

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO  
PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA



**DETECCIÓN DE *Plasmodium sp.* (HAEMOSPORINA: PLASMODIIDAE)  
EN MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)  
EN PANAMÁ**

**POR**

**JOSÉ DEL R. LOAIZA R.**

**PANAMÁ, 2004**

ST

12 SEP 2004

ok by del autor

**DETECCIÓN DE *Plasmodium sp.* (HAEMOSPORINA: PLASMODIIDAE)  
EN MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)  
EN PANAMÁ**

**TÉSIS**

**Sometida para optar por el Título de Maestro de Ciencias con especialidad en  
Entomología Médica**

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

**El permiso para la publicación y reproducción parcial o total de este documento  
debe ser obtenido en la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado**

**APROBADO**

Jorge E. B. Asesor  
[Signature] Jurado  
Rosario D. Pardo Jurado

1587

*" Dedico el esfuerzo de este trabajo  
a mi hija **Melanie del Rosario Loiza**  
Milagro de vida, luz en mi camino y  
Alegria de mi corazon "*

## AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi eterno agradecimiento a **Andrea Gager** por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación. Fue una gran oportunidad, pero más importante aún, que el apoyo logístico, el conocimiento adquirido y la satisfacción por la meta alcanzada, es para mi la confianza que tuviste en mi trabajo. Gracias por tu gran amistad.

Agradezco también a **Sara V. Pinzón Navarro** por formar parte de esta investigación. Mérces todo el crédito del trabajo, tu apoyo incondicional y tu gran aporte contribuyó de manera significativa en el éxito de este estudio.

Mi más sincero agradecimiento a **Gladys E. Loiza** y **Isabel de Linares** por apoyarme en estos dos años de gran esfuerzo y dedicación.

Finalmente, quiero agradecer de manera especial a un selecto grupo de científicos nacionales e internacionales que apoyaron sustancialmente nuestro estudio.

<b>Andrea Gager</b>	Princeton University
<b>Hector Barrios</b>	Programa Centroamericano de Entomología (UP)
<b>Iván Luna</b>	Universidad de Panamá
<b>Ricardo Carrasco</b>	Autoridad del Canal de Panamá
<b>Eldrege Bermingham</b>	Smithsonian Tropical Research Institute (Naos)
<b>Oris Sanjur</b>	Smithsonian Tropical Research Institute (Naos)
<b>Jim Pecor</b>	Walter Reed Army Institute of Research
<b>Robert Ricklefs</b>	Universidad de Missouri
<b>Maria A. Sallum</b>	Universidad de Parana
<b>José Rovira</b>	Instituto Gorgas para Estudios de la Salud (ICGS)
<b>Ricardo Chaverri</b>	Instituto Nac. de Biodiversidad de Costa Rica (INBio)
<b>Manuel Sumbado</b>	Instituto Nac. de Biodiversidad de Costa Rica (INBio)
<b>Jorge Morales</b>	Centro Regional Universitario de Colón (CRUC)
<b>Enrique Medianero</b>	Programa Centroamericano de Entomología (UP)
<b>Arsénio Garcia</b>	Instituto Gorgas para Estudios de la Salud (ICGS)
<b>Doristela Camargo</b>	Instituto Gorgas para Estudios de la Salud (ICGS)
<b>Maribel Gonzales</b>	Smithsonian Tropical Research Institute (Naos)
<b>Cesar Jaramillo</b>	Smithsonian Tropical Research Institute (Naos)
<b>Carlos Vergara</b>	Smithsonian Tropical Research Institute (Naos)
<b>Angel Aguirre</b>	Smithsonian Tropical Research Institute (TUPPER)
<b>Evidelio Adames</b>	Centro Regional Universitario de Veraguas (CRUV)
<b>Carlos Seixas</b>	Centro Regional Universitario de Veraguas (CRUV)
<b>Angel Vega</b>	Centro Regional Universitario de Veraguas (CRUV)
<b>Abdiel Rodriguez</b>	Centro Regional Universitario de Veraguas (CRUV)

## Resumen

La detección de agentes etiológicos en insectos transmisores y la posterior identificación de la especie del parásito es un trabajo arduo, que requiere de personal altamente capacitado y con mucha experiencia. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa es una poderosa arma de diagnóstico, en donde no sólo el patógeno es detectado inequívocamente, sino que todas las especies pueden ser identificadas en una muestra. El propósito del presente trabajo fue validar la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa como una herramienta de diagnóstico de *Plasmodium sp.* que infectan aves, en mosquitos (Diptera: Culicidae). Se aplicó la técnica a 14 especies de mosquitos colectadas en Gamboa, República de Panamá, procesándose un total de 409 grupos de trabajos, cada uno formado por 20 individuos (hembras) de cada especie de mosquito. A cada grupo se le extrajo ADN con el método Triton X, 1% de Dithiothreitol (Oskam *et al.*, 1996) para posteriormente ser sometidos a la PCR. La prueba resultó positiva en 18 ocasiones (4.4 %). Sólo dos especies de mosquitos, *Aedeomyia squamipennis* y *Culex ocosa* resultaron positivo para la PCR – *Plasmodium*. Se aislaron en total nueve secuencias diferentes de *Plasmodium*, seis de ellas, exclusivamente en *Aedeomyia squamipennis*. De igual forma, las tres secuencias restantes se aislaron solamente en *Culex ocosa*. Ambas especies de mosquitos son representativas y constantes durante todo el año en Gamboa. Los resultados de esta tesis nos indican que la técnica de PCR es de gran valor al momento de incriminar a especies de mosquitos como vectores de malaria en aves, y sus procedimientos podrían extrapolarse para ser aplicados en estudios de la malaria humana, en Panamá.

## SUMMARY

The detection of etiologic agents in vector insects and the posterior identification of the parasite species is a arduous labor that requires highly capacitated personal with expertise in the field. The technique of the polymerase chain reaction is a valuable diagnostic method, in which not only the pathogen is detected, but also all the species of the sample can be identified. The purpose of the present investigation was to validate the technique of the polymerase chain reaction as a diagnostic tool for *Plasmodium sp.* in mosquitos (Diptera: Culicidae) that affect birds. This technique was applied to 14 mosquito species collected in Gamboa, Panamá, being processed a total of 409 work groups, each one formed by 20 individuals (females) of each mosquito species. Of each group, the DNA was extracted with the Triton X, 1% of Dithiothreitol (Oskam *et al.*, 1996) methodology, to be later put under the PCR method. The test resulted positive 18 times (4.4 %). Only two mosquito species, *Aedeomyia squamipennis* and *Culex ocosa* resulted positive for the *Plasmodium* – PCR. Nine different *Plasmodium* sequences were isolated, six of them, exclusively from *Aedeomyia squamipennis*. Equally, the three other sequences were isolated only from *Culex ocosa*. Both mosquito species are represented constantly through the whole year in Gamboa. The results of this thesis indicates us that the PCR technique is of great value at the moment of the incrimination of a mosquito species as vector for malaria in birds and its proceedings could be extrapolated for human malaria studies in Panamá.

