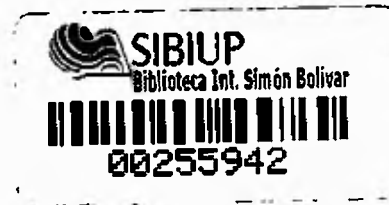


UNIVERSIDAD DE PANAMA  
MAESTRIA EN ENTOMOLOGIA

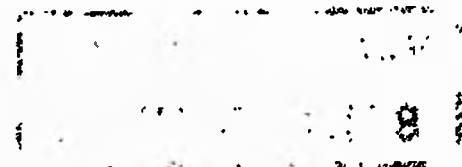


EVALUACION DE DOS METODOS EN LA DETERMINACION  
DE LA EDAD FISIOLÓGICA EN *Anopheles albimanus*  
(DIPTERA: CULICIDAE)  
EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

MARTA MARLENE BEST GONZALEZ

REPUBLICA DE PANAMA

DICIEMBRE 1990



F.A.

EVALUACION DE DOS METODOS EN LA DETERMINACION DE LA EDAD FISIOLÓGICA EN *Anopheles albimanus* (DIPTERA: CULICIDAE) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

ABR 10 1991

TESIS

Sometida para optar al título de Maestro en Ciencias con especialidad en Entomología Médica.

Obs. del autor

VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO

DIRECCION DE POSTGRADO

Permiso para su publicación y reproducción total o parcial, debe ser obtenido en la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado.

Aprobado:

J. Nelson ----- ASESOR

Dr. Germán P. de Charry ----- JURADO

Hector S.B. ----- JURADO

243172-

## AGRADECIMIENTO

Deseo manifestar mi más sincero agradecimiento al Dr. Michael Nelson por sus atinados consejos, su paciencia y dedicación que me ofreció en el desarrollo de la investigación.

Al Dr. John Petersen por todas las facilidades brindadas sin las cuales la investigación no hubiese llegado a feliz término.

Al personal del Laboratorio Conmemorativo Gorgas especialmente a la Licda. Anita de Vásquez, a la Sra. Celina González, al Sr. Enrique London y Sr. Roberto Rojas, mi eterna gratitud.

Al Profesor Diego Navas por toda su preocupación y al Dr. Héctor Barrios por la traducción de los artículos en ruso, los cuales fueron de gran beneficio en mi trabajo, a la Dra Rosemary de Chávez y a todas aquellas personas que me estimularon a continuar siempre hacia adelante.

Al Lic. Florentino Vega por el apoyo brindado en el análisis estadístico, mil gracias.

A la Organización Panamericana de la Salud por haber financiado mis estudios.

Al Dr. Abdiel Adames quien siempre recordaré, por su desinteresado apoyo brindado al iniciarme en el

estudio de la Entomología Médica. Al Lic. Belisario  
Polo y Leopoldo De León por su sincera amistad.

## INDICE GENERAL

	Páginas
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCION	3
REVISION DE LITERATURA	
1. Ubicación Sistemática.	6
2. Biología y Distribución Geográfica.	6
3. Importancia Médica.	8
4. Sistema Reproductor Femenino de <i>Anopheles albimanus</i> .	11
5. Ovogénesis. (Desarrollo Embrionario).	15
6. Ciclo Gonotrófico.	17
7. Digestión de Sangre y su Relación con el Desarrollo Ovárico.	20
8. Efecto del Peso Corporal, Cantidad de Sangre Ingerida y su Relación con la Fecundidad.	22
9. Determinación de la Edad Fisiológica.	23
a) Presencia de huevos retenidos.	
b) Grado de desgaste alar.	
c) Tamaño del Ampulla.	
d) Infestación por ácaros parásitos.	
e) Método de Detinova o "traqueación ovárica".	
f) Método de Polovodova o "reliquias foliculares".	

## MATERIALES Y METODOS

1. Area de Trabajo y Condiciones Ambientales.	34
2. Trabajo de Insectario.	34
3. Hembras Alimentadas con Miel Solamente. Serie 1.	35
4. Hembras No Inseminadas Alimentadas con Miel y Sangre. Serie 2.	36
5. Hembras Inseminadas Alimentadas con Miel y Sangre. Serie 3.	38
6. Hembras Inseminadas Alimentadas con Miel y Sangre Pesadas antes y después de su Alimentación Sanguínea. Serie 4.	39
7. Prueba "Doble Ciego". Serie 5.	42
8. Disecciones.	43
a) Diferenciación entre hembras paridas y nullparas por el examen del sis- tema traqueal ovárico. Método de Detinova.	
b) Determinación de la edad fisiológica por el número de dilataciones en los pedicelos foliculares. Método de Polovodova.	
c) Técnica de disección.	

## RESULTADOS Y DISCUSION

1. Condición Ambiental.	47
2. Estados de Desarrollo de los Folículos Ováricos.	47
3. Estados de Digestión de la Sangre y su Re- lación con el Desarrollo de los Folículos Ováricos.	52
4. Diferenciación de Hembras Inseminadas por la Apariencia de la Espermateca.	56

5. Diferenciación entre Hembras Páridas y Nullíparas por el Examen del Sistema Traqueal Ovárico. Método de Detinova.	57
6. Determinación de la Edad Fisiológica por el Número de Reliquias en los Pedículos Foliculares. Método de Polovodova.	60
7. Análisis de las Diferentes Series.	66
a) Hembras alimentadas con miel solamente. Serie 1.	
b) Hembras inseminadas y no inseminadas alimentadas con miel y sangre. Serie 2 y 3.	
c) Hembras inseminadas alimentadas con miel y sangre pesadas antes y después, de su alimentación sanguínea. Serie 4 y 5.	
d) Prueba Doble Ciego. Evaluación de las técnicas. Serie 5.	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>83</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>86</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>87</b>

## INDICE DE CUADROS

Cuadro I.	Frecuencia de hembras <i>A. albimanus</i> alimentadas con miel a los tres días de emergencia.	67
Cuadro II.	Hembras no inseminadas de <i>A. albimanus</i> alimentadas con miel y sangre a los tres días de emergencia.	71
Cuadro III.	Hembras inseminadas de <i>A. albimanus</i> alimentadas con miel y sangre a los tres días de emergencia.	72
Cuadro IV.	Método de Detinova o "Traqueación Ovárica".	79
Cuadro V.	Método de Polovodova o "Reliquias Foliculares".	82

Figura 20.	Apariencia general de un ovario de <i>Anopheles albimanus</i> .	60
Figura 21.	Ovariolos de <i>A. albimanus</i> después de haber cumplido dos ciclos gonotróficos.	63
Figura 22.	Ovariolos de <i>A. albimanus</i> después de haber cumplido tres ciclos gonotróficos.	63
Figura 23.	Ovariolos de <i>A. albimanus</i> después de haber cumplido cuatro ciclos gonotróficos.	64
Figura 24.	Ovariolos que muestran la apariencia de folículos degenerados en un desarrollo anormal.	64
Figura 25.	Ovariolos de <i>A. albimanus</i> donde se muestran diferentes estados de desarrollo folicular.	65
Figura 26.	Frecuencia diaria de los estados de desarrollo folicular.	68
Figura 27.	Relación peso mosquito y número de huevos.	74
Figura 28.	Número de huevos en los diferentes ciclos gonotróficos.	77

## RESUMEN

Durante el año 1988 - 1989 en la ciudad de Panamá se estudió la eficacia de dos métodos para diferenciar hembras pàridas de nulíparas de *Anopheles albimanus*. El primer método de Detinova o "traqueación ovàrica" està basado en la observaciòn de los cambios morfològicos que se dan irreversiblemente en las tràqueas y traqueolas de los ovarios durante el desarrollo del huevo. El segundo método de Polovodova o "reliquias foliculares" està basado en la observaciòn de las dilataciones que se forman en los pedicelos foliculares después de cada ciclo gonotròfico. Ambos métodos fueron aplicados a mosquitos *A. albimanus* procedentes de una colonia con un historial gonotròfico conocido. Se clasificaron hembras nulíparas y pàridas que habian cumplido hasta un máximo de 4 ciclos gonotròficos; con un margen de confiabilidad para el método de Detinova del 93.3% para las nulíparas y 97.7% para las pàridas. Con el método de Polovodova fueron clasificadas correctamente 88.89% de las nulíparas, 86.36% de las primíparas, 72.0% de las bíparas, 90.0% de las tríparas y 66.67% de las cuadríparas. En *A. albimanus*, se pudo establecer que la mínima cantidad de sangre ingerida que estimula el desarrollo folicular es 0.8 mg de sangre, y que a mayor cantidad de sangre ingerida mayor es el número de huevos desarrollados. El desarrollo de los folículos cesa a las 72 horas y se mantendrá en el estado fía de "reposo" a menos que tome una alimentaciòn sanguínea.

## SUMMARY

This study was made during the years 1988-89 in the city of Panama to determine the effectiveness of two methods to distinguish between parous and nulliparous female *Anopheles albimanus*. The first method employed was Detinova's method based on the irreversible morphological changes in the trachea and tracheoles of the ovaries during egg development. The second or "Polovodova's method" was based on the finding of a scar or "follicular relic" each time an egg was shed from an ovariole. Both methods were applied to *A. albimanus* from a colony with known gonotrophic history. Parous and nulliparous females that had completed a maximum of 4 gonotrophic cycles were classified; with a correct diagnosis under Detinova's method of 93.3% for the nulliparous females and 97.7% for the parous females. With Polovodova's method 88.89% nulliparous females were correctly classified, 86.36% of those who laid for the first time, 72.0% two times, 90% three times and 66.67% four times. It was established that in *A. albimanus* the minimum amount of blood to stimulate follicular development was 0.8 mg and that as more blood was engorged more eggs were laid. Follicular development ceased after 72 hours and remained in Stage IIa (the "resting" stage) until a blood meal was taken.

## INTRODUCCION

La determinación de la edad fisiológica basada en la estructura del aparato reproductor femenino y los cambios que se dan irreversiblemente durante el desarrollo folicular y sucesivos ciclos gonotróficos en varias especies de mosquitos hematófagos ha sido extensamente estudiado.

Conocer la edad fisiológica es una información útil que permite establecer la proporción de una población de mosquitos que en una fecha determinada del año se constituya en una amenaza a la salud del hombre. Permite calcular el porcentaje de sobrevivencia diaria como también, evaluar el impacto de las medidas de control (Colless, 1958; ; Detinova 1962, 1968; Garrett-Jones, 1970; Fleming, 1986; Gillett, 1957; Gillies, 1958; Hitchcock, 1968, McDonald, 1952; Nayar & Knight, 1981; Rachou et. al.; 1973; Rosay, 1969; Spencer, 1979; Tyndale-Biscoe , 1984).

Rachou et. al. (1973), aplicó los métodos Detinova y Polovodova en *A. albimanus*, señalando que ambos son efectivos en la clasificación de nulíparas y pãridas por el examen de las traqueolas del ovario, indicó que fue posible determinar el número de ciclos gonotróficos realizados por la hembra. Observó hasta un máximo de ocho dilataciones. Indicó la importancia que tiene

esta especie en la transmisión de la malaria en San Salvador considerando como potencialmente peligrosos aquellos mosquitos con un mínimo de cuatro ciclos gonotróficos y seis ciclos gonotróficos en la transmisión de la malaria por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* respectivamente. González et. al. (1984) al aplicar los métodos Detinova y Polovodova, indicaron que la peligrosidad epidemiológica de la población de *A. albimanus* era baja debido a su alto porcentaje de hembras nulíparas.

Con el propósito de comparar y ampliar los conocimientos que sobre la biología y comportamiento se tienen en *A. albimanus*, vector primario de la malaria en Panamá con amplia distribución en el Istmo y mayor abundancia en la estación lluviosa, nos propusimos estudiar la edad fisiológica la cual constituye uno de los parámetros necesarios en la evaluación de su potencial como vector.

Hasta el presente no se ha hecho una evaluación de los métodos Detinova y Polovodova en *Anopheles albimanus*.

En este estudio los objetivos principales fueron:  
— Evaluar la eficacia de los métodos Detinova y Polovodova en la determinación del grado de paridad y

múltiples ciclos gonotróficos,

-- Determinar la duración de la actividad gonotrófica  
y,

-- Observar cómo influye la cantidad de sangre ingerida en el número de huevos desarrollados.

Este trabajo que fue realizado en condiciones de laboratorio puede aplicarse a situaciones silvestres sirviendo de modelo para trabajos futuros.

## REVISION DE LITERATURA

### 1. Ubicaci6n Sistemática.

La especie *Anopheles albimanus* pertenece a la Familia Culicidae, Sub familia Culicinae y Sub genero Nyssorhynchus. Los caracteres diferenciales de las formas adultas pertenecientes al sub genero Nyssorhynchus Blanchard, 1902, se distinguen por la presencia de tufos postero-laterales de escamas en los segmentos abdominales; los tergitos abdominales, por lo menos del II en adelante, presentan escamas blancas o amarillentas; la sexta vena longitudinal es blanca con dos manchas oscuras subterminales, situadas una en cada extremidad; los segmentos tarsales posteriores III, IV, y V son, o totalmente blancos o con pequeños anillos oscuros en la base (Faran, 1980).

### 2. Biología y Distribución Geográfica.

Según Hobbs (1986), *A. albimanus* es una especie tropical que se encuentra mayormente en las partes bajas desde el Valle del Río Grande, México y Centro América, las costas de Colombia hasta la Península Paria en Venezuela y en algunas islas del Caribe. En la costa Pacífica, este mosquito se extiende desde baja California hasta el norte del Perú.

En Panamá, se encuentra a ambos lados del Istmo, siendo más abundante en la época lluviosa especialmente desde Abril hasta Julio, con otro aumento en su abundancia al final de esta época en el mes de Diciembre (Rozeboom, 1938).

Es generalmente zoofílica, alimentándose de animales domésticos como el ganado, caballo, mulas, cerdos, burros.

No parece ser antropofílico o endofílico, pero como se desarrolla en grandes cantidades durante ciertas épocas del año es el anofelino que con mayor frecuencia se encuentra en las casas con el hombre.

La hematofagia es relativa de acuerdo a la domesticidad. En algunos lugares se ha observado en habitaciones humanas, teniendo como periodo de mayor actividad, aquel comprendido en las primeras horas de la noche, o sea, las 19:00 y 21:00 horas. Después de realizar su alimentación sanguínea esta especie puede reposar dentro de las casas, o bien buscar otros hábitats cerca de o a cierta distancia del poblado (Fleming, 1986).

*Anopheles albimanus* por ser una especie de las regiones litorales bajas, prácticamente no existe a alturas superiores a 500 metros y a distancias mayores

de 100 kilómetros de la costa marítima. Sin embargo, ha sido capturado en Brasil, a elevaciones hasta de 1,941 metros siendo normalmente encontrado a alturas inferiores de los 400 metros (Forattini, 1962 ).

Fleming (1986) indicó que en Panamá *Anopheles albimanus* puede volar hasta 1,600 metros en condiciones poco favorables y, que puede llegar a alcanzar cerca de 20 kilómetros de sus criaderos.

### 3. Importancia Médica.

Diferentes estudios han demostrado que de las 15 especies de la tribu Anophelini que existen en la República de Panamá, las únicas que se han encontrado infectadas de *Plasmodium*: *A. albimanus*, *A. tarsimaculatus*, *A. albitalarsis*, *A. bachmanni*, *A. argyritarsis*, *A. eiseni*, *A. pseudopunctipennis*, *A. apicimacula*, *A. neomaculipalpus* y *A. punctimacula* (Clark, 1934).

De todas las especies mencionadas anteriormente *A. albimanus* es el vector primario de la malaria en Panamá, el otro vector de alguna consideración es *A. punctimacula* ( Clark op. cit.; Curry, 1932; Rozeboom op.cit.; Wright, 1972 ).

Desde comienzos del siglo XX ha sido el interés de los entomólogos dedicados al estudio de la malaria, controlar especies anofelinas en diferentes partes del mundo. Se han realizado estudios sobre el comportamiento y fisiología de las distintas especies anofelinas en todas las fases de su desarrollo. Se han buscado métodos que permitan eficazmente, determinar la estructura de la edad en poblaciones naturales de mosquitos.

