24
Fig. 7.	Diferencias entre los géneros <i>Anopheles</i> , <i>Culex</i> y <i>Aedes</i> (Bruce-Chwatt, 1985)	27
Fig. 8.	Anatomía de la proboscide de una hembra adulta (Bruce-Chwatt, 1985)	28
Fig. 9.	Sección longitudinal de una hembra de mosquito, se indican los sistemas digestivo y reproductor (Bruce-Chwatt, 1985)	28
Fig.10.	Ciclo de vida y ciclo gonotrófico de una hembra <i>Anopheles</i> (Knell, 1991)	31
Fig.11.	Distribución geográfica de <i>Anopheles albimanus</i> en México y Centro América (Fleming, 1991)	33
Fig 12.	Tres diferentes clases de modelos que podrían ser utilizados para describir El flujo génico entre poblaciones (Sork, 1998)	35
<b>CAPITULO 1</b>		
Fig. 1.1	Area de colecta de <i>Anopheles albimanus</i> y distribución de las cinco áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.	103

- Fig 1.2. Porcentaje de Inhibición de la acetilcolinesterasa en *An. albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura, pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México. 114
- Fig 1.3. Actividad enzimática con el sustrato pNPA de *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura en cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México. 115
- Fig 1.4. Actividad de glutatión s- transferasa (GsT) con el sustrato dicloronitrobenzenu *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura en cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México. 116
- Fig 1.5. Actividad de estererasas con el sustrato  $\alpha$ -naftil acetato en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México. 117
- Fig 1.6. Actividad de estererasas con el sustrato  $\beta$ -naftil acetato en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México. 118
- Fig 1.7. Promedio de citocromo P 450 que representa la actividad de monooxigenasas en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México. 119
- Fig 1.8. Pruebas bioquímicas por sexo de *Anopheles albimanus* en las cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México. Mosquito F1 de 1 día de edad. 120

Fig. 2.1	Área de estudio para determinar el flujo de genes en <i>Anopheles albimanus</i> en el ámbito macrogeográfico en México.	147
Fig. 2.2	Árbol de distancia genética de Nei (1972) utilizando el método de grupos pares no ponderado (UPGMA) en 20 localidades después de 100 replicas del análisis Bootstrap.	183
Fig 2.3	Árbol de distancia genética de Nei (1972) utilizando el método de grupos pares no ponderado (UPGMA) en cinco agroecosistemas después de 100 replicas del análisis Bootstrap.	184
Fig 2.4	Árbol de distancia genética de Nei (1972) utilizando el método de grupos pares no ponderado (UPGMA) entre diferentes estados de la República mexicana después de 100 réplicas del análisis Bootstrap.	187



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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).

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*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).

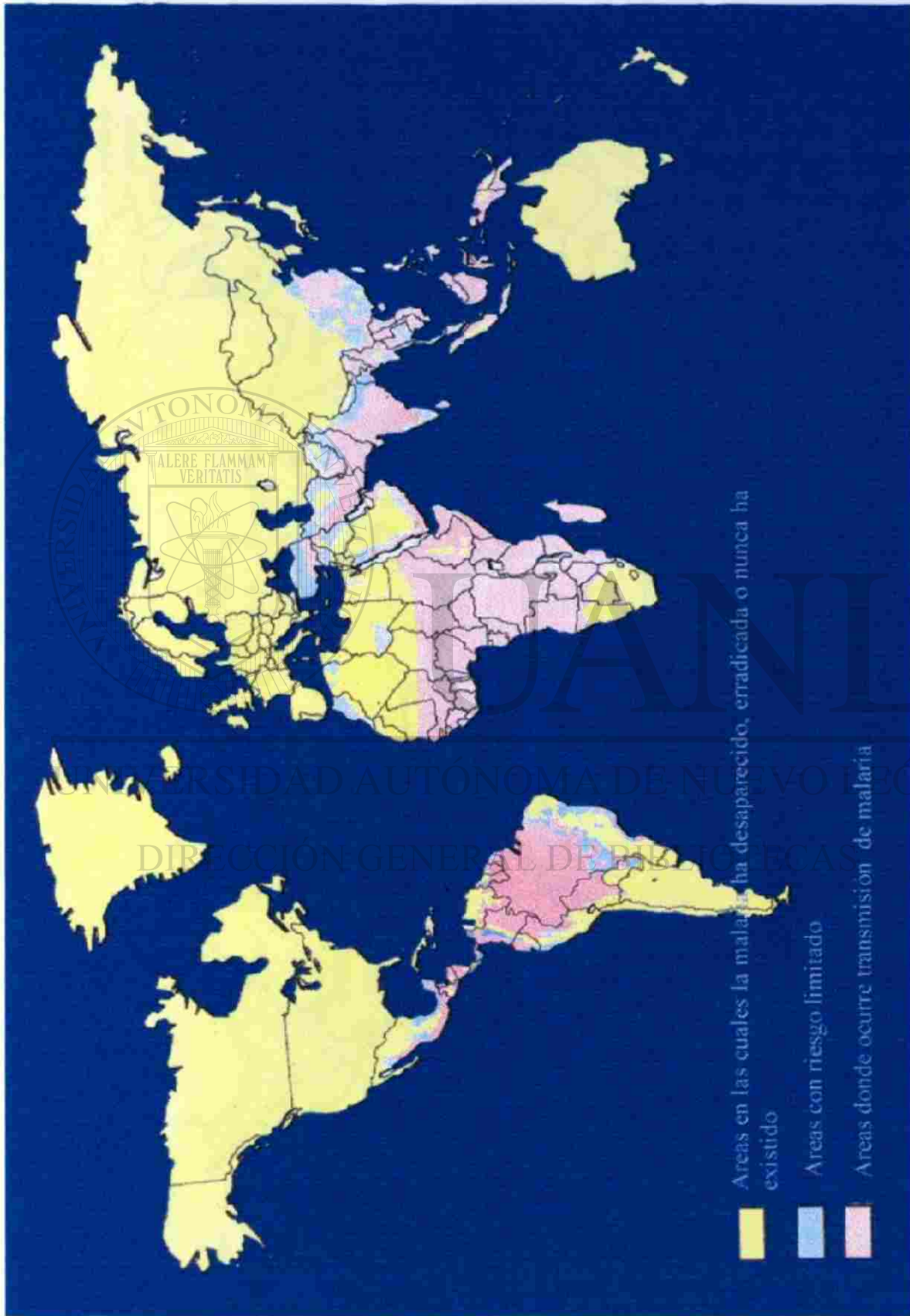


Fig. 1. Distribución de la malaria a fines de los 1980's. Trustees of the Wellcome Trust ( Knell, 1991)



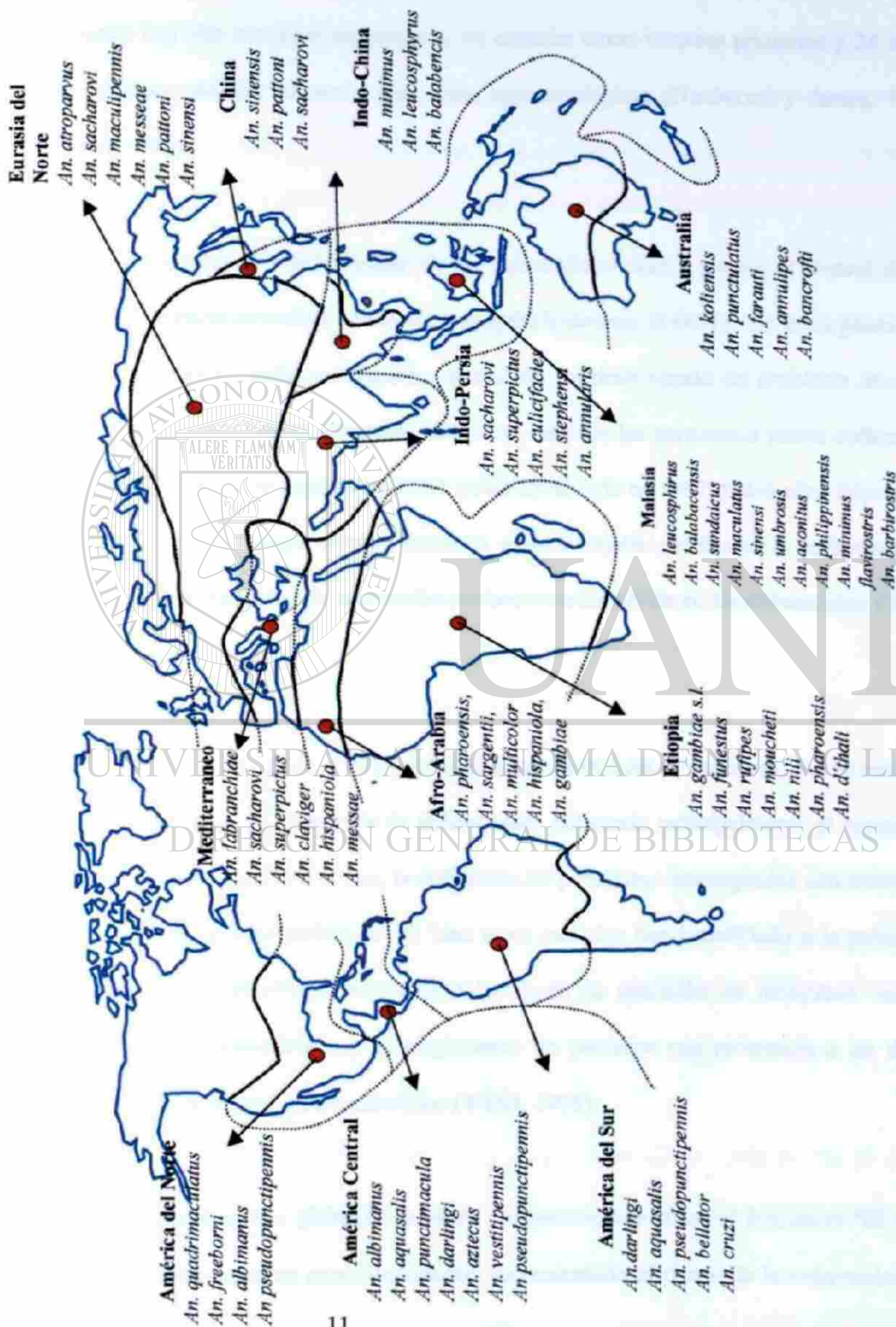


Figura 2. Zonas de acuerdo a la distribución geográficas de las principales especies vectoras de *Anopheles* (Macdonald, 1957)



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, incrementado 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

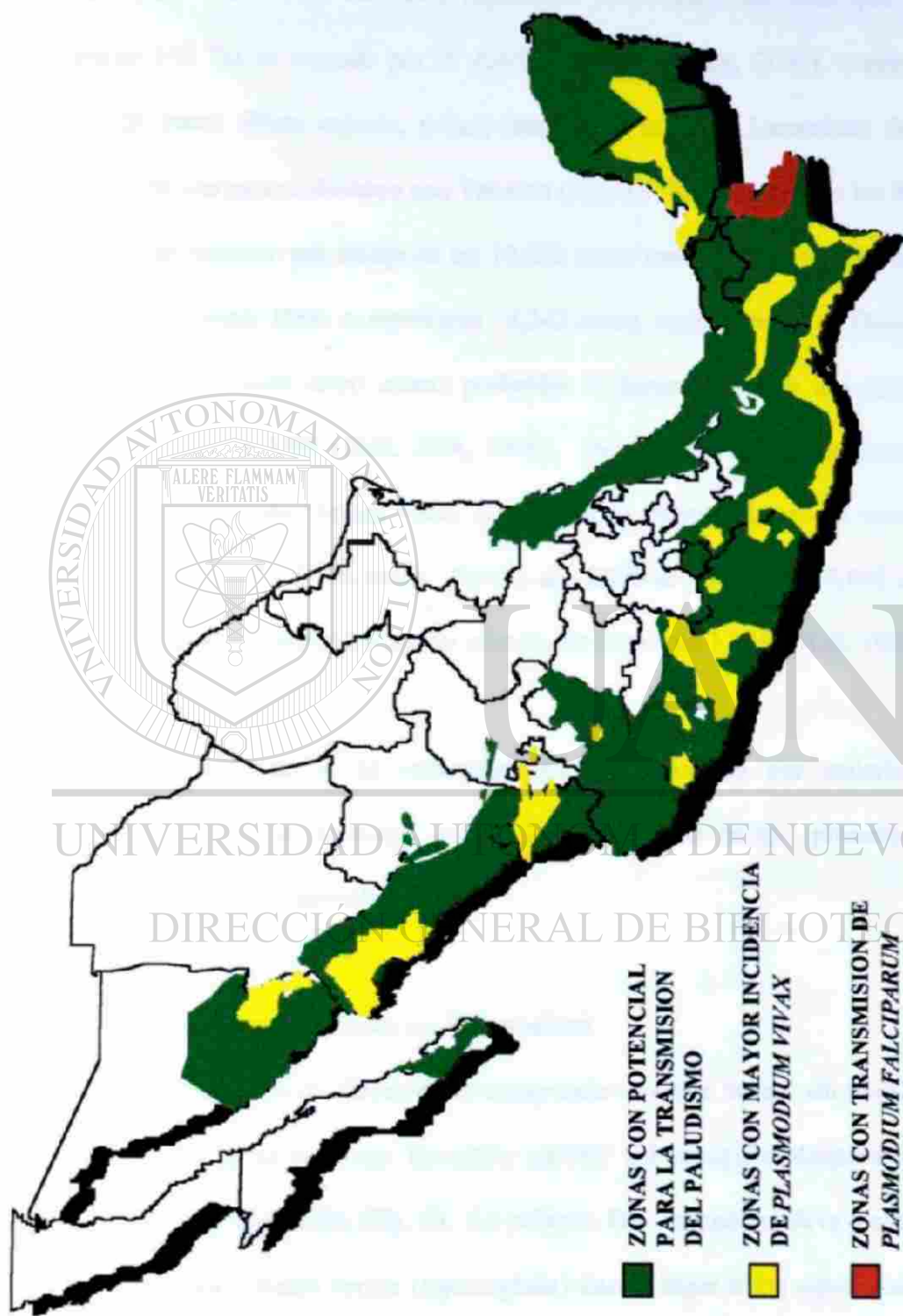


Figura 3. Areas palúdicas de México mostrando las diferentes zonas de riesgo (fuente: DGE/SSA, 1998-2000).

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 (Tellaèche, 1993). 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

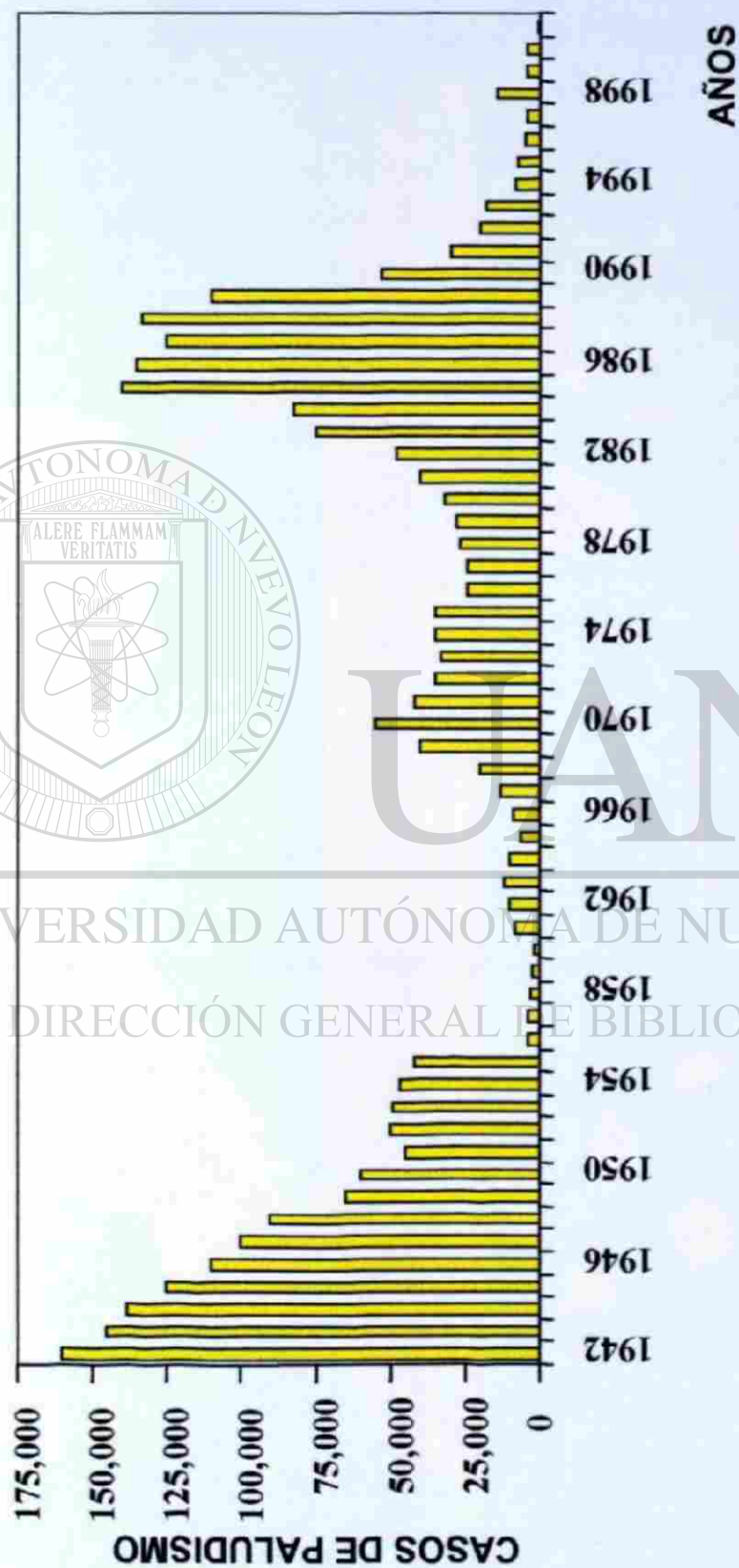
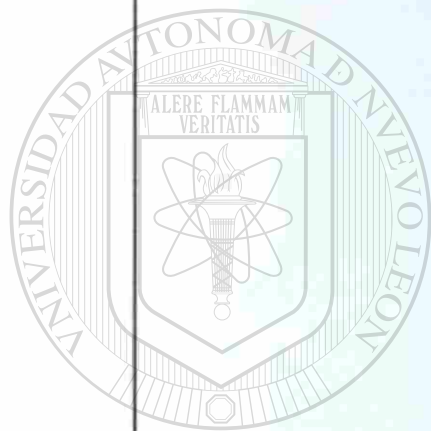


Figura 4. Numero de casos de paludismo desde 1942 a 2000 en México (DGE/SSA).



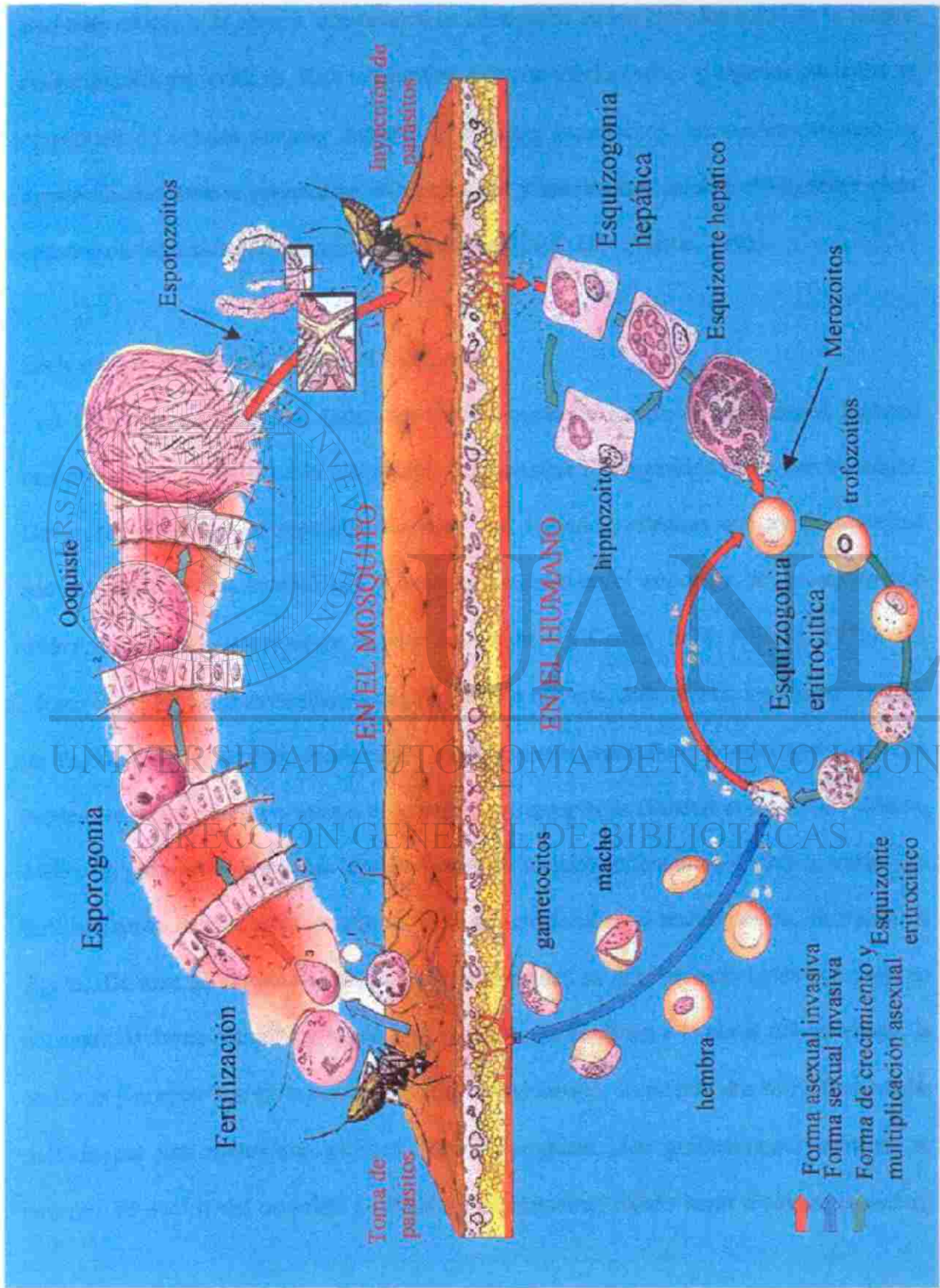


Fig 5. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* en el humano y en el mosquito (Knell, 1991)

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.**

Quando 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 Cyclorhapha. 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.

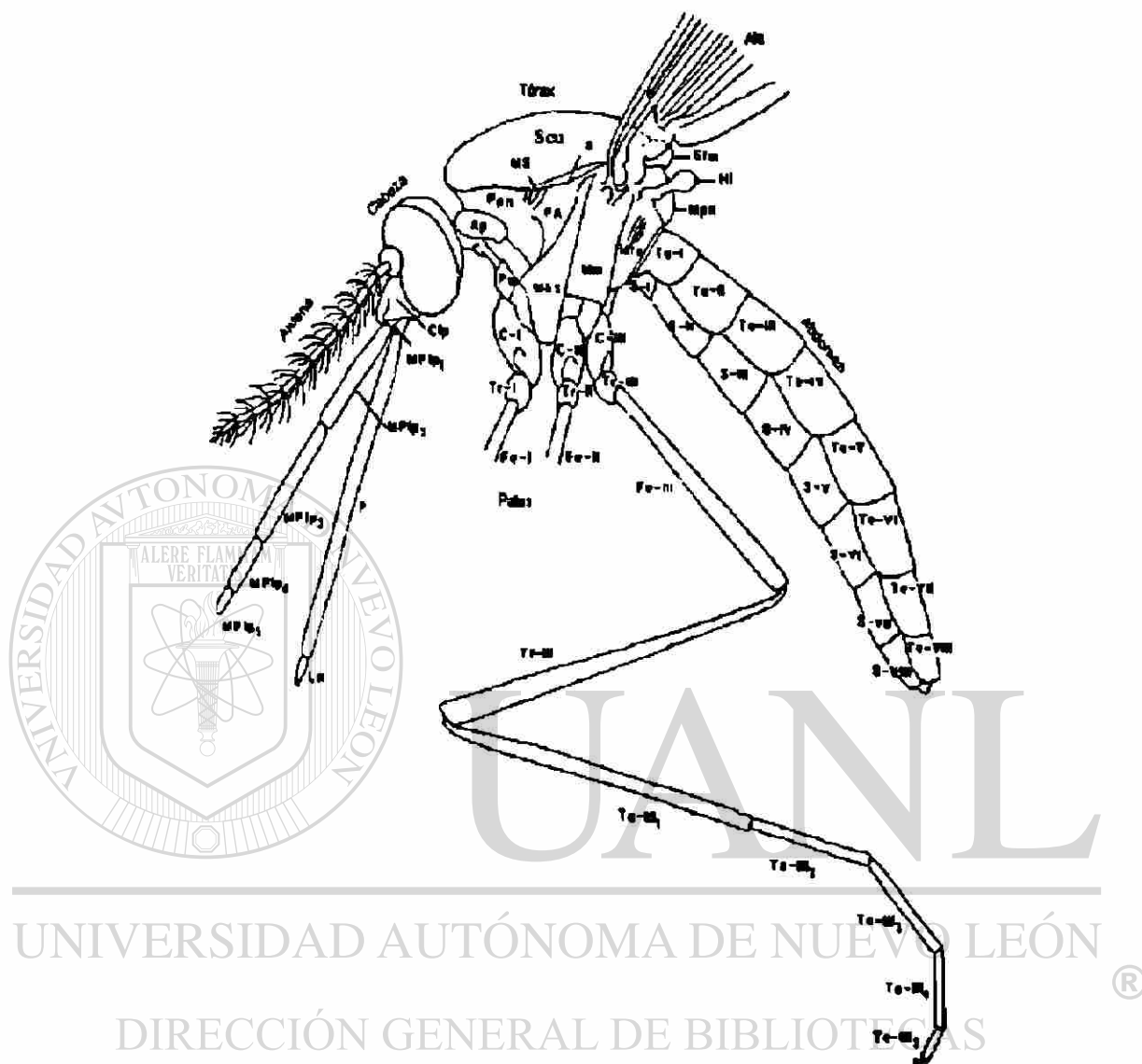


Figura 6. Mosquito anophelino hembra, vista lateral. AP: antepronoto; C- I, C-II y C-III : coxa de la pata anterior, media y posterior, respectivamente; Tr-I, Tr-II y Tr-III trocáncer de la pata anterior, media y posterior respectivamente, Fe-I, Fe-II y Fe-III fémur de la pata anterior, media y posterior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