## Índice General

Índice de figuras	i
Índice de cuadros	ii
Resumen	1
Capítulo I	
Introducción	4
Capítulo II	
Revisión bibliográfica	8
1. Antecedentes de malaria aviar	9
2. La enfermedad	13
3. Agente etiológico	17
3.a. Taxonomía del parásito	17
4. Vectores de malaria en aves	20
4.a. Vectores y susceptibilidad a <i>Plasmodium sp.</i>	20
4.b. Ciclo del parásito en el vector	25
4.c. Capacidad vectorial	27
5. Aves	30
5.a. Ciclo del parásito en el hospedero vertebrado	30
6. Reacción en cadena de la polimerasa	31
6.a. Extracción de ADN de Culicidae	33
6.b. Iniciadores o primers para <i>Plasmodium sp.</i>	34
6.c. Restricción de los productos de PCR (PCR-RFLPs)	35
7. Métodos de colecta para Culicidae	37
7.a. Atrayentes (CO <sub>2</sub> y Octanol)	39
7.b. Trampas de luz CDC (incandescente / UV)	41
Capítulo III	
Materiales y métodos	43
1. Caracterización del área de colecta	44
2. Muestreo de insectos	45
3. Cría de <i>Culex melanoconion sp.</i> y <i>Anopheles albimanus</i>	51
4. Identificación de especímenes	52
5. Infraestructura del laboratorio	54
6. Extracción del ADN de las muestras de Culicidae	57
6.a. Protocolo de extracción (Oskam <i>et al.</i> , 1996)	57
7. Evaluación del proceso de extracción de ADN	58
7.a. Electroforesis en gel de agarosa	59
7.b. Amplificación del ADN de Culicidae	61
7.c. Visualización de los productos de PCR con ADN de Culicidae	62
8. Amplificación del ADN del parásito (Haemosporina: Plasmodiidae)	63
9. Visualización de productos amplificados de PCR con ADN del parásito	66
10. Identificación de los productos amplificados	67
Capítulo IV	
Resultados	68
1. Colecta de Culicidae	69
2. Cría de <i>Culex melanoconion sp.</i> y <i>Anopheles albimanus</i>	76
3. Extracción del ADN de Culicidae colectados en el campo	77
4. Amplificación del ADN de <i>Plasmodium sp.</i> en muestras de Culicidae	79
5. Visualización e identificación de los productos de PCR	81
7. Fluctuación poblacional de <i>Aedeomyia squamipennis</i> y <i>Culex ocossa</i>	83

Capítulo V	
1. Discusión	86
Capítulo VI	
1. Conclusiones .....	102
2. Recomendaciones .....	105
Bibliografía	107

## Indice de figuras

Figura 1. (a) Trampa de CO <sub>2</sub> para vigilancia de arbovirus (b) Trampa de luz CDC ultravioleta (c) Trampa de luz CDC incandescente.	45
Figura 2. Áreas (Laguna, Hotel, Aves, Muelle) y estaciones de colecta (1A,2A,3A / 4B,5B,6B,7B / 8C,9C / 10D,11D,12D) distribuidas en los alrededores de Gamboa.	46
Figura 3. Estaciones de colecta fijas en los alrededores de la localidad de Gamboa (Trampas de CO <sub>2</sub> para vigilancia de arbovirus, y trampas de luz CDC ultravioleta e incandescente).	47
Figura 4. (a) y (b) Trampas de luz cebadas con Octanol (20 mg / 36 gotas) (c) Trampa de luz cebada con Dióxido de carbono (0.5 libras de CO <sub>2</sub> ).	48
Figura 5. Las trampas de luz eran activadas entre las 18h:00 y 19h:00 y retiradas en la mañana siguiente, entre 06h:00 y 07h:00.	49
Figura 6. (a) Separación e identificación de especies de Culicidae (b) y (c) grupos de 20 individuos (hembra) por especie (d) material insectil a - 20 °C.	50
Figura 7. (a) y (b) Cría e identificación de larvas y pupas colectadas en diversos criaderos en los alrededores de Gamboa (control negativo).	52
Figura 8. Colecta de larvas y pupas en sitios de cría presumibles para Culicidae en los alrededores de la localidad de Gamboa.	53
Figura 9. (a) Área de PCR (b) Termociclador MJ Research PTC - 200 para las reacciones de PCR.	56
Figura 10. (a) Cámara de electroforesis (b) (c) y (d) Área de confirmación de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa.	56
Figura 11. (a) y (b) Ciclos en nitrógeno líquido y baño húmedo (60 °C), que corresponde al paso número dos del protocolo de extracción de ADN.	58
Figura 12. (a) Cámara de luz ultravioleta (UV) para visualizar fragmentos de ADN amplificados, captando la imagen de la corrida mediante un ordenador con el programa Kodak ID 2.0.2 instalado junto al sistema 120 de documentación y análisis de electroforesis Kodak Digital Science.	60
Figura 13. (a) Área de PCR (b) Mezcla de reactivos y preparación de los tubos para la PCR - <i>Plasmodium sp.</i>	65
Figura 14. Porcentaje de individuos colectados por Géneros de Culicidae en Gamboa.- Panamá (Agosto 2003 - Marzo 2004)	75
Figura 15. Porcentaje de individuos colectados por especie, Género <i>Culex</i> en Gamboa – Panamá (Agosto 2003 - Marzo 2004)	75
Figura 16. Evaluación del método de extracción de ADN de Culicidae mediante electroforesis en gel de agarosa (MPM - marcador de peso molecular), 1 – 14 muestras de especies de Culicidae (ver-Cuadro 6, en orden descendente).	78
Figura 17. Evaluación del método de extracción de ADN de Culicidae mediante prueba de PCR, para amplificar el ADN del insecto (MPM - marcador de peso molecular), 1 – 14 muestras de especies de Culicidae (ver Cuadro 6, en orden descendente).	78

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa para PCR - <i>Plasmodium sp.</i> Especificidad de la reacción de PCR con los iniciadores HAMF y HAEMR2. (MPM: marcador de peso molecular, 1. <i>Aedeomyia squamipennis</i> 2. <i>Culex ocossa</i> 3. Control positivo 4. <i>Culex nigripalpus</i> 5. <i>Uranotaenia apicalis</i> 6. <i>Mansonia titillans</i> 7. <i>Anopheles triannulatus</i> 8. Control negativo.	80
Figura 19. Secuencias de ADN de <i>Plasmodium</i> (Grupo A) aisladas de <i>Aedeomyia squamipennis</i> mediante la prueba de PCR, se incluye el mes de colecta del aislamiento, número de muestra y la especie de ave de la cual se aislaron anteriormente.	81
Figura 20. Secuencias de ADN de <i>Plasmodium</i> (Grupo B) aisladas de <i>Culex melanoconion ocosa</i> mediante la prueba de PCR, se incluye el mes de colecta del aislamiento, el número de muestra y la especie de ave de la cual se aislaron anteriormente.	82
Figura 21. Fluctuación poblacional de <i>Aedeomyia squamipennis</i> en relación a la precipitación pluvial acumulada en Gamboa, Panamá.	84
Figura 22. Fluctuación poblacional de <i>Culex m. ocosa</i> en relación a la precipitación pluvial acumulada en Gamboa, Panamá.	85

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Número de individuos de Culicidae colectados en trampas de luz CDC, cebadas con CO <sub>2</sub> y octanol, en Gamboa.	71
Cuadro 2. Número de individuos colectados por tipo de trampa, en Gamboa, entre Agosto del 2003 y Marzo del 2004.	72
Cuadro 3. Número de individuos colectados por área (sub - área), en Gamboa, entre Agosto del 2003 y Marzo del 2004	73
Cuadro 4. Número de individuos colectados por estación, en Gamboa, entre Agosto del 2003 y Marzo del 2004.	74
Cuadro 5. Colecta de estados inmaduros de mosquitos (Culicidae), con cucharón o Dipper, en Gamboa (2003 - 2004).	77
Cuadro 6. Resultados de la prueba de PCR para <i>Plasmodium sp.</i> , en especies de mosquitos (Culicidae) colectados en Gamboa – Panamá.	79