Conocer la estructura de la edad en poblaciones de mosquitos es un elemento clave ya que, sólo pueden ser vectores eficientes aquellas especies capaces de tomar por lo menos dos alimentaciones de sangre con la posibilidad de que puedan adquirir y subsecuentemente transmitir un patógeno (Furmarn & Catts, 1982). Estos organismos en el caso de la malaria, necesitan un tiempo de desarrollo en el mosquito vector, permitiendo que los esporozoitos (formas infectantes) alcancen sus glándulas salivales, convirtiéndolos en transmisores potenciales. En segundo lugar, la estructura de la edad es uno de los datos requeridos por los modelos epidemiológicos para evaluar las medidas de control (Detinova, 1962; 1968; Machado-Allison, 1982; Panday, 1975a,b; Rachou et. al., 1973; Rosay, 1969).

Detinova (1962), indicó que desde el punto de vista epidemiológico hembras fisiológicamente jóvenes (con uno o dos ciclos gonotróficos) no son peligrosas ya que el proceso de esporogonia no se ha completado, aún si ellas hubiesen sido infectadas durante su primera ingesta de sangre. Para la evaluación epidemiológica de la hembra vectora, es necesario establecer individualmente hembras con edad potencialmente peligrosas (o sea, aquellas con tres o más ciclos gonotróficos).

Las medidas de control aplicadas pueden ser evaluadas por la composición de la edad en mosquitos hembras, observando cambios morfológicos que se dan irreversiblemente, en su sistema reproductivo. Fleming (1986), indicó que al evaluar las medidas de control, si éstas resultan efectivas en el control de larvas; se producirá un incremento gradual en la edad promedio de la población de los adultos, a medida que disminuye la densidad, mientras que un tratamiento de aspersión residual producirá una disminución abrupta en la edad promedio, así como, en la densidad.

#### 4. Sistema Reproductor Femenino de *Anopheles albimanus*.

El sistema reproductor de *Anopheles albimanus* consiste de dos ovarios, un par de oviductos laterales, los cuales se fusionan constituyendo el ampulla, ésta se continúa con el oviducto común o vagina, una espermateca, y glándulas accesorias.

Cada ovario, es un órgano saquiforme revestido por la membrana ovariana. Dentro de ella se observa la presencia de una serie de formaciones tubulares, denominadas ovariolos, los cuales se observan dispuestos radialmente al oviducto interno.

Todo el sistema reproductor se encuentra situado en posición dorsal al estómago, localizado entre el cuarto y quinto segmento abdominal. Durante la maduración de los huevos, hay un crecimiento de los mismos ocupando toda la cavidad abdominal del primero al séptimo segmento.

Snodgrass (1959) indicó que el número de ovariolos en Diptera no es constante variando de 50 a 100 por cada ovario (Fig. 1). Miura & Takahashi (1972), indicaron que el número de ovariolos está probablemente determinado genéticamente.

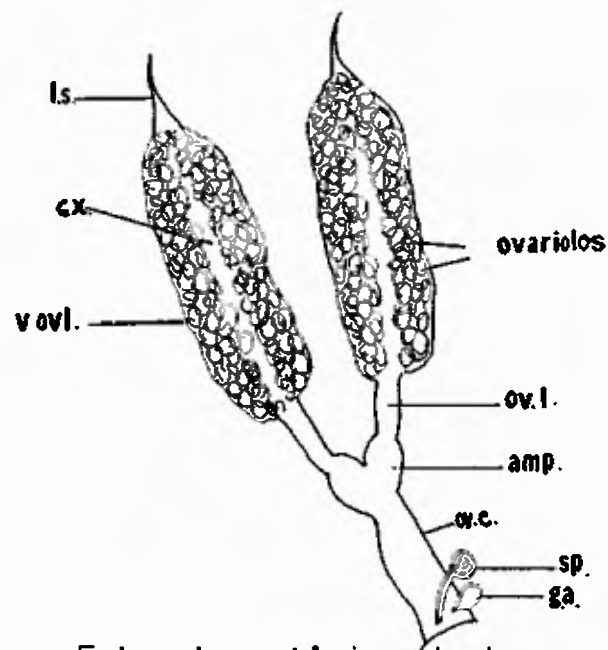


Fig. 1. Estructura típica de los ovarios. l.s., ligamento sensorial; c.x., cáliz; v.ovi., vaina ovariolar; ovariolos; s.p., espermateca; g.a., glándula accesoria; ov.c., oviducto común; amp., ámpula; ov.l., oviductos laterales; tr., troncos traqueales.

Cada ovario consiste de un germario (zona de crecimiento), del cual nacen sucesivos folículos que se comunican con el oviducto interno por medio del pedículo folicular. Los folículos son numerados a partir del pedículo (porción proximal del ovario) como números uno, dos, tres y así sucesivamente. En el segundo folículo, se distingue una capa basal formada por el epitelio folicular y un conjunto central de células que al desarrollarse constituirán el oocito o célula huevo.

Típicamente cada folículo consiste de tres tipos de células; (i) las foliculares, (ii) las nutrientes, y (iii) el oocito. La relación de las mismas en un folículo son indicadas en la Figura 2.

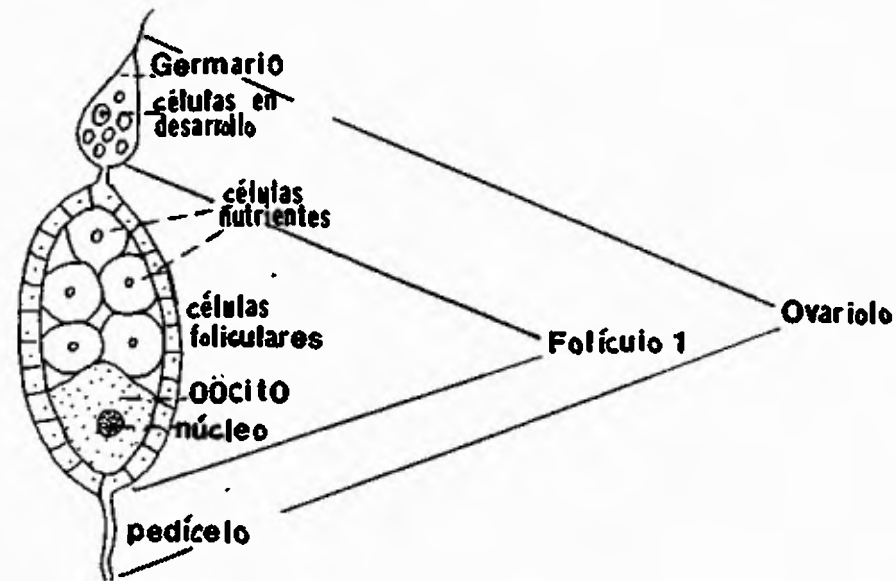


Fig. 2. Estructura típica de un ovariole.

En hembras recién emergidas, solamente un folículo indiferenciado es visible, al metabolizar reservas del estado larvario o carbohidratos, un segundo folículo comenzará a desarrollarse y tornarse visible, el cual pasará a otros estados de desarrollo después de tomar una alimentación sanguínea.

El oxígeno se obtiene a través de dos troncos traqueales principales; los cuales se subdividen en finas traqueolas ovarianas que se distribuyen a lo largo de

todo el ovario.

El aspecto característico del sistema traqueal en los individuos recién emergidos, tiene la apariencia de madejas o nudos en las extremidades de las ramificaciones. Tales madejas están constituidas por traqueolas muy finamente enrolladas. De ellas, salen los filamentos terminales, generalmente uno o dos, que penetran más profundamente los folículos fijándose en el germario hasta alcanzar la capa externa del ovario (Fig. 3).

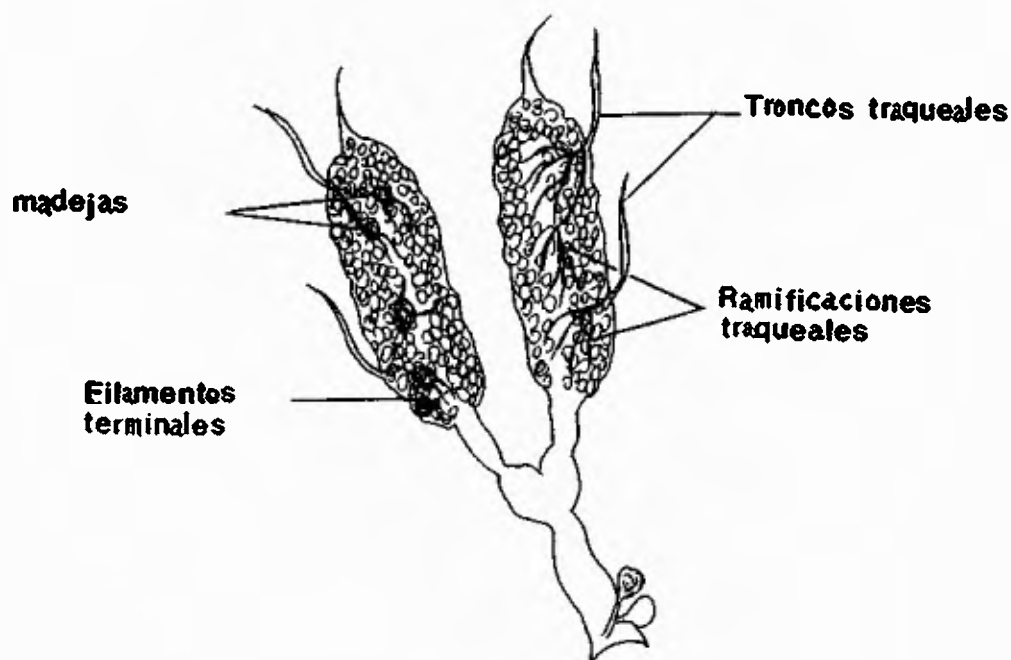


Fig. 3. Apariencia del ovario y sistema traqueal.

Generalmente cada madeja suple un ovariole (Detinova, 1962).

La spermateca está cubierta de células que tienen una cutícula chocolate con abundante porosidad; se considera que la secreción de éstas, al igual que, la de las glándulas accesorias tiene la función de segregar una substancia que le permite mantener viable el esperma durante toda la vida del mosquito (Polovodova, 1947 en Detinova, 1962).

##### 5. Ovogénesis (Desarrollo embrionario).

Los cambios progresivos que ocurren en los ovarios y ovariolos, durante el desarrollo del huevo, fueron determinados por Christophers (1911) dividiéndolo en cinco fases (Estado I-V) luego Mer (1936) agregó el estado N a las descritas por Christophers.

Los estados son clasificados de acuerdo a las siguientes características:

ESTADO	DESCRIPCION
N	Un folículo con ocho células indiferenciadas;
I	Oocito evidente, situado en la porción proximal del folículo, sobre el cual se

notan los siete trofocitos;

- I - II      En el citoplasma del oocito aparece una auréola constituida por una o dos hileras de gránulos de vitelo. El folículo tiende a tener contorno oval;
- II            Los gránulos de vitelo se tornan mayores y más numerosos. El oocito pasa al óvulo y crece, tornándose sensiblemente mayor que los trofocitos, ocupando cerca de la mitad del folículo;
- III          El óvulo pasa a ocupar cerca de  $3/4$  o más del folículo. El núcleo no es visible en el medio de la masa vitelina;
- IV          El folículo se alarga y los trofocitos solamente ocupan la extremidad distal. El huevo lleno de vitelo, ocupa  $9/10$  o más del folículo;
- V            El corion cubre todo el huevo. Los restos de trofocitos se encuentran distalmente al folículo. Aparece el orificio micropilar y los

elementos accesorios; variables con la especie, siendo característico los flotadores laterales en *H. albimanus*.

El huevo se encuentra en este momento listo para la postura (Christophers, 1911; Furman & Catts, 1982; Rosay, 1969; Nelson, 1971).

Una vez completado el desarrollo embrionario los oocitos dejan el tubo folicular, son fecundados y se realiza la postura.

#### 6. Ciclo Gonotrófico.

Es de gran utilidad determinar la duración de cada ciclo gonotrófico (proceso fisiológico que consiste en la digestión de sangre, desarrollo de los huevos, y ovipostura) ya que su duración determina la frecuencia de alimentación, el contacto mosquito-hombre y en consecuencia influye en la probabilidad de transmisión de agentes patógenos (Fleming, 1986).

Luego de las posturas el número de ciclos se determina por disecciones de las hembras; observando los cambios morfológicos que se dan irreversiblemente a nivel de los pedicelos foliculares. La contracción del

pedículo folicular indica el final de cada ciclo. Se emplea el "método de Polovodova" basado en la observación de reliquias foliculares que se forman en el pedículo folicular después de cada ciclo expresados como una dilatación en los ovariolos (Detinova, 1962).

En áreas tropicales, donde los cambios de temperatura son poco bruscos la duración de los ciclos gonotróficos tienen un ritmo más uniforme; para *Anopheles albimanus* la duración promedio en el laboratorio es de seis días a temperaturas comprendidas entre 26 - 27°C y 75% de humedad relativa (Restrepo, 1984). En poblaciones naturales la duración del ciclo gonotrófico reportada para *Anopheles albimanus* es de dos días (Rachou et. al.; 1973).

Otra consideración de importancia es el número de alimentaciones sanguíneas necesarias para cumplir el primer ciclo. Machado-Allison (1982) indicó, que existen características diferentes para cada especie en la duración del ciclo gonotrófico y el número de alimentaciones de sangre requeridas para el desarrollo del primer grupo de huevos. Nelson (1986) señaló que con frecuencia *Aedes aegypti* requiere más de una alimentación entre cada postura, especialmente si es perturbado antes de estar completamente lleno de sangre.

Hitchcock (1968b) señaló que aquellos mosquitos que requieren más de una alimentación para completar un ciclo gonotrófico son denominadas como "hembras pregrávidas". Charlwood & Wilkes (1979) encontraron 10% de hembras nulíparas de *Anopheles darlingi*, capturadas cuando chupaban sangre, con folículos desarrollados hasta el estado II de Christophers; indicando esto que las hembras ya habían obtenido previamente sangre.

La cantidad de sangre ingerida también es importante en el inicio de un ciclo gonotrófico y el número de huevos depositados por la hembra. Nelson (1986), señaló que existe un umbral en la distensión del estómago que estimula el desarrollo de los ovarios en *Aedes aegypti*. Colless & Chellapah (1960) indicaron que el número de huevos que pone la hembra depende de la edad fisiológica del mosquito, ingesta de sangre y el peso después de la emergencia. En tal sentido el número de huevos disminuye progresivamente a medida que aumenta la edad fisiológica. En general, el mayor número de huevos es producido en el primer ciclo gonotrófico con una reducción gradual en los ciclos posteriores.

## 7. Digestión de Sangre y su Relación con el Desarrollo Ovárico.

En la mayoría de las especies, el tiempo para desarrollar los huevos y el estado de desarrollo puede ser determinado, observando la apariencia externa del abdomen de la hembra. Sella (1920) en Detinova (1962), sugirió que el proceso de digestión de la sangre puede ser dividido en siete estados de desarrollo correlacionando el estado de desarrollo ovárico sugerido por Christophers (1911). Los mismos son caracterizados como sigue:

I - estómago sin sangre. Ovario no desarrollado;

II - estómago lleno de sangre fresca, bien roja. Los dos últimos esternitos y tres últimos tergitos no presentan sangre;

III - la sangre todavía retiene su coloración rojiza. 2-2,5 esternitos y 4-5 tergitos están libres de sangre; Los folículos en este estado son encontrados en estado II avanzado de Christophers;

IV - la sangre en el estómago se torna negruzca. Los últimos 2,5-3 esternitos y 5-6 tergitos están sin

sangre. El folículo se encuentra en estado III;

V - sangre negra. Los últimos 2,5-3,5 esternitos y 6,5 tergitos están sin sangre. Los folículos en este estado alcanzan por lo menos el estado IV;

VI - la sangre se mantiene negra y se observa una traza visible en el lado ventral;

VII - estómago libre de sangre. El abdomen está totalmente ocupado por los huevos maduros en estado V (Forattini, 1962; Rosay, 1969; Smith, 1966) Figura 4.

## ESTADO.

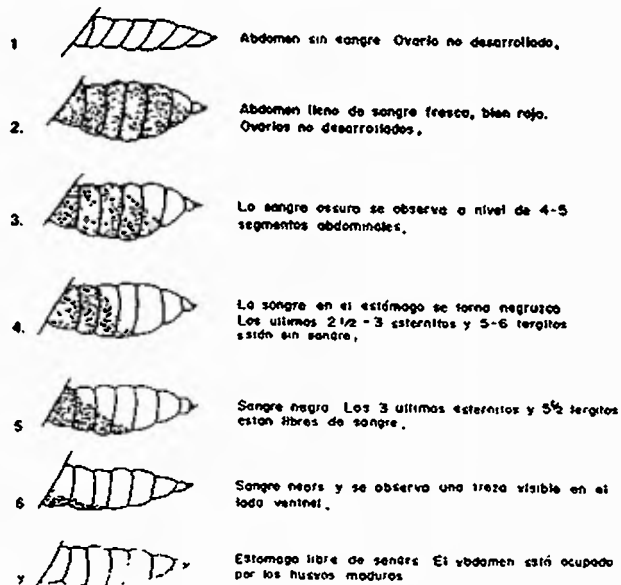


Fig. 4. Apariencia externa abdominal de un mosquito y su relación con los estados de digestión de la sangre.