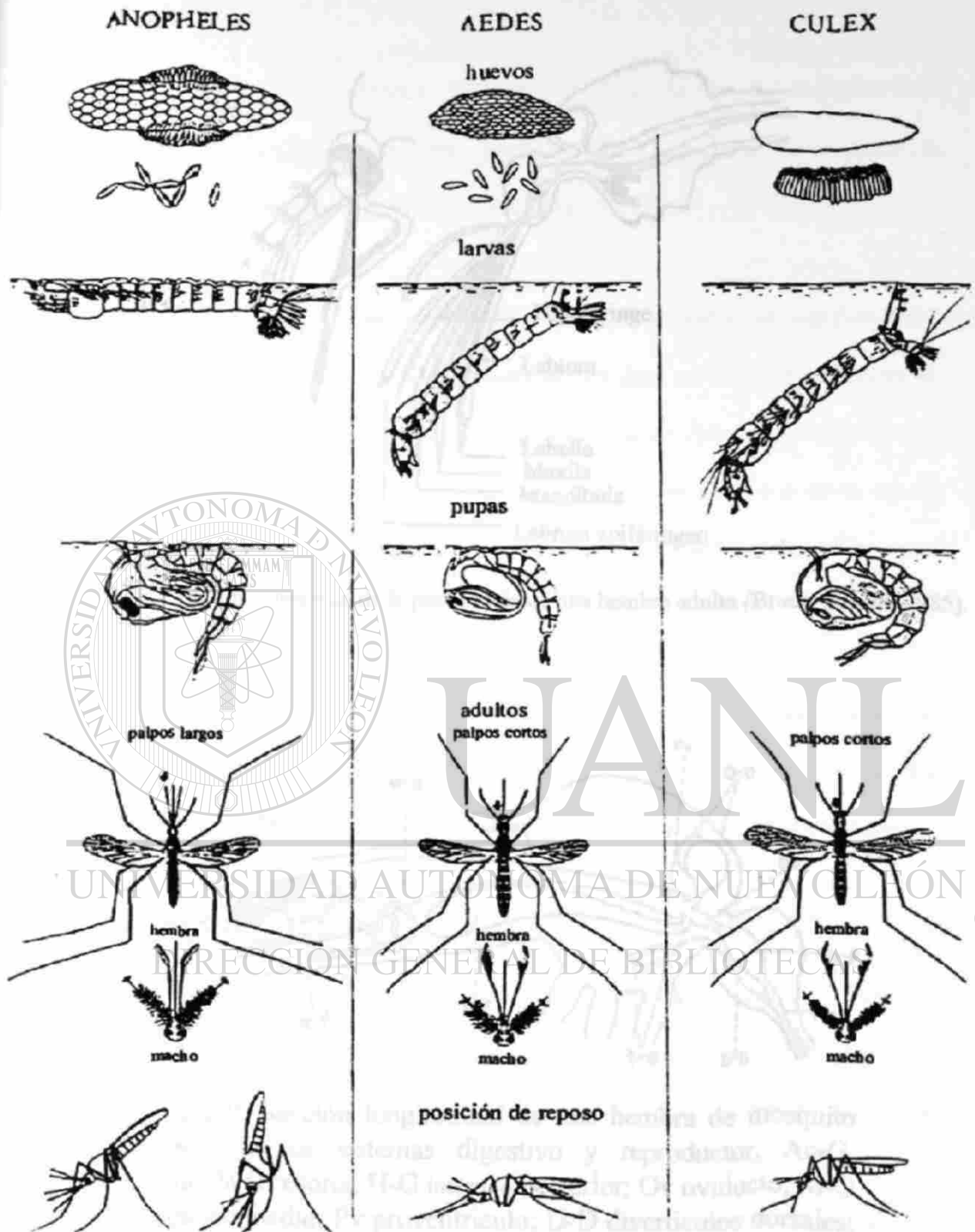


Figura 7. Diferencias entre los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes*. (Bruce-Chwatt, 1985)

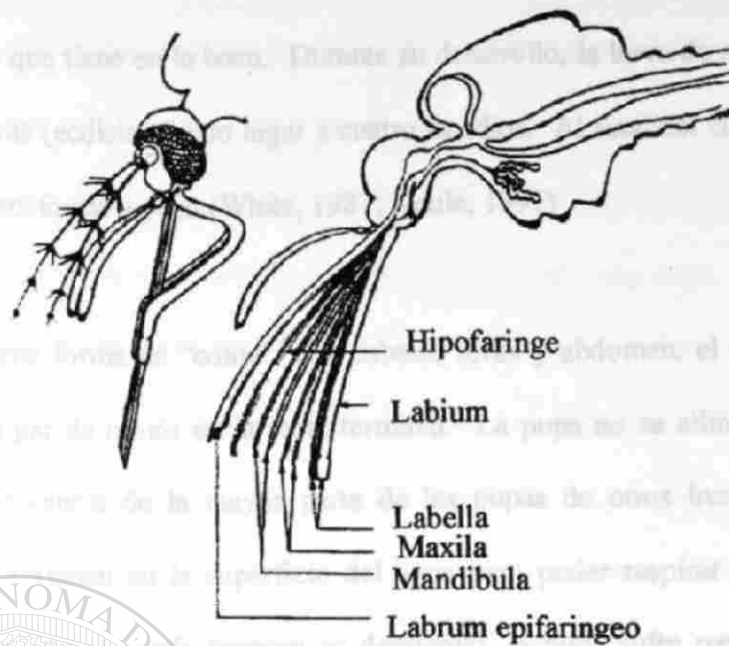


Figura 8. Anatomía de la proboscide de una hembra adulta (Bruce-Chwatt, 1985).

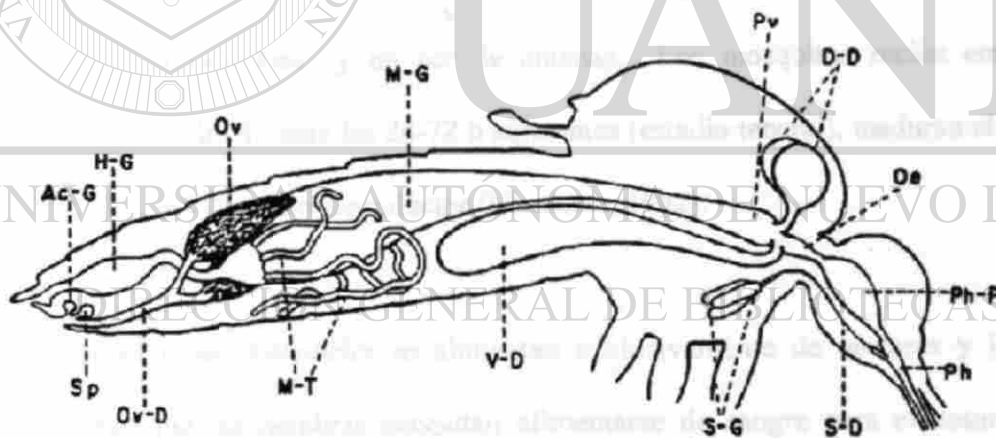


Figura 9. Sección longitudinal de una hembra de mosquito mostrando los sistemas digestivo y reproductor. Ac-G, glándula accesoria; H-G intestino posterior; Ov oviducto; M-G intestino medio; Pv proventriculo; D-D divertículos dorsales; Oe esófago; Ph-P bomba faringeal; Ph faringe; S-D ducto salival; S-G 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).

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 hematófaga 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).

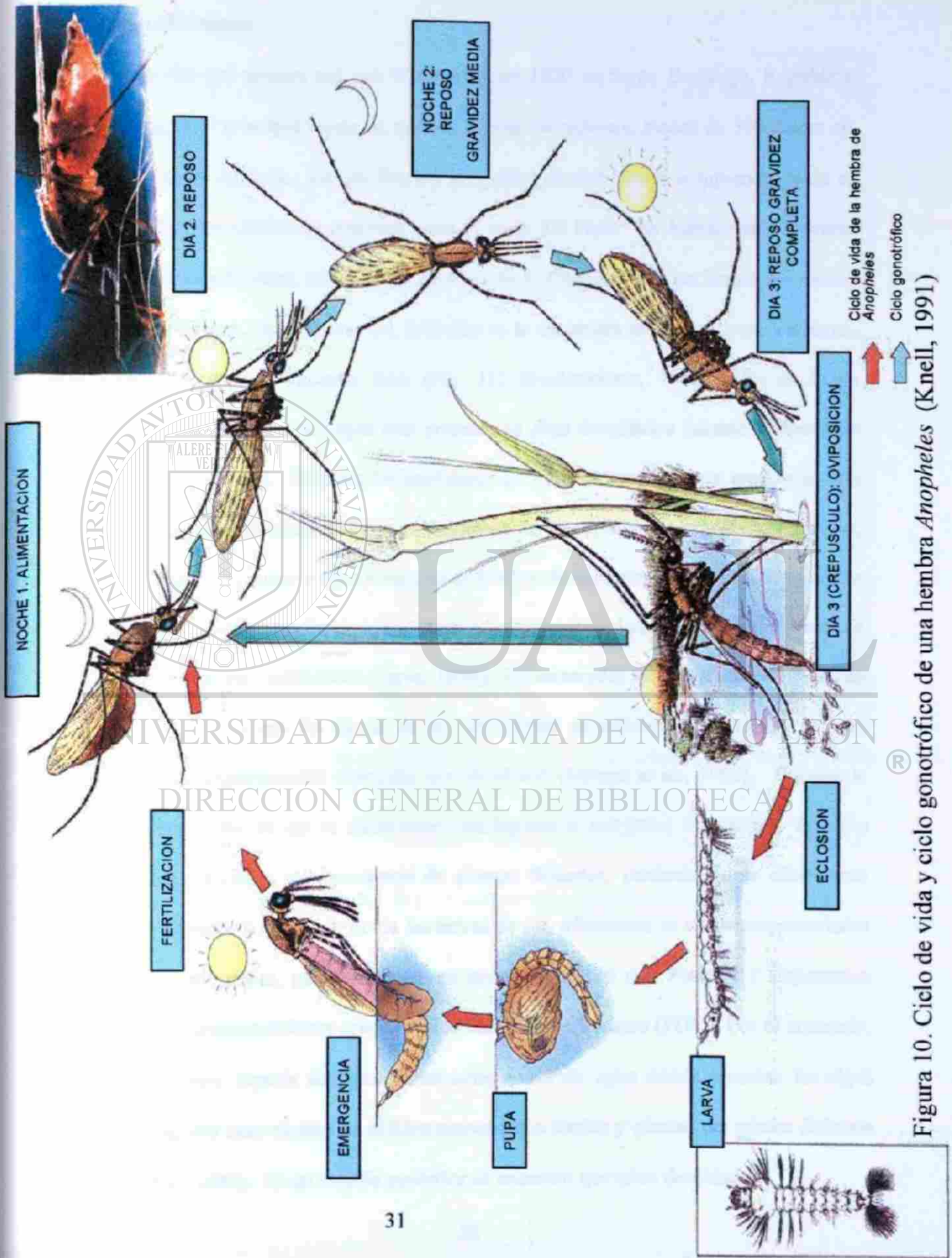


Figura 10. Ciclo de vida y ciclo gonotrófico de una hembra *Anopheles* (Kneill, 1991)



## *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).

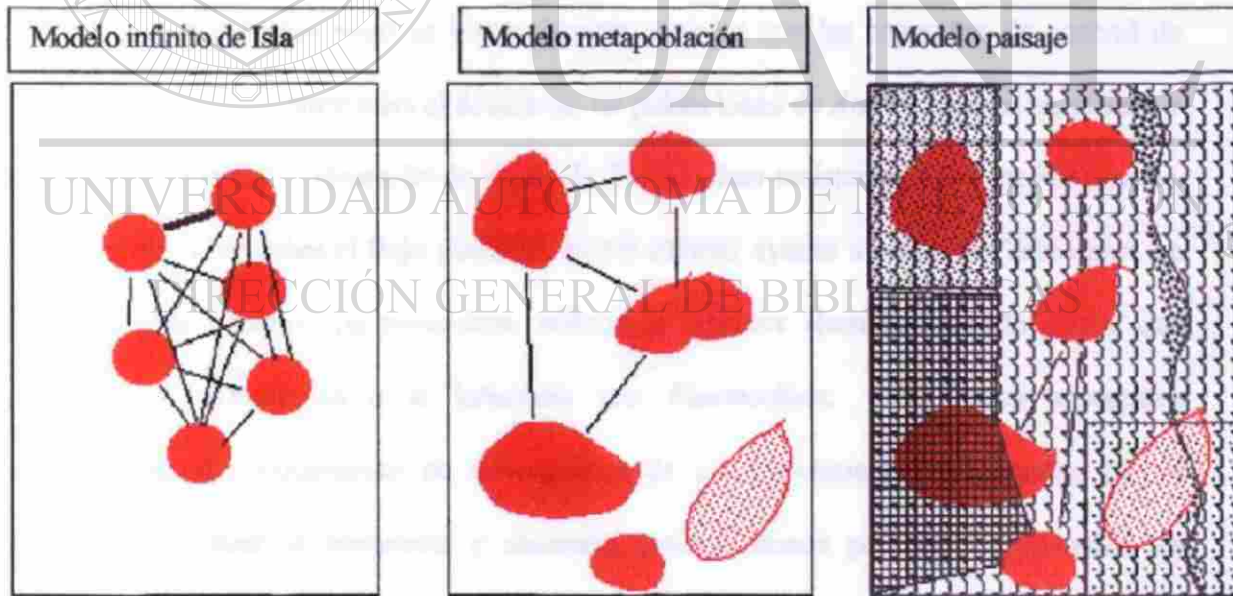


Fig. 12. Tres diferentes clases de modelos que podría ser utilizado para describir el flujo génico entre poblaciones (Sork et al., 1998).

## 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 inglés: 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. Rodriguez.  
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 continuous 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. Rodriguez. 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.

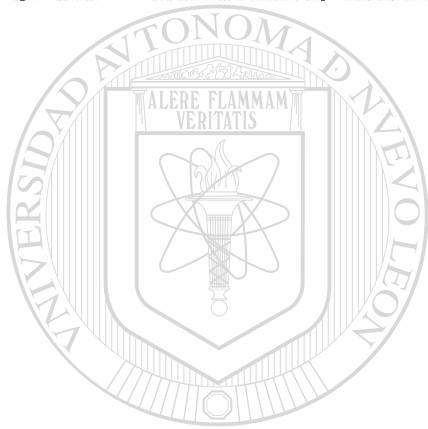
Wilkerson, R.C., D. Strickman. 1990. Illustrated key to the female anopheline mosquitoes of central América and México. *J Am Mosq Control Assoc*. 6:7-34.

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.



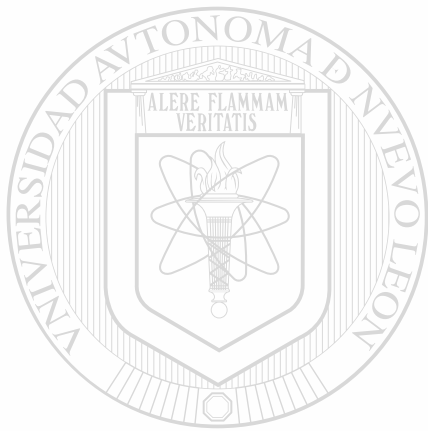
UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**CAPITULO 1**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

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.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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<sub>50</sub> 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, estéricamente 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 Norteamérica, 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).

---

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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  $\text{Na}^+$  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 $\text{Na}^+$ 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).

### **Oxidasa 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 oxidasa 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.

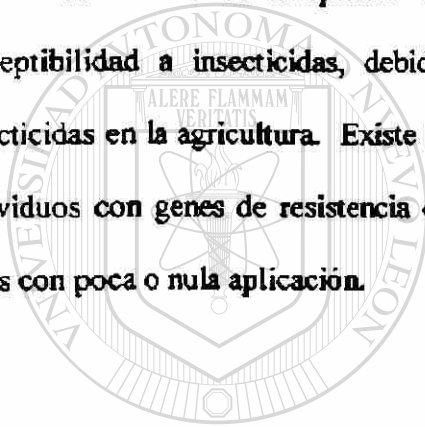
-Los procedimientos que implican cuantificación sólo pueden ser realizados por personal que posea ciertos conocimientos técnicos (WHO, 1992).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **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.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## **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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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).

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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  $\mu$ l del homogenizado para la GST, pNPA y ensayo de proteínas.

#### Acetilcolinesterasa insensible (AChE):

La AChE en el homogenizado fue solubilizada por adición de 145  $\mu$ l 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  $\mu$ l de solución de DTNB (0.01 M ácido ditiobis 2-nitrobenzoico en 0.1 M buffer de fosfatos pH 7.0) y 25  $\mu$ l 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  $\mu$ l del sustrato ASCHI conteniendo 0.2% del inhibidor propoxur (0.1 M) para la segunda replica de prueba. Los pozos control contenían 25  $\mu$ l de agua destilada, 145  $\mu$ l de buffer Tritón, 10  $\mu$ l de solución DTNB y 25  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l del stock, y aforando a 10 ml con buffer de fosfatos 0.02M pH 7.2) y 200  $\mu$ l 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).

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 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. albimarus* 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; Chardree 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. albimamus*, 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, pNPA, 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.

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.

insecticida, que en algunos casos se presenta en combinación con otros factores. En este caso se habla del gen *Pen* (penetración) (Plapp, 1976). La superficie del cuerpo de los insectos consiste de un exoesqueleto duro conocido como cutícula. Los insecticidas modernos son polares y de esta forma penetran fácilmente la cutícula del insecto. La mayoría de los insecticidas penetran por la cutícula, aunque algunos otros insecticidas entran por el aparato bucal, sistema respiratorio y otras partes vulnerables como las antenas, ojos y tarsos (Matsumura, 1985).

### **Manejo de Resistencia**

El manejo de la resistencia abarca todas las medidas para retrasar o prevenir grados de resistencia que superen aquellos que obligan a abandonar el plaguicida, manteniendo al mismo tiempo el control eficaz de la enfermedad. Esto implica aplicar conocimientos técnicos y los medios disponibles para prolongar el uso eficaz de plaguicidas en la forma más prudente y eficaz en relación con el costo. El manejo eficaz de la resistencia exige un sistema confiable de vigilancia, detección temprana y vigilancia precisa. El primer paso es tomar todas las precauciones necesarias para prevenir la aparición de resistencia y preparar por adelantado un plan para contrarrestarla en las etapas tempranas de su desarrollo. Es importante reconocer que sólo se dispone de una cantidad limitada de plaguicidas para el empleo en programas de salud pública. Esos plaguicidas deben tratarse como recursos valiosos y, por consiguiente, conservarse, en especial porque la resistencia cruzada (la aparición de resistencia a un plaguicida al cual tal vez nunca haya estado expuesto el vector, mediante la exposición a otro compuesto que comparte con el primero ya sea una vía metabólica o el lugar de acción) puede agotar con rapidez los recursos de plaguicidas (Hemingway et al., 2000).

El control de la resistencia se puede lograr con uno o más de los siguientes

métodos:

-limitación de los plaguicidas a zonas con altos grados de transmisión de las enfermedades.

-limitación del empleo del plaguicida a las estaciones en las que se produce la máxima transmisión de la enfermedad.

-empleando métodos no químicos de lucha ya sean solos o como medidas complementarias en las estaciones o zonas en que son aplicables y eficaces en relación con su costo.

-sustitución de los plaguicidas residuales por otros no residuales aplicados sólo cuando son esenciales para combatir adecuadamente el vector, y

-utilización de métodos que maten sólo a las hembras adultas en vez de a los ejemplares de ambos sexos o a todos los estadios del ciclo biológico (OMS, 1986; WHO, 1992; Hemingway et al., 2000).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Detección de la resistencia

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### Pruebas de Susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad estándares de la OMS, fueron desarrolladas con el propósito de determinar lo más pronto posible los niveles de susceptibilidad de los vectores de enfermedades. La técnica consiste en exponer los mosquitos a papeletas impregnadas con insecticida a una dosis diagnóstico estandarizada (OMS, 1975). Las papeletas consisten de papel Whatman #1 de 12 x 15 cm, las que se impregnan con una solución preparada con aceite de oliva como solvente y alcohol n-butílico como co-solvente. Esta

solución se distribuye uniformemente en la papeleta. El equipo para realizar las pruebas consiste de dos tubos cilíndricos interconectados por medio de una base con roscas a ambos lados, el cual tiene una placa deslizable interconectándolos a cada uno de ellos por esta base, en los extremos de cada tubo tiene una tapadera de rosca con malla que sirve para que los mosquitos no escapen. Cada equipo de tubos presenta un punto verde y rojo respectivamente. El tubo verde de observación lleva en su interior una papeleta de papel blanco de 12 x 15 cm sostenido al tubo por medio de un aro plateado. El tubo de punto rojo es de exposición, el cual lleva el papel impregnado de insecticida, sostenido por un aro de cobre. El criterio para definir la presencia de resistencia ha sido la supervivencia del 20% ó más de los individuos sometidos a ensayo con las concentraciones de diagnósticos de insecticidas actualmente conocidas (OMS, 1986). Sin embargo, esta técnica presenta inconvenientes: se necesitan cantidades grandes de mosquitos, únicamente se puede probar un insecticida por ensayo, su eficacia puede ser baja debido al constante uso de las papeletas impregnadas con insecticida, se requiere de temperatura adecuada  $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , alta humedad relativa (80 %) y además no proporcionan la información sobre el tipo de mecanismo bioquímico que está confiriendo la resistencia. No obstante son una medición estándar (WHO, 1992).

### **Pruebas Bioquímicas**

-Los resultados de los pruebas bioquímicas son más definidos que los bioensayos ya que un insecto que posea un mecanismo confirmado de resistencia sólo puede ser resistente. Por el contrario, en los bioensayos con dosis diagnósticas algunos insectos pueden haber sobrevivido como resultado de una dosificación inexacta, papeletas viejas o muy usadas, de

- Bisset, J., M.M Rodríguez, C. Díaz, A. Soca. 1998. Resistance in a strain of *Culex quinquefasciatus* coming from Medellín, Colombia. *Rev. Cubana Med. Trop.* 50(2): 133-7.
- Bloomquist, J.R. 1996. Ion channel as targets for insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 163-190.
- Brogdon, W.G., A.M. Barber. 1990. Microplate assay of glutathione s-transferase activity for resistance detection in single-mosquito triturates. *Comp Biochem Physiol B.* 96(2):339-42.
- Brogdon, W.G., J.C. McAllister, J. Vulule. 1997. Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing the elevated oxidase mechanism for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc.* Sep;13(3):233-237.
- Brogdon, W.G., J.C. McAllister. 1998.
- Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a pragmatic review. *J. Am. Mosq. Assoc.* 2: 123-140.
- Casida, J.E. y G.B. Quisad. 1998. Golden age of insecticide research: Past. Present, or Future?. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 1-16.



Chandre, F., F. Darriet, M. Darder, A. Cuany, J. M. Doannio, N. Pasteur, P. Gillet. 1998. Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from west Africa. *Med. Vet. Entomol.* 12:359-66.

Devonshire, A.I., L. M. Field, M.S. Williamson. 1991. Molecular Biology of Insecticide Resistance. in *Insect Molecular Science.* (J. M. Crampton and P. Eggleston, eds), 16<sup>th</sup> Symposium of the Royal Entomological Society of London. Imperial Collage. Academic Press. pp173- 182.

Ecobichon, D.J. 1996. Toxic effects of pesticides. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Curtis D. Klassen (Ed). fifth edition. McGraw-Hill, New York, 643-669 pp.

Frederickson, E.C. 1993. Bionomics and control of *Anopheles albimanus*. Washington, D.

C. P.A.H.O. Tech. Pap. 33-44.

Fuentes, M.G. 1992. Niveles de susceptibilidad en adultos de *Anopheles albimanus* Wiedemann y *An. pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae) a diferentes grupos toxicológicos de insecticidas en cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México. Tesis para obtener el título de Químico Agrícola. Universidad Nacional Autónoma de Chiapas.

Georghiou, G.P. 1973. Seasonal escalation of organophosphorus and carbamate resistance in *Anopheles albimanus* by agricultural sprays. *Env. Entomol.* 2(3): 369-374.

Gerberg, E.J., D.R. Barnard, R. A. Ward. 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Am. Mosq. Control Assoc. Bulletin No. 5. Louisiana.98 p.

Hemingway, J., G.I. Jayawardena. 1987. The use of biochemical tests to identify multiple insecticide resistance mechanisms in field selected populations of *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). Bull. Ent. Res. 77, 57-66.

Hemingway, J., G.J. Small, A. Monro, B.V. Sawyer, H. Kasap. 1992. Insecticide resistance gene frequencies in *Anopheles sacharovi* populations of the Cukurova plain, Adana Province, Turkey. Med. Vet. Entomol 6: 342-8.

Hemingway, J., R.P. Penilla, A.D. Rodriguez, B.M. James, W. Edge, M.H. Rodriguez. 1997. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. A large scale field trial in southern Mexico. Pesticide Science. 51: 375-382.

Hemingway, J., N. Hawkes, L. Prapanthadara, K.G. Jayawardena, H. Ranson. 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. Philos Trans R. Soc Lond B Biol Sci. 29; 353 (1376): 1695-9.

Hemingway J. Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. Annu Rev Entomol. 45:371-91.

Henao H. Samuel, G. Corey. 1991. Plaguicidas inhibidores de la colinesterasas. Serie Vigilancia 11. Centro Panamericano de Ecología Humana y salud. Programa de Salud Ambiental. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.

Lagunes Tejeda A., M.J. Rodriguez. 1989. Grupos Toxicológicos de Insecticidas y Acaricidas. Los mecanismos de resistencia como base para el manejo de insecticidas y acaricidas agrícolas 226 pa.

Loyola, E. G., M.A. Vaca, D. N. Bown, E. Pérez, M.H. Rodríguez. 1991. Comparative use of bendiocarb and DDT to control *An. pseudopunctipennis* in a malarious area of México. Medical and Vet. Entomol, 5: 233-242.

Malo-García, I. 2000. Variabilidad geográfica en la susceptibilidad a insecticidas y genética de poblaciones vecinas de *Anopheles albimanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). Tesis para obtener el título de Químico Fármaco Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de Chiapas.

Martínez- Torres D., Chandre F., M.S. Williamson, F. Darriet, J.B. Berge, A.L. Devoshier, P. Gullet, N. Pasteur, D. Pauron. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (Kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect. Mol. Biol. 7(2): 179-184.

Matsumura, Fumio. 1985. Toxicology of insecticides. 2da. ed. Plenum Press, New York 598 p.

Mazzarri M.B., G.P. Georghiou. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. J. Am. Mosq. Control Assoc. 11:315-22.

Miller, R.J., R.B. Davey, J.E. George. 1999. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus*. J. Med. Entomol. 36: 533-8.

Ocampo, B.C., W.G. Brogdon, C.M. Orrego, G. Toro, J.M. Lerna. 2000. Insecticide susceptibility in *Anopheles pseudopunctipennis* from Colombia: comparison between bioassay and biochemical assay.