# **Capítulo I**

## **Introducción**

La posibilidad de detectar agentes causantes de enfermedad en insectos vectores es de importancia vital como primera pista en el entendimiento de la epidemiología de estas afecciones. Tradicionalmente, la detección del agente etiológico en el vector y la posterior identificación de la especie ha sido un trabajo arduo que requiere de muchas horas de esfuerzo, personal altamente capacitado y mucha experiencia. En años recientes la detección de patógenos a través de técnicas moleculares ha cobrado significancia puntual, al implementar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección de virus como la encefalitis equina venezolana (EEV) en mosquitos (Armstrong *et al.*, 1995), patógenos como *Trypanosoma gambiense* en moscas Tsetse (Majiwa *et al.*, 1994), *Leishmania sp.* en *Lutzomyia sp.* (Meredith *et al.*, 1993) y *Onchocerca volvulus* en *Simulium sp.* (Meredith *et al.*, 1991). En Panamá, Carrasco *et al.* (2001) utilizaron la técnica de PCR por primera vez como método de diagnóstico de *Leishmania panamensis* en especies de *Lutzomyia* colectadas con cebo humano en tres áreas del país.

Las características de transmisión de los diferentes parásitos causantes de malaria en aves y sus subpoblaciones, las cuales usualmente coexisten en un área endémica, han sido pobremente estudiadas. En el caso de *Plasmodium sp.* en mosquitos, estos se han detectado a través de la disección y observación de sus intestinos y glándulas salivales en busca de formas infectantes (oocistos y/o esporozoítos). Sin embargo, no es posible la discriminación de especies mediante el uso de caracteres morfológicos del parásito, imposibilitando la diferenciación entre especies y/o de cepas de la misma especie.

Por muchos años ha existido confusión entre los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*, ya que los gametocitos de algunas especies de *Plasmodium* en aves son difíciles de separar de los de *Haemoproteus*. Sumado a esto, infecciones por ambos taxos son comunes en poblaciones silvestres de aves (Greiner *et al.*, 1975). Los parásitos causantes de malaria aviar en los géneros *Plasmodium*, *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* son imposibles de identificar basándose sólo en diferencias morfológicas de las etapas sexuales del parásito, las pruebas inmunológicas tampoco pueden alcanzar este objetivo.

Por otro lado, en áreas endémicas de malaria humana el porcentaje de mosquitos infectados es generalmente bajo (menos del 5 %), encontrándose una densidad ínfima de esporozoitos en glándulas salivales, incluso en períodos de elevada transmisión. De tal forma que el entendimiento de la dinámica de transmisión requiere de la revisión de un gran número de insectos y la validez de las conclusiones depende del nivel de precisión y destreza con que se realice el análisis de los mismos (Rosenberg *et al.*, 1990).

Como hemos mencionado, el uso de pruebas inmunológicas específicas ha mejorado las limitaciones del microscopio, pero éstas no detectan bajos niveles del parásito. Tampoco pueden identificar la diversidad de especies de *Plasmodium* presentes en un insecto, ya que el sitio blanco de la prueba, capa proteica del esporozoito llamada circunsporozoito (CS), no es inmunológicamente polimórfica (Beier *et al.*, 1988). Aunado a esto, los métodos antes mencionados son lentos, laboriosos, caros y no son convenientes para aplicación sobre un gran número de muestras.

En la actualidad se han desarrollado métodos moleculares usando enzimas de restricción para los productos de PCR (PCR-RFLP) y así identificar secuencias de DNA de parásitos conocidos tanto en muestras de sangre de aves como en sus vectores (Bensch *et al.*, 2000). Usando estos métodos, primero se busca asociar a las especies de mosquitos con los parásitos que portan y conjuntamente con datos de fluctuación poblacional y preferencia hospedera analizar el papel de los vectores en la epidemiología de la malaria aviar. Un objetivo a cumplir para entender la epidemiología de la malaria en aves será comparar los picos poblacionales de mosquitos vectores con los picos de parásitos aislados de la sangre de aves en la misma área de estudio, a través de técnicas moleculares como la denominada PCR.

Hoy día estos nuevos métodos de biología molecular muestran gran valor en la detección e identificación de forma rápida de agentes etiológicos presentes en insectos vectores brindando un diagnóstico más certero que otras técnicas (Carrasco *et al.*, 2001). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrece una práctica y ventajosa alternativa, ya que provee alta sensibilidad y especificidad, en donde no sólo el parásito puede ser detectado inequívocamente, sino también todas las especies del parásito pueden ser identificadas en una muestra (Arez *et al.*, 2000).

Finalmente en Panamá, la migración de la población desde y/o hacia zonas indígenas con fines recreativos, turísticos, culturales y/o empresariales ha traído como consecuencia la exposición de las personas a diferentes enfermedades entre ellas la malaria por *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* resurgiendo poderosamente estas afecciones en los últimos cuatro años.

Esta situación nos obliga a tomar medidas de control eficientes contra estas enfermedades y uno de los puntos clave es conocer las especies vectores. Para tal fin, es necesario la detección e identificación del parásito en los insectos con una técnica que brinde resultados rápidos con alta sensibilidad y especificidad. En este sentido la técnica de PCR representa un arma de diagnóstico de gran valor en estudios epidemiológicos de malaria aviar, que podrían extrapolarse a la detección de los parásitos causantes de malaria humana en Panamá.

El presente trabajo tiene como objetivos: Validar la técnica “de la Reacción en Cadena de la Polimerasa” en la detección de agentes etiológicos causantes de Malaria Aviar (Haemosporina: Plasmodiidae) en sus vectores (Diptera: Culicidae), identificar las especies de parásitos detectados por la técnica de PCR mediante la secuenciación del producto amplificado y determinar la fluctuación poblacional de las especies de Culicidae que resultaran positivo en la prueba de PCR para *Plasmodium sp.*

**Capítulo II**  
**Revisión Bibliográfica**

## 1. Antecedentes de malaria aviar

La malaria, una de las más devastadoras enfermedades que afectan al hombre, también afecta un amplio rango de otros vertebrados, entre ellos: reptiles, aves y mamíferos. La malaria en aves es transmitida por dípteros hematófagos y causada por esporozoarios intracelulares de los géneros *Haemoproteus* y *Plasmodium* pertenecientes al Filo Apicomplexa (Levine, 1988). Tanto *Haemoproteus* como *Plasmodium* causan cierta patogenicidad en aves. Sin embargo, con *Haemoproteus*, no ocurre merogonia eritrocitaria. De aquí que la patología es menos severa, además la transmisión ocurre por diversas especies de Culicoides y miembros de la familia Hippoboscidae.

El género *Plasmodium* es un grupo diverso de parásitos estrechamente relacionado entre sí, que se alojan en diferentes tejidos y en la sangre de las aves. Estos parásitos poseen una amplia distribución cerca de 25% de todas las especies de aves les sirven de hospederos. Algunas familias como Fringillidae y Sturnidae son comúnmente infectadas; mientras que otras como Laridae, Alcidae y Scolopaciidae raras veces son afectadas. Las razones de estas diferencias son pobremente comprendidas (Bennett *et al.*, 1982). Sin embargo, se considera que existe una combinación de factores como: susceptibilidad del hospedero, mecanismos de defensa y la selección de hábitat (como resultado de la coevolución entre el parásito y su hospedero). Además de esto, las condiciones ambientales particularmente las climáticas y la presencia o ausencia de vectores potenciales también parecen desempeñar un importante rol en la variación e incidencia de la infección en una población de aves (McClure *et al.*, 1978).