Los estudios realizados demuestran la posibilidad de usar la apariencia externa del abdomen del mosquito como indicador del grado de desarrollo ovárico; sin embargo se requieren hacer disecciones de hembras para poder correlacionar la apariencia abdominal con los diferentes estados de desarrollo ovárico (Smith, op cit.).

#### **8. Efecto del Peso Corporal, Cantidad de Sangre Ingerida y su Relación con la Fecundidad.**

Miura & Takahashi (1972) y Colless & Chellapah (1960) trabajando con *Hedes nigromaculis* y *Hedes aegypti* respectivamente demostraron que existe una correlación positiva entre la cantidad de sangre ingerida y el peso corporal. La relación entre el número de huevos depositados y el peso de la sangre ingerida fue altamente significativa.

El número de oocitos en el ovario de un espécimen está determinado genéticamente; la producción total de huevos está determinada por factores, tales como la cantidad y calidad de la nutrición, el apareamiento y las condiciones físicas y químicas del ambiente (Engelmann, 1970).

## 9. Determinación de la Edad Fisiológica.

Los métodos y criterios que se han utilizado en la determinación de la edad fisiológica, (número de ciclos gonotróficos por los cuales pasa una hembra) en mosquitos han pasado por varias etapas. La utilización de uno de ellos o de métodos combinados depende de la finalidad y tipo de trabajo y del tamaño de la muestra a ser analizada.

Los métodos hasta el presente descritos son los siguientes:

### a) Presencia de huevos retenidos.

Christophers (1911), indicó que luego de la ovogénesis, durante determinado ciclo gonotrófico uno o más huevos pueden quedar retenidos en el ampulla o en los ovarios sirviendo éstos como indicador de paridad. Hitchcock (1968a), trabajando con *Anopheles quadrimaculatus* demostró que había un incremento en la incidencia de huevos retenidos al aumentar la edad fisiológica del mosquito, pero que el número de huevos retenidos aparentemente no tenía relación con la edad fisiológica. Sin embargo, como no todas las hembras retienen huevos y no es posible determinar si hay huevos retenidos en

hembras grávidas cuyos ovarios están en estado V; este método como indicador de paridad no es confiable.

**b) Grado de desgaste alar.**

Perry *et al.* (1912) en Charlwood 1968, dividieron los mosquitos hembras en cuatro categorías según el grado de desgaste a nivel de las venas y escamas alares, considerando mosquitos jóvenes a los que presentaban sus alas sin alteración y, viejos los que presentaban algún tipo de alteración. Trabajos realizados posteriormente indicaron que algunas hembras que no tenían descamación se encontraron con esporozoitos en sus glándulas salivales (Detinova, 1962; Forattini, 1962).

**c) Tamaño del Ampula.**

Mer (1932), indicó que el tamaño de las ampulas del oviducto en *Anopheles saccharovi* después de la emergencia es pequeño y que aumenta con la ocurrencia de sucesivos ciclos gonotróficos. Polovodova (1941) En: Detinova (1962) aplicando ese criterio, verificó que los cambios más sensibles ocurrían durante los tres primeros ciclos gonotróficos. Indicando la dificultad de distinguir los especímenes más viejos entre todas

las hembras oníparas (aquellas hembras que han completado al menos un ciclo gonotrófico) en base a estas observaciones. Por otro lado, existen variaciones individuales acentuadas en el tamaño de las ampulas y ovarios entre los mosquitos. Siendo así, hembras más pequeñas, pueden presentar ampulas ovarianas menores de aquellas hembras jóvenes, y de tamaño más grande. La utilización de estos cambios estructurales resultan hasta cierto grado subjetivos y de difícil interpretación. Por lo cual, este método en la práctica fue abandonado.

**d) Infestación por ácaros parásitos.**

Gillett (1957), sugirió que la presencia o ausencia de ninfas de ácaros acuáticos Hydrachnidae en el cuerpo del mosquito, podría servir como indicativo de la edad. Indicó que la infestación se daba en el momento de la emergencia del revestimiento pupal y que los ácaros lo abandonan durante la oviposición, cuando el mosquito estaba sobre el agua, cayendo en el medio líquido donde continuaban su desarrollo (Charlwood et al., 1980).

Aplicando este método se podía dividir las poblaciones de mosquitos en dos grupos: nulíparas, las que

se encontraban infestados por ácaros y, oníparas, las que no presentaban dicha infestación. Gillett (1957) encontró que 49% de mosquitos *Taeniorhynchus africanus* con escaso desgaste alar estaban infestados con ácaros y apenas 3% con mayor desgaste alar se encontraba infestado. Corbet (1960, 1962) hace referencia de que solamente ciertos géneros de ácaros pueden ser indicadores de la edad y que estos ácaros deben encontrarse vivos; Forattini (1962) indicó que no todos los criaderos se encuentran infestados por ácaros.

Las observaciones que se han llevado en la práctica sobre los dos métodos anteriormente descritos indican que no son confiables en la estimación de la edad ya que: 1- el desgaste alar no solamente se debe a la edad sino también a las condiciones de vida del insecto en el medio ambiente en que se encuentre; y 2- en el momento de la oviposición puede darse la infestación por ácaros; los hidrácidos pueden también ser encontrados en hembras oníparas. También debemos considerar que no todos los criaderos se presentan infestados con estos ácaros, mostrando claramente la invalidez de establecer la proporción de mosquitos jóvenes o viejos, nulíparas u oníparas por estos métodos.

. Las investigaciones desde entonces han tratado de

distinguir hembras nullíparas, de las páridas y, entre las páridas se ha tratado de buscar un método que indicara el número de ciclos que había llevado a cabo cada mosquito.

En su búsqueda fueron estudiados varios elementos indicadores. Uno de ellos se basó en la observación del meconio en el estómago (excreta amarillenta, resultado del estado pupal) el cual indicaba que la hembra estaba recién emergida y que no había ingerido líquido alguno. Este método no sirvió de base para el conocimiento del número de nullíparas, ya que el meconio puede ser eliminado después del vuelo y el espécimen continuar nullípara por algunos días. De ese modo, la ausencia de meconio en el estómago no constituye un indicador seguro de oniparidad (Detinova, 1962; Hitchcock, 1968; Rosay, 1969).

Gillies (1958) sugirió que la presencia de espermatozoides en las espermatecas y los tampones de cópula (secreciones dejados en la genitalia femenina por el macho durante la cópula), podrían servir como elementos indicadores de la edad. Detinova (1962) y Gillies (1958) indicaron que tales tampones son reabsorbidos dentro de pocas horas y que, la presencia de los mismos solo indicaría que las hembras habían copulado re-

cientemente. Por otro lado, las hembras fecundadas permanecen nulíparas por cierto número de días, periodo que depende de la alimentación sanguínea y del tiempo necesario para el desarrollo ovárico.

De tales consideraciones, se concluye poca eficacia de esos indicadores para el cálculo de la proporción de hembras nulíparas.

Los métodos anteriormente descritos no permiten determinar la estructura de la edad en mosquitos con alto grado de exactitud. Algunos pueden ser utilizados solamente para diferenciar hembras que han depositado huevos (hembras páridas) de aquellas que no lo han hecho (nulíparas); otros métodos diferencian entre las hembras fisiológicamente jóvenes de las viejas, y entre las que ya han ovipositado.

Por esta razón, se usó el aparato reproductor femenino en las observaciones de los investigadores; debido a que permite en una forma más precisa determinar el estado de paridad y el número de ciclos gonotróficos que había realizado una hembra hasta el momento de su disección, pudiendo de esta manera evaluar el poder de transmisión, el riesgo epidemiológico de la población, y las medidas de control que se hayan aplicado.

De acuerdo a todos los métodos e indicadores descritos anteriormente; los que han permitido estimar el grado de paridad y estructura de la edad en forma más precisa son: el método de Detinova o "traqueación ovárica" y, método de Polovodova o "reliquias foliculares"; basados en cambios morfológicos que se dan irreversiblemente en los ovarios y ovariolos (Detinova, 1945; En: Detinova, 1962, Detinova, 1968; Joc, 1975; Polovodova 1947, 1949; En: Detinova, 1962).

**e) Método de Detinova o "traqueación ovárica".**

Detinova (1945); En: Detinova (1962), comprobó que en las traqueolas ováricas de las hembras nulíparas que tienen los folículos en estado N, I, I-II, ó II, las finas terminaciones de las traqueas se presentan enrolladas, contralidas y plegadas sobre sí mismas tomando la apariencia de nudos fuertemente apretados.

Después de la alimentación sanguínea, con el desarrollo de los huevos, el aumento de los ovarios y primera oviposición se dan alteraciones irreversibles en el sistema traqueal.

Al aumentar los folículos gradualmente de tamaño, los filamentos terminales deben respectivamente, aumentar en largo, consiguiendo deshacer las madejas. De

esta manera, al darse la primera ovogénesis, los nbdulos quedan completamente distendidos formándose una red de finas tráqueas y traqueolas que no vuelven más a su aspecto anterior.

En algunos casos, puede observarse hembras oníparas con nbdulos aislados en la red traqueolar arriba descrita. Esto indica que algunos folículos no se desarrollaron (Detinova, 1962).

La técnica no puede ser usada en aquellos mosquitos con folículos desarrollados del estado III en adelante, pues el aumento en la cantidad de vitelo tiende a oscurecer las traqueolas haciendo imposible su observación. También en los últimos estados de desarrollo, las terminaciones de las traqueolas ya están distendidas siendo una hembra nulípara (Rosay, 1969). Kardos y Bellamy (1961) al aplicar esta técnica en *Culex tarsalis* comprobaron que la condición de la traqueación de los ovarios prometían ser una herramienta útil para diferenciar hembras nulíparas de pàridas.

La técnica no hace distinción entre hembras que ovipositaron una vez de las que ovipositaron varias veces.

f) **Método de Polovodova o "reliquias foliculares".**

El método de Polovodova, basado en las dilataciones o reliquias que se forman en los pedicelos foliculares de los mosquitos cuando desarrollan y depositan sus huevos, hizo posible determinar en forma precisa la edad fisiológica en poblaciones de mosquitos.

En los tubos foliculares tienen lugar procesos irreversibles que se dan con la liberación de los huevos maduros, ya que después de cada oviposición queda en el tubo folicular una dilatación.

Los ciclos gonotróficos pueden distinguirse unos de otros por el hecho de que, en cada oviposición, restos de células foliculares son acumuladas en los pedicelos foliculares.

Como ya fue referido, cada ovario posee una membrana adherente denominada íntima, que se continúa con el pedicelo el cual, a su vez, se comunica con el oviducto interno. Con el crecimiento del folículo la íntima se distiende y, en el momento de la postura, el pedicelo se encuentra considerablemente alargado y dilatado por la formación del huevo maduro y adquiere su forma. Después de la oviposición se observa la

Intima semejando un saco. El largo de éste corresponde a los largos combinados del huevo y el pedicelo terminal. Dentro del saco quedan inclusiones de las células nodrizas y el epitelio folicular. Después de la ovulación, el saco pedicular se contrae y, al cabo de 24 horas aproximadamente, los restos forman una dilatación que también es conocida como "reliquia folicular". Según Joc (1975) y Lange & Joc (1981), las dilataciones son formadas después del paso del huevo por el pedicelo a causa de la degeneración folicular del pedicelo terminal y restos de células foliculares. El número de cada reliquia indica el número de ciclos gonotróficos que el mosquito ha completado.

En cada ovulación, se forma otra dilatación por el mismo proceso y cada huevo maduro en su salida debe pasar a través de las dilataciones previas. La dilatación más próxima al folículo en desarrollo corresponderá al último ciclo completado por la hembra, observándose las inclusiones más numerosas y evidentes en la última postura; debido a que los huevos al ser liberados, arrastran los restos celulares subyacentes.

Si cada dilatación indica que se ha producido un ciclo gonotrófico, y si se conoce la duración media del ciclo gonotrófico de una especie y se multiplica por el

número de dilataciones, se podrá calcular su edad cronológica.

La determinación de la edad fisiológica en mosquitos hembras, ha sido extensamente usada en el estudio del porcentaje de supervivencia y el potencial de transmisión de patógenos. El conocimiento de estas características permite evaluar el riesgo epidemiológico de los mosquitos y el impacto de las medidas de control (Beklemisheve, et al. 1959; Detinova, 1962; 1968; Garret-Jones 1970; Gillies, 1958; Hitchcock, 1968a,b; Joc, 1975; Lange & Joc, 1981; Spencer, 1979).

De acuerdo con Rosay (1969) la aplicación de este método resulta difícil por la localización, tamaño y color de las dilataciones. El investigador deberá desarrollar destreza no solamente en sus disecciones, sino también en el número de ovariolos que deberán ser observados. Indicó que con el pasaje del huevo (Estado V) inmediatamente después de la postura cuando el pedicelo está estirado, las dilataciones son difíciles de observar. En estos casos se deberá buscar cuidadosamente los folículos que no maduraron en el ciclo ovárico pasado.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Area de Trabajo y Condiciones Ambientales.

La investigación se realizó en el Insectario de la Maestría en Entomología en la Universidad de Panamá.

Los especímenes fueron mantenidos en un cuarto bajo condiciones naturales permitiendo el paso de radiación solar y fotoperíodo de 12:12 horas. Durante el período de la investigación se registró la temperatura y humedad relativa continuamente con un higrotermógrafo modelo 594-The Bendix Corporation.

### 2. Trabajo de Insectario.

Los especímenes utilizados en la investigación fueron obtenidos de la colonia de *Anopheles albimanus* cepa Green que se mantiene en el Insectario de la Universidad de Panamá; suministrada por el Laboratorio Conmemorativo Gorgas (L.C.G.). Las pupas fueron colocadas en cámaras de emergencia, provista en su interior de una mota de algodón embebido de miel de abeja pura.

Al cabo de 72 horas, después de la emergencia, cada mosquito hembra fue colocado individualmente en frascos plásticos cuyas medidas fueron de 8.5 cm de longitud X 3.0 cm. de diámetro. Cada frasco se acondi-

ción previamente a la introducción del mosquito, introduciendo algodón humedecido con agua de la pluma en su fondo, cubiertos con tul y encima un algodón embebido con miel de abeja pura (Figura 5).



Fig. 5. Viales que contienen los mosquitos individualmente en el estudio de cada ciclo gonotrófico.

El trabajo del insectario consistió de cinco series las cuales describimos a continuación:

**3. Hembras Alimentadas con Miel Solamente. Serie (1)**

Para determinar el máximo estado de desarrollo folicular en hembras alimentadas con miel solamente, se

colocaron pupas en jaulas que tenían en su interior una mota de algodón embebido con miel de abeja. Inmediatamente, después de la emergencia, se hicieron disecciones de 30 mosquitos hembras cada 24 horas hasta observar que los folículos, no proseguían su desarrollo. Luego se mantuvieron los mosquitos hasta completar 10 días desde la emergencia y se disectaron 30 mosquitos hembras nuevamente.

Se llevó registro del estado de desarrollo folicular e inseminación.

**4. Hembras No Inseminadas Alimentadas con Miel y Sangre. Serie (2).**

Con el fin de determinar si la inseminación influye en el desarrollo de los ovarios, en la proporción de las hembras que ovipositaron, y en el período de ovipostura; se hicieron las series 2 y 3. En la serie 2 las pupas fueron transferidas al laboratorio y se observaron al estereoscopio (NIKON SMZ-2B) con un aumento de 10X para separar las pupas hembras de los machos, las cuales fueron diferenciadas observando el poro genital en el IX segmento abdominal. Las pupas masculinas fueron descartadas y las femeninas se trasladaron al insectario donde se colocaron en una jaula

que tenía en su interior una mota de algodón embebido en miel de abeja.

Al cabo de tres días después de la emergencia se le ofreció alimentación sanguínea introduciendo el antebrazo en la jaula (Figura 6). Se dejó que se alimentaran hasta observar  $3/4$  de la longitud total del abdomen distendido (considerando esta distensión una alimentación completa). Los mosquitos hembras fueron introducidos individualmente en viales (descripción supracit.).