Organización Mundial de la Salud. 1980. Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. Serie de informes técnicos N0 655. Quinto informe del comité de expertos de la OMS en Biología de los vectores y Lucha anti Vectorial. Ginebra.

Organización Mundial de la Salud. 1986. Resistencia de vectores y reservorio de enfermedades a los plaguicidas. Serie de Informes Técnicos No. 737.

Pant, C. P. 1988. Malaria vector control : imagociding. In Wensdorfer, W. H. Mc Gregor (eds) in *Malaria: Principles and Practice of malariology*, Churchill-Livingstone, Edinburg, London, Melbourne and New York. Vol. 2: 1173-1212 pp

Pasteur N., M. Raymond. 1996. Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutations, migration, and selection in field populations. *J. Hered.* 87(6):444-9.

Penilla, R.P., A.D. Rodriguez, J. Hemingway, J.L. Torres, J.I. Arredondo-Jimenez, M.H. Rodriguez. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in Mexico. *Med Vet Entomol.* 12:217-233.

Pittendrigh B., R. Reenan, R.H. French-Constant, B. Ganetzky 1997. Point mutations in the *Drosophila* sodium channel gene para associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* 256: 602-610.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Plapp, F. W. 1976. Biochemical genetics of insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* 21: 179-197.

Prapanthadara La-aied, J. Hemingway, A.J. Ketterman. 1993. Partial purification and characterization of glutathione S-transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 47: 119-133.

- Prapanthadara La-aied, J. Hemingway, A.J. Ketterman. 1995. DDT- resistance in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) fro Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione S-transferase. Bull. Entomol. Res. 85: 267- 274.
- Ramsey, J. M., E. Salinas, I. R. López, G.E. Angel, L. Martínez and D.N.Bown. 1988. Laboratory oviposition, fecundity and egg hatching ability of colonized *Anopheles albimanus* from Southern México. Mosq. News. 509 – 515.
- Ramsey, L. L. 1970. A twilight for persistent pesticides. FDA Papers 4: 14-18.
- Raymond, M., C. Chevillon, T. Guillemaud, T. Lenormand, N. Pasteur 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 353 (1376): 1707-11.
- Roderick, G.K. 1996. Geographic structure of insect populations: Gene Flow, Phylogeography, and their uses. Annu. Rev. Entomol. 41: 325-352.
- Rodríguez A.D. 2000. Large scale field evaluation of rotations and mosaic spraying as resistance management strategies in the coastal plain of Chiapas, México. Tesis Ph D. University of Wales,Cardiff.

Rozendaal, J. A., J. P. M. Van Hoof, J. Voorham, B.F.J. Oostburg. 1989. Behavioral studies of *Anopheles darlingi* in Suriname to DDT residues on house walls. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5: 339 – 350.

Schoof, H. F., R. T. Taylor. 1972. Recent Advances in insecticides for Malaria Programs. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 21 (5): 807- 812.

Service, M.W. 1993. Mosquito ecology: Field sampling methods, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Elsevier Applied Science. 988 pp.

Suárez, M. F. 1990. First record of DDT resistance in *Anopheles darlingi*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 6: 72- 74.

Villarreal T. C., M.H. Rodriguez, D.N. Bown, J.I. Arredondo-Jiménez. 1995. Low volume application by mist-blower compared with conventional compression sprayer treatment of houses with residual pyrethroid to control the malaria vector *Anopheles albimanus* in México. *Med. Vet. Entomol.* 9: 187-194.

World Health Organization. 1975. Manual on practical entomology in malaria. Vol 2. World Health Organization, Geneva.

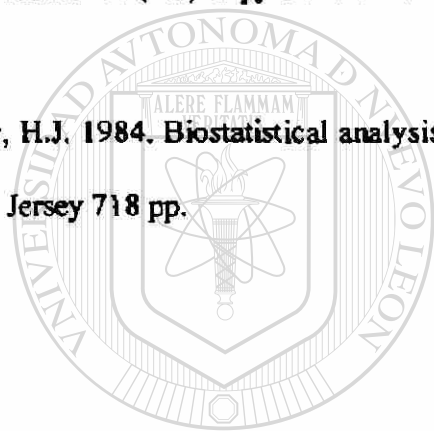
World Health Organization. Vector resistance to insecticides. 1992. 15<sup>th</sup> Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 818, 818: 1 – 62.



Williamson MS, I. Denholm, C.A. Bell, A.L. Devonshire. 1993. Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* 240(1): 17-22.

Williamson M.S., D. Martinez-Torrez, C.A. Hick, A.I. Devonshire. 1996. Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet.* 252: 51-60.

Zar, H.J. 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd Edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 718 pp.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 1.1. Localidades de colecta de *Anopheles albimanus* por agroecosistemas y sus coordenadas.

Localidad	Área	Latitud Norte	Longitud Oeste
Brisas del Mar	Banano	14° 37'	92° 18'
Cosalapa	Banano	14° 40'	92° 14'
Mareas del Suchiate	Banano	14° 32'	92° 13'
Herradero	Banano	14° 37'	92° 19'
Nueva Independencia	Banano	14° 37'	92° 14'
Álvaro Obregón	Cultivos Mixtos	14° 54'	92° 23'
Marte R. Gómez	Cultivos Mixtos	14° 55'	92° 26'
Cabildo	Cultivos Mixtos	14° 45'	92° 27'
Emiliano Zapata	Cultivos Mixtos	14° 50'	92° 32'
Confeti	Cultivos Mixtos	14° 54'	92° 17'
Altamira	Región azucarera	15° 07'	92° 35'
Castaño	Región azucarera	15° 11'	92° 45'
Río Arriba	Región azucarera	15° 08'	92° 43'
Xochicalco	Región azucarera	15° 04'	92° 36'
Lázaro Cárdenas	Región azucarera	15° 07'	92° 29'
Escobo	Reserva Ecológica	15° 06'	92° 40'
Aztlán	Reserva Ecológica	14° 57'	92° 39'
Barra San José	Reserva Ecológica	14° 54'	92° 37'
Barra Zacapulco	Reserva Ecológica	15° 12'	92° 52'
Las Palmas	Reserva Ecológica	15° 09'	92° 50'
Cuachas	Ganando	15° 26'	93° 07'
Mapastepec	Ganando	15° 25'	92° 54'
El Fortín	Ganando	15° 38'	93° 23'
Nuevo Progreso	Ganando	15° 33'	93° 07'
Zapotál	Ganando	15° 26'	93° 10'

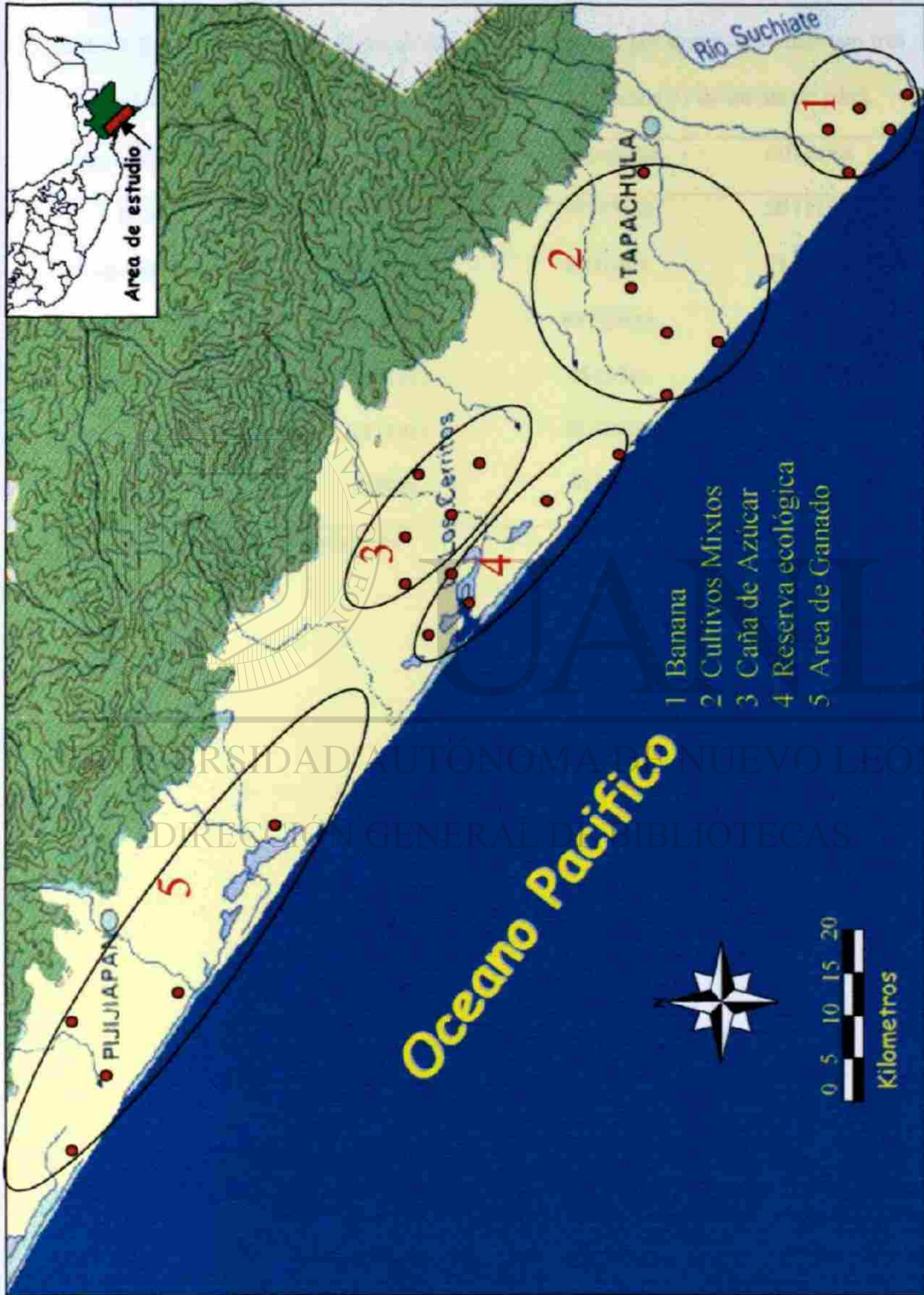
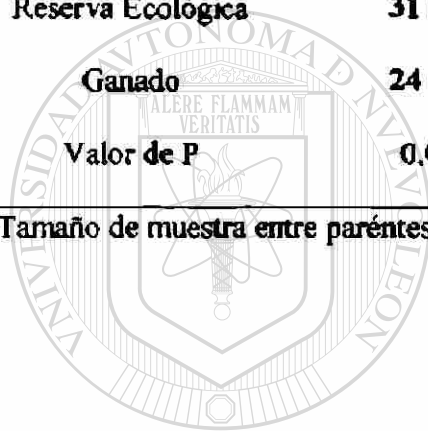


Fig 1.1 Área de colecta de *Anopheles albimanus* y distribución de las cinco áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

Cuadro 1.2 Porcentaje de mortalidad de *Anopheles albimanus* por agroecosistemas con tres insecticidas en el sur de Chiapas, México. Hembras + machos F1 de un día de edad.

Agroecosistema	DDT	deltametrina	ciflutrina
Banano	21 (1181) <sup>1</sup>	75 (1519)	50 (1308)
Cultivos Mixtos	50 (1931)	85 (640)	71 (1381)
Caña de Azúcar	31 (1490)	89 (2581)	69 (1043)
Reserva Ecológica	31 (137)	85 (374)	69 (291)
Ganado	24 (131)	92 (1058)	84 (330)
Valor de P	0.0001	0.0001	0.0001

<sup>1</sup>Tamaño de muestra entre paréntesis



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

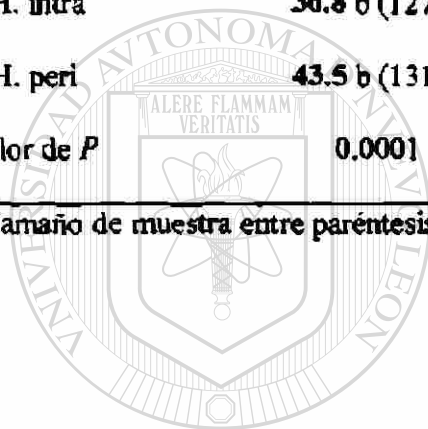
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 1.3. Susceptibilidad de *Anopheles albimanus* (machos + hembras) F1 de 1 día de edad, a los insecticidas DDT, deltametrina y ciflutrina por tipo de captura, en el sur de Chiapas, México.

Captura	DDT	Deltametrina	Ciflutrina
Trampa Animal	27.4 a (157) <sup>1</sup>	87.5 (800)	67.2 (333)
Corral	31.3 a (1883)	85.4 (3349)	64.7 (2079)
C.H. intra	36.8 b (1272)	87.5 (1004)	65.3 (908)
C.H. peri	43.5 b (1312)	81.4 (898)	67.4 (952)
Valor de P	0.0001	0.2524	0.7385

<sup>1</sup> Tamaño de muestra entre paréntesis



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 1.4. Susceptibilidad de *Anopheles albimanus* al DDT, deltametrina y ciflutrina, por sexo y agroecosistemas en Chiapas, México.

Zona	DDT		Deltametrina		Ciflutrina	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Banano	23.4 a (487) <sup>1</sup>	18.3 a (694)	79.6 a (697)	70.3 a (822)	52.2 a (594)	48.3 a (714)
Cultivos mixtos	54.3 b (870)	46.2 c (1061)	85.1 bc (289)	83.5 b (351)	75.1 b (631)	68.0 b (750)
Caña de Azúcar	31.5 a (676)	30.5 b (814)	92.4 bd (1168)	86.3 b (1413)	75.8 b (443)	64.2 b (600)
Reserva Ecológica	30.2 a (53)	32.1 b (84)	89.1 bc (184)	81.6 b (190)	75.5 b (135)	62.8 b (156)
Ganado	32.7 a (58)	16.4 a (73)	94.6 bd (469)	89.4 b (589)	84.1 b (157)	83.8 c (173)
Valor de P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

<sup>1</sup> Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.5. Títulos de enzimas responsables de la resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus* entre cuatro agro-ecosistemas del sur de Chiapas, México.

Area	AchE <sup>1</sup>	$\alpha$ -NA <sup>2</sup>	$\beta$ -NA <sup>2</sup>	PNPA <sup>2</sup>	GST <sup>2</sup>	C P450 <sup>3</sup>
Banano	96.3 a	0.000929 a	0.000703 a	0.058364 a	0.177742 a	0.000256 a
Caña	92.4 bc	0.000641 bc	0.000465 bc	0.034797 b	0.109906 bc	0.000173 bc
Reserva	82.8 bd	0.000763 ade	0.000544 bde	0.041208 b	0.106615 bce	0.000131 bce
Ganado	92.7 bc	0.000563 bcf	0.000412 bcf	0.035254 b	0.138122 bde	0.000125 bde
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

El tamaño de muestra por área agroecológica fue 145-150 mosquitos.

<sup>1</sup> Media del porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa,

<sup>2</sup> Media nmol de producto /min/mg de proteína.

<sup>3</sup> Media nmol unidades equivalentes de citocromo P<sup>450</sup> mg de proteína.

<sup>abcdc</sup> Prueba de diferencia mínima significativa de Fisher.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Cuadro 1.6. Inhibición de la actividad del AchE por propoxur en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad por tipo de captura en las diferentes agro-ecosistemas en el sur de Chiapas. (media  $\pm$  dvSt).

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	95.3 $\pm$ 5.6 (41) <sup>1</sup>	97.7 $\pm$ 5.1 (151)	91.9 $\pm$ 8.2 (49)	98.2 $\pm$ 7.9 (31)
Cultivos Mixtos		86.0 $\pm$ 18.5 (9)	93.9 $\pm$ 7.9 (135)	92.5 $\pm$ 7.8 (45)
Reserva Ecológica		89.4 $\pm$ 9.5 (26)	84.7 $\pm$ 12.9 (115)	82.8 $\pm$ 10.5 (30)
Ganado	90.2 $\pm$ 9.9 (18)	93.7 $\pm$ 9.2 (162)	91.9 $\pm$ 15.7 (19)	
Valor de P	0.0157	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

<sup>1</sup> Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.7. Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad:  $\mu\text{mol}$  de  $\alpha$  esterasas por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas.

Media  $\pm$  Desv. estándar nmol de producto/min/mg/proteína.

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.00057 $\pm$ 0.00025 (41) <sup>1</sup>	0.00086 $\pm$ 0.00074 (157)	0.00169 $\pm$ 0.00186 (52)	0.00048 $\pm$ 0.00020 (31)
Cultivos Mixtos		0.00052 $\pm$ 0.00021 (11)	0.00072 $\pm$ 0.00051 (144)	0.00075 $\pm$ 0.00028 (57)
Reserva Ecológica		0.00043 $\pm$ 0.00016 (29)	0.00072 $\pm$ 0.00037 (126)	0.00053 $\pm$ 0.00021 (32)
Ganado	0.00037 $\pm$ 0.00011 (21)	0.00060 $\pm$ 0.00026 (167)	0.00046 $\pm$ 0.00026 (20)	
Valor de P	0.0009	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

<sup>1</sup> Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.8. Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad:  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$  esterases por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media  $\pm$  Desv. estándar  $\text{nmol}$  de producto/ $\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ .

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.00043 $\pm$ 0.00024 (41) <sup>1</sup>	0.00060 $\pm$ 0.00054 (157)	0.00147 $\pm$ 0.00162 (52)	0.00030 $\pm$ 0.00016 (31)
Cultivos		0.00037	0.00053	0.00054
Mixtos		$\pm$ 0.00015 (11)	$\pm$ 0.00060 (144)	$\pm$ 0.00023 (57)
Reserva		0.0003	0.00052	0.00038
Ecológica		$\pm$ 0.00012 (29)	$\pm$ 0.00030 (125)	$\pm$ 0.00019 (29)
Ganado	0.00030 $\pm$ 0.00008 (16)	0.00044 $\pm$ 0.00019 (164)	0.00037 $\pm$ 0.00018 (17)	
Valor de P	0.0423	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

<sup>1</sup> Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.9. Actividad de esterasa en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad, actividad del sustrato pNPA por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media  $\pm$  Desv. estándar  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$ .

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.03198 $\pm$ 0.02312 (41) <sup>1</sup>	0.05015 $\pm$ 0.05596 (157)	0.11356 $\pm$ 0.12274 (52)	0.04116 $\pm$ 0.03913 (29)
Cultivos Mixtos		0.02924 $\pm$ 0.01248 (11)	0.03862 $\pm$ 0.05134 (144)	0.03697 $\pm$ 0.02166 (56)
Reserva Ecológica		0.03109 $\pm$ 0.01790 (29)	0.03730 $\pm$ 0.02360 (126)	0.03773 $\pm$ 0.02331 (32)
Ganado	0.02069 $\pm$ 0.01494 (20)	0.03424 $\pm$ 0.02069 (164)	0.02148 $\pm$ 0.01180 (20)	
Valor de P	0.0516	0.0015	< 0.0001	0.7948

<sup>1</sup> Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.10. Actividad de GST en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad, en cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media  $\pm$  Desv. estándar nmol de producto/min/mg/proteína.

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.10612 $\pm$ 0.05300 (41) <sup>1</sup>	0.15614 $\pm$ 0.11844 (156)	0.36045 $\pm$ 0.44521 (52)	0.08041 $\pm$ 0.04574 (31)
Cultivos		0.08885	0.12542	0.09289
Mixtos		$\pm$ 0.02199 (11)	$\pm$ 0.12892 (142)	$\pm$ 0.03842 (57)
Reserva		0.09519	0.10249	0.12654
Ecológica		$\pm$ 0.03520 (29)	$\pm$ 0.04942 (126)	$\pm$ 0.04772 (32)
Ganado	0.10262 $\pm$ 0.04379 (21)	0.15095 $\pm$ 0.07897 (168)	0.12587 $\pm$ 0.0844 (20)	
Valor de P	0.7955	0.0027	< 0.0001	< 0.0001

<sup>1</sup> Tamaño de muestra entre paréntesis

Cuadro 1.11. Monooxigenasas dependientes de citocromo P450 en *Anopheles albimanus* de 1 día de edad, por cuatro tipos de captura, en diferentes agroecosistemas del sur de Chiapas. Media  $\pm$  Desv. estándar nmol unidades equivalentes de citocromo P450/mg/proteína.

ZONA	Trampa Animal	Corral	Cebo humano intradomiciliar	Cebo humano peridomiciliar
Banano	0.00017 $\pm$ 0.00012 (41) <sup>1</sup>	0.00019 $\pm$ 0.00033 (151)	0.00061 $\pm$ 0.00068 (52)	0.00007 $\pm$ 0.00005 (31)
Cultivos Mixtos		0.00016 $\pm$ 0.00010 (11)	0.00020 $\pm$ 0.00033 (144)	0.00012 $\pm$ 0.00009 (57)
Reserva Ecológica		0.0003 $\pm$ 0.00012 (29)	0.00052 $\pm$ 0.00030 (125)	0.00038 $\pm$ 0.00019 (29)
Ganado	0.00014 $\pm$ 0.00009 (21)	0.00013 $\pm$ 0.00009 (168)	0.00012 $\pm$ 0.00007 (20)	
Valor de P	0.3994	0.1110	< 0.0001	0.0075

<sup>1</sup> Tamaño de muestra entre paréntesis

## Porcentaje de Inhibición de AChE por Propoxur

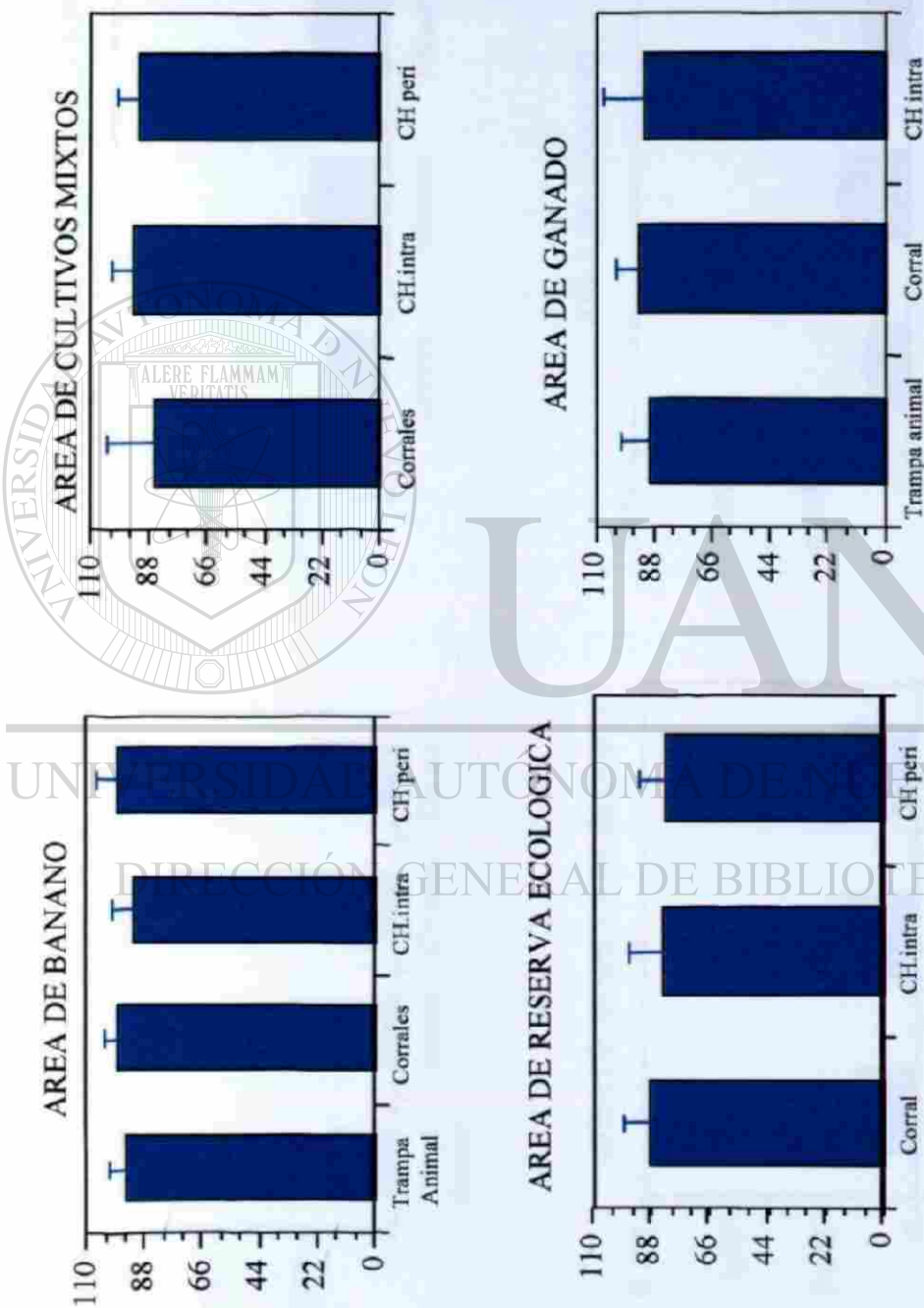


Fig 1.2. Porcentaje de Inhibición de la acetilcolinesterasa en *An.albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura, pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México.