La principal razón por el cual la malaria en aves, ha sido históricamente de interés general, es debido a la utilidad que ha brindado para el entendimiento de la malaria en humanos. Por ejemplo, la primera determinación del ciclo biológico completo de las especies de *Plasmodium* causantes de malaria humana se obtuvieron gracias a estudios realizados con los parásitos de malaria aviar. Por otro lado, gran parte del conocimiento que tenemos en la actualidad acerca de la malaria en aves proviene de trabajos realizados con especies de *Plasmodium* que infectan mamíferos (Atkinson y Van Riper, 1991).

El primer reporte de malaria en aves se realizó en Russia (Danilewsky, 1885) donde se documentó por primera vez la morfología del parásito y sus efectos sobre el hospedero. En adición a esto, este investigador demostró el proceso de exflagelación en sangre. MacCallum (1898) aclaró el término exflagelación resolviendo algunos problemas relacionados con la naturaleza del micro y macrogameto. Posteriormente, Ross (1898) identificó a *Culex pipiens fatigans* como portador de esporozoitos de *Plasmodium relictum*, utilizándolo luego para infectar aves susceptibles y así dilucidar el mecanismo de transmisión.

A principios de 1900 las investigaciones se concentraron en saber qué ocurría desde la inoculación del esporozoito por el mosquito, hasta la aparición del parásito en sangre, proceso conocido en la actualidad como período prepatente. Arago (1908) describió por completo el desarrollo asexual del parásito en los tejidos del ave, señalando diversos grados de compromiso en órganos como: el pulmón, hígado, y cerebro.

Estos descubrimientos explicaron la ineficacia de algunas terapias a base de drogas en la erradicación de los estados asexuales del parásito que no están en la sangre periférica al momento del tratamiento (Huff, 1935). Las especies *Plasmodium cathemerium* y *P. relictum* fueron las primeras en ser utilizadas para pruebas de laboratorio. Sin embargo, los costos muy altos requeridos para mantener una población de aves susceptibles en cautiverio dificultaban los trabajos (Brumpt, 1935). El posterior descubrimiento de *P. gallinaceum* y *P. lophurae*, los cuales infectan principalmente a gallinas y patos, respectivamente, resolvió este inconveniente (Coggeshall, 1938).

Una vez comprendido en su totalidad el ciclo biológico del parásito, los trabajos se dirigieron hacia la determinación de la incidencia y prevalencia de las especies de *Plasmodium* en sus hospederos; así como también, hacia estudios relacionados con la ecología de la relación parásito – hospedero, especificidad, evolución, distribución, fisiología, ecoepidemiología, medios de cultivo y especies vectores. Estudios de prevalencia de *Plasmodium* en aves se han conducido en diferentes partes del mundo. Por ejemplo, en Norte América por Greiner *et al.* (1975), en Sur América por White *et al.* (1978). en Europa por Bennett *et al.* (1982), en África por Pierce (1984) y en Asia por McClure *et al.* (1978).

En estudios evolutivos el rango de hospederos entre las especies de *Plasmodium* ha servido de base para explicar las relaciones filogenéticas entre ellas. Sin embargo actualmente se sabe que las 4 especies que causan la malaria en humanos no están directamente emparentadas (Escalante *et al.*, 1995) y que las especies de *Plasmodium* que tienen una periodicidad similar o causan ciclos febriles al mismo

tiempo en primates tampoco están estrechamente relacionadas (Kissinger *et al.*, 1998). Por otro lado, en la actualidad se cree que *Plasmodium falciparum* se originó a partir de los *Plasmodium* aviáres, esto posiblemente debido a una transferencia lateral de aves a hospederos humanos (Waters *et al.*, 1991).

Desde el descubrimiento de los parásitos causantes de malaria en aves se han descrito completamente sus ciclos biológicos, la morfología de sus diferentes etapas de desarrollo, así como su metabolismo, bioquímica y naturaleza antigénica. Además los aspectos de la patología y respuesta inmune del hospedero son bien comprendidos en la actualidad. Sin embargo, existe aún necesidad por estudiar aspectos de la ecología de estos parásitos. Entre estos: la mortalidad y morbilidad que causan en el mundo, la susceptibilidad de diversas especies de hospederos, las diversas cepas moleculares y la participación del ambiente y del vector en la epidemiología de la enfermedad.

Además de su importancia en salud pública y veterinaria, los parásitos del género *Plasmodium* (Haemosporina: Plasmodiidae) se han utilizado para estudiar los problemas evolutivos, comportamentales y ecológicos arraigados en la relación parásito – hospedero (Perkins *et al.*, 1998).

## 2. La enfermedad.

La malaria aviar es causada por parásitos del Filo Apicomplexa. El género *Plasmodium* infecta diversos tejidos y la sangre periférica de hospederos vertebrados. La transmisión ocurre horizontalmente por la picada de un mosquito (Culicidae), desarrollando el organismo infectado un prolongado período crónico (bajo nivel de parasitemia), después de una fase inicial aguda que es regulada por la respuesta humoral y celular del mismo. Las aves se mantienen infectadas de por vida con periódicas recidivas que son controladas por complejas interacciones entre la respuesta inmune individual, el "stress" fisiológico y la endocrinología del ave (Atkinson y Van Riper, 1991).

Como es el caso en la mayoría de las infecciones producidas por Haemoparina de otros géneros como *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* en aves, raras veces hay expresión clínica con síntomas visibles (etapa crónica antes expuesta). Sin embargo, bajo supresión o elevado "stress" fisiológico, progresa una elevada parasitemia con la consecuente pérdida de peso, hipertensión, debilidad, anemia, diarrea, fiebre moderada a alta y en casos severos pérdida de coordinación, cardiomegalia, parálisis y muerte (Huchzermeyer, 1998). Todas las especies de *Plasmodium* son patogénicas en diversos grados, éstas tienen un amplio espectro de patogenicidad y producen muy diversos síntomas. Sin embargo, en muchas ocasiones debido a una ligera patogenicidad muy pocas evidencias clínicas son apreciadas en las aves infectadas (Merino *et al.*, 2000).

Sin embargo, algunas especies de *Plasmodium* que poseen una elevada virulencia producen pérdida del apetito, disnea, cansancio (reflejado en una actividad disminuida) y anemia severa. Estudios fisiológicos en aves infectadas indican que durante la infección aguda ocurren problemas de transporte de oxígeno y termorregulación. Además, puede haber una disminución de la tasa metabólica (Hayworth *et al.*, 1987). Por otro lado, los parásitos de la misma cepa difieren en su patogenicidad cuando infectan diversos hospederos, las causas de esto aún no son bien comprendidas.

La materia fecal producida por las aves afectadas es casi totalmente sólida y de color blanco, debido a la severa deshidratación que produce una excreción concentrada en nitratos. El volumen de plaquetas en la sangre puede ser muy bajo y en algunos casos la pérdida de peso antecede la muerte. En la fase aguda de la enfermedad algunas especies de aves infectadas pierden parte de su plumaje y colocan constantemente la cabeza por debajo de sus alas, en signo de impotencia y desesperación. Algunas veces existe visible hinchazón alrededor de la orbita ocular (Mathey, 1955).