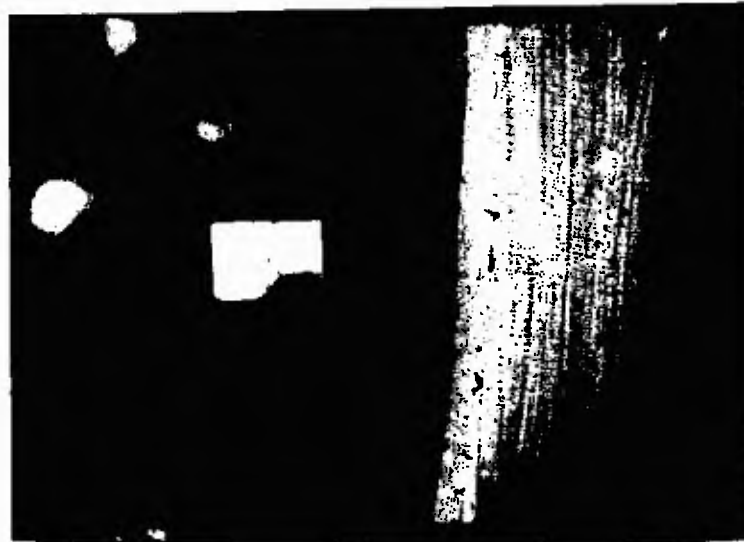


Fig. 6. Antebrazo introducido en la cámara de emergencia en el momento en que se alimentan los mosquitos.

Se disectaron 30 mosquitos diariamente por el término de 10 días consecutivos. Se registró el estado

de desarrollo folicular, apariencia abdominal, estado de paridad, día de postura y si el mosquito había defecado o no.

**5. Hembras Inseminadas Alimentadas con Miel y Sangre. Serie (3).**

Se colocaron pupas de ambos sexos en pequeñas jaulas que tenían en su interior una mota de algodón embebido con miel de abeja.

Al cabo de tres días después de la emergencia se le ofreció alimentación sanguínea introduciendo el antebrazo en la jaula. Se dejó que se alimentaran hasta observar  $3/4$  de la longitud total del abdomen distendido. Los mosquitos alimentados fueron introducidos individualmente en viales plásticos (descripción supracit.). Se disectaron 30 mosquitos diariamente por el término de 10 días consecutivos. Además se disectaron 30 mosquitos nuevamente a los 15 días después de haber recibido su alimentación sanguínea.

Se registró el estado de desarrollo folicular, apariencia abdominal, estado de paridad, inseminación, día de postura y si el mosquito había defecado o no. Para el análisis se utilizaron solamente los datos de las hembras inseminadas.

**6. Hembras Inseminadas Alimentadas con Miel y Sangre Pesadas Antes y Después de su Alimentación Sanguínea. Serie (4).**

El estudio de la relación entre de la cantidad de sangre ingerida y el número de huevos depositados fue realizado con hembras de tres días de edad.

Tres días después de la emergencia, la jaula que contenía los mosquitos fue trasladada al cuarto de pesaje para estudiar la relación entre el peso de hembras no alimentadas y el peso de una ingesta de sangre, cada mosquito hembra no alimentada que habían recibido solamente miel como fuente de carbohidrato fue trasladado de la jaula y colocado en un micro-vial cuyas dimensiones eran 10 mm de diámetro y 25 mm de alto para su pesaje en una balanza electrónica micro-analítica Sartorius Modelo 1800 (Figura 7), con un margen de pesada de 110g y de lectura de 0.1mg.

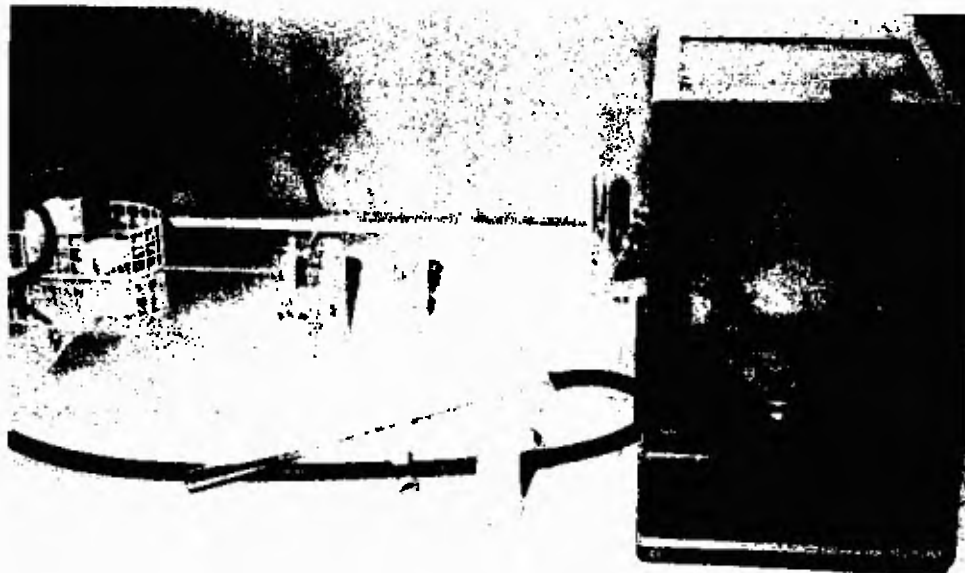


Fig. 7. Equipo de Pesaje. Balanza microanalítica Modelo Sartorius 1800, aspirador, microvial donde se colocaron los mosquitos individualmente para el pesaje y, viales para el mantenimiento de los mosquitos.

Inmediatamente después, los mosquitos fueron introducidos en viales plásticos y alimentados con sangre humana colocando la mano sobre cada uno de los frascos. Se dejó alimentar cada mosquito hasta que espontáneamente dejara de alimentarse. Nuevamente, cada mosquito se pesó después de su alimentación de sangre. La cantidad de sangre ingerida fue calculada por la diferencia de peso del mosquito antes y después de la alimentación.

Una vez pesados los mosquitos fueron trasladados al insectario. En el cuarto de trabajo fueron coloca-

dos en bandejas; individualmente a cada vial se le colocó en su parte superior una motita de algodón embebido de miel de abeja. Durante las primeras 24 horas se observó si el mosquito había excretado o defecado parte de la ingesta.

Se observó diariamente el mosquito para determinar el día en que se daba la postura. Al término de 7 días, los mosquitos que no habían realizado postura, se le ofrecía una segunda alimentación sanguínea, el procedimiento de pesaje se repetía cada vez que el mosquito recibía una nueva alimentación.

Cada mosquito fue identificado con un número el cual se anotó en cada vial, permitiéndonos conocer la historia de la edad de cada hembra.

La fecha de postura fue registrada; ese mismo día se le ofreció una nueva alimentación colocándolo en otro vial con las mismas características a la anteriormente descrita. Los huevos contenidos en el vial fueron contados y descartados.

Este proceso se repetía hasta completar como máximo 4 ciclos gonotróficos. De este modo, se estimó la duración de cada ciclo.

## 7. Prueba Doble Ciego. Serie (5).

Con la finalidad de evaluar la eficacia de los métodos Detinova y Polovodova en *Anopheles albimanus* la cual no había sido evaluada anteriormente, se realizó un examen doble ciego. Se entregaron 130 especímenes enumeradas de *A. albimanus* de historia conocida al Dr. M. Nelson. El Dr. M. Nelson quitó el número de cada vial y puso números nuevos, seleccionados al azar. Esta información fue anotada y guardada en un sobre sellado con el propósito de que la información fuera desconocida para el investigador que iba a preparar y corregir el examen y para el disector. Los especímenes fueron entregados al disector (Licda. Marta Best).

Se utilizaron un total de 36 hembras nulíparas y 94 pàridas con las siguientes características: 27 mosquitos que habían cumplido un ciclo gonotròfico, 31 mosquitos con dos ciclos gonotròficos, 31 con tres ciclos gonotròficos y, cinco con cuatro ciclos gonotròficos.

Se llevó registro de la apariencia abdominal, desarrollo folicular, número de dilataciones, estado traqueolar, presencia de saco folicular, número de huevos desarrollados, número de huevos depositados y

estado de inseminación.

#### **B. Disecciones.**

Para separar los órganos reproductivos, el sistema digestivo y los túbulos de Malpighi las hembras fueron disectadas de la siguiente manera:

Se inmovilizó el mosquito introduciéndolo en un frasco que contenía agua de la pluma, y se sacudió ligeramente. Después se colocó el mosquito sobre una gota de agua de la pluma en un portaobjeto bajo el estereoscopio; se sujetó con una aguja de microdisec-  
ción a nivel del tórax con la mano izquierda y a nivel del VII y VIII segmento abdominal con otra aguja de microdisec-  
ción en la mano derecha, se deslizó suavemente la mano hacia la derecha extrayendo los órganos internos. Estos últimos se separaron de los ovarios y se eliminaron; de inmediato, los segmentos abdominales VIII, IX y X fueron colocados sobre una gota de solución salina (0.67%). Se separó la espermateca y se observó al microscopio en 100X de aumento.

a) **Diferenciación entre hembras pãridas y nuliparas por el examen del sistema traqueal ovãrico. Método de Detinova.**

Cuando se diferenciò el grado de paridad por el Método de Detinova o de "traqueación ovãrica" solamente las hembras con folículos en estado de desarrollo N, I, I-II, y II; de acuerdo con la clasificación de Christophers (1911) y modificada por Mer (1936) pudieron ser evaluadas. Es decir, que en aquellos folículos en donde solamente existía una pequeña cantidad de vitelo era posible ver las tráqueas y traqueolas de los ovarios. Los ovarios disectados fueron transferidos a otra gota de agua, con la finalidad de limpiar el excedente de grasa y escamas existentes en el medio. Un ovario fue colocado sobre una gota de agua de la pluma y se dejó secar por 24 horas protegiéndolo del polvo y el roce. Al secarse el ovario el aire entraba por todo el sistema traqueal incluyendo las ramificaciones más pequeñas.

Se colocaron 8 ovarios por cada portaobjeto. Se anotó el número de la hembra al cual correspondía cada ovario.

La presencia de madejas nos indicò que la hembra era nulipara y la presencia de una red fina traqueal fue signo de paridad. El examen de paridad se hizo con

el microscopio compuesto utilizando diferentes aumentos. Los portaobjetos con los ovarios fueron guardados en cajas para su posterior revisión.

**b) Determinación de la edad fisiológica por el número de dilataciones en los pedículos foliculares. Método de Polovodova.**

Aplicando este método durante la disección el ovario se mantuvo siempre sobre una gota de solución salina fisiológica (0.67%).

Las hembras en cualquier etapa de digestión de sangre y desarrollo ovárico fueron usadas en las disecciones. Los ovarios se examinaron bajo un estereoscópio (NIKON SMZ-2B).

**c) Técnica de disección.**

El ovario fue colocado sobre una gota de solución salina (0.67%) teñida de violeta genciana por espacio de un minuto.

Luego de la tinción el ovario se colocó sobre una nueva gota de solución salina (0.67%).

El ovario fue llevado a uno de los bordes de la gota, con la finalidad de remover cuidadosamente la membrana ovárica. Se observó la apariencia general del

ovario, y se dió seguimiento en la disección a ciertos folículos, separándolos desde el oviducto interno para observar si existían o no dilataciones.

Cada muestra fue observada al estereoscopio, y para observar el número de dilataciones con más detalle, se observó cada muestra al microscopio NIKON ALPAPHOT YS a 100X y 400X de magnificación. El diafragma se mantuvo cerrado en su totalidad y se jugó con el enfoque y la iluminación; ya que en muchas ocasiones el pedicelo folicular no podía ser observado en un solo plano, permitiéndonos de esta forma observar el número de dilataciones y poder entonces estimar el número de ciclos gonotróficos que había completado cada mosquito durante su vida.

Se tomaron microfotografías de los diferentes estados de desarrollo, estados de paridad, folículos degenerados, folículos con una, dos, tres y, cuatro dilataciones o reliquias foliculares.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Condición Ambiental.

Durante el periodo de la investigación la temperatura promedio fue de 27.16°C (con un mínimo de 25.88°C y máximo de 28.54°C) y una humedad relativa de 71.10% (con un mínimo de 59.28% y máximo de 81.57%).

Detinova (1962) indicó que el proceso de desarrollo folicular y de digestión de la sangre está íntimamente relacionado con las condiciones meteorológicas (temperatura y humedad) del medio ambiente del mosquito. Si la temperatura aumenta la velocidad de los procesos aumenta y viceversa.

### 2. Estados de Desarrollo de los Folículos Ováricos.

Se observó el desarrollo de los folículos ováricos en *A. albimanus*. Todos siguieron las etapas descritas por Christophers (1911) y modificadas por Mer (1936).

El criterio empleado en *A. albimanus* para facilitar la división del desarrollo folicular dentro de los distintos estados de clasificación fueron los siguientes: (i) presencia de gránulos de vitelo en el oocito, (ii) proporción ocupada de vitelo en el foli-

culo y, (iii) presencia del huevo maduro cubierto por el corion. Linley (1965) diferenciò 6 estados de desarrollo folicular (Estado I, IIa, IIb, III, IV y V) en *Leptoconops becquaerti*. Posteriormente Hitchcock (1968) aplicò este mismo criterio de diferenciación en *Anopheles quadrimaculatus*. Las ilustraciones de los estados de desarrollo folicular se presentan en las Figuras (8 - 14).

**Estados de desarrollo folicular. Según Christophers, 1911.**



Fig. 8. N El folículo es casi redondo, consiste de 8 células no diferenciadas.



Fig. 9. I El oocito y las células nutrientes son diferenciadas, el folículo se torna oval.

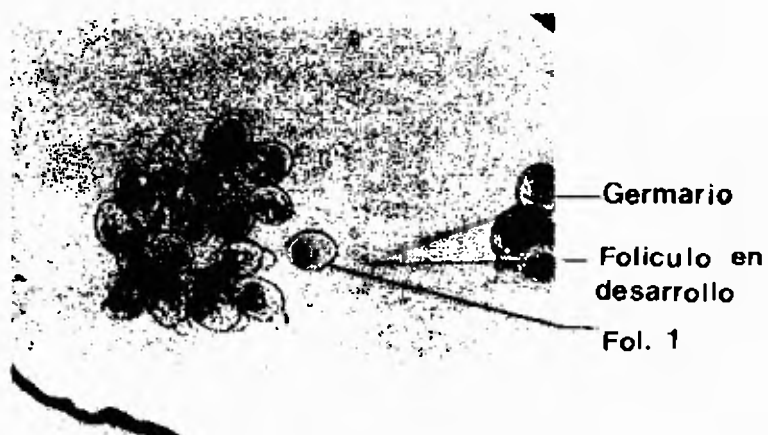
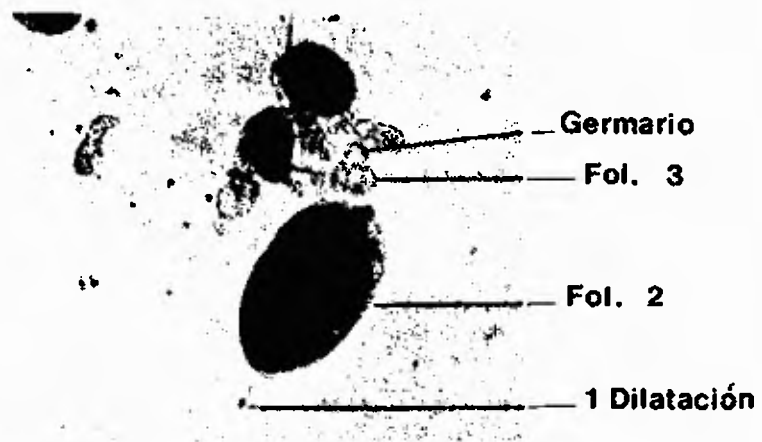


Fig. 10. IIa Los gránulos de vitelo aparecen en el citoplasma del oocito. El folículo tiende a tener contorno oval.



11. I Ib Los gránulos de vitelo se tornan mayores y más numerosos, ocupando la mitad del folículo.



12. III El folículo crece en tamaño, la célula huevo ocupa cerca de 3/4 o más del folículo.

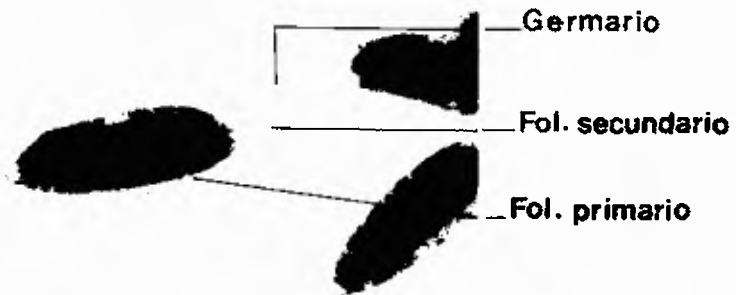


Fig. 13. IV El huevo lleno de vitelo, ocupa  $9/10$  o más del folículo. El folículo se elonga y toma la forma del huevo maduro.