## Actividad de pNPA

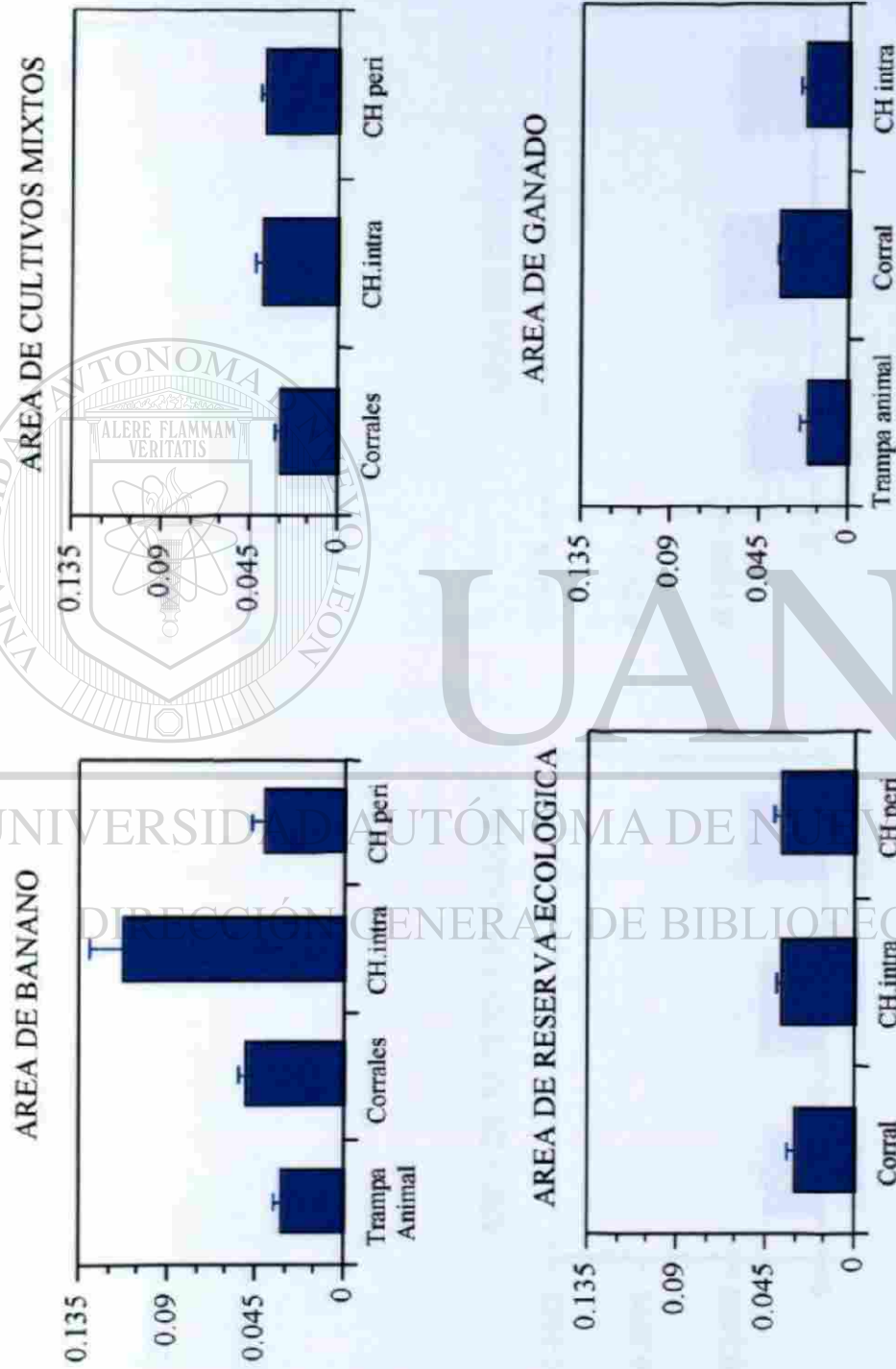


Fig 1.3. Actividad enzimática con el substrato pNPA de *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura en cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

# Actividad de GsT

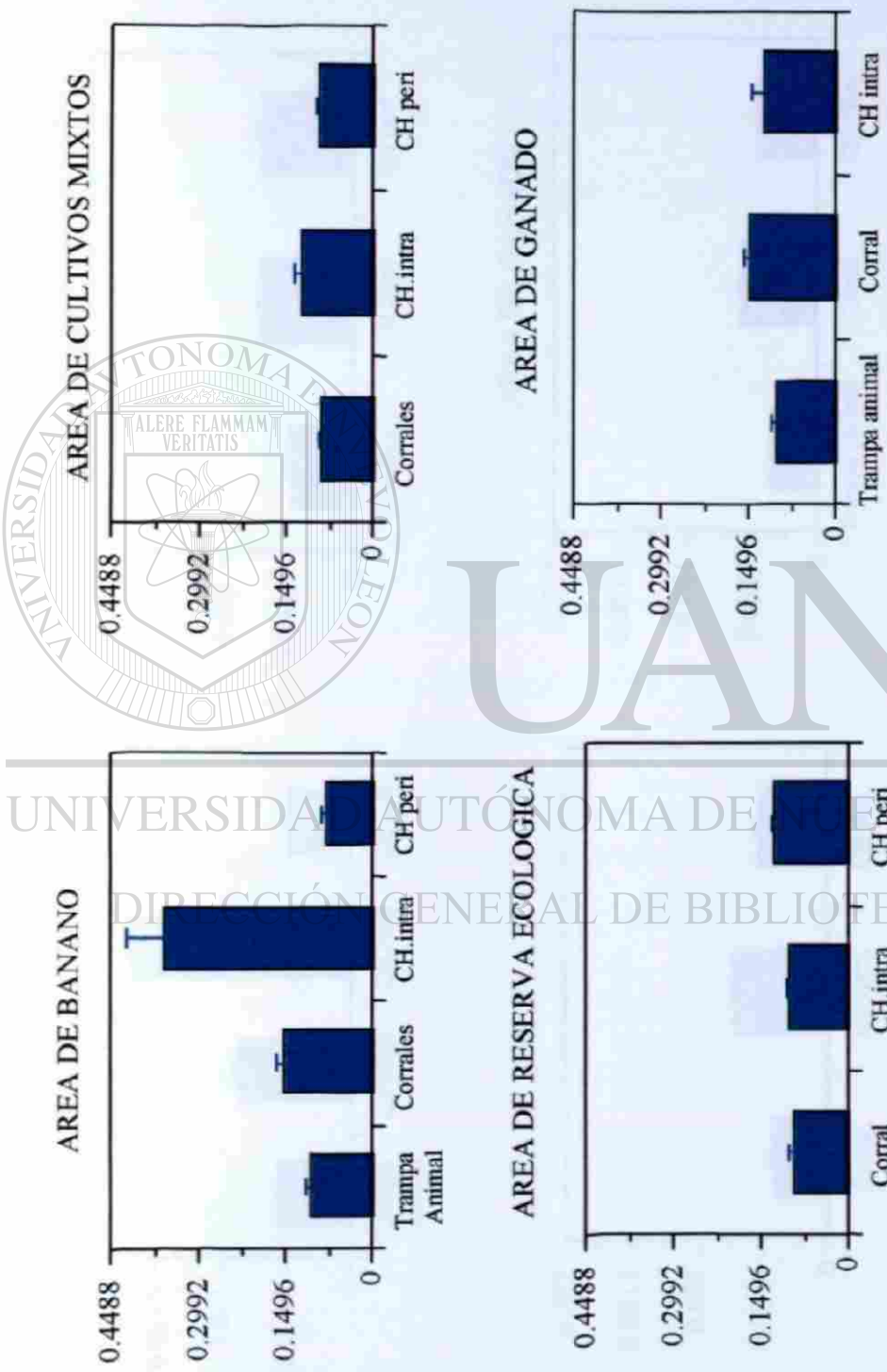


Fig 1.4. Actividad de glutatión *s*-transferasa (GsT) con el substrato dicloronitrobeneno *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) por tipo de captura en cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

# $\mu$ Moles de $\alpha$ -Naftol producido /min/mg de proteína

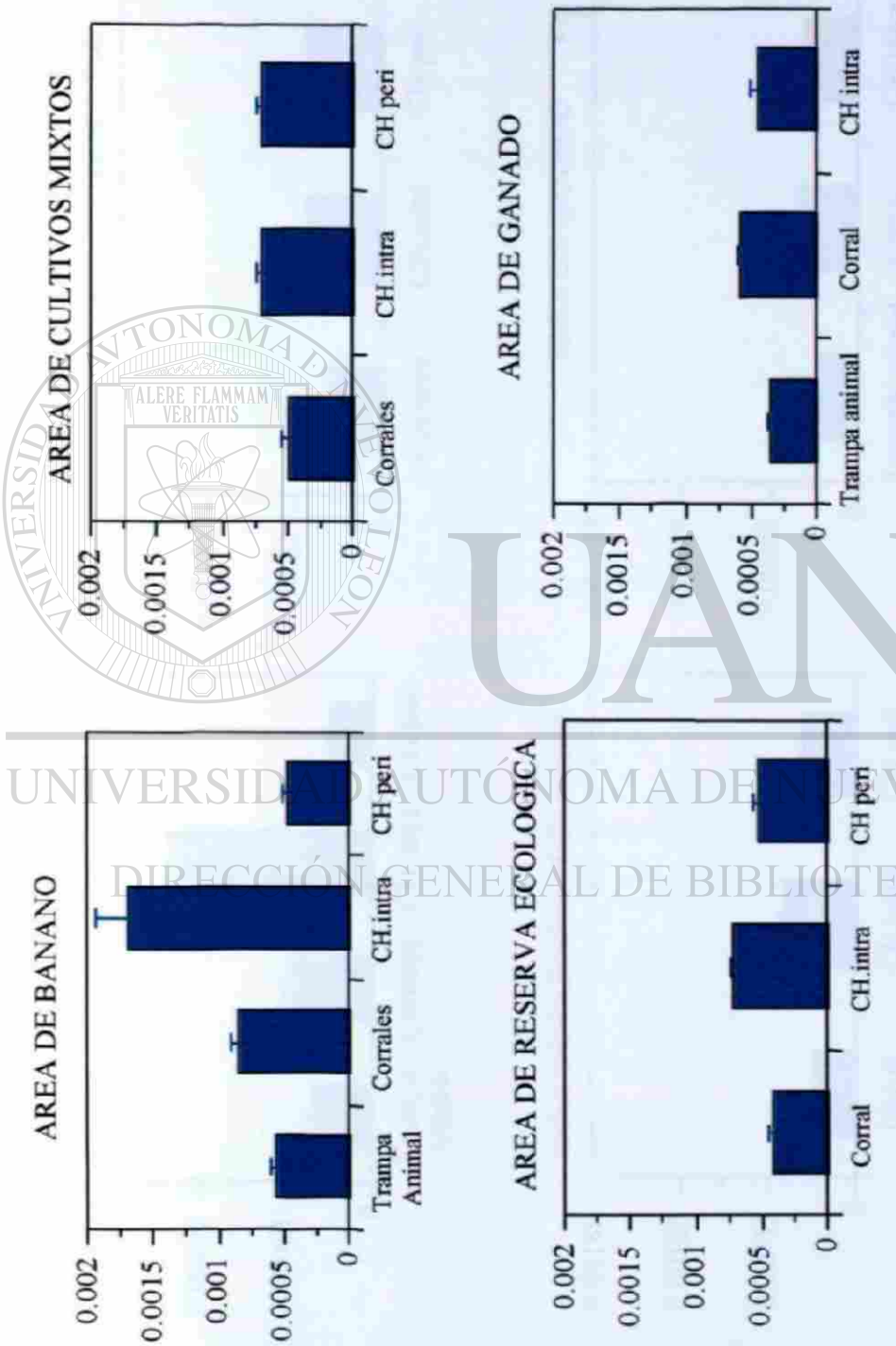


Fig 1.5. Actividad de esterases con el sustrato  $\alpha$ -naftil acetato en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

## $\mu$ Moles de $\beta$ -Naftol producido /min/mg de proteína

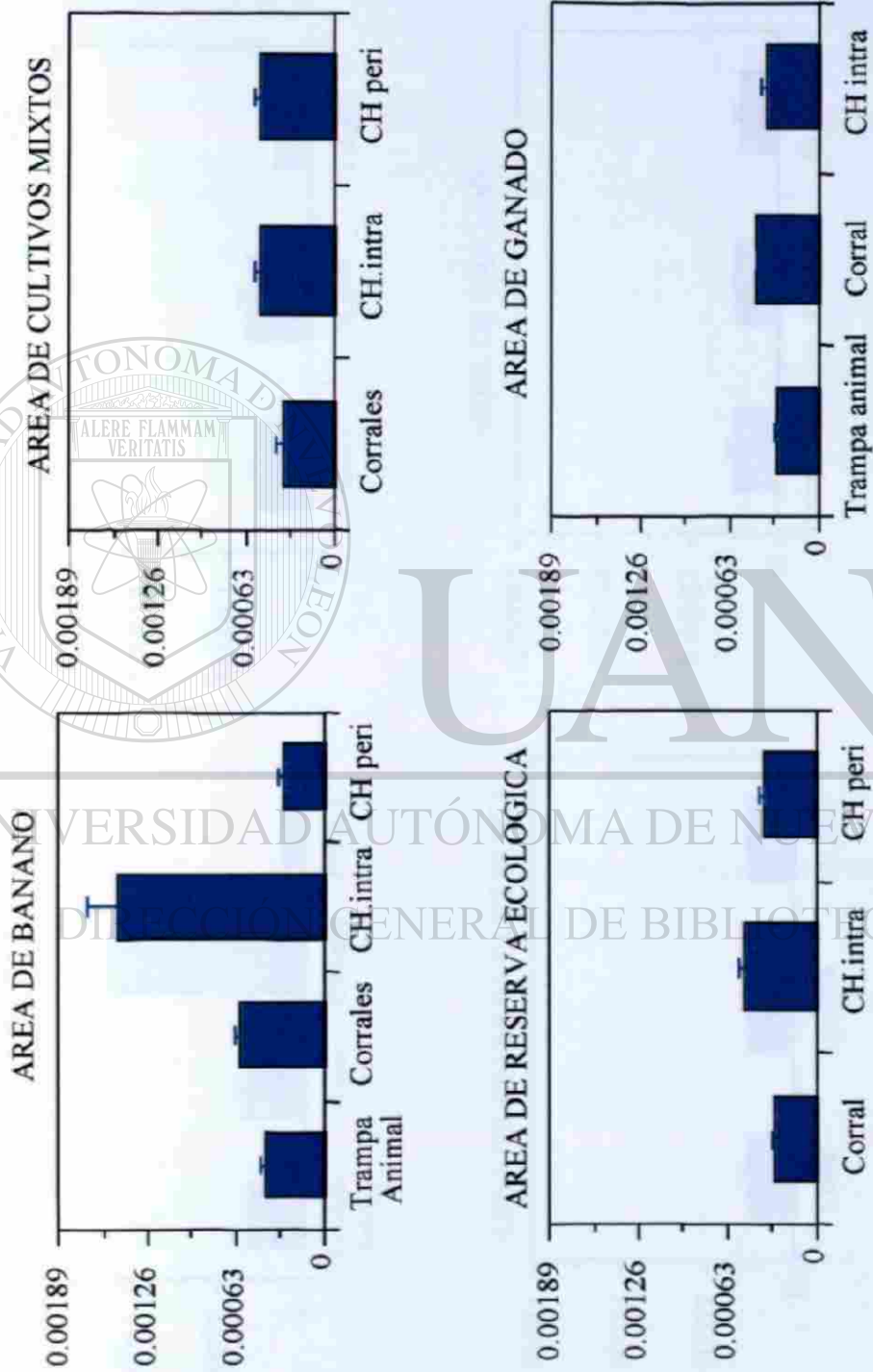


Fig 1.6. Actividad de esteratasas con el sustrato  $\beta$ -naftil acetato en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.

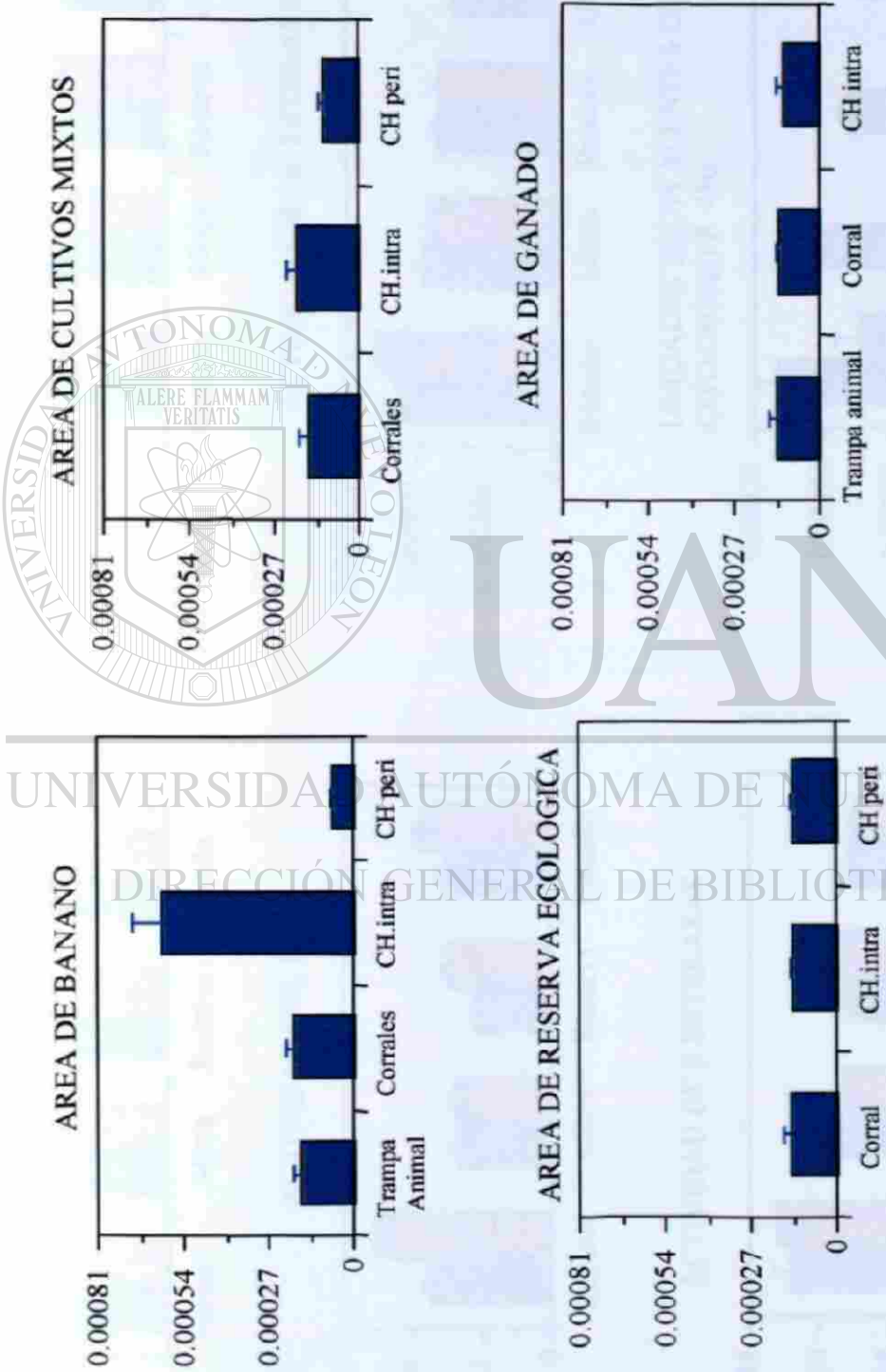


Fig 1.7. Promedio de citocromo P 450 que representa la actividad de monooxigenasas en *Anopheles albimanus* (F1 machos + hembras, de 1 día de edad) de diferentes localidades pertenecientes a cuatro áreas agroecológicas en el sur de Chiapas, México.



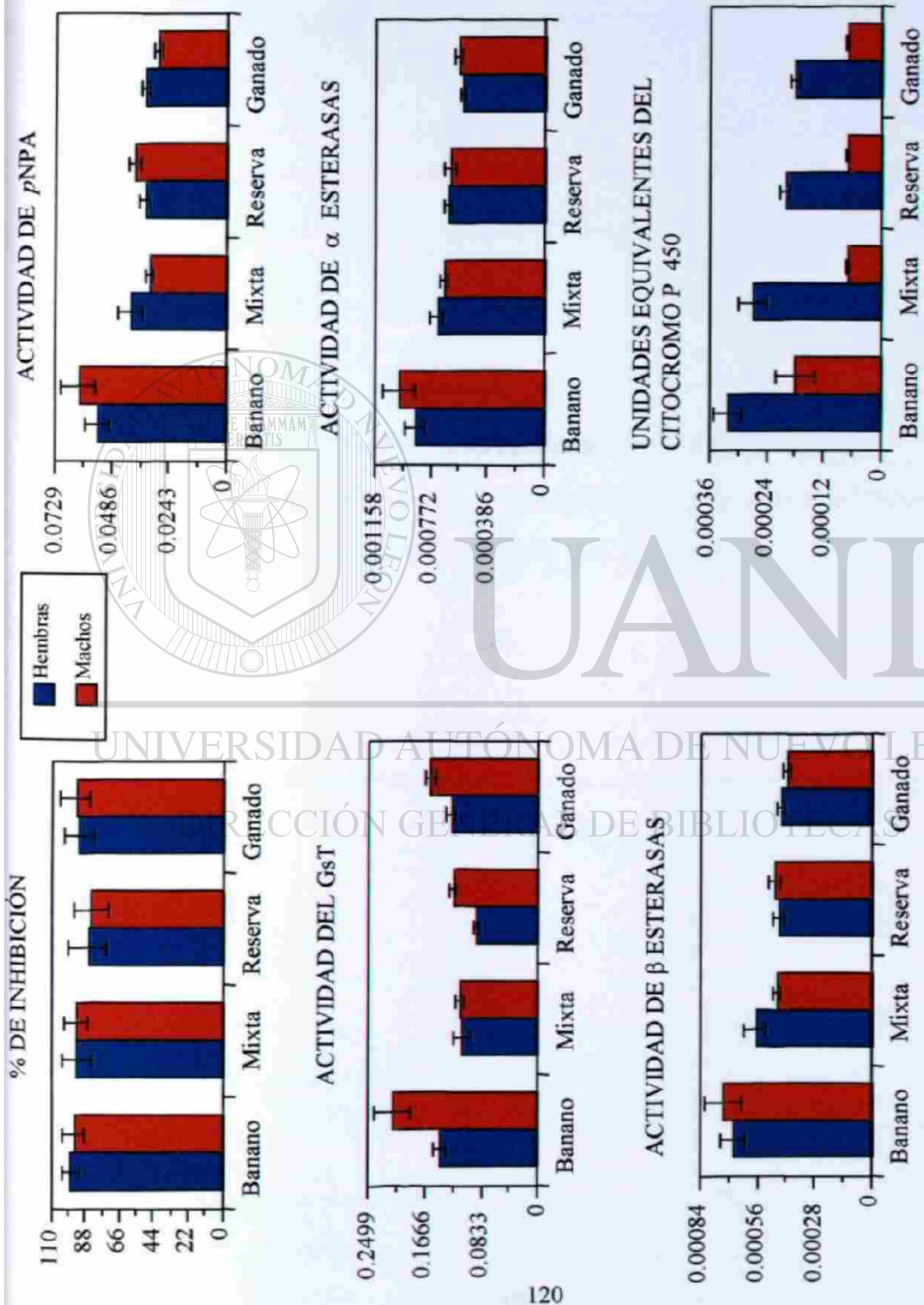
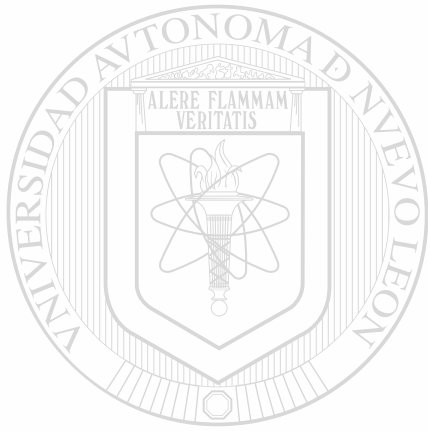


Fig 1.8. Pruebas bioquímicas por sexo de *Anopheles albimanus* en las cuatro áreas agroecológicas del sur de Chiapas, México. Mosquito F1 de 1 día de edad.



**CAPITULO 2**


UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**FLUJO DE GENES DE *ANOPHELES ALBIMANUS* EN EL AMBITO  
MICROGEOGRÁFICO EN EL SUR DE CHIAPAS Y MACROGEOGRÁFICO: EN  
MÉXICO UTILIZANDO RAPD-PCR.**

UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## RESUMEN

Se determinó la frecuencia de marcadores genéticos mediante la amplificación de regiones aleatorias del DNA genómico con iniciadores de 10 pares de bases utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (RAPD-PCR) en *Anopheles albimanus* en un estudio microgeográfico en la costa sur de Chiapas, y en un estudio macrogeográfico en la República mexicana. En un tamizado inicial de 60 iniciadores, se escogieron cinco (A05, A20, B04, B11, B18) que produjeron 46 marcadores genéticos en Chiapas y siete (A05, A08, A12, A19, A20, B04 y B11) que produjeron 51 marcadores moleculares en México.

Las distancias genéticas de Nei (1972) entre las localidades de Chiapas presentaron un rango de a 0.109. Las localidades con menor distancia genética fueron entre La Barra San José y Las Palmas (0.011). La mayor distancia genética se presentó entre las localidades de El Fortín y El Zapotal (0.109).

La distancia genética de Nei (1972) entre agroecosistemas presentó un rango 0.0078 a 0.0212. La menor distancia genética entre las cinco áreas se observó entre el banano y caña de azúcar (0.0078), mientras que la mayor distancia genética fue entre banano y reserva ecológica (0.0212).

Al comparar las distancias genéticas entre los estados de la República, se encontró que la mayor fue entre el estado de Jalisco comparado con Chiapas (0.1975), Tabasco (0.2079) y Guatemala (0.1499), mientras que las menores distancias genéticas se presentaron entre los estados de Guerrero y Colima (0.0203), Chiapas y Tabasco (0.0254).

Los valores de  $Nm$  fluctuó entre 1.8 a 3.3 (Método de Wright), en el área de ganado y área de reserva ecológica respectivamente. El valor promedio de  $F_{ST}$ , por los tres métodos propuestos (Wright; Weir y Cockerham; Lynch y Milligan) entre las 20 localidades en Chiapas fueron:  $F_{ST} = 0.117 (\pm 0.073)$ ;  $0.088 (\pm 0.080)$  y  $0.109 (\pm 0.153)$  y el valor de  $Nm$  a partir de  $F_{ST}$  calculado fueron 1.9, 2.6 y 2.0 respectivamente. El flujo génico entre los cinco agroecosistemas fue  $Nm = 1.8$  a 2.4 (calculado a partir de los valores de  $F_{ST}$  de Wright).

Los valores promedios de  $F_{ST}$  entre estados de la República mexicana fueron 0.169 ( $\pm 0.122$ ), 0.149 ( $\pm 0.136$ ) y 0.186 ( $\pm 0.194$ ) por los métodos de Wright, Weir y Cockerham; y Lynch y Milligan, respectivamente. Los valores de  $Nm$  por los tres métodos fue: 1.2, 1.4 y 1.1 respectivamente.

El dendrograma con las 20 localidades mostró una incipiente agrupación de localidades por agroecosistemas. El mayor valor de análisis Bootstrap (87%) se presentó entre dos localidades de la zona de reserva ecológica Las Palmas y La Barra San José. Las localidades de Álvaro Obregón y Cabildo presentaron un 54 % de consistencia, ambas pertenecientes a la zona de cultivos mixtos. Mientras que Brisas del Mar y Mareas del Suchiate presentaron 55 % ambas localidades pertenecientes a la zona de banano.

El dendrograma por agroecosistemas unió la zona de Caña de Azúcar con la zona de Banano, con un 87% de consistencia en el análisis de Bootstrap.

El dendrograma en el ámbito nacional mostró dos ramas principales, una agrupa los estados del norte de México y otra los estados del sur. El estado de Jalisco fue colocado como aparte de estas dos ramas de similitud genética. El análisis Bootstrap indicó una alta consistencia (100 %) entre el estado de Chiapas y Tabasco, y agrupó con 86 % de consistencia a los estados de Nayarit, Sinaloa, Colima y Guerrero.