Al igual que ocurre con las especies de *Plasmodium* que causan malaria en humanos, durante el curso de la infección se suceden tres fases claramente definidas. El período prepatente (desde la inoculación hasta la demostración en sangre del parásito), precede a la fase aguda (período patente) de la enfermedad, en donde el parásito alcanza su mayor número en eritrocitos infectados y posteriormente declina disminuyendo el grado de parasitemia (fase crónica de la enfermedad) en el período subpatente.

Posteriormente y sólo en algunos casos pueden ocurrir ligeras recidivas, en las cuales un pequeño número de parásitos son nuevamente liberados en la sangre (Van Riper, 1991).

Las recidivas pueden ser tan severas como la fase aguda de una infección primaria. Sin embargo, gran parte de la población que resiste a la primera infección genera resistencia concomitante por lo menos hacia la misma cepa del parásito. Gran parte de los estudios de patogenicidad en malaria aviar sugieren que el "stress" ambiental y/o nutricional es la principal causa que desencadenan un nuevo paroxismo (Fix *et al.*, 1988). Por otro lado, usualmente después de la recuperación clínica existen muy pocos parásitos circulando en la sangre. De aquí que es casi imposible encontrarlos en placas e incluso inoculando ésta sangre en un ave susceptible puede no producir infección.

Una vez enferma, el ave mantiene la infección por un considerable período de tiempo y probablemente de por vida, aún cuando los parásitos no aparezcan en placas de sangre. Debido a la naturaleza de la malaria en aves, la mayor patología de esta afección se da por el compromiso de la sangre y diversos órganos del sistema circulatorio. De aquí que la afección se atribuye a una disfunción en la circulación. Sin embargo, esto no es exclusivo de la malaria en aves, sino que también ocurre en otras clases de malaria. El nivel de destrucción celular en gallinas infectadas con *Plasmodium gallinaceum* es usualmente proporcional al número de parásitos en eritrocitos, pero en algunos casos de severa infección esto no se cumple (Wright y Kreier, 1969).

La destrucción eritrocitaria es producto tanto de la hemólisis intravascular, como de la fagocitosis. La hemólisis en los eritrocitos se debe a la fragilidad de su membrana por la invasión del parásito, especialmente durante las etapas finales de la merogonia. Por otro lado, durante la fase aguda los eritrocitos no parasitados también son afectados por cambios en los constituyentes del plasma sanguíneo (Seed y Kreier, 1972). La química del plasma sanguíneo de las aves infectadas varía notablemente respecto a las aves sanas, contribuyendo posiblemente a la gravedad de los síntomas. Por ejemplo, la anoxia en aves maláricas resulta no sólo de la destrucción de los eritrocitos, sino también por la caída del pH del plasma, lo cual reduce la capacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno (Soni y Cox, 1974).

En adición a los daños causados en la sangre, diversos órganos internos del hospedero son afectados. Las placas de tejidos en aves infectadas revelan fuerte infección en células del bazo y el hígado, mientras que el corazón, médula espinal y el pulmón son afectados en menor grado. Por otro lado, muy pocos parásitos son encontrados en el riñón (Van Riper y Van Riper, 1985). El bazo puede crecer hasta veinte veces su tamaño normal, debido al edema y a la proliferación celular, adoptando un color oscuro u opaco; mientras que los daños en el hígado son similares, pero con diversos grados de hiperplasia linfoide.

En algunas aves enfermas por malaria se desarrolla un colapso cerebral, producto de la gran hinchazón que presenta el órgano, debido a la oclusión del lumen en los capilares sanguíneos (células endoteliales) por los parásitos y como resultado la obstrucción del flujo sanguíneo (Graham *et al.*, 1973). La necropsia del cerebro en aves infectadas al momento de su muerte, evidencia notable signo de hemorragia y

petequias con los vasos capilares totalmente obstruidos por numerosos merontes exoeritrocíticos. Sin embargo, al mismo tiempo muy pocos parásitos son encontrados circulando en sangre e incluso el ave puede mostrar un estado normal de salud.

### 3. Agente etiológico

#### 3.a. Taxonomía del parásito

Los parásitos causantes de la malaria aviar pertenecen al género *Plasmodium* y se encuentra ubicado dentro del Reino de los Protistas de la siguiente manera:

<b>Reino</b>	Protista
<b>Subreino</b>	Protozoo
<b>Filo</b>	Apicomplexa
<b>Clase</b>	Sporozoasida
<b>Subclase</b>	Coccidiasina
<b>Orden</b>	Eucoccidiorida
<b>Suborden</b>	Haemosporina
<b>Familia</b>	Plasmodiidae
<b>Género</b>	<i>Plasmodium</i> (Levine, 1988)

Los parásitos de la malaria en la familia Plasmodiidae son diversos taxonómicamente, poseen una distribución cosmopolita y muestran un gran éxito ecológico al explotar un amplio rango de hospederos vertebrados. Existen aproximadamente unas 450 especies descritas, ubicadas en 12 géneros; siendo el más conocido *Plasmodium*. Por otro lado, existen 34 especies mundialmente reconocidas de *Plasmodium* que infectan 1,180 especies de aves de 362 diferentes familias.

Estas integran 4 subgéneros (*Haemamoeba*, *Huffia*, *Giovannolaia*, y *Novyella*) diferenciadas en base a la morfología de sus gametocitos, esquizontes y la posición anatómica de éstos en relación al núcleo de los eritrocitos infectados (Corradetti *et al.*, 1963).

El actual número de especies de *Plasmodium* que infectan aves es aún incierto y la taxonomía del grupo dista de ser satisfactoria. El problema taxonómico se debe a la falta de consenso entre los taxónomos por escoger criterios válidos de ordenamiento.

De forma tal que se han descrito muchas más especies de las que realmente ocurren en aves. Tradicionalmente la descripción y clasificación de las especies en géneros y subgénero se ha basado en características de la historia de vida, la morfología de sus estados de desarrollo, los síntomas que producen en el hospedero vertebrado, la especificidad hospedera y los vectores que los transmiten. Sin embargo, la filogenia producto del análisis de estos caracteres ha sido muy cuestionada (Manwell, 1957).

La confusión taxonómica se da a nivel genérico e incluso a nivel de familia, ya que la familia Plasmodiidae posee las características del Suborden Haemosporina, mismas que incluyen a parásitos muy relacionados con el género *Plasmodium* como: *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*. Sin embargo, otros autores los disgregan en las familias Haemoprotidae y Leucocytozoidae, respectivamente (Bennett *et al.*, 1994).

En el caso de los subgéneros de *Plasmodium* que infectan aves: *Haemamoeba*, *Giovannolaia*, *Huffia*, y *Novyella* existe discrepancia entre lo que puede considerarse grande o pequeño respecto al tamaño y al número de los estados asexuales (merozoitos) del parásito (Greiner *et al.*, 1975). De aquí que muchas especies ubicadas en los dos últimos grupos poseen traslape en sus características. Por otro lado, la situación se complica, ya que muchas especies de *Plasmodium* exhiben una morfología diferente al desarrollarse en diferentes hospederos (Garnham, 1966).