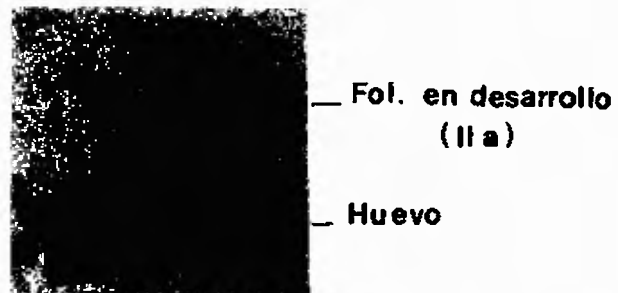


Fig. 14. V El corion cubre todo el huevo. Los flotadores laterales característicos en *A. albimanus* son evidentes.

### 3. Estados de Digestión de la Sangre y su Relación con el Desarrollo de los Folículos Ováricos.

Durante el proceso de digestión de la sangre simultáneamente ocurre el desarrollo de los folículos ováricos el cual da como resultado la ovipostura.

Al observar el proceso completo de digestión de la sangre (apariencia abdominal) sugerido por Seita (1920, En: Detinova 1962) y correlacionándolo con los estados de desarrollo ovárico sugerido por Christophers (1911), Detinova (1962) indicó que al encontrarse la hembra no alimentada los ovarios no están desarrollados y los folículos ováricos se encuentran hasta el estado IIa (II inicial) y que una vez que la hembra es recién alimentada el proceso de desarrollo folicular ovárico continúa.

La Figura 15 muestra los cambios de digestión de la sangre (apariencia abdominal) a través del tiempo así mismo, en la Figura 16 apreciamos un crecimiento similar en los estados de desarrollo folicular a través del tiempo. Si observamos los estados de desarrollo folicular y la digestión de la sangre simultáneamente a través del tiempo en la Figura 17 se puede apreciar que existe una relación directamente proporcional entre

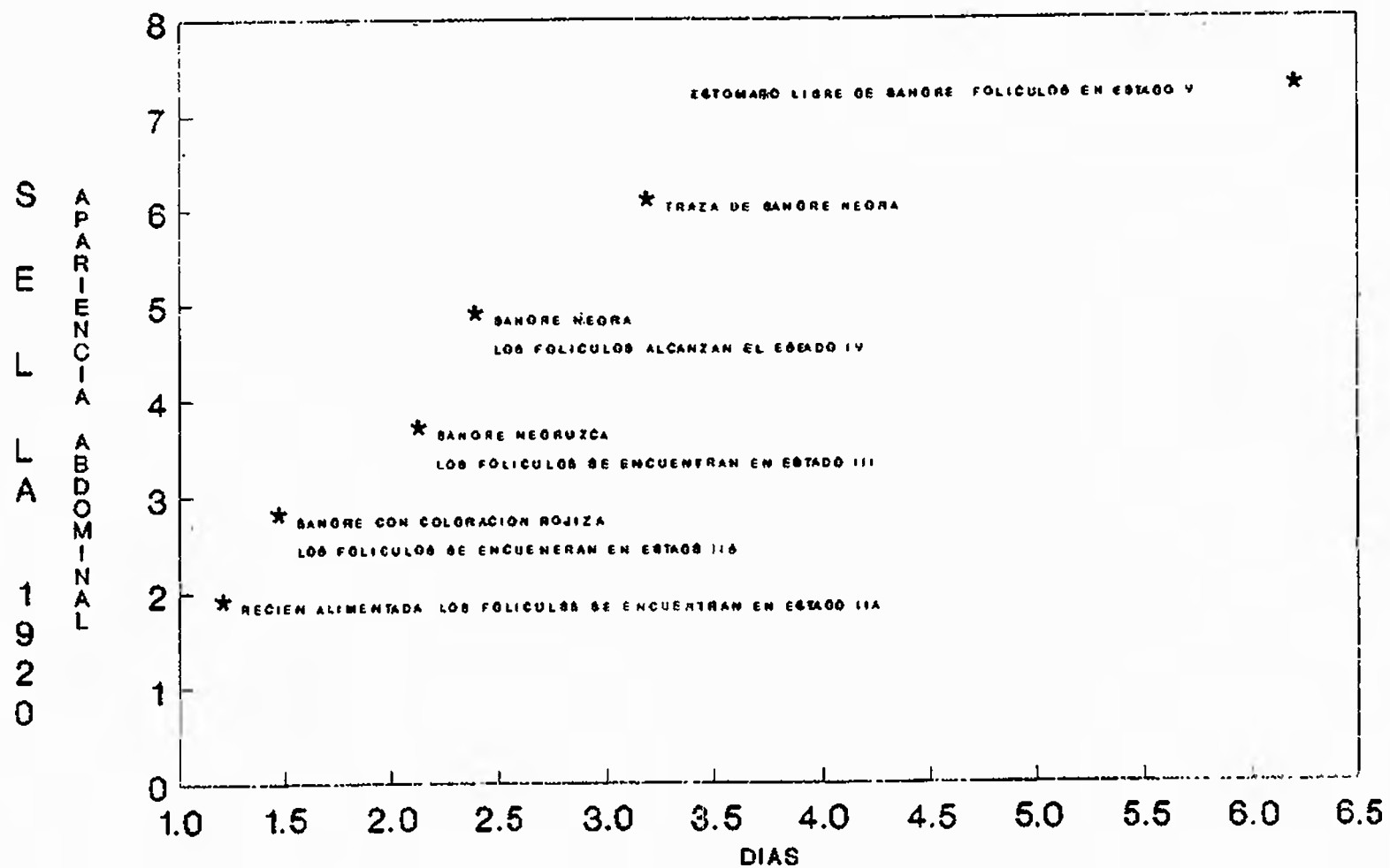


FIGURA. 15. APARIENCIA ABDOMINAL A TRAVES DEL TIEMPO.

CICLO-ESTRADIOLICO

ESTADO DE DESARROLLO FOLICULAR

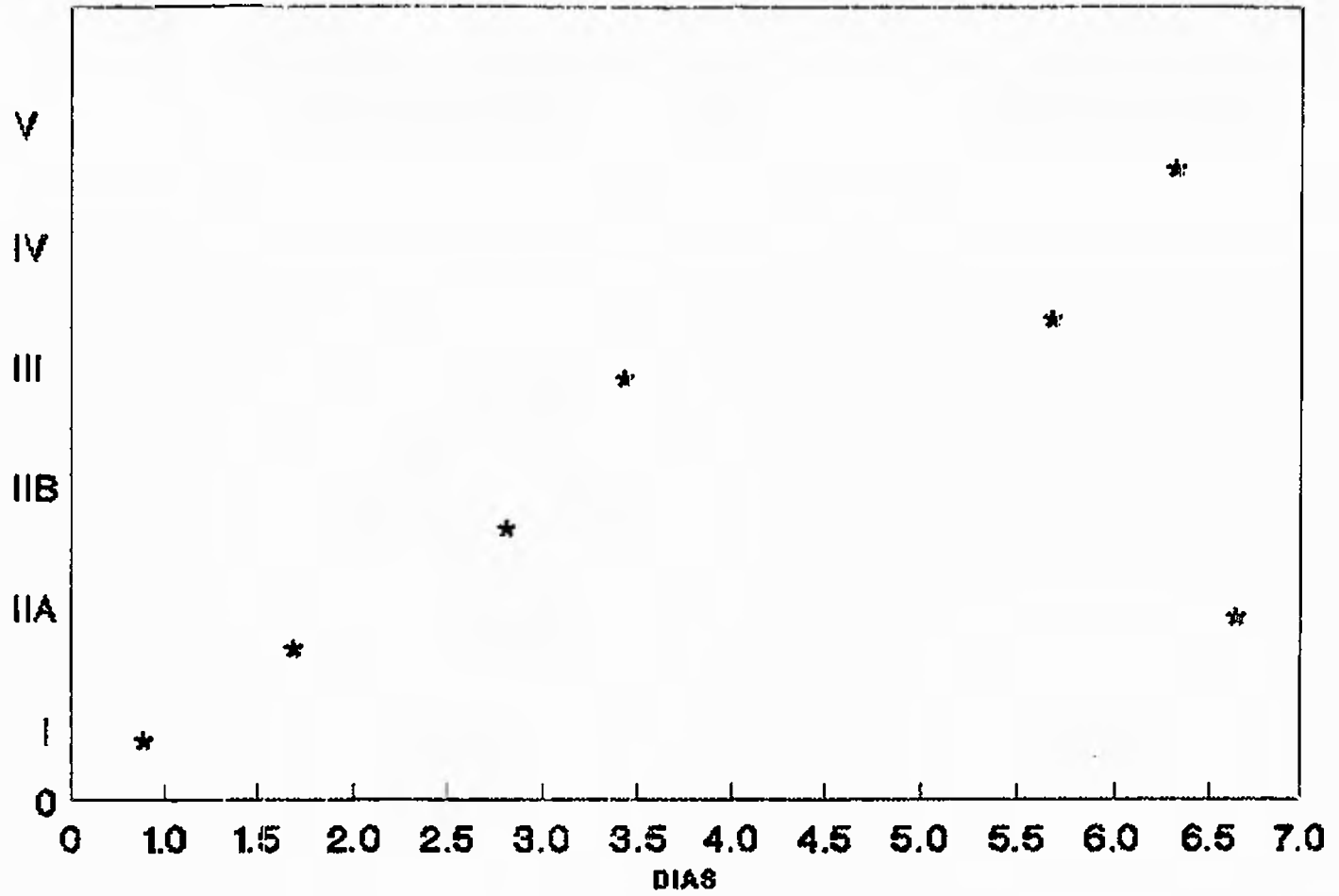


FIGURA 16. ESTADO DE DESARROLLO FOLICULAR A TRAVES DEL TIEMPO.

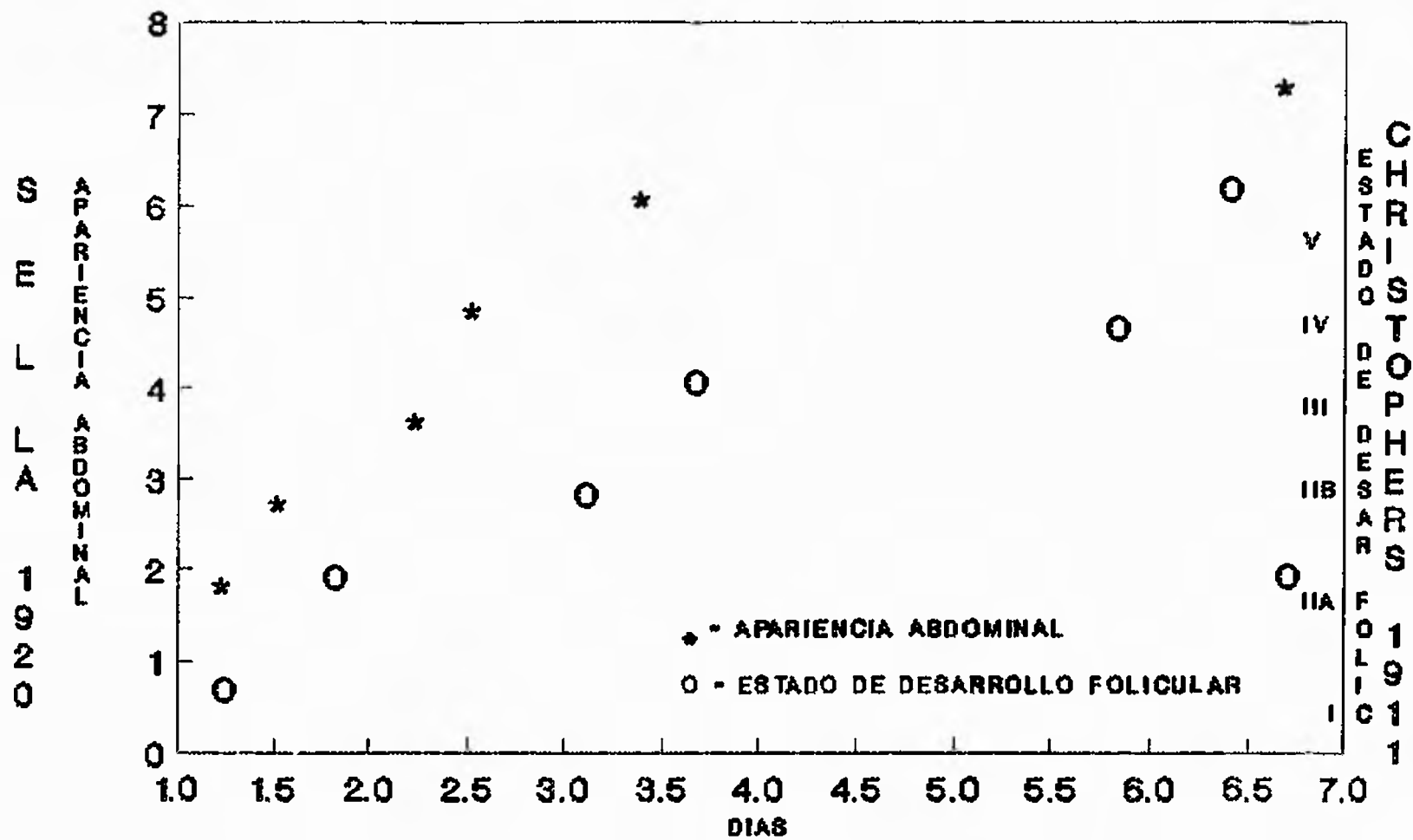
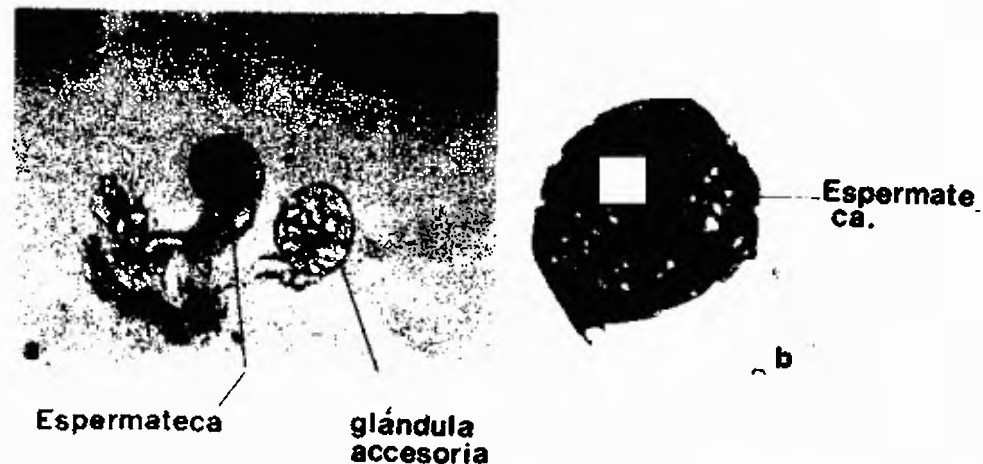


FIGURA 17. ESTADO DE DESARROLLO FOLICULAR Y APARIENCIA ABDOMINAL.

la digestión de la sangre y el desarrollo de los folículos a través de los días.

4. **Diferenciación de Hembras Inseminadas por la Apariencia de la Espermateca.**

Se observó que la apariencia de las espermatecas en hembras fertilizadas es opaca, el esperma se observó moviéndose rápidamente en círculos como finos filamentos negros ( Figuras 18a, b). En hembras no fertilizadas la apariencia es marrón y translúcida. Observaciones similares fueron hechas por Rosay (1969) en *Aedes nigromaculis*.



- 18 a. Espermateca inseminada de *Anopheles albimanus*.  
b. Espermateca no inseminada de *Anopheles albimanus*.

**5. Diferenciación entre Hembras Páridas y Nulíparas por el Examen del Sistema Traqueal Ovárico. Método de Detinova.**

Se observó que solamente las hembras con folículos en estado de desarrollo N, I y IIa (II inicial) pudieron ser clasificadas con este método. Es decir, que en aquellos folículos en donde solamente existía una pequeña cantidad de vitelo fue posible ver las tráqueas y traqueolas de los ovarios. En folículos con estado de desarrollo avanzado (Estados III, IV y V según Christophers) este método no es aplicable ya que la presencia de vitelo hace imposible ver las tráqueas y traqueolas.