En un programa hipotético de control genético utilizando mosquitos transgénicos refractarios a la malaria será necesario conducir liberaciones separadas de mosquitos modificados genéticamente en cada uno de los agroecosistemas.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## INTRODUCCION

*Anopheles albimanus* es el principal vector de paludismo ocasionado por *Plasmodium vivax* fenotipo VK210 en la planicie costera de Chiapas (Rodríguez et al., 2000). Las poblaciones de este importante vector son muy abundantes en la temporada de lluvias (mayo a octubre) y disminuyen durante la temporada de secas. Ocurren en una diversidad de hábitat y presentan alta variación fenotípica pupal (Faran, 1980). En un estudio sobre la posible existencia de sub-poblaciones o subespecies con preferencia por alimentarse de humanos, *An. albimanus* presentó un comportamiento oportunista en la búsqueda de hospederos (Arredondo et al., 1992). Estudios previos han demostrado variaciones en las poblaciones de campo por ejemplo: morfología de huevos (Rodríguez et al., 1992), fenotipos larvales con susceptibilidad diferencial a *Plasmodium vivax* (Chan et al., 1994) y variabilidad en la resistencia a insecticidas en mosquitos capturados por diferentes métodos (Peñilla et al., 1998).

---

Con el incremento en la resistencia a insecticidas es necesario implementar una nueva estrategia para el control de vectores, mediante la utilización de mosquitos alterados genéticamente refractarios a la infección con *P. vivax*, pero antes de liberar los mosquitos alterados genéticamente es necesario determinar el flujo de genes en poblaciones de campo y la situación ecológica de los focos endémicos.

Williams et al. (1990) desarrolló una técnica para determinar polimorfismo en el DNA utilizando iniciadores únicos de 10 pares de bases de secuencia arbitraria. Esta técnica se le denominó: DNA polimórfico amplificado aleatoriamente y se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (siglas en ingles RAPD-PCR). Esta técnica es una

herramienta útil para estudiar la estructura genética de poblaciones de diversos organismos incluyendo los insectos. Esta técnica es rápida, fácil de realizar en casi cualquier laboratorio y no utiliza productos radioactivos. La técnica de RAPD requiere pequeñas cantidades de DNA, no se necesita información posterior de secuenciación y revela gran cantidad de polimorfismo. Marcadores RAPD han sido probados en una gran variedad de insectos como áfidos, coleópteros y mosquita blanca (Black, et al., 1992; Gawel, et al., 1993; Brown, et al., 1997). Algunos grupos de la familia culicidae han estado sujetos a estudio mediante el patrón de bandas de RAPD-PCR para diferenciar especies y poblaciones de *Aedes (Stegomia) scutellaris* (Kambhampati, et al., 1992), y también fue utilizada esta técnica para distinguir poblaciones geográficas de especies del grupo *Stegomia Aedes aegypti aegypti* versus *Ae. aegypti formosus* (Ballinger-Crabtree et al., 1992). Mediante esta técnica molecular se logró diferenciar exitosamente a las dos principales especies transmisoras de malaria en África: *An. gambiae* y *An. urabiensis*, pertenecientes al complejo *An. gambiae*. Para este estudio se tamizaron 57 primers de los cuales solo se seleccionaron 13 (Wilkerson, et al., 1993). También se usó la técnica de RAPD-PCR para determinar la estructura genética poblacional de *Ae. albifasciatus* en Argentina (De Sousa, et al., 1999).

## IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

*Anopheles albimanus* es una especie neotropical considerada como el vector primario de paludismo en bajas elevaciones, especialmente en las costas de ambos océanos en México, Centroamérica, el norte de Sur América y el Caribe (Rodríguez y Loyola, 1989; Frederickson, 1993). Las poblaciones de *An. albimanus* localizadas en esta extensa área muestran diferencias en su ecología larvaria, comportamiento de picadura, tasas de infección con *P. vivax*, resistencia a insecticidas, pero se desconoce si la población de esta especie manifiesta flujo de genes continuo a lo largo de su distribución geográfica o si existe algún tipo de restricción y dónde se presenta. El conocimiento del flujo de genes, una indicación del intercambio de individuos entre poblaciones, es importante para entender los patrones de dispersión del paludismo, es decir, la dinámica de transmisión del mismo. Con el conocimiento del flujo de genes se podrá determinar la velocidad de dispersión de genes por ejemplo genes de resistencia a insecticidas y susceptibilidad a *P. vivax*.

La rápida diseminación de cepas multi-resistentes a los medicamentos de parásitos de paludismo humano (Schapira et al., 1993) y resistencia a insecticidas de los vectores de paludismo (Raymond et al., 1991), resalta la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control más eficientes. Una estrategia podría ser reemplazar las poblaciones de mosquitos de campo, con poblaciones de la misma especie alterados genéticamente incapaces de transmitir el parásito *Plasmodium*, utilizando para este propósito la manipulación genética de los vectores. Sin embargo, antes de la ejecución de una estrategia de este tipo, es necesario determinar el flujo génico entre poblaciones de campo y, se debe determinar si

existen barreras geográficas que impidan el libre movimiento de mosquitos (Slatkin, 1987). La estimación del flujo de genes se realiza por métodos directos e indirectos. Dentro de los métodos indirectos se encuentra la técnica molecular DNA polimórfico amplificado arbitrariamente (RAPD).

El propósito de este estudio fue determinar la magnitud del flujo de genes en poblaciones vecinas en el estado de Chiapas bajo diferentes condiciones de habitat larvario, uso del suelo, aplicación de insecticidas y disponibilidad de hospedero. También se determinó el flujo génico entre diferentes estados de la República los cuales comprende desde el estado de Chiapas hasta Sinaloa por la vertiente del pacífico, mientras que la vertiente del atlántico comprende una localidad de la Selva Lacandona y de Tabasco utilizando marcadores genotípicos obtenidos por medio de la técnica RAPD-PCR.



---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## ANTECEDENTES

### **Genética de Poblaciones.**

Todos los organismos viven, se reproducen y mueren. Sin embargo, no son los individuos los que evolucionan sino las poblaciones. La evolución es el cambio en la frecuencia de genes que ocurren en un grupo de genes en una población con el tiempo. Por lo tanto, la herencia es la relación entre la vida de los organismos y la evolución de las poblaciones (Audesirk y Audesirk, 1993).

Todas las células de los organismos contienen un depósito de información genética, codificada en el DNA. Un gen es un segmento de DNA ubicado en un lugar específico de un cromosoma. Su secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína que por lo general, es una enzima que cataliza una reacción específica en la célula. Secuencias de nucleótidos ligeramente diferentes en un sitio determinado del gen, denominados alelos, generan diferentes formas de la misma enzima. Por lo regular, hay dos o más alelos de un sólo gen. El individuo que tiene alelos del mismo tipo es homocigoto y el que los posee de diferente tipo es heterocigoto. Los alelos específicos que tienen los cromosomas de un organismo (su genotipo) establecen sus características físicas y conductuales (su fenotipo) al interactuar con el ambiente (Klug y Cummings, 1996).

La genética de poblaciones, es el estudio de la variación genética en poblaciones naturales y los factores que influyen esta variación. Entendiendo la variación genética en poblaciones de vectores, se puede entender el papel del vector sobre la epidemiología de la enfermedad. Los factores que provocan la variación genética en especies vectoras también influyen en la variación de la capacidad vectorial y características de la competencia

vectorial (Tabachnick y Black, 1994). La rama de la genética llamada genética de poblaciones, tiene que ver con la frecuencia, distribución y herencia de alelos en las poblaciones (Klug y Cummings, 1996). Una población es un grupo de individuos que se cruzan entre sí libremente en un área restringida (Winchester, 1985). Las poblaciones son dinámicas, ellas pueden crecer y extenderse, o contraerse y desaparecer por medio de cambios en las tasas de nacimientos o muertes. Ellas pueden también cambiar por migración o por unirse con otras poblaciones. Cambios en la organización, localización y tamaño de la población pueden llevar a cambios en la estructura genética de la población (Klug y Cummings, 1996). El grupo de información genética que contienen todos los miembros de la población que se entrecruzan se conoce como grupo de genes (gene pool).

Una práctica utilizada para el estudio de la estructura genética poblacional es la medición de la frecuencia de un alelo determinado que controla una característica conocida. Esto es posible una vez que se establece el modo de herencia y el número de diferentes alelos presentes en la población. La frecuencia de alelos no puede ser siempre medida directamente debido a que en muchos casos, se pueden observar sólo los fenotipos, pero no los genotipos. En el caso de que los alelos son expresados como codominantes, los fenotipos son equivalentes a los genotipos, y las frecuencias alélicas pueden ser medidas directamente. Tal es el caso de la herencia autosomal de los grupos sanguíneos MN en humanos. Si uno de los alelos fuera recesivo, los heterocigotes no serían fenotípicamente idénticos a los individuos dominantes homocigotos, y la frecuencia de los alelos no podría ser directamente determinada. En tales casos los genetistas de poblaciones utilizan métodos matemáticos para determinar la frecuencia alélica y predecir la aparición de caracteres específicos en una población. Uno de los instrumentos matemáticos más útiles

es conocido como el principio de Hardy-Weinberg. Este principio fue desarrollado en 1908 por un matemático inglés Godfrey H. Hardy y un médico alemán, Wilhelm Weinberg. Básicamente, sostiene que: "En una población larga con apareamiento aleatorio la frecuencia de genes y genotipos permanecerán constantes de una generación a otra generación, en la ausencia de selección, migración y mutación,". La ley de Hardy-Weinberg es uno de los conceptos fundamentales en genética de población. Las frecuencias de alelos en una población permanecerán constantes durante muchas generaciones sólo si se cumplen las siguientes condiciones: (1) no debe haber mutación; (2) no debe haber flujo de genes, no debe haber migración neta de alelos hacia adentro o fuera de la población, y la deriva génica debe ser aleatoria. (3) La población debe ser infinitamente larga, (4) el apareamiento debe ser al azar, (5) todos los genotipos son igualmente viables y fértiles, deben reproducirse, sin selección natural. Tales condiciones rara vez, si no es que nunca, se cumplen en la naturaleza. Entender por qué no se cumplen nos lleva a comprender los mecanismos de la evolución (Klug y Cummings, 1996).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### **Mecanismos de micro evolución.**

Las cinco causas principales para el cambio evolutivo dentro de una población son:

mutación, flujo de genes (migración), deriva génica, apareamiento no aleatorio y selección natural.

**Mutación:** Es la fuente fundamental de la variabilidad genética. Las células tienen mecanismos eficientes que protegen la integridad de sus genes. Existen enzimas que examinan al DNA constantemente reparando los defectos causados por la radiación, el daño químico o los errores en el copiado. No obstante pueden suceder cambios en la secuencia

nucleotídica. Estos cambios son las mutaciones. Algunos cambios en el DNA casi no tienen efecto en el organismo, pero es probable que la mayor parte, son dañinos y unos cuantos pueden ser benéficos o ayudar al organismo a enfrentar ambientes nuevos o diferentes. Las mutaciones actúan para crear nuevos alelos.

Flujo de genes (migración): Frecuentemente las especies de plantas o animales se dividen en subpoblaciones que en cierta medida están geográficamente aisladas. Diferencias en la tasa de mutación y presión de selección pueden establecer diferentes frecuencias alélicas en las subpoblaciones. La migración ocurre cuando los individuos se mueven entre estas poblaciones. La migración puede ser registrada como el flujo de genes entre dos poblaciones que estuvieron aisladas, pero ahora están en contacto (Slatkin, 1987; Klug y Cummings, 1996).

Los movimientos migratorios de ciertos individuos de una población a otra y que dejan descendencia fértil producen flujo de genes entre poblaciones. En biología la palabra migración tiene dos significados diferentes. En el contexto más conocido la palabra migración se refiere al movimiento estacional de muchas especies entre los terrenos veraniegos de reproducción y los refugios invernales. Sin embargo en biología evolutiva, la migración es el flujo de genes entre poblaciones.

El flujo de genes disemina alelos provechosos a la especie. Si suponemos que surge un alelo nuevo en una población y que éste beneficia a los organismos que lo poseen. La migración puede llevar este alelo nuevo a otras poblaciones de la especie. El flujo de genes ayuda a mantener a todos los organismos en una región extensa como una especie. Si los

migrantes llevan constantemente genes de una población a otra entonces las poblaciones nunca podrán desarrollar diferencias significativas en las frecuencias de alelos. El flujo de genes se define como el número promedio de migrantes entre poblaciones por cada generación (Slatkin, 1987).

Cuando dos poblaciones difieren en la frecuencia de genes e intercambian migrantes, la frecuencia génica en cada población cambiará dependiendo de la proporción de individuos migrantes. Si una población de individuos  $AA$  recibe inmigrantes de una población de individuos  $BB$ , la frecuencia de  $A$  declinará dependiendo en el número de inmigrantes  $BB$ . Si las dos poblaciones intercambian migrantes continuamente, la migración causará que las dos poblaciones tengan similar frecuencia génica (Tabachnick y Black, 1994).

La proporción de migrantes relativo al total de la población es llamada tasa de migración ( $m$ ). La tasa de migración determina que tan rápido la migración causará que la población llegue a ser genéticamente similar. El parámetro  $m$  es importante, para artrópodos vectores de enfermedades debido a que éste estima el potencial para la diseminación de un patógeno por un artrópodo de una población a otra (Tabachnick y Black, 1994).

La relación entre el valor de  $Nm$  y  $F_{st}$  es como sigue (Sork et al., 1998).

Relación entre  $F_{ST}$  y  $N_m$ .

$N_m$	$F_{ST}$	Explicación
0.025	0.50	Extremadamente alta diferenciación entre subpoblaciones
0.5	0.33	Muy alta diferenciación entre subpoblaciones
1	0.2	Gran diferenciación entre subpoblaciones
2	0.11	Moderada diferenciación entre subpoblaciones
4	0.06	Baja o moderada diferenciación entre subpoblaciones

**Deriva génica:** Una de las suposiciones de la ley de Hardy-Weinberg es el tamaño infinito de la población. Las poblaciones pequeñas están sujetas a cambios aleatorios en la frecuencia de alelos. Es mucho más probable que los sucesos fortuitos cambien la frecuencia de alelos en una población pequeña que en una grande, debido a un proceso llamado deriva génica. Dos casos especiales de deriva génica llamados población con efecto de cuello de botella y efecto fundador, ilustran aun más las enormes consecuencias que puede tener el tamaño pequeño de la población en las frecuencias de alelos de una especie.

Cuello de botella es cuando una especie se reduce drásticamente su tamaño poblacional, de tal forma que solo unos pocos individuos proporcionan genes a la población total futura. La población que pasa por un cuello de botella puede resultar en diferencias en la frecuencia alélica y reducción en la variabilidad genética. Aun y cuando la población abunda y la especie llega a ser común, estos efectos genéticos del cuello de botella pueden permanecer por cientos o miles de generaciones (Audesirk y Audesirk, 1993).

El efecto fundador es un caso especial de cuello de botella en el cual colonias aisladas se establecen por un pequeño número de individuos. Si el aislamiento de la población fundadora se mantiene por largo periodo de tiempo, la nueva población que se desarrolle en esa área diferirá grandemente de la población original (Audesirk y Audesirk, 1993).

Apareamiento no aleatorio: El apareamiento dentro de una población casi nunca es aleatorio. Es raro que los organismos se apareen al azar. Entre los animales hay tres formas comunes de apareamiento no aleatorio: la reproducción tipo harén, el apareamiento discriminado y la selección sexual.

Selección natural: La selección natural es un proceso en el cual ciertos organismos de una población particular ante las condiciones cambiantes del medio ambiente, son seleccionados de acuerdo a la suma de sus adaptaciones. La selección natural es el mecanismo más importante en la evolución de las especies.

Hay tres tipos de selección natural:

1. La selección direccional. Los individuos con características que son diferentes del promedio en una dirección (por ejemplo, más pequeños) se ven favorecidos en comparación con los individuos promedio y los que difieren del promedio en la dirección opuesta.
2. Selección estabilizadora. Los individuos de "valor promedio" para una característica se ven favorecidos sobre los individuos de valores extremos.

3. Selección disruptiva. Los individuos de características extremas se ven favorecidos sobre los individuos con valores promedio.

La selección natural ocurre como resultado de las interacciones de los organismos con las partes bióticas (viviente) y abiótica (no viviente) de sus ambientes. Cuando dos o más especies interactúan estrechamente como para ejercer presiones selectivas mutuas durante largos períodos, ambas evolucionan como respuesta a ello. Dicha co-evolución puede ocurrir como resultado de cualquier tipo de relación entre organismos, incluidas la competencia, la relación depredador-presa y la simbiosis (Audesirk y Audesirk, 1993).

#### Propiedades de los marcadores RAPD

Los marcadores genéticos amplificados por la técnica DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) puede ser usada para la identificación de diversidad genética entre poblaciones conespecíficas de algunas especies. Es un método simple y rápido utilizado para generar marcadores genéticos y patrón de huellas genéticas, con la ventaja de que no se requiere conocimiento del genoma bajo investigación. Las condiciones de amplificación de RAPD difieren de la PCR standard en que únicamente se emplea un único iniciador aleatorio. RAPD es utilizado para amplificar DNA molde sobre la base que el genoma nuclear contiene varios sitios complementarios al iniciador, cercanos uno de otro en orientación invertida. Como los iniciadores se unen en la cadena a diferentes distancias, esto trae como consecuencia la amplificación de segmentos del DNA de longitud variable. RAPD-PCR utiliza un primer de 10 pb de secuencia aleatoria con un mínimo contenido de GC de 60 % para amplificar muchas regiones en el genoma simultáneamente (Williams et



al., 1990). Durante la reacción de RAPD-PCR, el primer se alinea al DNA genómico molde a baja temperatura (35 – 36°C). En teoría el primer se alinea a muchas regiones del genoma simultáneamente. Sin embargo, sólo ocurre la amplificación geométrica en aquellas regiones en las cuales al final del 3' de la cara del primer alineado el uno al otro sobre la cadena contraria no es separadas a más de 3 kb. Estas condiciones sugieren que los sitios del alineamiento del primer pueden ser inversiones repetidas (Tabachnick y Black, 1994).

Los polimorfismos en regiones amplificadas por RAPD-PCR son típicamente manifestadas como la presencia o ausencia de una banda en geles de electroforesis del material amplificado entre individuos. Muchos estudios han mostrado que la mayoría > 90% de las bandas amplificadas por RAPD-PCR son heredadas en forma Mendeliana como alelos dominantes. Esto significa que un individuo que manifiesta la banda puede poseer dos copias (homocigoto dominante) o una sola copia (heterocigoto dominante) del alelo amplificable de un locus RAPD. El individuo homocigoto recesivo no manifiesta la banda. La dominancia de la mayoría de los alelos RAPD-PCR presentan un problema para estudios de genética de poblaciones. Los patrones de apareamiento en las poblaciones no pueden ser estudiados, porque para probar el equilibrio Hardy-Weinberg se requiere de la identificación de ambos alelos en un locus. Si hacemos la suposición de que una población está en equilibrio Hardy-Weinberg, entonces la frecuencia del alelo recesivo (q) puede ser calculado como la raíz cuadrada de la frecuencia del homocigoto recesivo individual (q<sup>2</sup>) (no banda) (Apóstol et al., 1996). Con esta suposición todas las técnicas que utilizan frecuencias alélicas pueden ser aplicadas a estudios de variación de RAPD-PCR (Tabachnick y Black, 1994). Muchos de los análisis en la genética de poblaciones son de

diferenciación espacial (FST de Wrights y distancia genética), pueden ser aplicados a los marcadores RAPD (Lynch y Milligan, 1994; Black, 1996; Apóstol et al., 1996). Los RAPD-PCR han sido criticados por la falta de reproducibilidad (Black, 1993). Sin embargo, este problema puede ser superado con la cuidadosa estandarización de la técnica, reactivos y proveedores de reactivos. La facilidad con la cual se puede encontrar polimorfismo se ve balanceado con la frecuencia con la cual aparecen artefactos. Se menciona que la razón de la ocurrencia de estos artefactos es por el uso de primers extremadamente cortos para la amplificación del DNA (Favia et al., 1994).

Los marcadores RAPD se caracterizan por ser rápidos en la detección de marcadores, de hecho se obtienen de 50 -60 marcadores de DNA polimórficos en 4 -5 reacciones de PCR. Otra ventaja es que la identificación no radioactiva de los productos, velocidad (un grupo de 50 - 60 insectos pueden ser analizados dentro de 24 -48 h), y la capacidad para llevar a cabo el procedimiento sin ninguna información previa de la secuencia. El análisis de los marcadores RAPD ha sido tradicionalmente realizado en geles de agarosa al 1.2 -1.5% con bromuro de etidio (Apóstol et al., 1993, Apóstol et al., 1996).

Algunas de las desventajas de los RAPD, es la dificultad de distinguir muchos de los polimorfismos aparentes usando esta técnica a partir de artefactos de PCR. La PCR no siempre es un proceso preciso que proporciona exactamente el mismo resultado. A veces la menor diferencia en la calidad del DNA molde, causan diferencias en un producto particular de individuo a otro. Debido a que algunos de los resultados RAPD se hacen a partir de la evidencia negativa ( la falta de una banda en el gel), es crítico el preciso control de las condiciones de amplificación para la interpretación confiable del resultado.

También, la ausencia de un producto en una reacción particular puede ser causado por diferencias genómicas, como sustitución nucleotídica en uno a ambos sitios de primers, desigualdad de recombinación o replicación entre los sitios creados, a lo largo de una inserción que no se amplificó bien, o inversiones en el sitio de unión del primer (Wilkerson et al., 1993; Favia et al., 1994).

Por último, loci homólogos son muy difíciles de identificar, haciendo que los RAPD dificulten el uso de comparaciones interpoblacionales o interespecíficas. Este problema puede ser resuelto mediante la clonación y secuencia del producto RAPD-PCR, y usando un rediseño de primer, locus-específico para amplificar un locus homólogo a partir de otros individuos o especies (Wilkerson et al., 1993).

#### Ejemplos del Uso de RAPD-PCR

Desde sus inicios el uso de la técnica RAPD-PCR ha creado polémica por la falta de reproducibilidad, sin embargo con esta técnica se han realizado trabajos como a continuación se exponen:

La técnica se utilizó exitosamente para diferenciar las dos principales especies del complejo *An. gambiae*. Se aplicó la técnica de RAPD-PCR para diferenciar a *An. gambiae* s.s. y *An. arabiensis*, mediante un tamizaje inicial de 57 primers, que produjeron 377 bandas, de las cuales 295 fueron diferentes entre las dos especies. Sobre la base de reproducibilidad, interpretabilidad y simplicidad, se escogieron sólo 13 primers para análisis posteriores del DNA, utilizando 30 individuos de cada especie. Finalmente se escogieron 7 primers que produjeron bandas diagnósticos (Wilkerson et al., 1993)

En otro estudio se realizó un análisis genómico a las dos principales especies transmisoras de malaria del complejo *An. gambiae* que son *An. gambiae* s.s. y *An. arabiensis*. Se utilizaron 80 diferentes primers, de los cuales cerca de la mitad fueron capaces de detectar polimorfismo. La otra mitad de los primers no amplificaron o produjeron un patrón de bandas idénticas. Con estos primers seleccionados se logró obtener 60 segmentos diferentes del DNA, que fueron diferentemente amplificados en diferentes cepas de *An. gambiae* s.s. y *An. arabiensis* (Favia et al., 1994).

*Anopheles darlingi* fue sujeto a análisis con el propósito de determinar si estaba constituido de un complejo de especies. Para ello, se utilizó análisis de isoenzimas, marcadores RAPD y marcadores ITS2 (internal transcribed spacer 2). Los resultados mostraron que la población de *An. darlingi* procedente de Belice en Centro América, y Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana Francesa, Perú y Venezuela en Sur América, demostraron similitud genética, que es consistente con la existencia de una sola especie y se sugirió que el flujo de genes es continuo a través del rango geográfico de esta especie (Manguin et al., 1999).

Utilizando RAPD-PCR se logró diferenciar 4 especies del complejo de especies *An. (Nyssorhynchus) albitarsis*. Los ejemplares se obtuvieron del sur de Brasil, Paraguay, y norte de Argentina. Para ello se realizó primeramente un tamizaje de 65 iniciadores o primers de los cuales se identificaron 12, que produjeron 19 marcadores genéticos específicos de especie y 4 marcadores comunes a 2 o más especies. Los resultados de este

estudio mostraron que los RAPD-PCR son una herramienta útil para caracterizar complejos de especies hermanas (Wilkerson et al., 1995).

Se han realizado intensos estudios con el vector del dengue y fiebre amarilla *Ae. aegypti*. En un estudio con este vector de dengue se diferenciaron genéticamente mediante RAPD las subespecies *Ae. aegypti aegypti* de *Ae. aegypti formosus* indicando que la técnica de RAPD puede ser útil en estudios de taxonomía molecular de artropodos y en estudios epidemiológicos sobre la relación que existe entre poblaciones separadas geográficamente y movimiento de vector (Ballinguer-Crabtree et al., 1992).

Otro ejemplo sobre el uso de RAPD en Aedinos fue el trabajo realizado en poblaciones de *Ae. albifasciatus*, principal vector de virus de encefalomiелitis equina del oeste, en 6 poblaciones de Argentina Central. Se encontró un rango de heterosis esperada entre 0.19 y 0.31, el cual es un valor  $\approx 3$  veces mayor al obtenido por 16 aloenzimas estudiadas previamente ( $H_e = 0.069 \pm 0.024$ ) (De Sousa et al., 1996). La tasa efectiva de migración entre las poblaciones, estimada a partir de valores de  $F_{ST}$ , presentó un rango de 2.3 a 9.0. En este mismo estudio utilizaron sólo dos primers, que produjeron 28 loci presuntivos (De Sousa et al., 1999). En otro estudio realizado en Puerto Rico con *Ae. aegypti*, se encontró un promedio de heterocigosis de  $H_e = 0.354$  con 57 loci presuntivos RAPD, mientras que con 11 isoenzimas se detectó una heterosis más baja con un valor de  $H_e = 0.163$ , el valor de  $N_m$  (tasa efectiva de migración) tubo un rango de 9.7 a 12.2 indicando alta tasa de dispersión (Apóstol et al., 1996).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Chiapas están presentes diversos hábitats a lo largo del plano costero con diversos usos del suelo y aplicación de insecticidas. Las poblaciones de *Anopheles albimanus* en época de seca se restringen a charcas permanentes en los esteros y los criaderos tierra adentro permanecen aislados de estas poblaciones. En la época de lluvia las poblaciones de *An. albimanus* se incrementan producto de la formación de nuevos criaderos provocando probablemente que las poblaciones se mezclen libremente.