Por otro lado, la incertidumbre es mayor a nivel específico, ya que muchas de las especies consideradas válidas, han sido muy escasamente estudiadas en el laboratorio, incluso en algunas ni siquiera se conoce la morfología de los estados en sangre, entre ellas: *Plasmodium bertii*, *P. formanosum*, *P. hegneri*, *P. lutzi* y *P. gundersi*. Todo esto sumado al sesgo que originan los resultados producidos por la inoculación de especies de *Plasmodium* en hospederos no habituales vía inyección, alejándose de lo que ocurre en la naturaleza, reafirma la necesidad de conocer más sobre los ciclos de vida, rango de hospederos, distribución y los vectores que permita elaborar criterios válidos de ordenamiento.

En la actualidad está demostrado que la historia de vida, la periodicidad o replicación asexual, la morfología y la virulencia no concuerdan con la filogenia de las especies del género *Plasmodium*, ya que parásitos de otros géneros como *Hepaticocystis* encajan en el Clade de *Plasmodium* (Escalante *et al.*, 1998). Por ejemplo, la morfología de los diversos estados del parásito vistos en un microscopio es afectado por diferentes métodos de montaje y preservación; además de esto se han encontrado especies crípticas (Perkins, 2001).

Bennett *et al.* (1982) han propuesto el más reciente intento por ordenar la taxonomía de las especies del género *Plasmodium* que infectan aves, listando un total de 75 especies y subespecies, de las cuales treinta (30) son consideradas sinónimos en la actualidad, ocho (8) *incertae sedis* y una (1) es *nomen nudum*.

#### 4. Los vectores de malaria en aves

##### 4.a. Vectores y susceptibilidad a *Plasmodium sp.*

Desde los trabajos pioneros de Ross (1898) se asume que los parásitos causantes de malaria en aves *Plasmodium sp.* son transmitidos sólo por mosquitos de la subfamilia Culicinae. Sin embargo, en la actualidad, al menos experimentalmente, algunas especies de Anophelinae han sido infectados con estos parásitos. Por otro lado, Levine (1985) señala la posible participación de dípteros de la subfamilia Phlebotominae como vectores de estos parásitos en aves, aunque los Culicinae son aún considerados los principales transmisores de malaria en aves bajo condiciones naturales. La más comprensiva revisión de estudios de susceptibilidad en mosquitos a parásitos causantes de malaria en aves fue realizada por Huff (1965) quien realizó pruebas de susceptibilidad en 7 géneros de la familia Culicidae, encontrando 25 especies susceptibles a infección con *Plasmodium relictum*. Entre ellas 13 pertenecían al género *Culex*, tres a *Aedes* y dos a *Culiseta*. Por otro lado, algunos trabajos muestran resultados contradictorios. Por ejemplo, Mok (1952) demostró la transmisión de *Plasmodium relictum* por *Anopheles freeborni* en California. Sin embargo, trabajos posteriores con este parásito fallaron en demostrar la transmisión por ésta y otras especies como *Culiseta inornata* y *Anopheles franciscanus*.

Estudios realizados por Work *et al.* (1990) señalan que un 85% de *Culex tarsalis* fueron infectados con diferentes especies de *Plasmodium* aviar, apoyando esto la hipótesis de que el modo de transmisión más frecuente de *Plasmodium* en aves ocurre por mosquitos de la subfamilia Culicinae. Es necesario mencionar que las condiciones de laboratorio son muy diferentes a las que ocurren en la naturaleza, debido a esto no es posible hacer afirmaciones producto de resultados obtenidos en este tipo de investigaciones, porque cualquier generalidad puede ser un error producto de la presión de selección (Huff, 1965). Una variedad de factores ecológicos usualmente relacionados, facilitan la transmisión de *Plasmodium* aviares en la naturaleza. Entre los más importantes está el grado de exposición de la población susceptible a la picada del vector, relacionado esto con la preferencia hospedera, horas de actividad y la abundancia relativa (sitios de cría) del último (Atkinson y Van Riper III, 1991).

Greiner *et al.* (1975) indican que la alta prevalencia de taxa hermanos a *Plasmodium*, como *Leucocytozoon* y *Haemoproteus*, en aves está estrechamente relacionada con las áreas y estaciones del año en donde los vectores de ambos grupos muestran su mayor actividad. De aquí que *Leucocytozoon* está bien representado en tierras altas cuyos ríos de corriente rápida permiten el continuo desarrollo de poblaciones de *Simullium sp.* Mientras que la alta prevalencia de *Haemoproteus* posee una distribución mucho mayor debido a la amplitud de situaciones ecológicas en las que *Culicoides sp.* pueden completar su ciclo de desarrollo. Sumado a esto, la transmisión tanto de *Haemoproteus* como de *Leucocytozoon* en un área en particular puede ocurrir por diversas especies de sus vectores, algo muy difícil de considerar en el caso de *Plasmodium* que infectan aves (Bennett *et al.*, 1982).

En el caso de *Plasmodium sp.* resulta más difícil asociar los vectores con la transmisión; ya que a diferencia de *Haemoproteus* y *Leucocytozoon*, *Plasmodium* desaparece de la sangre periférica después de un corto período (fase aguda de la enfermedad) para alcanzar un equilibrio y se refugia en diferentes tejidos del hospedero (fase crónica de la enfermedad), lo cual hace también muy difícil estimar su prevalencia en aves al fallar constantemente las pruebas en sangre para su detección. En adición a esto, estudios realizados por Goff y Van Riper III (1980) en Hawai indican que una pequeña porción de la población de *Culex quinquefasciatus* es capaz de mantener elevada la tasa de transmisión de *Plasmodium relictum* en poblaciones de aves nativas. Esto refleja un poco la complejidad de la transmisión de *Plasmodium* aviares por mosquitos en la naturaleza.

El factor genético es muy importante en la infección de mosquitos por *Plasmodium*, ya que aún dentro de individuos de una especie de mosquito la susceptibilidad puede variar considerablemente. Esto sin duda alguna se debe a diferencias genéticas. Por ejemplo, Huff (1931) encontró que la susceptibilidad de *Culex pipiens* a *Plasmodium cathemerium* en una población depende de un gen recesivo. Por otro lado, se cree que una especie de mosquitos receptiva a una especie en particular de *Plasmodium* no es receptiva a otras del mismo grupo de parásitos (Applegate, 1971).

Algunas características fisiológicas de los vectores marcan diferencias en la susceptibilidad por las diferentes especies de *Plasmodium* causantes de malaria. Entre ellas, la velocidad de digestión de la sangre y el tiempo que tardan en formar su membrana peritrófica.

En este sentido, *Anopheles gambiae* y *Anopheles stephensi* con una lenta velocidad de digestión poseen una significativa tasa de infección por *Plasmodium falciparum* respecto a otras especies de *Anopheles* (Ponnudurai *et al.*, 1988).

Las interacciones entre el oocineto y la membrana peritrófica han sido pobremente estudiadas. Algunos autores citan la importancia de ésta como barrera que impide la penetración del oocineto en el intestino medio y, consecuentemente, el desarrollo del oociste y de la esporogonia en algunas especies de Culicidae (Sluiters *et al.*, 1986). Sin embargo, otros señalan que el oocineto de diversas especies de *Plasmodium* puede penetrar la membrana peritrófica, si ésta no posee más de 20 a 30 horas de formación, y por ende, no está totalmente endurecida (Sinden, 1984).