Las tráqueas y traqueolas en ovarios de hembras nulíparas se observaron formando madejas fuertemente apretadas.

Observaciones sobre la ocurrencia de cambios en el sistema traqueal de los ovarios durante el primer ciclo de la ovogénesis en el momento en que la hembra toma su primera ingesta de sangre fueron hechas por Detinova (1962), Kardos & Bellamy (1961), Rosay (1969). Después de una ingesta de sangre, en adición al crecimiento de los ovarios por el desarrollo de los folículos, las

madejas traqueolares se desenrollan irreversiblemente transformándose en una red de finas ramas traqueales y traqueolares. Después de la ovipostura los ovarios se tornan nuevamente pequeños y no se distinguen por su tamaño de los ovarios de hembras nulíparas en etapa Iia de Christophers.

Ningún cambio en el sistema traqueal de los ovarios fue observado antes de completarse el primer ciclo gonotrófico.

Las placas que contenían los ovarios que fueron guardados después de un año fueron observadas en buenas condiciones pudiendo diferenciar hembras nulíparas de pàridas.

La presencia de madejas fue signo de hembras nulíparas y la presencia de una red fina traqueal fue signo de pàridas.

Ilustraciones del estado de paridad basado en el método de Detinova o "traqueación ovàrica" se presentan en las (Figuras 19a,b).



19 a. Ovario de una hembra *Anopheles albimanus* Nulipara. Se observan las madejas fuertemente apretadas.



19 b. Ovario de una hembra *Anopheles albimanus* Parida. Se observan las ramificaciones traqueales desarrolladas.

6. **Determinación de la Edad Fisiológica por el Número de Reliquias en los Pedicelos Foliculares. Método de Polovodova.**

Se observó características definidas a nivel de los pedicelos foliculares que permitieron determinar el número de ciclos gonotróficos completados por el mosquito *Anopheles albimanus*.

Al teñir los ovarios en solución salina - violeta genciana (1 gota en 10 cc. de Sol. 0.67%) el vitelo y restos foliculares fueron definidos claramente en los pedicelos foliculares permitiendo determinar con mayor claridad el número de dilataciones. Al remover la membrana ovárica se observó la apariencia general del ovario (Figura 20).



Fig. 20. Apariencia general de un ovario de *Anopheles albimanus*. Se observan los folículos ováricos después de haber separado la íntima ovariolar.

En la determinación del número de ciclos gonotróficos completados por el mosquito se revisó el máximo número de ovariolos intactos posibles, de acuerdo a las recomendaciones de Joc(1975) y Tyndale-Biscoe (1984). Solamente se pudo contar las dilataciones cuando los ovariolos se mantuvieron intactos durante la disección.

Cuando los ovariolos fueron observados con huevos maduros o con sacos foliculares el número de ciclos gonotróficos completados por la hembra fue imposible de determinar. Cuando la membrana externa del ovario fue removida y rota en varios lugares, los ovariolos con huevos desarrollados se mueven a un lado. Entre ellos se buscó aquellos ovariolos que no estaban funcionando en el último ciclo gonotrófico y en los cuales las dilataciones o reliquias foliculares estaban formadas.

En aquellos ovariolos en que se observó diferencias en el número de dilataciones que se habían formado, el mayor número de ellas en el ovario fue designado como el total de ciclos gonotróficos completados por la hembra (Detinova, 1962). El número total de ciclos gonotróficos permitió estimar la edad fisiológica del mosquito.

En aquellos folículos en que se observó degenera-

ción éstos fueron contados como si hubieran realizado un desarrollo normal y en ellas no hubo dificultad en la búsqueda de las dilataciones.

La edad fisiológica pudo ser determinada también por el número de degeneraciones foliculares ocurridas durante una ovogénesis anormal (Charlwood et al., 1980). Estas dilataciones son producto de degeneraciones, y por su posición correspondieron a los huevos maduros depositados por los otros ovarios durante el ciclo gonotrófico previo (Lange & Joc, 1981).

Las dilataciones por degeneración tienen forma irregular, se observaron con los restos foliculares desuniformemente distribuidos.

Los mosquitos que ovipositaron en el lapso de tiempo en que se hacían las observaciones diarias, se les dejó que transcurrieran 24 horas para confirmar la formación de dilataciones. Se observó que después de 24 horas, de la oviposición el saco folicular se contraía en la parte terminal del ovario formándose la dilatación folicular. Roberts (1983), al estudiar el tiempo requerido para la digestión y desarrollo de huevos en *Anopheles darlingi* observó que después de 24 horas de la postura se puede observar la dilatación formada a nivel del pedicelo folicular.

Este método fue aplicable a cualquier estado de desarrollo folicular.

Muestras representativas de los diferentes estados de paridad, folículos con una, dos, tres y cuatro dilataciones o reliquias foliculares y folículos degenerados, se presentan en las Figuras 21 - 25.

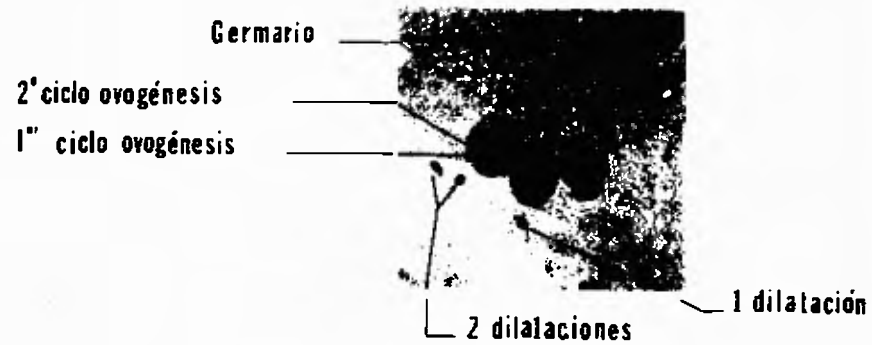


Fig. 21. Ovariolos de *Anopheles albimanus* después de haber cumplido dos ciclos gonotróficos.



Fig. 22. Ovariolos de *Anopheles albimanus* con tres reliquias foliculares, después de haber completado tres ciclos gonotróficos.



Fig. 23. Apariencia de un ovariolo con cuatro reliquias foliculares después de haber cumplido cuatro ciclos gonotróficos.

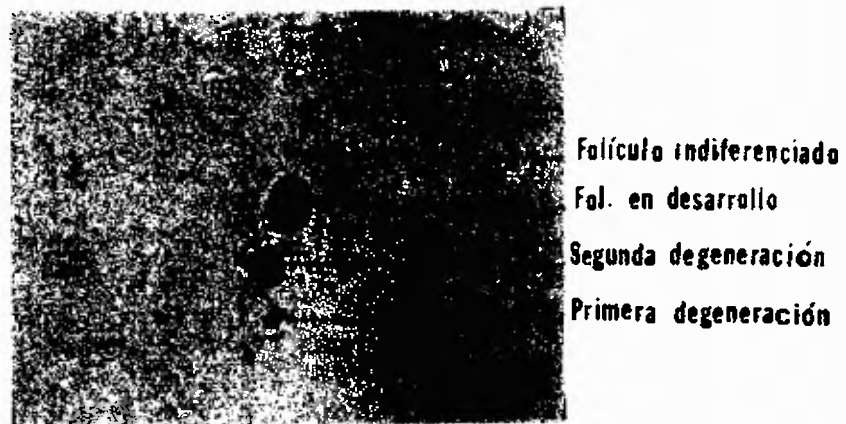
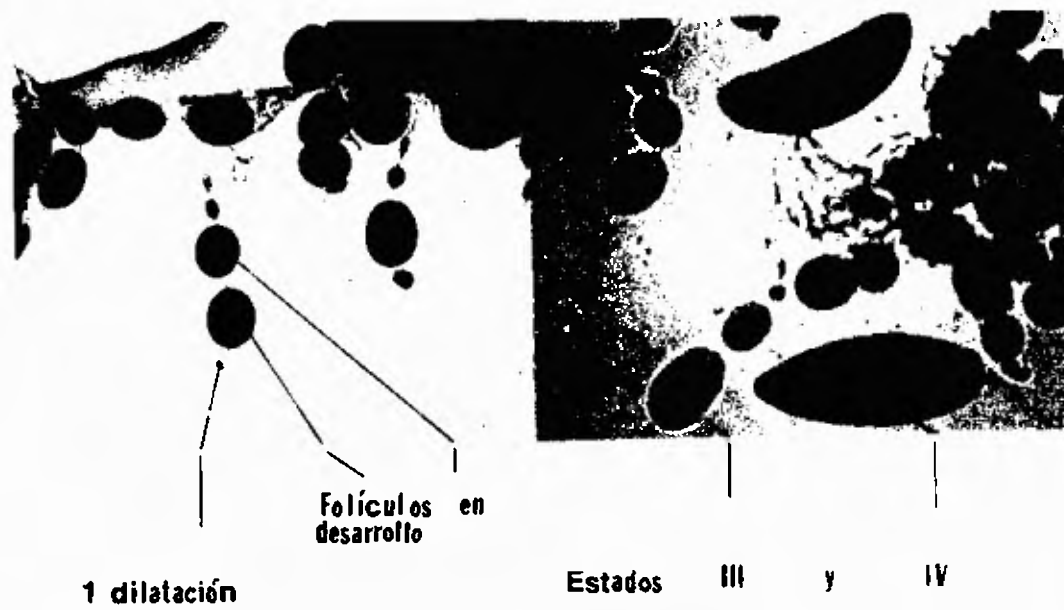


Fig. 24. Ovariolos que muestran la apariencia de folículos degenerados en un desarrollo anormal.



- g. 25. Ovarioles de *Anopheles albimanus* donde se muestran diferentes estados de desarrollo folicular.

## 7. Análisis de las Diferentes Series.

### a) Hembras alimentadas con miel solamente. Serie 1.

El Cuadro I y Figura 26, muestran la frecuencia diaria del desarrollo folicular en hembras de *Anopheles albimanus* que recibieron como fuente de carbohidratos alimentación con miel de abeja solamente.

A las 24 horas, el estado de desarrollo folicular en el 100% (30) mosquitos, se encontraba en el estado N; después de ese tiempo ningún mosquito permaneció en el estado N. A las 48 horas, 66.67% (20) mosquitos, se observaron en estado IIa (II inicial) y 33.33% (10) de los mosquitos en estado I. A las 72 horas 100% (30) de los mosquitos disectados se observaron en el estado IIa. Diez días después se observó que el 100% (30) de mosquitos disectados, el desarrollo folicular, se encontraba en el estado IIa.

En especies anautógenas (aquellas que requieren alimentación sanguínea para "iniciar" el proceso de ovogénesis) de *Anopheles*, la formación de los folículos por el germario cesa después que el folículo primario alcanza el estado II (estado de reposo), y sólo se estimulará el desarrollo del folículo primario bajo una alimentación sanguínea. Charlwood *et. al.* (1980),

Detinova (1962), Furman et al. (1982), Hitchcock (1968), Linley (1965), Magnarelli (1977), Mer (1936), Mullens & Schmidtman (1982), Nayar & Knight (1981), y Oda (1968) <sup>1981</sup> han indicado que antes que el mosquito tome cualquier alimentación sanguínea se dan cambios secuenciales en los folículos hasta el estado IIa (inicial) y no continuará el desarrollo folicular hasta que el mosquito reciba alimentación sanguínea.

Cuadro I. FRECUENCIAS DE HEMBRAS de *Anopheles albimanus* ALIMENTADAS CON MIEL A LOS 3 DÍAS DE EMERGENCIA.

HORAS DESPUES DE LA EMERGENCIA		ESTADO DE DESARROLLO FOLICULAR			T
		N	I	IIa	O
HORAS	- DIA				L
0-24 HORAS	1	30	.	.	30
25-48 HORAS	2	.	10	20	30
49-72 HORAS	3	.	.	30	30
217-240 HORAS	10	.	.	30	30
TOTAL		30	10	80	120

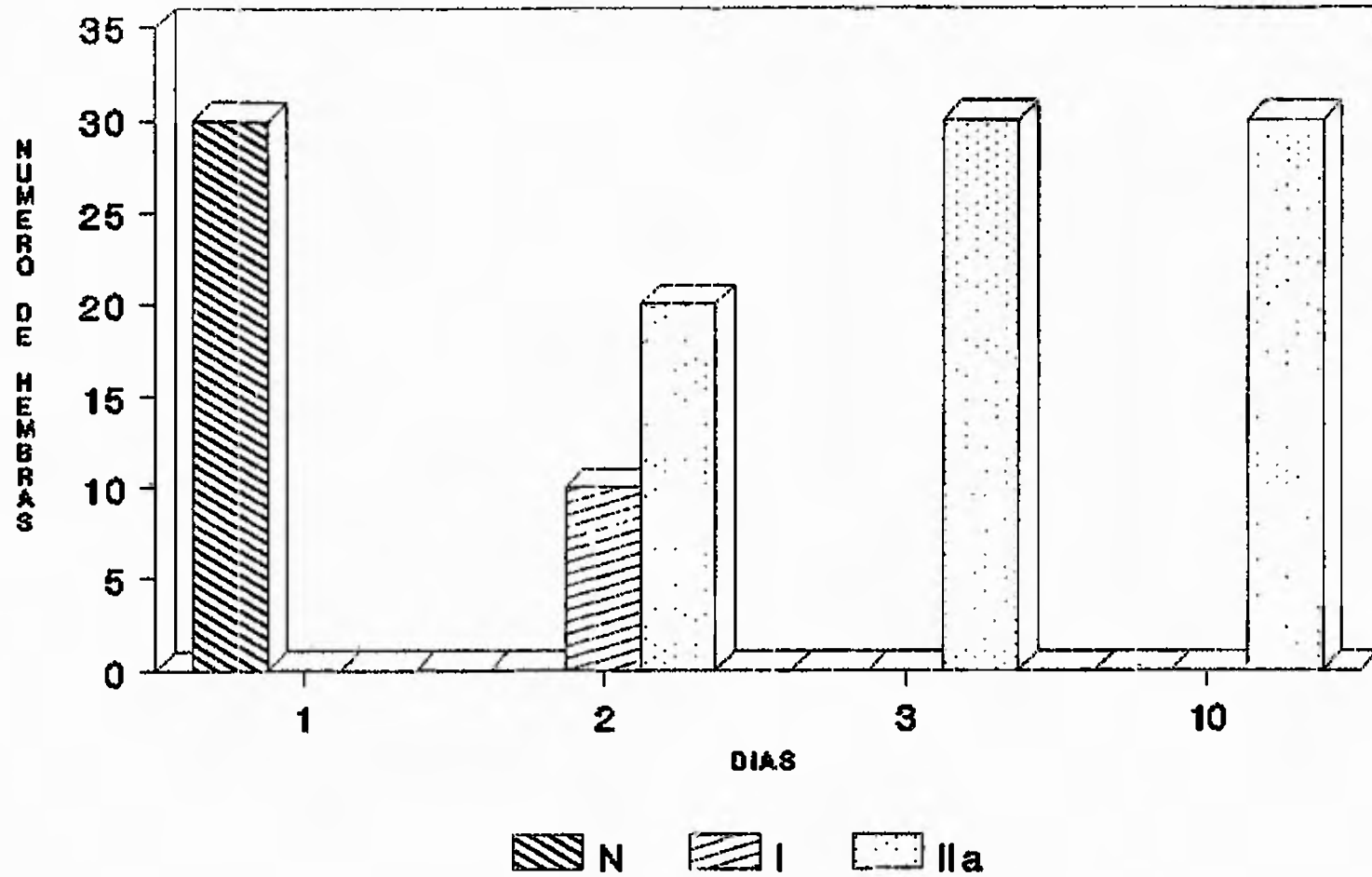


FIGURA 26. ESTADO DE DESARROLLO DE HEMBRAS ALIMENTADAS CON MIEL DESPUES DE LA EMERGENCIA.

**b) Hembras inseminadas y no inseminadas alimentadas con miel y sangre. Serie 2 y 3.**

Con la finalidad de determinar si la inseminación influye en el desarrollo de los ovarios las Series 2 y 3 fueron analizadas como un solo grupo. Un total de 626 registros fueron analizadas. El Cuadro II muestra un total de 418 hembras no inseminadas, de las cuales no ovipositaron 402 que representa un porcentaje de 96.17% y 16 que si ovipositaron corresponden al 3.83% desde el quinto al octavo día.