*Anopheles albimanus* se distribuye en México en la vertiente del pacífico y del Atlántico, desde Chiapas hasta Sinaloa y desde Tamaulipas hasta la península de Yucatán. A lo largo de su distribución geográfica existen áreas endémicas al paludismo, mientras que en otras el paludismo es raro.

## HIPÓTESIS

No existe ninguna barrera para el libre flujo de genes a lo largo del plano costero ni entre poblaciones de diferentes altitudes ni entre mosquitos criados en diferentes hábitats. A lo largo de su distribución geográfica existe un continuo flujo de genes entre los diferentes estados de la República mexicana, debido a que no hay barreras geográficas ni de comportamiento del vector que impidan el libre flujo de migrantes, lo que favorece la existencia de una sola población panmítica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Utilizando marcadores RAPD en hembras adultas de *An. albimanus* se determinó la tasa efectiva de migración  $Nm$  o patrón del flujo genético y la variabilidad genética mediante los valores de  $F_{ST}$ , en el ámbito microgeográfico en el sur de Chiapas y en el ámbito nacional en México.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Se colectaron *An. albimanus* en 20 localidades en un área aproximada de 250 km desde la frontera con Guatemala hasta 250 Km al noreste del sur de Chiapas. Se escogieron de dos o cinco localidades situadas dentro de diferentes agroecosistemas Área de Banano, Cultivos Mixtos, Reserva Ecológica, Caña de Azúcar y Ganadero.

Se colectaron mosquitos de *An. albimanus* en el ámbito macrogeográfico en 9 localidades comprendidas en 8 estados de la República mexicana que son: Chiapas (plano costero y Selva Lacandona), Oaxaca, Colima, Guerrero, Nayarit, Jalisco, Sinaloa, Tabasco, y La Palmilla, Guatemala CA.

Se determinó el flujo génico ( $Nm$ ) y los valores de  $F_{ST}$  entre localidades, áreas agroecológicas y estados de la República mexicana.

Se determinaron las distancias genéticas entre localidades, agroecosistemas y estados de la República mexicana y se representaron por medio de dendrogramas.

## MATERIAL Y METODOS

### A. Colecta de mosquitos en Chiapas.

Hembras adultas de *An. albimanus* fueron colectadas en corrales de ganado, alimentadas con sangre humana o de conejo y una vez grávidas se les colocó en recipientes individuales para obtener las larvas F1 y criarlas por familias en condiciones estándares de insectario (Gerberg et al., 1994). Las capturas se hicieron en 20 localidades separadas entre 4 a 20 km, localizadas desde la frontera con Guatemala hasta 200 km al noroeste y desde el nivel del mar hasta 50 km tierra dentro.

**Área de estudio.** El área de estudio comprende desde la frontera de México con Guatemala (14° 33' N, 92° 13' O) hasta aproximadamente 180 km al noroeste (15° 43'N, 93° 29'O). Se seleccionaron 20 localidades que en estudios previos fueron positivas a la presencia de *An. albimanus*. El área de estudio fue dividida en cinco agro-ecosistemas de acuerdo al uso del suelo y aplicación de insecticidas en la agricultura: 1) Banana, 2) cultivos mixtos (mango, soya, ajonjolí, y maíz), 3) Reserva ecológica, 4) caña de azúcar y 5) ganado (Fig 2.1). Se utilizaron entre dos a cinco localidades por cada área, equivalente a treinta a cincuenta mosquitos adultos F1 por agro-ecosistema. Los adultos F1 de 1 día de edad fueron almacenados a -70 ° C. Todos los adultos utilizados para las pruebas moleculares fueron de diferentes hembras de campo.

### B. Colecta de mosquitos en México

Se realizaron colectas en diferentes estados de la República mexicana, en localidades situadas el litoral Pacífico que son: Río Arriba, Chiapas; Puerto Ángel, Oaxaca; Cayucan, Guerrero; Colomo, Colima; Barra Navidad, Jalisco; San Blas, Nayarit;



Topolobampo, Sinaloa; por el Litoral Atlántico San Pedro Balancán, Tabasco; y entre ambos litorales y por ser un área de alta transmisión del paludismo se escogió Benemérito de las Américas en la Selva Lacandona, Chiapas y “La Palmilla” en Guatemala C.A (Fig. 2.1, Cuadro 2.1). Para la captura de los mosquitos se utilizaron cilindros de plástico de 30 cm de diámetro y 20 cm de alto, cubiertos en la parte superior con malla fina o jaulas de aluminio de 45 cm<sup>3</sup> cubierta de malla metálica. Las capturas de mosquitos se realizaron alrededor de corrales en un horario de 19:00 a 23:00 hrs, sin alimentación sanguínea preferentemente. Aquéllas que presentaron sangre en su abdomen, al momento de la captura se les colocó un algodón húmedo con agua azucarada al 10 %, durante dos días para permitir el metabolismo de la sangre. Los métodos empleados fueron el cebo humano intra y peri, corrales y trampa caballo (Service, 1976). Las hembras después de colocarlas en viales individuales y su debida etiqueta, se trasladaron en nitrógeno líquido al Centro de Investigación de Paludismo en Tapachula, Chiapas donde posteriormente se almacenaron a – 70 ° C hasta su procesamiento.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Fig 2.1. Área de estudio para determinar el flujo de genes en *Anopheles albimanus* en el ámbito macrogeográfico en México. (2)

Cuadro 2.1. Localidades de colecta de *Anopheles albimanus* en el ámbito nacional y sus coordenadas.

Localidad	Estado	Latitud Norte	Longitud Oeste
Topolobampo	Sinaloa	25° 36'	109° 03'
San Blas	Nayarit	21° 32'	105° 17'
Barra Navidad	Jalisco	19° 11'	104° 41'
Colomo	Colima	19° 02'	104° 16'
Cayucan	Guerrero	17° 11'	100° 05'
Puerto Ángel	Oaxaca	15° 39'	96° 28'
Río Arriba	Chiapas	15° 08'	92° 43'
San Pedro Balancán	Tabasco	17° 45'	91° 08'
Benemérito (Selva Lacandona)	Chiapas	16° 30'	90° 38'
La Palmilla	Guatemala	14° 52'	89° 22'

## Extracción de DNA

Adultos individuales fueron macerados y aislado su DNA como fue descrito por Coen et al. (1982) modificado para mosquitos por Black y Munstermann (1994), como se detalla a continuación:

1. Se colocó el mosquito en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, y con 25  $\mu$ l de buffer de extracción (NaCl 0.1M, Sacarosa 0.2M, Tris-HCl pH 9.1, EDTA 0.05M, SDS 0.005). Se maceró uniformemente el mosquito con un pistilo utilizando una punta adecuada al fondo del tubo, hasta que quedó totalmente molido, sin partes reconocibles. Se colocó 25  $\mu$ l más de buffer de extracción, limpiando el pistilo.
2. Se centrifugó por 30 segundos para concentrar los restos al fondo del tubo.
3. Se incubó el tubo con el homogeneizado a 65°C por 30 minutos.
4. Mientras los tubos todavía están calientes, se agregó a cada uno 7  $\mu$ l de Acetato de Potasio 8M.

---

5. Se incubó en hielo como mínimo 30 minutos, para precipitar el SDS del buffer de extracción.
6. Se centrifugó a 14,000-17,000 xg por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y estéril, procurando no llevar nada del precipitado de SDS (Es preferible centrifugar a 4°C).
7. Se agregó al sobrenadante 100  $\mu$ l de ETOH 100%, incubando inmediatamente después en hielo por 5 minutos. OPCIONAL: Puede suspenderse el proceso en este punto, conservando los tubos a -20 °C toda la noche. Centrifugar a 14,000-17,000 xg por 15 minutos.

8. Se retiró cuidadosamente el etanol y se agregaron 100  $\mu$ l de ETOH al 70%. Se lavó y centrifugó por 5 minutos. Se retiró cuidadosamente el etanol. EL DNA precipitó en los lados y el fondo del tubo, y se observó como una mancha blancuzca. Se adicionaron 100  $\mu$ l de etanol 100%, y se lavó y centrifugó por 5 minutos.
9. Se retiró el etanol absoluto y agregaron 100  $\mu$ l de etanol al 70%, lavar por última vez y descartar el etanol con cuidado. Por ultimo se secó totalmente la humedad del tubo en un termoblock por aproximadamente por 30 minutos a 42°C.
10. Resuspender la pastilla de DNA en 300  $\mu$ l de TE pH 8.0 durante un mínimo de 12 horas a 4°C. Con este protocolo el DNA permanece estable hasta por más de 6 meses. La pastilla de DNA fue resuspendida en 300  $\mu$ l de TE (0.05 M Tris- HCL, EDTA pH 8.0), y se mantuvo a 4 ° C.

### **Amplificación del DNA**

Con algunas modificaciones la reacción de RAPD-PCR se realizó como fue descrito por Black y Du Teau (1997). Se preparó la mezcla de reactivos para 12 individuos (volumen total de 50  $\mu$ l). En tubos de 1.5 ml eppendorf, se añadió 447.6  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O; 60  $\mu$ l de buffer de PCR 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% gelatina (peso/vol) y 1 % Triton X-100), 6  $\mu$ l de dNTPs (20 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Gibco, BRL, Life Technologies Alameda Calif); 12  $\mu$ l del iniciador de 10 bases (concentración final 50 pmol/ $\mu$ l) (de Operon Technologies, Alameda, Calif). Los tubos se colocaron en el transiluminador por 10 min para destruir contaminantes, después se le adicionó 2.4  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerasa equivalente a 1 U (Perkin Elmer Norwalk, CT), y se vertieron 49  $\mu$ l en tubos de 0.2 ml, posteriormente se adicionó 1  $\mu$ l de DNA molde. En



todas las reacciones se colocó un control negativo que contenía todos los componentes excepto el DNA molde.

### **Condiciones de la PCR**

Las muestras se incubaron en una termociclador Gene Amp 9600 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) las temperaturas fueron: 1 min a 95 °C como primer paso de desnaturalización, cuarenta y cinco ciclos de 1 min a 92 °C (denaturalización), 1 min de 35 °C (alineación) y 2 min a 72 °C (elongación), el tiempo de rampa desde la alineación a la elongación fue 1°C /8 seg. Se programó una elongación final de 7 min a 72 °C, y los productos amplificados se almacenaron a 4 °C.

### **Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa 1.5 % con 0.8 µg/ml bromuro de etidio, se corrieron a 65V por cerca de 6 hr, se visualizaron con luz UV (312 nm). 1 Kb fue utilizado como marcadores de peso molecular provistos por Gibco BRL, Life Technologies, Alameda Calif.

### **Iniciadores Oligonucleotidos**

Los iniciadores utilizados fueron de 10 bases en longitud de Operon Technologies (Alameda, CA). Cada grupo de 20 iniciadores del A, B y C se suspendieron en agua destilada a una concentración final de 50 pmol/µl y fueron almacenados a -20 °C. Para el estudio en Chiapas se seleccionaron los primers: A05 (5' AGGGGTCTTG 3'), A20 (5' GTTGCGATCC 3'), B04 (5' GGACTGGAGT 3'), B11 (5' GTAGACCCGT 3') y B18 (5'

CCACAGCAGT 3') y en el estudio en el ámbito macrogeográfico se utilizaron los siguientes primers: A05, A08 (5'GTGACGTAGG3'), A12 (5' TCGGCGATAG 3'), A19 (5' CAAACGTCGG 3'), A20, B04, y B11.

### Análisis estadístico

Los productos amplificados se registraron directamente de la fotografía de los geles. La presencia/ausencia de los marcadores dominantes se designaron como 1/0 respectivamente. Se realizaron los cálculos de  $F_{ST}$  y tasa efectiva de migración ( $Nm$ ) dentro de los agroecosistemas y entre localidades utilizando tres diferentes metodologías: Wright (1931), Weir y Cockerham (1984) y Lynch y Milligan (1994). La  $F_{ST}$  y  $Nm$  fueron calculados utilizando el programa RAPDFST 4.0.1 (Black 1996).

El análisis estadístico de los valores de  $F_{ST}$  se estimó mediante valores de contingencia chi-cuadrada =  $2N F_{ST}$ , con grados de libertad igual al número de subpoblaciones menos 1.

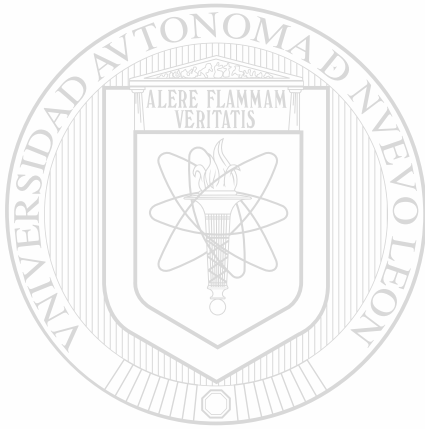
La  $Nm$  fue estimada de la ecuación:  $Nm = [(1/ F_{ST}) - 1]/4$  (Wright 1931).

El programa analiza el valor de  $F_{ST}$  como:

$$F_{ST} = \text{Varianza } (p) / (\text{promedio } p (1 - \text{promedio de } p))$$

Donde  $p$  es la frecuencia de un alelo en un locus RAPD y promedio de  $p$  es la frecuencia promedio ponderada entre todas las subpoblaciones. Esta  $F_{ST}$  es el radio de la varianza observada en la frecuencia de un alelo entre las subpoblaciones, relativa a su máxima varianza en la población total. RAPDFST computa los valores de  $F_{ST}$  para cada

locus RAPD, asumiendo que las subpoblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg y asumiendo dominancia en cada locus. La distancia genética de Nei (1972) y análisis Bootstrap fue realizado con el programa RAPDDIST realizando 100 replicas. Las matrices fueron analizadas con el programa NEIGHBOR en PHYLIP 3.5C utilizando el método de análisis de grupos pares no ponderados (UPGMA). Un árbol de similitud genética con el análisis bootstrap se hizo mediante el estadístico CONSENSUS de Joseph Felsenstein (1993).



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## RESULTADOS

### A. Estudio Microgeográfico en Chiapas.

La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa al DNA de mosquitos con oligonucleótidos únicos de secuencia de DNA arbitraria, resultó en la amplificación de una serie de fragmentos con alto polimorfismo. Oligonucleótidos iniciadores que no produjeron bandas polimórficas bien amplificadas, claramente distinguibles de sus bandas vecinas, fueron eliminados del análisis para reducir ambigüedad. De un tamizaje inicial se escogieron solo 5 iniciadores con base al criterio antes mencionado. No se escogió ningún iniciador del kit C debido a que este grupo de iniciadores amplificaron muchos segmentos difíciles de leer o por el contrario algunos de ellos produjeron pocas bandas con poco polimorfismo y por consiguiente poca información. Del kit A se escogieron dos (5 y 20) y del kit B tres (4, 11 y 18) (Cuadro 2.2). Fueron seleccionados un total de 46 loci polimórficos presuntivos, amplificados por 5 primer (Cuadro 2.2).

La distancia genética de Nei (1972) entre agroecosistemas presentó un rango 0.0078 a 0.0212 (Cuadro 2.3). La menor distancia genética entre las cinco áreas se observó entre el banano y caña de azúcar (0.0078), mientras que la mayor distancia genética fue entre banano y reserva ecológica (0.0212).

Al analizar la estructura genética poblacional de *An. albimanus* entre localidades se encontró con menor distancia genética a La Barra San José y Las Palmas (distancia genética = 0.011), ambas pertenecientes a la zona de reserva ecológica y con mayor distancia genética entre las localidades de El Fortín y El Zapotal (distancia genética = 0.109), ambas pertenecientes a la zona de ganado (Cuadro 2.4).

Los valores de  $F_{ST}$  y  $Nm$  dentro de los agroecosistemas y entre localidades se determinó mediante los tres métodos propuestos (Cuadro 2.5). El valor promedio de  $F_{ST}$  entre las 20 localidades de acuerdo al método de Wright (1931), Theta de Weir & Cockerham (1984) y  $F_{ST}$  de Lynch & Milligan (1994) fue de 0.117 ( $\pm 0.073$ ), 0.088 ( $\pm 0.080$ ) y 0.109 ( $\pm 0.153$ ) respectivamente.

Al analizar la  $F_{ST}$  por agroecosistemas por los tres métodos, se encontró que los menores valores corresponden al área de reserva ecológica que son: 0.070 ( $\pm 0.84$ ), 0.050 ( $\pm 0.115$ ) y 0.042 ( $\pm 0.157$ ) respectivamente. Los mayores valores de  $F_{ST}$  con los tres métodos propuestos se presentaron en le área de ganado: 0.12 ( $\pm 0.133$ ), 0.142 ( $\pm 0.170$ ) y 0.141 ( $\pm 0.22$ ), respectivamente.

En general, el flujo de genes o tasa efectiva de migración ( $Nm$ ), obtenida dentro de las áreas fue moderadamente bajo con rangos 1.8 a 3.3 (Wright), 1.5 a 4.7 (Weir & Cockerham), y 1.5 a 5.7 (Lynch & Milligan) (Cuadro 2.5). El mayor flujo de genes se presentó dentro del área de reserva ecológica (3.3, 4.7 Y 5.7), mientras que el menor flujo génico fue de 1.8, 1.5 y 1.5 en el área de ganado, con los tres métodos propuestos respectivamente.

Al comparar la tasa efectiva de migración entre los agroecosistemas, se presentó un mayor movimiento de individuos migrantes entre la reserva ecológica y cultivos mixtos

( $Nm= 2.4$ ), mientras que la menor tasa efectiva de migración fue entre el área de ganado con plantaciones de banano y caña de azúcar ( $Nm= 1.8$ ) (Cuadro 2.6).

El dendrograma por localidades muestra algunos grupos de localidades con porcentaje de consistencia  $> 50\%$ , que se encuentran cercanas (menos de 10 kms) son: Mareas del Suchiate y Brisas del Mar (55%), Barra San José y Las Palmas (87 %), Álvaro Obregón y Cabildo (55%) (Fig 2.2).

El análisis de Bootstrap entre agroecosistemas indicó con un 87 % de soporte que la caña de azúcar y el área de plantación de banano pertenecen a un mismo grupo con un flujo de genes continuo. En el caso de las áreas restantes el porcentaje fue bajo (35 a 45 %) indicando que el flujo de genes es en cierto punto restringido entre estas áreas (Fig. 2.3).

## B. Estudio Macrogeográfico en México

En el estudio macrogeográfico se seleccionaron 7 oligonucleótidos, 5 del kit A y 2 del kit B, no se escogió ninguno del kit C (Cuadro 2.2). Se seleccionaron 51 marcadores genotípicos sobre la base de los criterios mencionados anteriormente.

Al comparar las distancias genéticas entre los estados de la República, se encontró que la mayor distancia genética se presentó entre el estado de Jalisco comparado con Chiapas (0.1975) y Tabasco (0.2079), y Guatemala (0.1499), mientras que las menores distancias genéticas se presentaron entre los estados de Guerrero y Colima (0.0203), y los estados de Chiapas y Tabasco (0.0254) (Cuadro 2.7).

El valor promedio de  $F_{st}$  entre todas las localidades fue de 0.169 ( $\pm 0.122$ ), y con un valor de  $Nm = 1.2$  mediante el método de Wright (1931) (Cuadro 2.7). El valor de  $Nm$  fue ligeramente menor con el método de Lynch y Milligan (1.1) y ligeramente mayor con el método de Cockerham (1.4). Al determinar la tasa efectiva de migración, agrupando los estados del norte y los del sur, no se observaron diferencias entre los valores de  $Nm$  entre las poblaciones del norte ( $Nm = 2$ ) y las del sur ( $Nm = 1.8$ ) (Cuadro 2.8).

El dendrograma de similitud genética mostró dos ramas principales en donde se observa que se agrupan los estados del norte de México en una y los del sur en la otra (Fig. 2.4). La población del estado de Jalisco se presentó separada de estas ramas de similitud genética. El análisis de Bootstrap demostró 100 % de consistencia entre los estados de Chiapas y Tabasco, y un 86 % entre los estados de Nayarit, Sinaloa, Colima y Guerrero. Otras ramificaciones fueron menores del 70 %.

## DISCUSIÓN

Con el descubrimiento de complejos de especies en *Anopheles gambiae* y *An. maculipennis* en África y Europa, respectivamente se han hecho considerables esfuerzos por detectar especies hermanas en otras especies de anophelinos en el continente Americano, dentro de estas especies esta *An. albimanus*. Esto se debe a la diversidad de hábitats donde las larvas se pueden desarrollar, al mismo tiempo que exhibe alta variación fenotípica pupal (Faran, 1980). Las larvas se desarrollan desde huellas de animales hasta lagunas, con variación en temperatura y salinidad (Breeland, 1972). Este vector de paludismo ha sido sujeto a diversos estudios en la búsqueda de especies hermanas o sub-poblaciones específicas de *An. albimanus* responsables de la transmisión de paludismo, sin embargo hasta el momento no se ha logrado identificar una población críptica con hábitos antropofílicos exclusivos (Arredondo-Jiménez et al., 1992).

---

Se cree que *An. albimanus* se originó en algún punto de Centro América y que posteriormente las poblaciones se extendieron hasta sus límites actuales que son al norte hasta el sur de Estados Unidos de América y hacia el sur hasta la parte norte del Perú (Frederickson, 1993). Estudios previos en busca de sub-poblaciones con *An. albimanus* no se detectaron inversiones de heterocigotos en cromosomas politeros de larvas procedentes de Panamá, El Salvador, Guatemala, México y Jamaica además de ser interfértiles al realizar cópulas-cruzadas (Hobbs, 1962). En otro estudio con 11 poblaciones de Colombia utilizando isoenzimas, análisis citogenético y cópula-cruzadas se encontró que las 11 poblaciones pertenecen a la misma especie (Narang et al., 1991). En Guatemala y Centro América se analizaron poblaciones de campo mediante espaciadores intergénicos del DNA

ribosomal nuclear, y se encontró que existen barreras para el libre flujo de genes entre las poblaciones del Pacífico y el Atlántico (De Mérida et al., 1995). Posteriormente se estudió la variación del DNA mitocondrial entre poblaciones de varios países y dentro de Guatemala. La frecuencia de haplotipos fue similar entre poblaciones del norte y sur de Guatemala, poblaciones cercanas a los 200 km intercambian genes continuamente, pero al analizar poblaciones de México, Guatemala, Honduras y Nicaragua contra aquéllas de Costa Rica y Panamá se presentan cambios abruptos en la frecuencia de haplotipos mitocondriales, es decir, que la cantidad del flujo genético disminuye con la distancia geográfica entre poblaciones alejadas > 200 km (De Merida, et al., 1999).

Análisis visual del patrón de bandas producidas por la reacción RAPD-PCR nos permitió seleccionar 5 primers en el ámbito microgeográfico en Chiapas y 7 en el ámbito macrogeográfico en México, de un total de 60 primers analizados. Los primers no seleccionados fueron descartados porque produjeron muchas bandas de tal forma que fue imposible leer las bandas polimórficas de interés y otros primers produjeron pocas bandas y con poco polimorfismo. La mayor distancia genética se presentó entre dos áreas que se distinguen por el diferente uso del suelo y aplicación de insecticidas que son la zona de plantación de banano y reserva ecológica (0.0212). La historia de aplicación de insecticidas en el área de banano es desde los años 60' ya que anteriormente esta zona se cultivaba el algodón y posteriormente se cambió al cultivo de banano. Las diferencias genéticas entre poblaciones de estas dos áreas pueden ser debido a la presión de selección provocada por los productos químicos vertidos al suelo, para el control de plagas agrícolas, los cuales en la época de lluvia son arrastrados a las zonas de baja elevación donde están

presentes criaderos permanentes de *An. albimanus*. En el transcurso de varias generaciones los insecticidas empleados en la agricultura la presión de selección ejercida en la población de este vector, dio como resultado mosquitos con alta tolerancia a los productos insecticidas. El flujo de genes entre áreas y dentro de las áreas fue moderadamente restringido (1.8 a 3.3, mediante el método de Wright). En comparación con otro culicido, *Aedes aegypti* en Puerto Rico, presentó una tasa efectiva de migración de 10 a 12 (Apostol et al., 1996). Una de las posibles causas de esta diferencia entre el flujo de genes de Anophelinos y Aedinos puede ser su comportamiento de oviposición, es decir, una hembra de anophelino como *An. albimanus* normalmente deposita todos sus huevos desarrollados o la mayor parte de ellos durante un ciclo gonotrófico. Este comportamiento se repite durante todos los ciclos de la vida de la hembra, ya que se han obtenido hasta 7 ciclos gonotróficos en condiciones de laboratorio y todos con la misma longitud de 48 hrs (Rodríguez et al., 1992), con concordancia gonotrófica por arriba del 90 % (Villarreal, datos no publicados). En el caso de *Ae. aegypti*, no presenta concordancia gonotrófica y oviposita un pequeño grupo de huevos en varios recipientes, entonces se mueve de un lugar a otro buscando sangre y ovipositando, dejando descendencia fértil en otras áreas. En otra especie transmisora de virus de la encefalomiелitis equina del oeste en Argentina *Ae. albifasciatus*, el flujo génico tuvo un rango de 2.3 a 9.0 determinado por la técnica de RAPD-PCR (De Sousa et al., 1999).

En nuestro estudio la diferencia en el valor de  $Nm$  dentro del área de reserva ecológica ( $Nm = 3.3$ ) y la de ganado ( $Nm = 1.8$ ) puede ser debida a la mayor disponibilidad de hospederos en el área de ganado en comparación a la escasa o nula cantidad de animales domésticos en la zona de la reserva ecológica. Por lo que al tener mayor disponibilidad de

hospederos los mosquitos no se mueven largas distancias como se presentó en el área de reserva ecológica.

Al analizar el flujo génico entre áreas se encontró que el área de cultivos mixtos y la reserva ecológica son las que comparten mayor número de individuos ( $Nm = 2.4$ ), mientras que el menor flujo génico se presentó entre el área de ganado contra banano y caña de azúcar con una  $Nm = 1.8$  en ambos casos. Esto puede ser explicado por la distancia geográfica, la diversidad de hábitats entre las áreas, además de las diferencias que existen en el uso del suelo y aplicación de insecticidas en la agricultura.