Vinetz *et al.* (2000) demostraron la participación de dos genes que codifican la formación de quitinasas por el oocineto totalmente maduro de *Plasmodium gallinaceum* durante las 20 a 25 horas posteriores a la formación del cigoto. En el caso de *Plasmodium falciparum*, recientemente asociado filogenéticamente a los *Plasmodium* que infectan aves (Waters *et al.*, 1991), las quitinasas no son previamente activadas por proteasas del mosquito *Anopheles*, sino que se activan por un factor genético aún desconocido y actúan para destruir la membrana peritrófica, permitiendo el paso del oocineto y la consecuente invasión del epitelio intestinal. Por otro lado, estudios en mosquitos del género *Anopheles* señalan que algunas especies completan el desarrollo esporogónico, pero los esporozoitos liberados por el oociste son incapaces de penetrar las glándulas salivales.

Diversos factores ambientales en adición al genético y a los relacionados con la ecología del vector impiden el desarrollo completo de algunas especies de *Plasmodium* en mosquitos, como son la temperatura y la humedad, siendo la temperatura probablemente el factor más importante (Ball y Chao, 1964). La temperatura óptima de desarrollo varía para cada especie de *Plasmodium*. En el caso de *P. relictum* en mosquitos es 26 °C, temperaturas superiores o inferiores a esta previenen la maduración de los esporozoitos.

Una vez infectado el mosquito probablemente permanece así por el resto de su vida, lo cual en la naturaleza representa un corto período de tiempo. Elevadas temperaturas en combinación con baja humedad son letales para los mosquitos; así como, también las bajas temperaturas (menos de 4 °C). De aquí que algunos autores señalan que en zonas templadas la supervivencia de los mosquitos es baja, siendo las aves los principales reservorios de *Plasmodium sp.* (Work *et al.*, 1990).

Finalmente, la resistencia de mosquitos hacia parásitos causantes de malaria puede estar relacionada con la capacidad del insecto de encapsular el oocineto vía melanina. Sin embargo, otros mecanismos de defensa (resistencia) en el vector, como el uso del óxido nítrico y de enzimas proteasas como la serina, han sido también involucrados (Collins *et al.*, 1986). Los *Plasmodium* inducen respuestas innatas de defensa en el vector que pueden detener su desarrollo o destruirlo. Sin embargo, los mecanismos moleculares envueltos en la destrucción del parásito no han sido bien identificados. Recientemente, se demostró que las moléculas derivadas del oxígeno generadas en el proceso de encapsulación con la melanina juega un papel importante en la destrucción del parásito en el insecto (Mendoza *et al.*, 2002).

#### 4.b. Ciclo biológico del parásito en el vector

El desarrollo de los gametocitos de *Plasmodium* se inicia en el hospedero vertebrado (en los eritrocitos) y continúa en el mosquito al ingerir la sangre proveniente de un ave infectada. Luego, ésta pasa al intestino medio, suscitándose una serie de cambios ambientales que estimulan la salida de los gametocitos de las células que los portan.

Entre los factores que controlan el inicio de la gametogénesis están la caída de la temperatura y cambios en el pH, producto del paso de la sangre desde el ave hacia el intestino medio del vector. (Carter y Graves, 1988). Inhibidores de fosfodiesterasa como: la cafeína, y el 8 - Bromo 3,5 cicloadenosina monofosfato pueden estimular al menos experimentalmente el proceso de gametogenesis (Martín *et al.*, 1978). Algunas sustancias naturales indeterminadas presentes en el vector también pueden acelerar el inicio de esta etapa.

Estudios realizados con *Plasmodium elongatum* demostraron que algunas sustancias pueden determinar la capacidad del vector para completar la gametogenesis. Debido a que la distribución natural de estas sustancias es variable a través de las especies de mosquito, la formación de los gametos puede sólo ocurrir en algunas especies de mosquito (Nijhout, 1979). Estudios en la ultraestructura del proceso de gametogenesis en *Plasmodium gallinaceum* revelan una estrecha similitud con el mismo proceso ocurrido en especies de *Haemoproteus* y *Leucocytozoon* (Aikawa *et al.*, 1970).

Al inicio del ciclo en el vector, pocos minutos después de la ingesta de sangre los gametocitos salen de los eritrocitos que los portan, alcanzando su madurez. El microgameto (♂) (uno de los ocho que se forman por exflagelación) fertiliza al macrogameto (♀), originando un cigoto que rápidamente cambia para formar un oocineto móvil. Este se mueve hacia la periferia de la masa de sangre en el intestino del vector, escapando a la membrana peritrófica y penetrando el epitelio intestinal, posteriormente irrumpe en la lámina basal transformándose en el oociste.

Luego de pocos días dependiendo de la temperatura y la especie de parásito se producen múltiples formas infectantes llamadas esporozoitos, los cuales son liberados en el hemocele del mosquito luego de la ruptura del oociste, en el proceso llamado esporogonia (reproducción asexual dentro del insecto).

Finalmente los esporozoitos invaden las glándulas salivales y están listos para ser liberados en la próxima alimentación sanguínea (Aikawa *et al.*, 1984). El desarrollo de todas las especies de *Plasmodium* que infectan aves es similar al de otros que infectan mamíferos y probablemente también a reptiles, de donde los dos primeros grupos han descendido. Es más la morfología de los estados en la sangre de aves y reptiles es muy similar.

#### 4.c. Capacidad vectorial

La malaria sólo se mantendrá en un área, si la tasa de infección tanto en mosquitos como en humanos es alta y constante. En el caso de la malaria humana por *P. falciparum*, el establecimiento de métodos tradicionales de agricultura han permitido el continuo contacto entre hospedero susceptible y vector, al brindar sitios de cría artificiales propicios para éstos. Por otro lado, en el caso de la malaria aviar la tasa de infección estará delimitada por el grado de asociación entre los vectores infectados y la población de aves susceptibles; así como por los períodos de mayor vulnerabilidad a la picada (mayor exposición en épocas de cría).

Con el fin de evaluar el riesgo de transmisión de malaria aviar en una zona y establecer las bases de la epidemiología de la afección es imprescindible definir la capacidad vectorial de las especies de Culicidae presentes en la zona, lo cual determina el riesgo de transmisión. Una vez que los mosquitos se infectan con *Plasmodium*, ellos son capaces de transmitir el parásito durante toda su vida. Por otro lado, la capacidad vectorial esta condicionada por múltiples y diversos factores.

Entre los más importantes tenemos: la duración del ciclo gonotrófico (expectativa de vida), la densidad poblacional del vector y el índice de infección en la población del vector. El primer factor es intrínseco para cada especie; mientras que los otros dos pueden ser influenciados por una serie de factores ambientales locales. Adicionalmente, existen otros factores ligados a la etiología del insecto que pueden explicar la forma en que acontece la transmisión, como por ejemplo: sitio y hora de picada, preferencia hospedera, y el radio de vuelo.

Muchos son los autores que han tratado de demostrar los patrones de preferencia hospedera que se dan en las diferentes especies de la familia Culicidae. Sin embargo, las generalizaciones en este aspecto deben ser tomadas con mucha precaución debido al sesgo que acarrea el uso de diversas técnicas y a la conducta de algunas especies, la cual puede variar radicalmente entre diversas áreas y estaciones del año, dependiendo de los factores ambientales y la disponibilidad de fuentes de sangre.

El mayor esfuerzo por dilucidar la preferencia hospedera se ha realizado en los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* por la significancia médica y veterinaria que éstos poseen. De 50 especies estudiadas en el género *Anopheles*, los bovinos son los principales hospederos de 32 de ellas y los primates de otras 14. Mientras que sólo 1 % de las muestras fueron positivas para sangre de aves (Bruce Chwatt y Gockel, 1960). Al parecer pocas especies de *Anopheles* se alimentan de sangre de aves.