Se observó que el tiempo medio de ovipostura para el primer ciclo gonotrófico fue de 6.5 días. De las 16 hembras que tuvieron oportunidad de ovipositar, 15 lo hicieron después de los cuatro días.

EL Cuadro III muestra la proporción de hembras inseminadas que desarrollaron sus ovarios y ovipositaron. De un total de 208 hembras inseminadas alimentadas con miel y sangre 25 ovipositaron que corresponde a un porcentaje de 12.02% y no ovipositaron 183 hembras que corresponde a 87.98%. El tiempo medio de ovipostura fue de 6.0 días. Restrepo (1984) trabajando con *Anopheles albimanus* indicó que la duración promedio del ciclo gonotrófico en el laboratorio fue de seis días a temperaturas comprendidas entre 26 - 27°C y 75%

de humedad relativa. En poblaciones naturales la duración del ciclo gonotrófico reportada para *Anopheles albimanus* fue de dos días (Rachou *et. al.*; 1973).

Cuadro II. HEMBRAS NO INSEMINADAS de *Anopheles albimanus* ALIMENTADAS CON MIEL Y SANGRE A LOS 3 DIAS DE EMERGENCIA.

HORAS DESPUES DE ALIMENTADAS CON SANGRE		NO OVIPOSITO	SI OVIPOSITO	TOTAL
HORAS	DIA			
0-24 HORAS	1	40	.	40
25-48 HORAS	2	35	.	35
49-72 HORAS	3	40	1	41
73-96 HORAS	4	41	.	41
97-120 HORAS	5	34	3	37
121-148 HORAS	6	30	4	34
149-168 HORAS	7	36	4	40
169-192 HORAS	8	40	4	44
193-216 HORAS	9	45	.	45
217-240 HORAS	10	44	.	44
241-360 HORAS	11	17	.	17
TOTAL		402	16	418
PORCENTAJE %		96.17	3.83	
TIEMPO MEDIO PARA PRIMER CICLO		6.5 días		

Cuadro III. HEMBRAS INSEMINADAS de *Anopheles albimanus* ALIMENTADAS CON MIEL Y SANGRE A LOS 3 DIAS DE EMERGENCIA.

HORAS DESPUES DE ALIMENTADAS CON SANGRE	NO OVIPOSITO		SI OVIPOSITO	TOTAL
	NO	SI		
HORAS - DIA				
0-24 HORAS 1	20	.		20
25-48 HORAS 2	24	1		25
49-72 HORAS 3	19	.		19
73-96 HORAS 4	19	.		19
97-120 HORAS 5	14	9		23
121-148 HORAS 6	17	9		26
149-168 HORAS 7	14	6		20
169-192 HORAS 8	16	.		16
193-216 HORAS 9	15	.		15
217-240 HORAS 10	16	.		16
241-360 HORAS 11	9	.		9
TOTAL	183	25		208
PORCENTAJE %	87.98%	12.02%		
TIEMPO MEDIO PARA PRIMER CICLO	6.0 días			

- c) Hembras inseminadas alimentadas con miel y sangre pesadas antes y después, de su alimentación sanguínea. Serie 4 y 5.

Las series 4 y 5 se estudiaron en conjunto. Se analizaron un total de 505 mosquitos.

Al observar diariamente los mosquitos, el 61.0% ovipositaron con una alimentación y 18.0% mosquitos necesitaron tomar dos alimentaciones para completar su primer ciclo gonotrófico.

Machado-Allison (1982) indicó que existen características diferentes para cada especie en la duración del ciclo gonotrófico y el número de alimentaciones de sangre requeridas para el desarrollo del primer grupo de huevos. Nelson (1986) señaló que con frecuencia *Aedes aegypti* requiere más de una alimentación entre cada postura, especialmente si es perturbado antes de estar completamente lleno de sangre.

La Figura 27 muestra la relación entre el peso de los mosquitos y el número de huevos ovipositados. Se observó que la cantidad de sangre ingerida influyó significativamente en la fertilidad de la hembra *A. albimanus*; esto es, a mayor cantidad de sangre ingerida el número de huevos desarrollados por la hembra aumenta a razón de 20.54 huevos por mg. de peso de sangre de

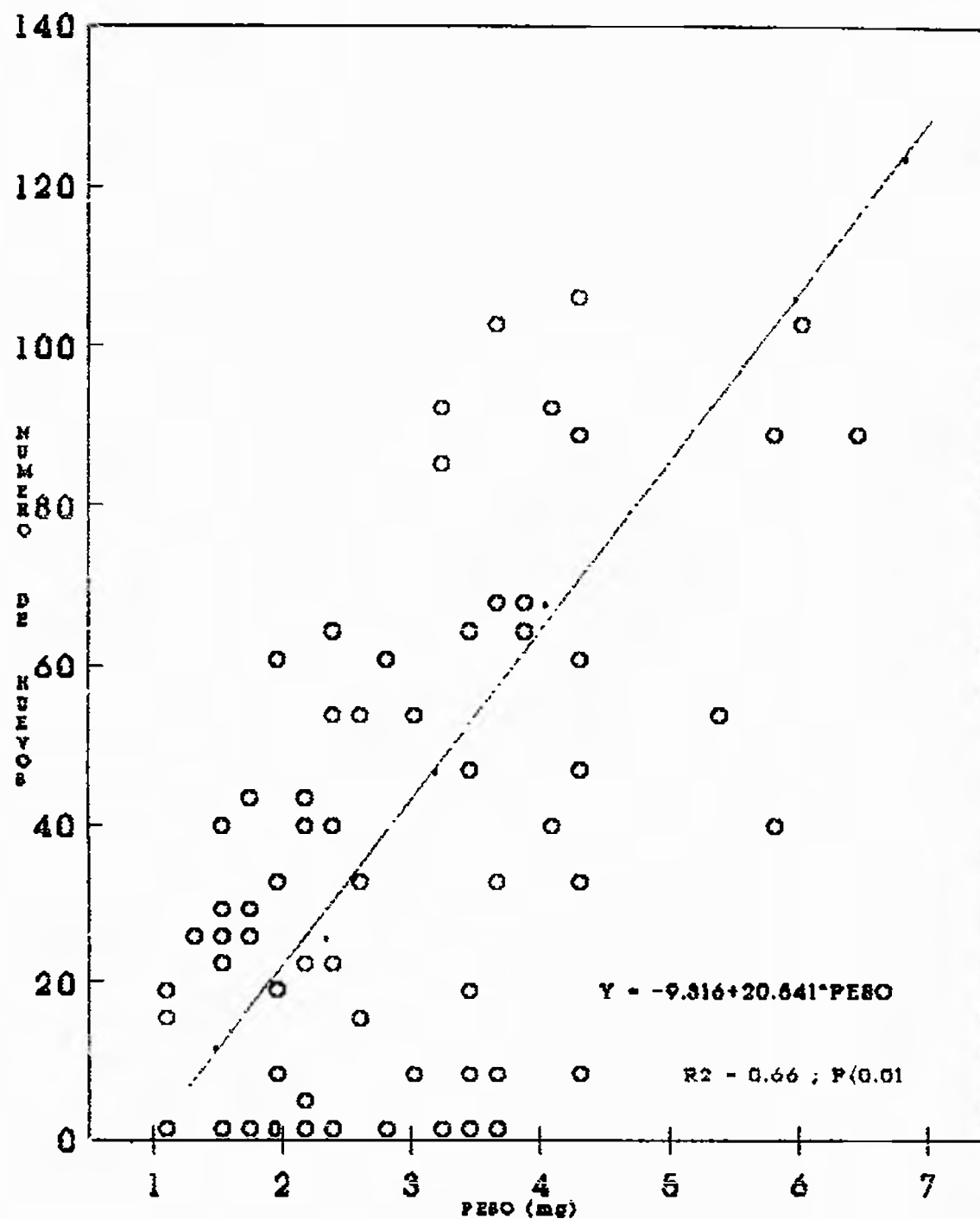


FIGURA 27. EFECTO DEL PESO DE MOSQUITOS EN EL NUMERO DE HUEVOS.

acuerdo a la ecuación de  $y = -9.316 + 20.541 * PESO$  el cual tiene una significancia de  $P < 0.01$ . Observaciones similares fueron reportadas por Colless & Chellapah (1960), Miura & Takahashi, (1972).

La cantidad de sangre ingerida también es importante en el inicio de un ciclo gonotrófico y el número de huevos depositados por la hembra. Nelson (1986), señaló que existe un umbral en la distensión del estómago que estimula el desarrollo de los ovarios en *Aedes aegypti*. En *A. albimanus* encontré que el umbral fue de 0.8 mg. de sangre. Colless & Chellapaha (1960), indicaron que el número de huevos que pone la hembra depende de la edad fisiológica del mosquito, ingesta de sangre y el peso después de la emergencia. En tal sentido el número de huevos disminuye progresivamente a medida que aumenta la edad fisiológica.

Al contar el número de huevos desarrollados en todas las edades consecutivas desde el primer al cuarto ciclo gonotrófico en la Figura 28 se muestra que la fecundidad en *A. albimanus* aumentó en el segundo ciclo gonotrófico y luego en el tercer y cuarto ciclo disminuyó el número de huevos no significativamente al aumentar la edad fisiológica. El número promedio de huevos desarrollados en el primer ciclo fue de 36

en el segundo ciclo fue de 39 huevos, para el tercer ciclo fue de 38 y para el cuarto ciclo gonotrófico fue de 37 huevos.

La edad fisiológica de la hembra de *Anopheles maculipennis* y su fertilidad fue determinada por Detinova (1962) indicando que existe una conexión directa entre la edad de la hembra y el número de huevos desarrollados. Así, el número promedio de huevos en el primer ciclo gonotrófico es mayor comparado con las subsecuentes oviposiciones donde hay una reducción gradual en el número de huevos. Este descenso en la fertilidad puede ser explicado por el hecho de que con el aumento de la edad hay una reducción en la proporción de los ovarios que producen un huevo, normalmente desarrollado; mientras que el número de ovarios produciendo folículos degenerados aumenta.

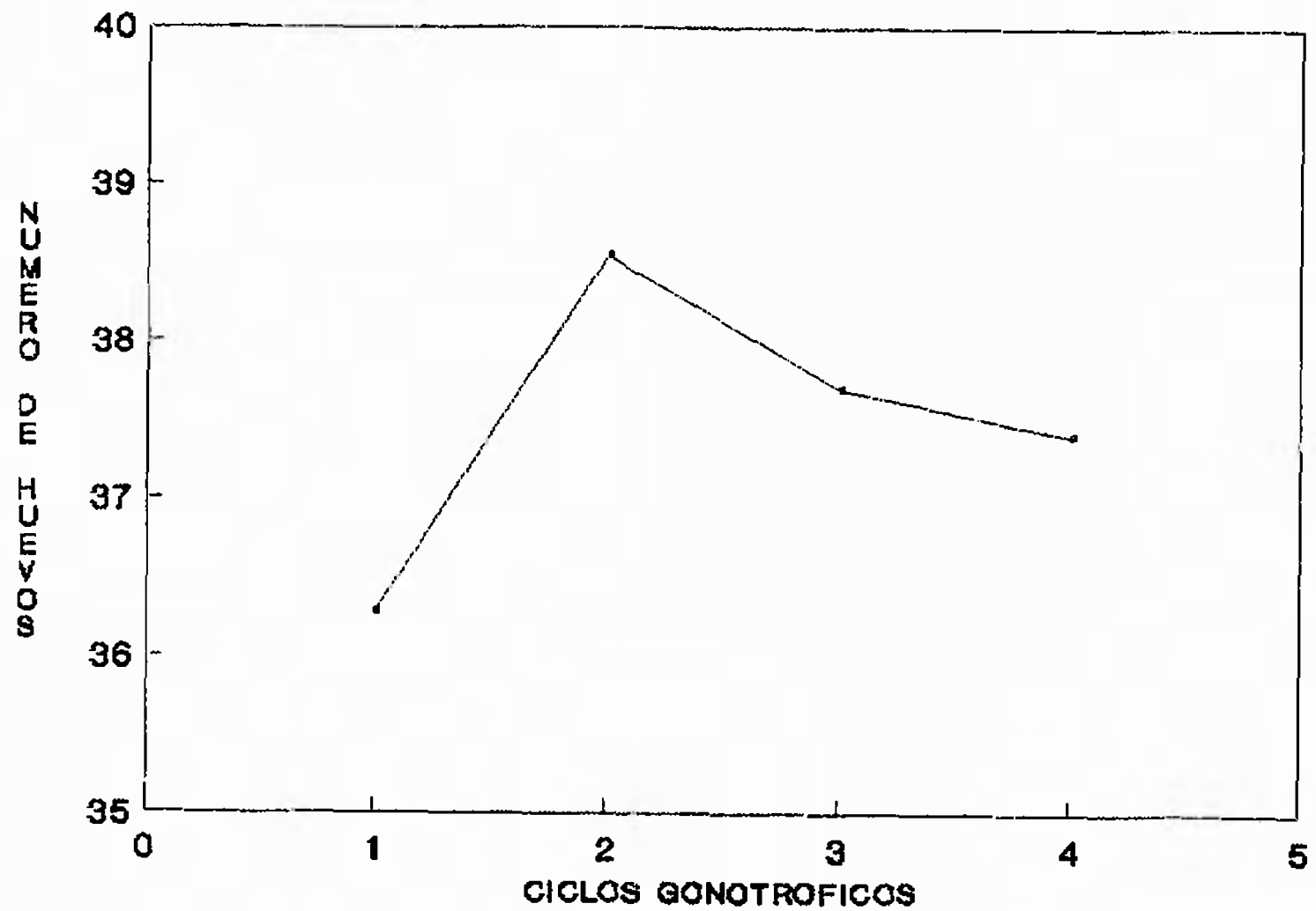


FIGURA 28. NUMERO DE HUEVOS EN LOS DIFERENTES CICLOS GONOTROFICOS.

d) Prueba Doble Ciego. Evaluación de las técnicas.  
Serie 5.

La prueba se inició con 130 hembras de *Anopheles albimanus*. Se analizó un total de 100 mosquitos ya que 30 murieron durante la semana en que se realizó la prueba.

Las disecciones y toma de fotos por espécimen duró aproximadamente 30 minutos por cada hembra por el método de Polovodova. Una vez secos los ovarios después de un período de 24 horas el examen diagnóstico de las placas por el método de Detinova requirió menos de dos horas para el análisis de todos los ovarios. Los especímenes con pocas madejas desarrolladas cuya clasificación era dudosa fueron colocados en la categoría de pãridas. Kardos y Bellamy (1961) al aplicar esta técnica con *Culex tarsalis* consideraron como estado intermedio aquellas hembras con menos traqueolas del ovario enrolladas que las observadas en especímenes nulíparas, pero mayor que en los especímenes que habían formado balsas "normales" de huevos. Consideraron como hembras intermedias las que habían ovipositado probablemente una balsa de huevos más pequeña que la normal, quizás en forma autógena.

El Cuadro IV muestra los resultados de la clasificación de la técnica de Detinova o de "traqueación ovárica".

CUADRO IV. METODO DE DETINOVA O "TRAQUEACION OVARICA".

Ciclos Reales	Nullipara	Párida	No Hecho	Total	Error	% Error
0	14	1	12	27	1	6.7
1	0	11	10	21	0	0.0
2	0	13	9	22	0	0.0
3	0	15	10	25	0	0.0
4	1	3	1	5	1	25.0
Total	15	43	42	100		
Error	1	1			2	
% Error	6.7	2.3				3.4
% Confiabilidad para Detinova				93.3 Nulliparas		
				97.7 Páridas		

De un total de 15 hembras nulliparas, 14 fueron clasificadas correctamente y una hembra fue clasificada incorrectamente resultando en un porcentaje de error

del 6.7% . De un total de 43 hembras pãridas, un mosquito fue clasificado incorrectamente resultando en un porcentaje de error del 2.3% . No se pudo clasificar por este método 42% de mosquitos ya que se encontraban en estado de desarrollo folicular avanzado (III, IV, V) de Christophers donde la presencia de yema hizo imposible ver el sistema traqueal.

Aplicando el método de Detinova se observó una confiabilidad de 97.7% al clasificar las pãridas y 93.3% al clasificar las nulíparas.