La técnica molecular de RAPD's a suscitado recientemente controversias sobre la reproducibilidad de las bandas (Pérez et al., 1998), en un estudio realizados en *Sus scrofa* la temperatura de alineación baja de 35 °C dio mejores resultados que a 45 ° C, pero temperatura de alineación de 45 °C produjo bandas reproducibles en el patrón de bandas en *Drosophila*. En este estudio la temperatura de alineación de 35 °C, fue la que presentó resultados satisfactorios produciendo bandas reproducibles. El problema de baja reproducibilidad se presentó al inicio de nuestro estudio, durante el proceso de estandarización, pero este problema se solucionó al disminuir el tiempo de precalentamiento de 5 min a 1 min a una temperatura de 95 ° C. También una vez realizado nuestra estandarización se trabajó siempre bajo las mismas condiciones de ciclos, temperaturas, cantidad de  $Mg^{++}$  y búferes, e incluso se trabajó con las mismas casas comerciales con la finalidad de evitar la aparición de artefactos que pudieran interferir con la lectura de la nuestras bandas. Durante el proceso de estandarización y tamizaje de iniciadores se encontraron problemas semejantes a los reportados en un estudio de



diferenciación de especies del complejo sobre *An. gambiae* utilizando RAPD (Favia et al., 1994), donde se menciona que cambio en Mg<sup>++</sup> produce diferente patrón de bandas, al igual que cambios en la cantidad de DNA produce diferente cantidad y calidad en las bandas. Durante el proceso de selección de las bandas se descartaron aquéllas llamadas “fantasmas” por ser borrosas. Estas bandas consisten de alto peso molecular y exhiben inconsistente amplificación, semejante problema se han presentado en la búsqueda de bandas diagnóstico para diferenciar a las principales especies del complejo *An. gambiae*, que son *An. gambiae* s.s. y *An. arabiensis* (Wilkerson et al., 1993). Otro problema que se presentó fue al asignarles valores de “0” y “1” a las bandas, debido a la homología que se presenta entre ciertas bandas, sobre todo en los primers que producen altos número de bandas. Este problema de homología puede ser definitivamente determinado por posteriores investigaciones, tales como secuenciación (Wilkerson et al., 1993).

En el continente americano se sospecha que varias especies de Anophelinos están constituidos por complejos de especies. Por ejemplo *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald es uno de los principales vectores de paludismo en el continente Americano (PAHO 1996), y también es el vector con mayor distribución geográfica en el nuevo mundo (Fleming 1986). Pertenece al Subgénero *Anopheles* (Wilkerson y Strickman 1990). Recientemente con el desarrollo de nuevas técnicas moleculares, esta especie ha sido sujeta a diversos estudios con el fin de determinar si está constituida por una sola especie o de un complejo de especies. En un estudio utilizando isoenzimas y análisis del rDNA mediante la técnica: fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), entre poblaciones de México y Sudamérica se encontraron suficientes diferencias para elevar estas poblaciones a nivel de especie, nombrando la especie “A” en México y especie “B” en Perú y Bolivia

(Estrada-Franco et al 1993a). También se encontró esterilidad macho/hembra unidireccional en cópula-cruzada entre cepas del norte (México) y del sur (Perú y Bolivia), presentado en la forma de testículos atrofiados y extensiva asinapsis de cromosomas politenos (Estrada-Franco 1993b). Un segundo grupo de investigadores (Manguin et al., 1995), analizaron 42 localidades distribuidas desde el Sur de Estados Unidos (Houston, Texas) hasta el norte de Argentina utilizando isoenzimas. Se encontró que a lo largo de su distribución geográfica *An. pseudopunctipennis* consta de dos principales poblaciones, una que se extiende desde el sur de EUA hasta el sur de México y Guatemala y la segunda desde Belice hasta el Argentina. Estas dos poblaciones convergen en el sur de México y norte de Centroamérica. Una parte de esta zona de convergencia fue identificada en una área situada al este de Guatemala y sur de Belice. A diferencia de los reportes previos, ellos concluyeron que las variaciones son clinales y no indicativo de especies sibilinas. Sin embargo los datos indican un patrón descrito como "zona de sutura" (Remington, 1968), donde una población de una especie se separa del grupo por un periodo extensivo de tiempo y posteriormente se reunifican. Otro vector importante de malaria *An. darlingi* ha estado sujeto a diversos estudios mediante isoenzimas, RAPD y espaciadores intergénicos 2 (ITS 2), con el propósito de saber si está constituida en un complejo de especies, pero hasta el momento no se ha demostrado la existencia de algún complejo (Manguin et al., 1999). Es necesario realizar más estudios con la finalidad de encontrar nuevas evidencias que apoyen o rechacen el actual status taxonómico de *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi* con el fin de diferenciar poblaciones importantes en la transmisión de paludismo de aquellas sin importancia. La técnica de RAPD se aplicó a *An. albicans* procedente de Paraguay, Argentina y Brasil, logrando distinguir cuatro especies por medio de 12 primers de un tamizaje inicial de 65, los cuales produjeron 19 marcadores genéticos específicos de especie y cuatro marcadores

comunes a 2 o más especies. Los marcadores fueron correlacionados en casi todos los individuos de cada especie en el rango hecho un muestreo, incluyendo poblaciones tal lejanas como 2,500 km. En nuestro estudio no se encontró bandas únicas de una localidad en el estudio microgeográfico o único de un estado de la República mexicana, en el estudio macrogeográfico, pero se observa en el dendrograma que las poblaciones del norte de México se encuentran separadas de las del sur, probablemente por la presencia de los fuertes vientos constantes que se presentan en el istmo de Tehuantepec que pueden estar actuando como una barrera que impide el libre flujo génico entre las poblaciones de Chiapas y Oaxaca y los estados del norte de México.

El árbol producido por el análisis de Bootstrap presentó un rango de 34 a 87 % de consistencia entre las cinco áreas, indicando que las poblaciones de *An. albimanus* están segregadas y que el flujo de genes es moderadamente restringido. Esto probablemente es resultado de la diversidad de hábitats, y a los procesos de disminución de las poblaciones durante la época de secas, donde las poblaciones de *An. albimanus* disminuyen considerablemente, y la población se concentra principalmente en cuerpos de agua permanentes de baja elevación, mientras que la mayoría de las poblaciones tierra adentro desaparecen o bajan considerablemente (Savage et al., 1990). Está claro que el componente hidrológico potencial más importante para la cría de mosquitos son las áreas inundables, especialmente pastos localizados a bajas elevaciones (Rodríguez et al., 1996), y que estos hábitats son los que producen la mayor cantidad de adultos (Rodríguez et al., 1993). Otra posible explicación de la segregación de la población es por el diferente uso del suelo, aplicación de productos químicos al medio ambiente o disponibilidad de alimento (Statkin, 1987).

Mediante la técnica RAPD-PCR se encontró que *Anopheles albimanus* presentó un flujo de genes moderadamente restringido. Este flujo de genes restringido indica que cuando se presenta un nuevo caso de paludismo, el mosquito infectado propagará la enfermedad principalmente en los alrededores donde se presentó el caso y por el hecho de que *An. albimanus* presenta un rango de vuelo reducido según estudios realizados en El Salvador (Hobbs, et al., 1974). La dispersión del paludismo, puede ser debido a movimientos de personas enfermas a nuevas áreas, mas que al movimiento de mosquitos enfermos.

En el análisis macrogeográfico en el ámbito Nacional, la tasa efectiva de migración fue de 1.2, lo que indica un flujo de genes restringido, sin embargo el análisis jerárquico por regiones mostró que el flujo de genes es mayor entre los estados del norte ( $Nm = 2$ ). Las divergencias genéticas se presentaron principalmente entre las poblaciones del norte de México y las del sur, indicando la existencia de alguna barrera geográfica debido a montañas, factores ecológicos como el clima, fuentes de alimento de la hembra adulta etc. (Slatkin, 1987). Otro de los factores puede ser debido a los fuertes vientos que se presentan en el istmo de Tehuantepec entre los límites del estado de Oaxaca y Chiapas, donde a lo largo del año imperan vientos fuerte del norte de la República mexicana, y que dichos vientos pueden actuar como una cortina que impide el libre paso de los mosquitos entre el norte y sur de México.

## CONCLUSIONES

En Chiapas el dendrograma presentó incipiente agrupación de localidades por agroecosistemas. El área de Barano y Reserva Ecológica presentaron la mayor distancia genética (0.0212). El mayor flujo génico ( $Nm = 3.3$ ) se presentó entre localidades pertenecientes al área de Reserva Ecológica y el menor entre localidades del área de Ganado ( $Nm = 1.8$ ), probablemente como resultado de la disponibilidad hospederos animales.

En el estudio macrogeográfico el dendrograma presentó dos ramas de similitud genética principales, una donde se agrupan los estados del norte: Sinaloa, Nayarit, Colima, Guerrero y Oaxaca y otra rama donde se agrupan los estados del sur: Selva Lacandona, Chiapas, Tabasco, y Guatemala. El estado de Jalisco se presentó separado de las dos ramas genéticas principales.

El flujo de genes de *Anopheles albimanus* fue muy restringido ( $Nm = 1$  en Chiapas y 2 en México), lo cual podría explicar (en parte) la focalización del paludismo e indica que cualquier estrategia de control genético, deberá ser realizado con cada una de las metapoblaciones del vector.

*Anopheles albimanus* esta constituida por metapoblaciones con un flujo génico grandemente diferenciando entre las subpoblaciones pertenecientes a los diversos habitats presentes y con un modelo metapoblacional de tipo paisaje.

## REFERENCIAS CITADAS

Apostol, B.L. W.C.Black IV, B.R. Miller, P. Reiter, B.J. Beaty. 1993. Estimation of the number of Full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. Theor Appl Genet. 86: 991-1000.

Apostol, B. L., W. C. Black IV, P. Reiter, B. R. Miller. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. Heredity 76: 325 – 334.

Arredondo-Jiménez, J. I., D. N. Bown, M. H. Rodriguez, 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.

Audesirk Teresa, Audesirk Gerald. 1993. Biology. Life on earth. 4ta. ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. 1-947.

Ballinger-Crabtree, M.E., W.C. Black 4th, 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, N. M. Duteau, G. J. Puterka, J. R. Nechols, J. N. Pettorini. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* 82: 151 – 159.

Black, W.C. IV. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect. Molec. Biol* 2: 1-6.

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.

Black, W.C. IV. 1996. Fortran programs for analysis of RAPD-PCR data.

[wcb4@lamar.colostate.edu](mailto:wcb4@lamar.colostate.edu).

Black, W.C. IV, N. M. Du Teau. 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In *Molecular Biology of Insect Vector: A methods manual*. Edited by Crampton, C. B. Beard and C. Louis. Chapman & Hall.

Breeland, S. G. 1972. Studies on the ecology of *Anopheles albimanus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 271-274.

Brown RJ, Malcolm CA, Mason PL, Nichols RA. 1997. Genetic differentiation between and within strains of the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) at RAPD loci. *Insect Mol Biol.* 6: 285-289.

Chan A.S., M.H. Rodriguez, J.A. Torres, M.C. Rodriguez, C. Villarreal. 1994. Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *J Med Entomol.* 31: 400-403.

Coen, E.S., J.M. Thoday, G. Dover. 1982. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 295: 564-568.

Coetzee, Maureen, Jose G. Estrada-Franco, Collen A. Wunderlich, Richard H. Hunt. 1999. Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60: 649-653.

De Merida, Ana Maria, M. P. de Mata, E. Molina, C. H. Porter, W.C. Black IV. 1995. Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of *Anopheles albimanus* in south and central America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 469 – 477.



De Merida AM, Palmieri M, Yurrita M, Molina A, Molina E, Black WC 4th. 1999. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. Am J Trop Med Hyg 1999. 61: 230-239.

De Sousa, G. B., A. Blanco, C.N. Gardenal. 1996. Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) from a marsh ecosystem in Córdoba, Argentina. J. Med. Entomol. 33: 531-536.

De Sousa, G. B., G. P. De Dutari, C. N. Gardenal. 1999. Genetic Structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) populations in Central Argentina Determined by Random amplified polymorphic DNA- Polymerase Chain Reaction Markers. J. Med. Entomol. 36: 400 – 404.

Estrada-Franco, J. G., G.C. Lanzaro, M. C. Ma, A. Walker-Abbey, P. Romans, C. Galvan-Sanchez, J. L. Cespedes, R. Vargas-Sagarnaga, A. Laughinghouse, I. Columbus, and R. W. Gwadz. 1993a. Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis sensu lato* from three countries of neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49: 735-745.

Estrada-Franco, J. G., M. C. Ma, R. W. Gwadz, R. Sakai, G. C. Lanzaro, A. Laughinghouse, C. Galvan-Sanchez, J. L. Cespedes and R. Vargas-Sagarnaga 1993b. Evidence through crossmating experiments of a species complex in *Anopheles*

*pseudopunctipennis* Sensu Lato: a primary malaria vector of the American continent.

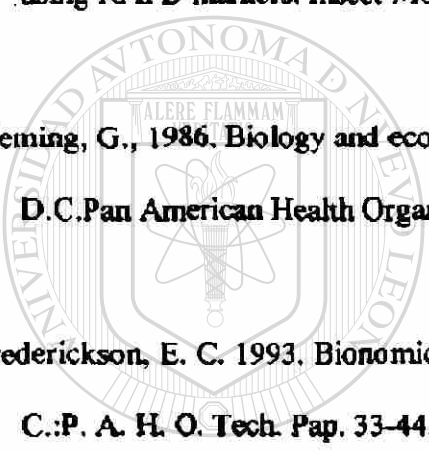

Am. J. Trop. Med. Hyg. 49: 746-755.

Faran, M. 1980. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. Contributions to the American Entomological Institute 15: 1 - 215.

Favia, G., G. Dimopoulos, C. Louis. 1994. Analysis of the *Anopheles gambiae* genome using RAPD markers. Insect Molec. Biology 3: 149-157.

Fleming, G., 1986. Biology and ecology of Malaria Vectors in the Americas. Washington, D.C. Pan American Health Organization. PNSP/86-72.

Frederickson, E. C. 1993. Bionomics and control of *Anopheles albimanus*. Washington, D. C.: P. A. H. O. Tech. Pap. 33-44.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) v.3.5c, Department of Genetics, The University of Washington. Seattle, WA.  

Gawel, N. J., A. C. Bartlett. 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. Insect. Mol. Biol. 2: 33 - 38.

Gerberg, E.J., D.R. Barnard, R. A. Ward. 1994. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. Am. Mosqr. Control Assoc. Bulletin No. 5. Louisiana. 98 p.

Hobbs J. 1962. Cytogenetic of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culiciadae). Ann Entomol. Soc. Am 55: 245-251.

Hobbs, J., Lowe, R., Schreck, C. 1974. Studies on flight range and survival of *Anopheles albimanus* in coastal Guatemala. Mosq. News. 34: 389-393.

Kambhampati, S., W. C. Black IV, K. S. Rap. 1992. Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera : Culiciadae): techniques, statistical analysis, and applications. J. Med. Entomol. 29: 939 - 945.

Klug Williams S., Cummings Michael R. 1996. Essentials of Genetics. 2da. ed. Prentice Hall.76.

Lynch, M., B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Mol. Ecol. 3: 91 - 99.

Manguin, S., D.R. Roberts, E.L. Peyton, I. Fernández-Salas, M.Barreto, R.F. Loayza, R.E.Spinola, R.M.Granaou, M. H. Rodríguez 1995. Biochemical systematics and population genetic structure of *Anopheles pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53(4): 362-377.

Manguin, S., R.C. Wilkerson, Y. Rubio-Palis, J.A. Danoff-Burg, D.R. Roberts. 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles*

*darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 60: 364-376.

Narang, S. K., J.A. Seawright, M. F. Suarez. 1991. Genetic structure of natural populations of *Anopheles albimanus* in Colombia. J. Am. Mosq. Control Assoc. 7: 437 - 445.

Nason, J. Empirical population genetics. Course Bot 567x, Iowa State University, Ames Iowa.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292.

Pan American Health Organization. 1996. Status of Malaria Program in the Americas. Washington DC. Report XLIV.

Penilla, P. R., A. D. Rodriguez, J. Hemingway, J. L. Torres, J. I. Arredondo-Jiménez, M. H. Rodriguez. 1998. Resistance management strategies in malaria vector mosquito control. Baseline data for a large-scale field trial against *Anopheles albimanus* in México. Med. Vet. Entomol. 12: 217 - 233.

Pérez, T., J. Albornoz, A. Domínguez. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. Mol. Ecol. 7: 1347-1357.

Raymond, M., A. Callaghan, P. Fort, N. Pasteur. 1991. World wide migration of amplified resistance genes in mosquitoes. Nature 350: 151-153.

Remington, C. L., 1968. Suture-zones of hybrid interaction between recently joined biotas. Pp. 321-428 in *Evolutionary Biology*. (T. Dobzhansky, M.K. Hecht, and W.C. Steere, eds.) Appleton Century Crofts, New York.

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., B. Chávez, A. Orozco, E. G. Loyola, Martínez-Palomo. 1992a. Scanning electron microscopic observations of *Anopheles albimanus* (Diptera : Culicidae) Eggs. *J. Med. Entomol.* 29: 400 – 406.

Rodríguez, M.H., D.N. Bown, J.I. Arredondo-Jiménez, C. Villarreal, E.G. Loyola, C.E. Frederickson. 1992b. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) in southern México. *J. Med. Entomol.* 29: 395-399.

Rodríguez MH, L. Gonzalez-Ceron, J.E. Hernandez, J.A. Nettel, C. Villarreal, K.C. Kain, R.A. Wirtz. 2000. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 62: 122-127.

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, A.D., M. H. Rodríguez, J. E. Hernández, S.W. Dister, L. R. Beck, E. Rejmankova, D.R. Roberts. 1996. Landscape surrounding human settlements and *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) abundance in southern Chiapas, México. *J. Med. Entomol.* 33: 39-48.

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.

Schapira, A., P.F. Beales, M.E. Halloran. 1993. Malaria: living with drug resistance. *Parasitology today* 9: 168-174.

Service, M.W. 1976. Mosquito ecology field sampling methods. Applied Science Publishers, London.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787 - 792.

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

Tabachnick, W.J., W. C. Black IV. 1994. Population genetic in vector biology. In: The Biology of Disease Vectors (Beaty J.B, and Marquardt, W.C. eds). University of Colorado Press, Boulder, Co. p 417- 437.

Weir, B. S., C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 33: 1358 – 1370.

Wilkerson, R.C., T.J. Parsons, D. G. Albright, T.A. Klein, M J. Braun. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera : Culicidae : Anopheles). *Insect Mol. Biol.* 1: 205 - 211.

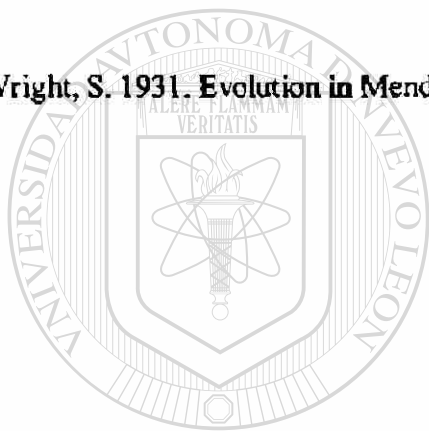
Wilkerson R. C, T. J. Parsons T. A. Klein, T. V. Gaffigan, E. Bergo, J. Consolim. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. *J. Med.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

Williams, J. K., A.R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Wilkerson and Strickman, 1990. Clave Ilustrada para la identificación de las hembras de mosquitos anofelinos de México y Centroamérica. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* Vol. 6, No. 1 pp. 7-34.

Winchester A., M., 1985. Herencia. Una introducción a la Genética. Ed. Continental, S.A. de C. V., México. 83-85 y 252.

Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97 – 159.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

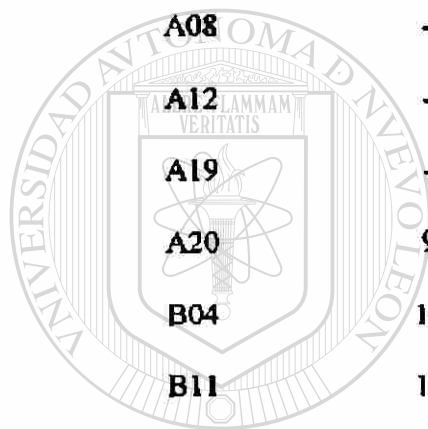
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





Cuadro 2.2. Número de marcadores genéticos y la secuencia de los iniciadores seleccionado en *Anopheles albimanus* procedentes de Chiapas, México.

Iniciadores	No de marcadores	
	En Chiapas	En México
A05	7	7
A08	-	8
A12	-	9
A19	-	6
A20	9	8
B04	10	6
B11	10	7
B18	10	-
<b>TOTAL</b>	<b>46</b>	<b>51</b>



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Cuadro 2.3. Distancia genética de Nei (1972)(abajo) y distancia geográfica (arriba) en *Anopheles albimanus* entre agroecosistemas.**

<b>Agro-ecosistema</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1 Banano</b>	-	32.3	74.6	70.7	156
<b>2 cultivativos mixtos</b>	0.0122	-	42.1	39.5	124
<b>3 Caña de Azúcar</b>	0.0078	0.0146	-	15.7	83.5
<b>4 Reserva Ecológica</b>	0.0212	0.0163	0.0182	-	84.5
<b>5 Área de Ganado</b>	0.0168	0.0124	0.0112	0.0116	-



**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 2.4. Matriz de distancia genética de Nei (1972) (abajo) y distancia geográfica (arriba) en *Anopheles albimanus* por localidades del sur de Chiapas, México.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 Herradero	-	.32	.88	5.2	7.2	26.4	42.4	39.1	35.2	73.2	72.4	80.8	72.4	87.6	96	90.4	56	172	120	137.2
2 Guincho	.031	-	10	3.6	8.4	27.6	43.2	42	38	75.2	74.4	82	74	89.2	96.2	91.6	56	172.8	120.8	138
3 Bñisab	.055	.030	-	13.2	6	18	34	33.6	31.2	66.4	65.2	72.8	64.8	79.6	87.6	82.4	46.8	162.4	111.6	128
4 Mareal	.061	.046	.026	-	11.2	30.8	46.8	45.2	40.4	78	77.6	85.6	77.6	92	100	95.2	59.6	176	160.8	141.6
5 Coatlapa	.048	.036	.062	.075	-	22	37.2	34	29.2	67.2	66.8	74.8	66.8	82	90	93.6	50	164.8	114.4	130.4
6 Cahillo	.067	.035	.043	.041	.034	-	16	21.6	26.4	48.4	48	50.8	47.6	62	69.6	64	28.8	144	94	110
7 E. Zapata	.043	.025	.030	.037	.037	.022	-	20	28.8	36.4	33.6	40	32.8	46.4	53.6	48.4	13.2	128.8	78	94
8 A. Obregon	.057	.043	.036	.067	.034	.023	.029	-	10.4	34	34.8	44.8	36	51.6	62	56.4	26.4	136	49.6	101.6
9 Cantel	.066	.060	.048	.053	.048	.044	.048	.042	-	42	45.2	54.4	45.6	61.2	71.2	66.4	37.2	145.6	96	110.4
10 L. Cardenas	.045	.047	.080	.034	.051	.075	.064	.067	.066	-	8.8	18	12	22.4	34.4	30.8	29.6	8.8	56.8	70.8
11 Akamira	.043	.041	.034	.032	.062	.057	.040	.063	.032	.034	-	10.4	2	16	27.2	23.1	26.8	98.8	49.6	64
12 Río Arriba	.045	.051	.065	.065	.040	.058	.057	.076	.070	.043	.060	-	9.2	6.8	17.6	13.2	28	91.2	40.8	56.8
13 Xochicalco	.047	.021	.049	.039	.035	.048	.043	.052	.045	.027	.043	.042	-	15.6	26	21.6	22	100	50	66
14 Castaño	.050	.031	.044	.051	.034	.032	.024	.036	.052	.073	.049	.064	.040	-	12	9.6	34	84.4	34.8	50.4
15 Zacaolco	.057	.041	.077	.084	.038	.044	.049	.050	.066	.093	.080	.078	.054	.042	-	4.8	40.8	75.6	24.8	40.8
16 Las Palmas	.057	.038	.066	.064	.030	.040	.028	.036	.074	.050	.072	.053	.043	.030	.051	-	36	80.6	30	45.6
17 San José	.055	.044	.071	.071	.021	.039	.031	.027	.054	.044	.064	.051	.039	.027	.054	.011	-	112	65.2	81.6
18 Fortín	.073	.053	.067	.070	.073	.082	.080	.077	.053	.058	.043	.038	.034	.067	.064	.093	.075	-	50.8	34.4
19 B. Pajón	.073	.041	.077	.082	.042	.032	.031	.036	.075	.066	.082	.075	.054	.035	.049	.026	.025	.105	-	16
20 Zapotal	.067	.060	.093	.089	.036	.041	.047	.033	.086	.081	.090	.083	.069	.039	.041	.031	.030	.109	.034	-

Cuadro 2.5.  $F_{ST}$  estadística y tasa efectiva de migración ( $Nm$ ) dentro de agroecosistemas y entre localidades, por tres métodos en *Anopheles albimanus* de Chiapas, México.

Agro-ecosistema	$\theta$ de Weir & Cockerham		$F_{ST}$ de Lynch & Milligan &			
	Wright' $F_{ST}$ &	$Nm$	$Nm$	$Nm$		
Banana	0.093 (0.086)	2.4	0.079 (0.106)	2.9	0.081 (0.184)	2.8
C. Mixtos	0.0790 (0.076)	2.9	0.0520 (0.098)	4.6	0.043 (0.148)	5.6
Caña de Azúcar	0.101 (0.096)	2.2	0.091 (0.115)	2.5	0.097 (0.183)	2.3
Reserva	0.0700 (0.84)	3.3	0.050 (0.115)	4.7	0.042 (0.157)	5.7
Ganado	0.120 (0.133)	1.8	0.142 (0.170)	1.5	0.141 (0.22)	1.5
Entre Localidades	0.117 (0.073)	1.9	0.088 (0.080)	2.6	0.109 (0.153)	2.0

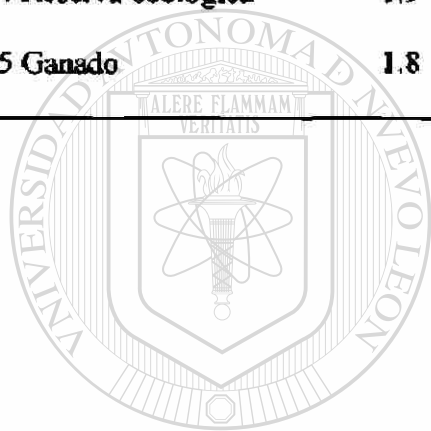
& (Media  $\pm$  D St)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 2.6. Tasa efectiva de migración ( $Nm$ ), entre agroecosistemas en *Anopheles albimanus* de Chiapas, Mexico.

Agroecosistema	1	2	3	4	5
1 Banano	–				
2 Cultivos mixtos	2.3	–			
3 Caña de azúcar	2.0	2.1	–		
4 Reserva ecológica	1.9	2.4	2.1	–	
5 Ganado	1.8	1.9	1.8	2.0	–



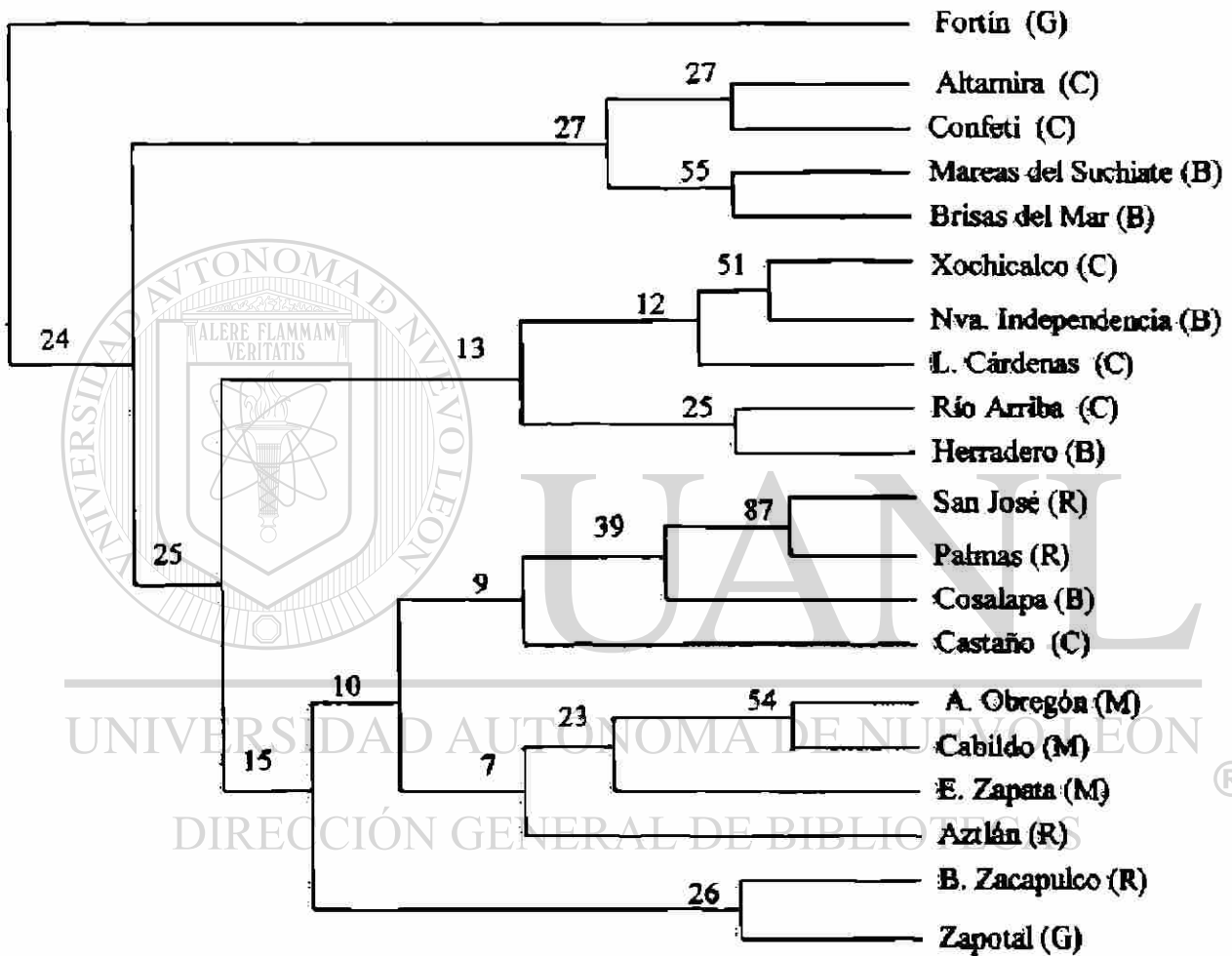
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

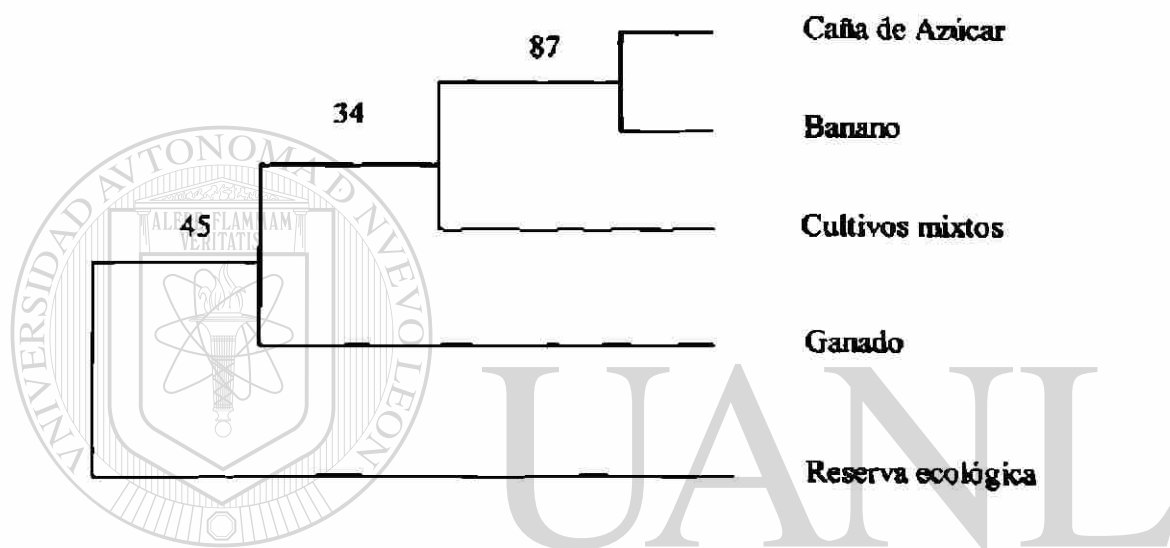
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig. 2.2 Arbol de distancia genética de Nei (1972) utilizando el método de grupos pares no ponderado (UPGMA) en 20 localidades después de 100 replicas de Bootstrap.



B: Banano; R: reserva ecológica; M: cultivos mixtos; C: Caña; G: Ganadero.

Fig 2.3 Arbol de distancia genéticas de Nei (1972) utilizando el método de análisis de grupos pares no ponderado (UPGMA) entre cinco agroecosistemas después de 100 replicas del análisis bootstrap.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Cuadro 2.7. Matriz de distancia genética de Nei (1972) (abajo) y distancia geográfica (arriba) de *Anopheles albimanus* en la República Mexicana.

Localidades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 Sinaloa	—	645	1038	1456	2239	2334	2464	896	1848	2606
2 Nayarit	0.0294	—	355	833	1733	1720	1921	277	1271	2001
3 Colima	0.0336	0.0351	—	455	1357	1395	1537	49.1	893	1741
4 Guerrero	0.0342	0.0350	0.0203	—	1025	859	1089	552	418	1249
5 Tabasco	0.1097	0.0877	0.0960	0.1231	—	336	144	1700	613	397
6 Chiapas	0.0951	0.0764	0.0835	0.1014	0.0254	—	272	1467	470	361
7 Selva, Chis	0.0861	0.0646	0.0797	0.0878	0.0820	0.0776	—	1629	659	228
8 Jalisco	0.0964	0.0938	0.0894	0.0650	0.2079	0.1975	0.1226	—	1048	2058
9 Oaxaca	0.0612	0.0575	0.0694	0.0567	0.0828	0.0930	0.0680	0.1005	—	878
10 Guatemala	0.0840	0.0667	0.0799	0.0917	0.0740	0.0704	0.0591	0.1499	0.0680	—

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



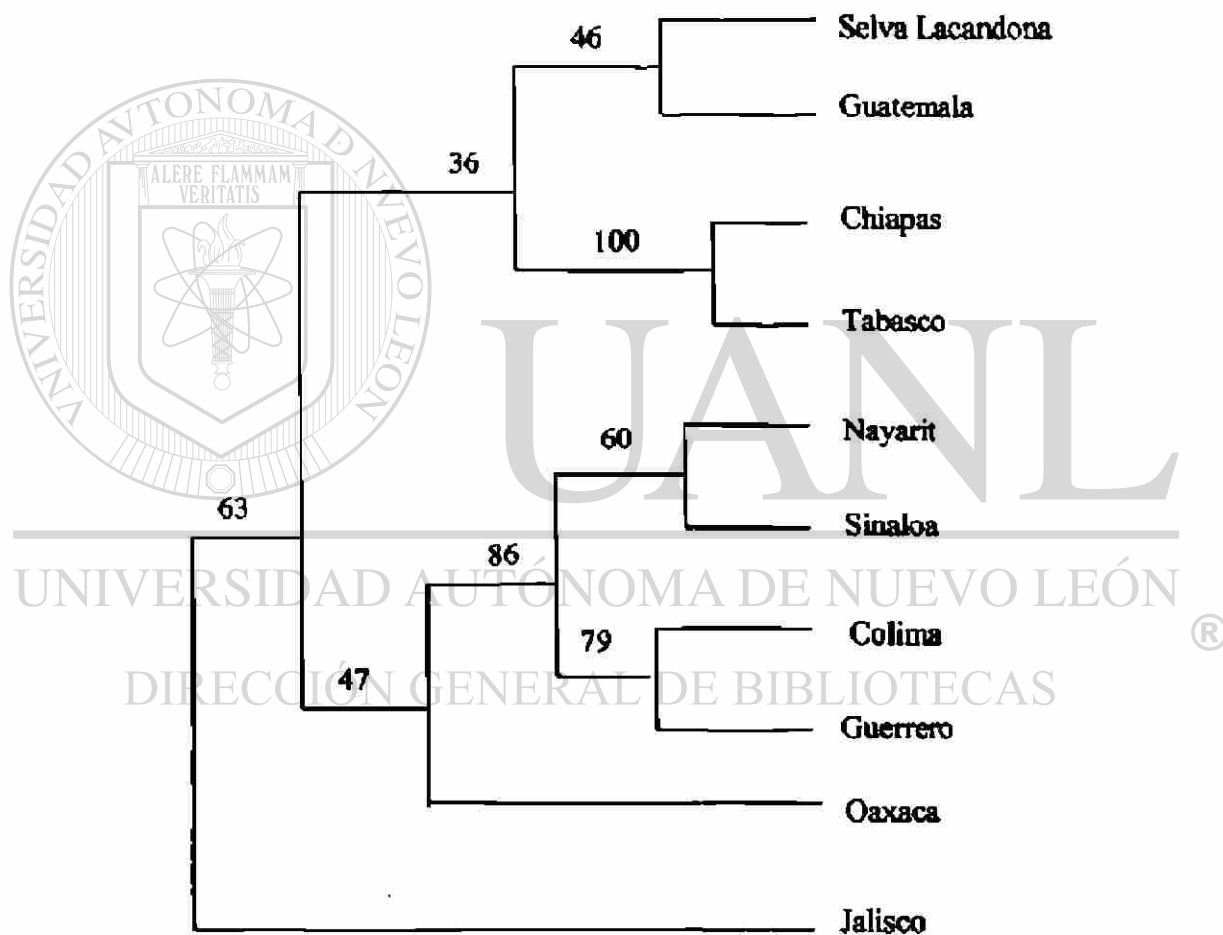
Cuadro 2.8. Valores promedio de  $F_{st}$  y  $N_m$  en *Anopheles albimanus* entre diferentes estados de la República Mexicana.

Areas	$F_{st}$ de Wright ( $\pm$ Desv.St)	$N_m$	$\phi$ Weir y Cockerham ( $\pm$ Desv.St)	$N_m$	Lynch y Milligan ( $\pm$ Desv.St)	$N_m$
Entre estados del Norte	0.113 (0.096)	2.0	0.103 (0.107)	2.2	0.0123 (0.189)	1.8
Entre estados del Sur	0.122 (0.097)	1.8	0.109 (0.110)	2.0	0.123 (0.198)	1.8
Todos los Estados	0.169 (0.122)	1.2	0.149 (0.136)	1.4	0.186 (0.194)	1.1

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 2.4 Árbol de distancia genética de Nei (1972) utilizando el método de análisis de grupos pares no ponderados (UPGMA) entre los diferentes estados de la República mexicana después de 100 réplicas de Bootstrap.



Anexo 1. Zonas epidemiológicas y vectores de la malaria en humanos.

<p>1. Norte America</p> <p><i>A. (A) freeborni</i></p> <p><i>A. (A) quadrimaculatus</i></p> <p><i>(A. (N) albimanus)</i></p> <p><i>A. (A.)pseudopunctipennis</i></p>	<p>7. Afrotropical</p> <p><i>A. (C.) arabiensis</i></p> <p><i>A. (C.) funestus</i></p> <p><i>A. (C.) gambiae</i></p> <p><i>(A. (C.) melas)</i></p> <p><i>(A. (C.) merus)</i></p> <p><i>(A. (C.) moucheti)</i></p> <p><i>(A. (C.) nili)</i></p> <p><i>(A. (C.) pharoensis)</i></p> <p><i>A. (C.) rufipes</i></p> <p><i>A. (C.) d'thali</i></p>
<p>2. America Central</p> <p><i>(A. (A) aztecus)</i></p> <p><i>(A. (A) punctimacula)</i></p> <p><i>A. (N) albimanus</i></p> <p><i>(A.(A) albitarsis</i></p> <p><i>A. (N) aquasalis</i></p> <p><i>A. (N) argiritarsis</i></p> <p><i>A. (N) darlingi</i></p>	<p>8. Indo-Irani</p> <p><i>(A. (A.) sacharovi)</i></p> <p><i>(A. (C.) annularis)</i></p> <p><i>A. (C.) culicifacies</i></p> <p><i>A. (C.) fluviatilis</i></p> <p><i>(A. (C.) pulcherrimus)</i></p> <p><i>(A. (C.) stephensi)</i></p> <p><i>(A. (C.) superpictus)</i></p> <p><i>(A. (C.) resellatus)</i></p>

3. Sur America

*A. (A.) pseudopunctipennis*

*A. (A.) punctimacula*

*(A. (K) bellator)*

*(A. (K) cruzii)*

*A. (N) albimanus*

*(A. (A) albitarsis*

*A. (N) aquasalis*

*A. (N) argitarsis*

*A. (N) darlingi*

*(A. (N) nunestovari)*

*A. (N) triannulatus*

9. Colinas Indo-chinas

*(A. (A.) nigerrimus)*

*(A. (C.) annularis)*

*A. (C.) culicifacies*

*(A. (C.) dirus)*

*A. (C.) fluviatilis*

*(A. (C.) maculatus)*

*A. (C.) minimus*

*A. (C.) leucosphyrus\*\*\**

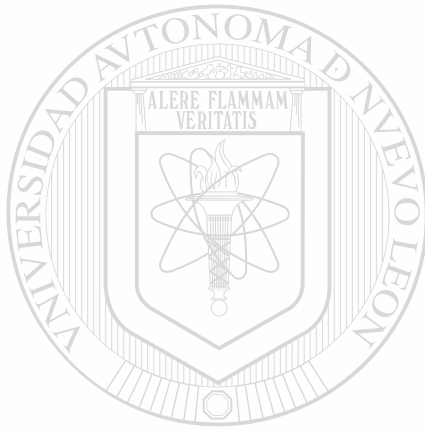
*A. (C.) balabacensis\*\*\**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4. Eurasiatico Norte

- A. (A.) atroparvus*  
*(A. (A.) messeae)*  
*(A. (A.) sacharovi)*  
*(A. (C.) sinensis*  
*(A. (C.) pattoni)*  
*A. (C.) maculipennis\*\**



10. Malasia

- A. (A.) campestris*  
*A. (A.) donaldi*  
*A. (A.) leitifer*  
*A. (A.) nigerrimus*  
*(A. (A.) whartoni)*  
*A. (C.) aconitus*  
*A. (C.) balabacensis*  
*A. (C.) dirus*  
*A. (C.) flavirostris*  
*A. (C.) leucosphyrus*  
*A. (C.) ludlowae*  
*A. (C.) maculatus*  
*A. (C.) minimus*  
*(A. (C.) philippinensis)*  
*A. (C.) supictus*  
*A. (C.) sundaicus*  
*A. (C.) unprosus*  
*A. (C.) barbirostris*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

<p>5. Mediterraneo</p> <p><i>A. (A.) atroparvus</i></p> <p><i>(A. (A.) claviger</i></p> <p><i>A. (A.) labbranchiae</i></p> <p><i>(A. (A.) messeae)</i></p> <p><i>A. (A.) sacharovi</i></p> <p><i>(A. (A.) hispaniola)</i></p> <p><i>(A. (C.) pattoni)</i></p> <p><i>A. (C.) superpictus**</i></p>	<p>11. China</p> <p><i>A. (A.) anthropophagus</i></p> <p><i>A. (A.) sinensis</i></p> <p><i>(A. (C.) pattoni)</i></p> <p><i>A. (A.) sacharovi</i></p>
<p>6. Afro-arabia</p> <p><i>(A. (A.) hispaniola)</i></p> <p><i>(A. (C.) multicolor</i></p> <p><i>A. (C.) pharoensis</i></p> <p><i>A. (C.) sergentii</i></p> <p><i>A. (C.) gambiae</i></p>	<p>12. Australia</p> <p><i>(A. (A.) bancroftii)</i></p> <p><i>A. (C.) farauti tipo 1</i></p> <p><i>A. (C.) farauti tipo 2</i></p> <p><i>(A. (C.) hilli)</i></p> <p><i>(A. (C.) karwari)</i></p> <p><i>A. (C.) koliensis</i></p> <p><i>A. (C.) punctulatus</i></p> <p><i>(A. (C.) subpictus)</i></p> <p><i>A. (C.) koliensis</i></p>

A= Anopheles

C= Cella

K= Kerteszia

N= Nysorhynchus Nysorhynchus

Anexo 2. Distribución de los anofelinos mexicanos por estados de la República Mexicana.

ESPECIE	ENTIDAD FEDERATIVA
<i>An. albimanus</i>	Chiapas (las dos vertientes), Oaxaca (las dos vertientes), Guerrero, Michoacán, Colima, Nayarit, Sinaloa, Tamaulipas, Nuevo León, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, San Luis Potosí. Desde el nivel del mar hasta lugares altos como tres puentes cerca de Morelia, Michoacán, altitud de Morelia: 1,941 msnm.
<i>An. apicimacula</i>	Chiapas (las dos vertientes), Michoacán, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz, Yucatán. Desde los lugares bajos de la costa hasta 1,427 msnm.
<i>An. argyritarsis</i>	Campeche, Chiapas (las dos vertientes), Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Oaxaca (las dos vertientes), San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas. Desde la costa hasta lugares tan altos como Banderillas, Veracruz, 1,520 msnm.
<i>An. aztecus</i>	Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Jalisco, México, Michoacán, Puebla, Tlaxcala, y Zacatecas. Sólo en la Altiplanicie, a más de 1,500 metros. Una de las localidades más altas es Xochicalco, D.F., a 2,266 msnm.
<i>An. barberi</i>	Sonora. Única localidad conocida: Imuris, Son., 852 msnm.
<i>An. bradleyi</i>	Campeche, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas. En localidades próximas al nivel del mar.
<i>An. crucians</i>	Nuevo León, Quintana Roo, San Luis Potosí, Veracruz, Yucatán. Casi desde el nivel del mar hasta lugares altos. Localidad de mayor altitud conocida: Banderillas, Veracruz, 1,520 msnm.

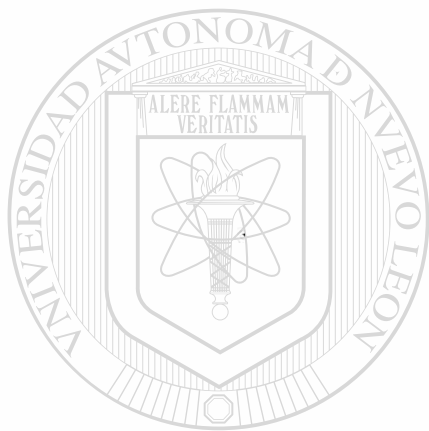
<i>An. durlingi</i>	Chiapas (vertiente del Golfo de México), Tabasco. En localidades de escasa altitud como Teapa, Tabasco, 60 msnm.
<i>An. eiseni</i>	Chiapas (las dos vertientes), Durango, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca (las dos vertientes), San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz. Casi desde el nivel del mar hasta lugares muy altos. Localidad más alta conocida: Aldea Berriozábal, municipio de Motozintla Chiapas, 1,920 msnm.
<i>An. fausti</i>	San Luis Potosí. Única localidad: Tlapexhuacán, Tamazunchale, San Luis Potosí, 110 msnm.
<i>An. freeborni</i>	Baja California Norte, Sonora. Localidad de mayor altitud conocida: Imuris, Sonora, 852 msnm.
<i>An. gabaldoni</i>	Chiapas (vertiente del Golfo de México), Tabasco, Veracruz. Sólo en localidades de baja altitud; la más alta conocida es Salto de Agua, Chiapas, 518 msnm.
<i>An. hectoris</i>	Chiapas. Sólo en las localidades de más de 1,200 msnm. Una de las más altas es San Cristobal de las Casas, Chiapas, 2,128 msnm.
<i>An. hermsi</i>	Baja California, Rosarito y Ensenada.
<i>An. neivai</i>	Chiapas y Veracruz (Córdova, Veracruz, 924 msnm).
<i>An. neomaculipalpus</i>	Chiapas (vertiente del Pacífico), Tabasco, Veracruz. Sólo en localidades de poca altitud; la más alta que se conoce es finca. La Esmeralda, Pueblo Nuevo, Chiapas, 650 msnm.



<i>An. parapunctipennis</i>	Chiapas, Morelos, Oaxaca, Veracruz, Sólo en lugares altos, a más de 1,200 msnm sobre el nivel del mar. La localidad más alta es Lagunas de Zempoala, Morelos, 2,820 msnm.
<i>An. franciscanus</i>	Baja California Norte y Baja California Sur.
<i>An. pseudopunctipennis</i>	En todas las entidades estatales del país, desde el nivel del mar hasta la Altiplanicie. Uno de los lugares más altos es Tacuba, D.F., 2,270 msnm.
<i>An. pseudopunctipennis willardi</i>	Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Hidalgo, Sonora, Zacatecas. Localidad de mayor altitud conocida: Madera, Chihuahua, 2,079 msnm.
<i>An. punctimacula</i>	Campeche, Chiapas, (las dos vertientes), Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Veracruz. Desde la costa hasta lugares como Jalapa, Veracruz 1,427 msnm
<i>An. punctipennis</i>	Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz. Principalmente en la Altiplanicie, zonas bajas cerca de la costa.
<i>An. quadrimaculatus</i>	Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz. Sólo en lugares de poca elevación en la costa del Golfo de México. La más alta es Ciudad Victoria, Tamaulipas, 321 msnm
<i>An. strodei</i>	Veracruz. En lugares bajos de la costa como a 60 msnm
<i>An. vestitipennis</i>	Campeche, Chiapas, (las dos vertientes), Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán. En lugares próximos al nivel del mar. El más alto es Tamasopo, San Luis Potosí, 350 msnm.
<i>An. walkeri</i>	Veracruz. Única localidad: Pánuco, Veracruz, 20 msnm

*An. xelajuensis*

Oaxaca. Única localidad conocida: Galera Vieja, entre Ixtlán y Tepanzacoalco, Oaxaca, 2,400 msnm.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Nombre: Cuauhtémoc Villarreal Treviño  
Licenciatura Ing. Agrónomo Parasitólogo. ITESM. Campus Mty. 1980 - 1984  
Maestría En Ciencias especialidad en Sanidad Vegetal. ITESM Campus Mty 1985 - 1988.

#### SISTEMA NACIONAL DE INVESTIGADORES

Candidato a Investigador 1992 - 1996  
Investigador Nacional Nivel 1 1996 - 2002

#### EXPERIENCIA EN INVESTIGACION

Jefe del Departamento de Biología de Vectores

Investigador Asociado C.

Instituto Nacional de Salud Pública / Centro de Investigación de Paludismo. 1989 -

#### PUBLICACIONES:

Rodríguez, M. H., D. N. Bown, J. I. Arredondo-Jiménez, C. Villarreal T., E.G. Loyola, and C. E. Frederickson. 1992. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) in southern México. J. Med. Entomol. 29 (3): 395-399.

Arredondo- Jiménez J.I., D.N. Bown, M. H. Rodríguez, C. Villarreal, E. G. Loyola, and C. 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., 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.

Rodríguez, M. H., E.G. Loyola, A. F. Betanzos, C. Villarreal, D. N. Bown. 1994. Tratamiento focal usando quimioprofilaxis y rociado intradomiciliar con insecticidas para el control del paludismo en el sur de México. Gaceta Médica de México. 130: (5).

Chan, A. T., M. H. Rodríguez, J. A. Torres, M. Del C. Rodríguez and C. Villarreal. 1994. Susceptibility of three laboratory strain of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coinidgenous *Plasmodium vivax* southern México. J. Med. Entomol. 31: 400-403.

Villarreal T. C., G. F. Maldonado, M. H. Rodríguez and B. Yuval. 1994. Low rates of multiple fertilization in parous *Anopheles albimanus*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 10: 67-69.

Villarreal T. C., M.H. Rodríguez, D.N. Bown, J.I. Arredondo-Jiménez. 1995. Low volume application by mist-blower compared with conventional compression sprayer treatment

of houses with residual pyrethroid to control the malaria vector *Anopheles albimanus* in México. *Med. Vet. Entomol.* 9: 187-194.

Villarreal T. C., J. I. Arredondo-Jiménez, M. H. Rodríguez and A. Ulloa. 1998. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from México. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*

Gonzalez-Cerón, L., M.H. Rodríguez, Jose C. Nettel, Cuauhtemoc Villarreal T., Kevin C. Kain and Juan E. Hernández. 1999. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infection with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern México. *Infection and Immunity* 410 – 412.

Rodríguez, M. H., L. G. Cerón, J. E. Hernández, J. A. Nettel, Cuauhtémoc Villarreal T., Kevin C. Kain, and Robert A. Wirtz. 2000. Different prevalences of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 and VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 62(1) 122 – 127.

#### CAPITULOS DE LIBROS:

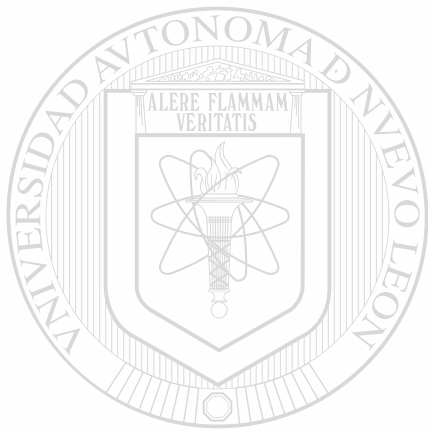
Villarreal, T.C., J. I. Arredondo, M.H. Rodríguez. 1998a. Bionomía de los principales vectores del paludismo en México. A cien años del descubrimiento de Ross. El paludismo en México. Ed. Jesús Kumate y A. M. Palomo. El Colegio Nacional. 149 – 161.

Áreas de Interés: Genética de poblaciones, taxonomía clásica y molecular, comportamiento de insectos y resistencia a insecticidas en vectores de paludismo.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