Los resultados analizados por el método de Polovodova o "reliquias foliculares" se muestran en el Cuadro V. Se pudo observar que entre las nulíparas tres mosquitos fueron clasificados errtneamente y 24 correctamente de un total de 27 mosquitos haciendo un error del 11.1%. Entre las primíparas 19 fueron clasificados correctamente y tres clasificados incorrectamente, haciendo un error de 13.6% . Entre las bíparas 18 fueron clasificados correctamente y 7 incorrectamente, haciendo un error de 28.0% . Entre las tríparas 18 fueron clasificados correctamente y dos incorrectas haciendo un error de 10.0% . Finalmente entre las cuadríparas dos mosquitos fueron clasificados incorrec-

tamente y cuatro fueron clasificados de manera correcta. Entre las pãridas, 59 fueron clasificadas correctamente con una o mäs dilataciones y 14 fueron clasificadas incorrectamente. Entre las nuliparas, 24 fueron clasificados correctamente y tres pãridas fueron clasificadas como nuliparas.

Si se compara el promedio de número de dilataciones con el número real de ciclos gonotrãficos (Cuadro V), se encuentra que el error o diferencia para cero ciclos es del 0.15 reliquias, para un ciclo es 0, para dos ciclos es de 0.09, para tres ciclos es de 0.12 y que para cuatro ciclos es de 0.6.

Nelson (1966) indicã que esta tãcnica no se pudo aplicar en *Culex tarsalis* para determinar el número de oviposiciones de cada hembra individual, como se usa en otras especies de mosquitos (Detinova 1962). No obstante fue ùtil para distinguir las hembras pãridas de las nuliparas.

Las observaciones obtenidas en este trabajo demuestran la eficcacia de ambas tãnicas para distinguir hembras de *A. albimanus* pãridas de nuliparas y poder calcular el número de ciclos gonotrãficos completados por la hembra.

CUADRO V. METODO DE POLOVODOVA O "RELIQUIAS FOLICULARES".

Ciclos	Número de reliquias observadas					Total	Error	%	Error	Media	Error
Reales	0	1	2	3	4						
0	24	2	1	0	8	27	3	11.1	8.15	8.15	
1	1	19	1	0	8	21	2	9.5	1.80	0.00	
2	2	0	18	2	0	22	4	18.2	1.91	8.09	
3	8	8	5	18	2	25	7	28.0	2.88	0.12	
4	0	1	8	0	4	5	1	20.0	3.40	0.68	
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>22</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>6</b>	<b>180</b>					
<b>Error</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>2</b>		<b>17</b>				
<b>%Error</b>	<b>11.1</b>	<b>13.6</b>	<b>28.8</b>	<b>10.0</b>	<b>33.3</b>			<b>17.0</b>			

## CONCLUSIONES

Con base a los datos disponibles sobre los cambios funcionales y de edad en los órganos reproductivos de la hembra de *Anopheles albimanus* se llegó a las siguientes conclusiones:

-- En los *Anopheles albimanus* que fueron alimentados solamente con carbohidratos, los primeros folículos maduran hasta la etapa Iia (estado de reposo) aún con diez días de edad.

-- El desarrollo folicular avanza a los estados de Christophers Iib a V solamente cuando las hembras de *Anopheles albimanus* recibieron alimentación de sangre.

-- La no inseminación influye significativamente sobre el porcentaje de ovipostura diaria pero no en la duración del primer ciclo gonotrófico. En los grupos no inseminados, la ovipostura se dio en los primeros cinco a ocho días después de alimentación de sangre y en el grupo de los inseminados la ovipostura se dio en los primeros cinco a siete días.

-- *Anopheles albimanus* requirió una alimentación para completar el primer ciclo gonotrófico en un porcentaje

del 61.0% y 18 % requirib de dos alimentaciones.

-- A mayor cantidad de sangre ingerida, mayor fue el número de huevos depositados.

-- El método de Detinova o "traqueación ovárica" permitib diferenciar entre hembras nulíparas de pãridas con una confiabilidad de 97.7% para las pãridas y 93.3% para las nulíparas.

-- El método de Detinova es mucho más rápido que el método de Polovodova en el diagnóstico.

-- El método de Detinova no permite clasificar las hembras con estado de desarrollo folicular mas allá del estado IIa de Christophers.

-- Las muestras de ovarios por el método de Detinova se pueden guardar por varios meses.

-- El método de Polovodova o "reliquias foliculares" nos permitib diferenciar entre hembras nulíparas y pãridas con una confiabilidad de 96.05% para las pãridas y 87.5% para las nulíparas.

-- El método de Polovodova o "reliquias foliculares" permite diferenciar el número de ciclos gonotròficos

completados por la hembra *Anopheles albimanus*, con un error de 10 - 28%, y una diferencia entre la media de número de reliquias y el número de ciclos reales de 0 a 0.6 dependiendo del número de ciclos gonotróficos.

\_\_\_ Con el método de Polovodova se pudieron clasificar todos los mosquitos no importa su estado de desarrollo folicular.

La aplicación de la técnica de Polovodova al ser un trabajo minucioso en cuanto a la calidad de las disecciones se deben tomar los siguientes parámetros de referencia:

1. Extender la membrana del ovario con la finalidad de observar el estado de desarrollo general del ovario.
2. Separar el ovario desde su parte más externa con mucho cuidado, para no perder ninguna de sus partes.
3. Observar el mayor número de folículos intactos.

## RECOMENDACIONES

1. Aplicar las técnicas Detinova y Polovodova en poblaciones naturales de mosquitos vectores en áreas tratadas y áreas no tratadas para probar la efectividad en las medidas de control.
2. Estudiar la relación entre el tamaño del mosquito, cantidad de sangre ingerida y fecundidad.
3. En trabajos futuros se debe probar el método de la Organización Mundial de la Salud, que sugiere que se pueden guardar las muestras por el método de Polovodova en preparaciones de glicerina 10 partes; formalina 3% una parte y 0.65% solución salina fisiológica 25 partes (WHO 1962).

## LITERATURA CITADA.

- Alecrim, W.D. 1979. Estudo clínico-epidemiológico da malária no Rio Ituxi-Amazonas. T. de Maestrado. Universidades de Brasília. 115p.
- Bellamy, R. E. and Corbet, P. S. 1974. Occurrence of ovariolar dilatations in nulliparous mosquitoes. *Mosquito News*. 34(3): 334.
- 1973. Combined autogenous and anaautogenous ovarian development in individual *Culex tarsalis* Coq. (Dipt., Culicidae). *Bull. Ent. Res.* 63: 335-346.
- Beklemishev, W.N. <sup>?</sup> *et al.* 1959. Determination of physiological age in anophelines and of age distribution in anopheline populations in U.S.S.R. *Bull Wild. Hlth. Org.* 21: 232-232.
- Breeland S. G. 1972. Studies on the ecology of *Anopheles albimanus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 21(5): 751-754.
- Burdick, D. J. and Kardos, E. H. 1963. The Age Structure of Fall, Winter, and Spring Populations of *Culex tarsalis* in Kern County, California. *Ann. Ent. Soc. Am.* 56: 527-535.
- Charlwood, J. D. & Wilkes T. J. <sup>etal 1980.</sup> 1980. Methods to determine the physiological age of Diptera of Medical importance. A revision, with special reference to disease vectors in South America [in Portuguese]. *Acta Amazonica* 10, 311-333.
- Charlwood, J.D. & Wilkes, T.J. 1979. Studies on the age compositions of samples of *Anopheles darlingi* Root (Diptera:Culicidae) in Brazil. *Bull. ent. Res.* 69, 337-342,
- Christophers, S.R. 1911. The development of the egg follicles in anophelines. *Paludism* 2: 73-88.
- Clark, H. C. 1934. Symposium on malaria Part 3. *Southern Medical Journal*. 27(7): 642-6557.
- Corbet, P. S. 1960. Recognition of nulliparous mosquitoes without dissection. *Nature*, 187, 525-26.

- Corbet, P.S. 1962. The age composition of biting mosquito populations according to time and level: a further study. *Bull. Entomol. Res.*, 53: 409-416.
- Colless, D.H. 1958. Recognition of individual nulliparous and parous mosquitoes. *Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.*, 52 :187.
- Colless, D. H. and Chellapah, W. T. 1960. Effects of body weight and size of blood-meal upon egg production in *Aedes Aegypti* (Linnaeus) (Diptera, Culicidae). *Am. Trop. Med. Parasitol.* 54: 475-482.
- Curry, D. P. 1932. Some observations on the Nyssorhynchus group of the *Anopheles* (Culicidae) of Panama. *Am J. Hyg.* 15(2): 566-572.
- Detinova, T. S. 1968. Age structure of Insect populations of medical importance. *Ann. Rev. Ent.* 13: 427-450.
- 1962. Age-grouping methods in Diptera of medical importance. *Geneva: Wld. Hlth. Organ. Monogr. Ser. No. 47*, 216 pp.
- Engelmann, F. 1970. The physiology of insect reproduction. *Pergamon Press, Oxford*. 307p.
- Faran M. E. 1980. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contributions of the American Entomological Institute*, 15(7): 35-49.
- Fleming, G. 1986. Biología y Ecología de los Vectores de la Malaria en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. Ref: PNSP /86-72
- Forattini, O. P. 1962. Entomologia Médica. I.º Volume. Parte Geral, Diptera, Anophelini. Fac. de Higiene e Saúde Pública. Dep. Parasitologia, Sao Paulo.

- et al* 1982 X  
 Furman, D. P. and Catts E. P. 1982. Manual of Medical Entomology. Fourth edition. Cambridge University.
- Garrett-Jones, C. 1970. Problems of epidemiological entomology as applied to malariology. *Miscel. Publ. Entomol. Soc. Am.* 7: 168-180.
- Giffett J. D. 1957. Age analysis in the biting-cycle of the mosquito *Taeniorhynchus (Mansonioides) africanus* Theobald, based on the presence of parasitic mites. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 51:151-158.
- Gillies, M. T. 1958. A modified technique for the age-grading of populations of *Anopheles gambiae*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 261-273.
- González, Fuentes D.; Mendoza, L. J.; Rodriguez, C. M.; Negrin, M. E. 1984. Estudio entomológico de un brote de paludismo. *Rev. Cub. Med. Trop.* 36: 282-287.
- Graham, J. E. and Bradley, I. E. 1972. Changes in the age structure of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann populations in Rangoon, Burma after intensive larviciding. *J. Med. Ent.* 9(4): 325-329.
- Guardia, C. A. 1983. Salud Pública y Saneamiento en la Zona del Canal de Panamá: Un recuento histórico, 1880 - 1915. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.* 95(1) 62-71.
- Hitchcock Jr., J. C. 1968.<sup>a</sup> Egg retention in *Anopheles quadrimaculatus* Say in relation to the physiological age of the mosquito. *J. Med. Ent.* 5(1): 8.
- 1968.<sup>b</sup> Age composition of a natural population of *Anopheles quadrimaculatus* Say (Diptera: Culicidae) in Maryland, U.S.A. *J. Med. Ent.* 5(1): 125-134.
- Hobbs, J. H. et al. 1986 X The biting and resting behavior of *Anopheles albimanus* in northern Haiti. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2(2): 150-153.

- Joc, Ch. K. 1975. Estructura del pedicelo terminal y de los pedicelos terminales de unibn de la ovariola en mosquitos hematofagos (Culicidae). Nuevos datos complementarios usados en la determinaci6n de la edad fisiol6gica, *Biologia, Bestnic Moscovcogo Universiteta* 30(4): 12-17. [En ruso, Traducido al espa6ol].
- Kardos, E. H. and Bellamy, R. E. 1961. Distinguishing nulliparous from parous female *Culex tarsalis* by examination of the ovarian tracheation. *Ann. Ent. Soc. Am.* 54(3): 448-451.
- Lange, A. B. and Joc, Ch. K. 1981. Oogenesis abortiva y edad fisiol6gica de mosquitos hematofagos (Diptera: Culicidae) *Medskaya Parazit.* 50(3): 48-56. [En ruso. Traducido al espa6ol].
- Lewis, D. J. 1958. The recognition of nulliparous and parous *Anopheles gambiae* by examining the ovarioles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 52(5): 456-461.
- Linley J. R. 1965. The ovarian cycle and egg stage in *Leptoconops (Holoconops) Becquaerti* (Kieff.) (Diptera, Ceratopogonidae) *Bull. Ent. Res.* 56: 37-56.
- Machado-Allison C. E. 1982. Ecologia de los mosquitos (Culicidae). III. Adultos. *Acta Biol. Venez.* 11(3): 133-237.
- Macdonald, G. 1952. The analysis of the sporozoite rate. *Trop. Dis. Bull.* 49: 569-586.
- Magnarelli, L. A. 1977. Physiological age of mosquitoes (Diptera: Culicidae) and observations on partial blood-feeding. *J. Med. Ent.* 13(4): 445-450.
- Mer, G. G. 1936. Experimental study on the development of the ovary in *Anopheles elutus* Edw. (Diptera: Culicidae). *Bull. Ent. Res.* 27: 351-359.
- \_\_\_\_\_. 1932. The determination of the age of *Anopheles* by differences in the size of the common oviduct. *Bull. ent. Res.*, 23:563-564.

- Miura, T. and Takahashi, M. 1972. The fecundity of *Aedes nigromaculis* in the laboratory effects of body weight and size of blood meal. *Mosquito News*. 32(3): 417-421.
- Moore, Ch. G.; Retter, P and Xu Jin-Jiang. 1986. Determination of Chronological age in *Culex pipiens* S.L. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2(2): 204-208.
- Mullens, B. A. and Schmidtman, E. T. 1982. The gonotrophic cycle of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) and its implications in age-grading field populations in New York State, USA. *J. Med. Ent.* 19(3): 340-349.
- Nayar, J. K. and Knight, J. W. 1981. Occurrence of ovariolar dilatations in nulliparous mosquitoes: *Culex nigripalpus*. *Mosquito News*. 41(2): 281-286.
- Nelson, M.J. 1986. *Aedes aegypti*, Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud.
- . 1971. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXVI. Winter biology of *Culex tarsalis* in Imperial Valley, California. *Contributions of the American Entomological Institute* 7(6): 56 p.
- . 1966. A comparison of two techniques for distinguishing parous from nulliparous *Culex tarsalis* Coquillett. *Mosquito News* 26(1): 11-13.
- Oda, Tsutomu. <sup>1961</sup>1968. Studies on the follicular development and overwintering of the house mosquito, *Culex pipiens pallens* in Nagasaki area. *Tropical Medicine*. 10(4): 195-216.
- Panday, R. S. 1975. Age structure of some mosquito populations in a coastal area in Surinam. *Mosquito News*. 35(3): 305-308.
- . 1975. Age structure of some mosquito populations in a savanna area in Surinam. *Mosquito News*. 35(3): 301-304.

- Rachou, R. G., L. A. Schinazi, & M. M. Lima. 1973. An intensive epidemiological study of the causes for the failure of residual DDT spraying to interrupt the transmission of malaria in Atalaya and Falla, two villages on the coastal plain of El Salvador, Central America. *Revta. bras. Malar. Doec. trop.* 25, 1-293.
- Ramsey, J. M., et al. 1988. Laboratory oviposition, fecundity and egg hatching ability of colonized *Anopheles albimanus* from southwestern Mexico. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 4(4): 509-515.
- Restrepo, R. M. 1984. Contribución a los estudios de longevidad y ciclo gonotrófico en una colonia de *Anopheles albimanus*. Tesis para optar por el título de Biólogo. Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Roberts (1983).
- Rosay, B. 1969. Anatomical indicators for assessing age of mosquitoes: dissection techniques and field application of methods. *Mosquito News.* 29(3) 419-423.
- Rozeboom, L. E. 1938. The role of some common anopheline mosquitoes of Panama in the transmission of malaria. *Am. J. Trop. Med.* 18: 289-302.
- Smith, T. A. 1966. External appearance as an indicator of ovarian development in *Culex pipiens quinquefasciatus* Say. *Mosquito News.* 26(1) 42-44.
- \_\_\_\_\_. 1968. Comparison of known age with physiological aging in the adult female house fly, *Musca domestica* L. *J. Med. Ent.* 5(1): 1-4.
- Snodgrass, R. E. 1959<sup>1959?</sup>. Principles of INSECT MORPHOLOGY. McGraw-Hill Book Company New York and London. p550-552.
- Spencer, M. 1979. Age grouping of female *Anopheles farauti* populations (Diptera: Culicidae) in Papua New Guinea. *J. Med. Entomol.* 15, 555-569.
- Tyndale-Biscoe, M. 1984. Age-grading methods in adult insects: a review. *Bull. Ent. Res.* 74: 341-377.

- Vargas, L. y Martinez Palacios, Amado. 1956. *Anofelinos Mexicanos, Taxonomía y Distribución.*
- WHO/MAL/348 Supplement (2), 1962: "An alternative fluid medium for age grading dissections".
- Wright, J.W. et al. 1972. Changing concepts of vector control in malaria eradication. *Ann. Rev. Entomol.* 17: 75-102.