Por otro lado, Christensen *et al.* (1996), en Panamá, señalan que 24% de *Anopheles triannulatus* colectados en trampas sin cebo se habían alimentado previamente con sangre de aves. Forattini *et al.* (1962) señalan que *Anopheles kertezia cruzii* habita en el dosel del bosque en Suramérica y se alimenta predominantemente de sangre de aves. Datos obtenidos sobre el género *Aedes* señalan a los mamíferos como sus principales hospederos. Sin embargo, las especies *Ochlerotatus taeniorhynchus*, *O. atlanticus*, *O. canadiensis*, *O. infirmatus*, *O. vigilax*; *Aedes (protomacleaya) triseriatus*, y *A. aegypti* se alimentan tanto de mamíferos como de aves (Edman, 1971; Templéis, 1974; Mitchell *et al.*, 1987).

Los patrones alimenticios del género *Culex* son variables y sólo se conoce para algunas especies. Algunos *Culex* se alimentan de mamíferos; mientras que, otros lo hacen en aves. También existen especies que se alimentan en ambos grupos y un pequeño porcentaje lo hace de reptiles y anfibios. Las especies: *Culex (melanoconion) amazonensis*, *C. annulirostris*, *C. antennatus*, *C. erraticus*, *C. ocosa*, *C. decens*, *C. dunni*, *C. epanastasis*, *C. invidiosus*; *Culex (Culex) nigripalpus*, *C. declarator*, *C. quinquefasciatus*, *C. tarsalis*, *C. univittatus*, *C. salinarius*, *C. thalassius*, y *C. tritaeniorynchus* se alimentan tanto en mamíferos, aves y reptiles (Edman, 1971; Templéis, 1974; Mitchell *et al.*, 1987; Christensen *et al.*, 1996).

Galindo *et al.* (1975) indican que el comportamiento alimenticio de los géneros *Culex* y *Deinocerites* en áreas tropicales es muy variable respecto a las especies de zonas templadas, debido a una mayor variedad de hospederos susceptibles en éstas áreas. Finalmente, especies de varios géneros han demostrado cierta preferencia por la sangre de aves, entre ellas: *Mansonia dyari*, *Mansonia leberi*, *Coquillettidia nigrosignata*, *Deinocerites cancer*, *Culiseta litorea*, y *Culiseta morsitans*. Resalta el caso de *Aedeomyia squamipennis* colectada en Panamá en trampas sin cebo, quién se alimentó en un 86.6% de aves; 7.3% en reptiles - anfibios y 6.1% en mamíferos (Christensen *et al.*, 1996).

## 5. Aves

### 5.a. Ciclo del parásito en el hospedero vertebrado

Todas las especies de *Plasmodium* requieren de un hospedero vertebrado (el ave) y uno invertebrado (el mosquito) para completar su ciclo vital. Debido a que el parásito alcanza su madurez sexual y se reproduce en el vector, se le ha considerado como su hospedero definitivo, mientras que los vertebrados (aves) son considerados hospederos intermediarios. Algunos autores prefieren usar los términos hospedero definitivo en referencia a los mosquitos e intermediario en el caso del ave, para evitar la confusión (Garnham, 1966). Los cambios propagativos y de desarrollo en el parásito ocurren tanto en el insecto, como en el ave, pero sólo el cigoto – oocineto es diploide; mientras que todos los estados de *Plasmodium* en el ave son haploides.

El ciclo en las aves inicia con la inoculación de la fase infectante por el mosquito, a través de la picada. En el caso de *Plasmodium relictum* los esporozoitos liberados con la saliva del vector invaden diversas células, entre ellas las células reticulares del seno esplénico. Sin embargo, generaciones posteriores del parásito pueden alojarse en otros tejidos. Entre ellos los más atacados son el hígado, pulmones y cerebro. Posteriormente, luego de un mínimo de tres generaciones de desarrollo exoeritrocítico (en tejidos de órganos) los parásitos en diferentes formas criptozoitos, metacriptozoito y fanerozoito, respectivamente, liberan pequeños y esféricos merozoitos que infectan tanto eritrocitos como otros tejidos en otros órganos.

Luego de invadir a los glóbulos rojos, los merozoitos adoptan forma de anillo y se transforman en trofozoitos que eventualmente formaran merontes o fanerozoitos (desarrollo asexual) o gametocitos (desarrollo sexual). Finalmente, una vez maduros los gametocitos pueden ser ingeridos por otro insecto, iniciando así un nuevo ciclo. Luego del primer desarrollo en los eritrocitos del ave, los *Plasmodium* que infectan aves son capaces de continuar la merogonia en los eritrocitos para formar gametocitos o reiniciar la infección en otros órganos en forma de fanerozoitos. Esta opción parece no tenerla los merozoitos de *Plasmodium* que infectan mamíferos, las causas de esto son aún inciertas.

#### **6. Reacción en cadena de la polimerasa**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método “in vitro” de amplificación del ADN el cual fue introducido en 1985. El método de la PCR es simple, y es un arma extremadamente valiosa para el diagnóstico, además brinda la facilidad que sólo requiere de una pequeña cantidad de material para la amplificación del ADN (Simon *et al.*, 1994). La adopción de una ADN polimerasa termoestable (*Taq*) en 1988 simplificó grandemente el proceso de desarrollo de la prueba, permitiendo la automatización de la PCR. Desde entonces un gran número de aplicaciones han sido desarrolladas en áreas de diagnóstico e investigación. La disponibilidad de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR ha marcado el inicio hacia un mejor entendimiento de la ecoepidemiología de las enfermedades transmitidas por insectos vectores, ya que permite medir parámetros importantes de la capacidad vectorial como la preferencia hospedera.

Además, ella permite la incriminación de especies vectores al detectar e identificar los patógenos que portan y el estudio de complejos o especies crípticas (Sibling) cuya morfología es similar, pero con hábitos divergentes.

La PCR ha sido considerada como una versión simple de los procesos de replicación del ADN que ocurren durante la división celular. Básicamente esta prueba consiste en tres pasos: desnaturalización térmica del ADN blanco, anidamiento de los iniciadores y extensión de los iniciadores anidados por medio de la enzima ADN polimerasa. Estos tres pasos constituyen un ciclo de la reacción y este ciclo se repite un número de veces. Cada ciclo dobla aproximadamente el número de moléculas blanco (Carrasco *et al.*, 2001). Las electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio es el método más comúnmente utilizado en el análisis de los productos de PCR. Un gel de agarosa al 1.5% es el adecuado para el análisis de productos con tamaños comprendidos entre 150 y 1000 pares de bases (pb).

El éxito de la PCR en la amplificación de ADN depende en gran medida de la selección de los iniciadores (primers) apropiados y de las condiciones bajo las cuales van a amplificar dichos iniciadores (Goebel *et al.*, 1999). Además de esto, la confiabilidad de la prueba depende de una serie de factores como el tiempo de anidamiento y extensión, temperatura de anidamiento, concentración de dNTP, concentración de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), presencia de inhibidores y el tipo de ADN polimerasa empleada.

### 6.a. Extracción de ADN de Culicidae

Para extraer el ADN de los insectos es necesario romper la barrera natural y primaria que protege sus tejidos y órganos de daños que le pueda producir diferentes agentes presente en su medio. Ésta barrera de protección es el exoesqueleto constituido principalmente por quitina. Arez *et al.* (2000) demostraron que los mosquitos contienen poderosos inhibidores de polimerasa durante la prueba de PCR en sus partes más esclerotizadas (mayor proporción de quitina); es decir la cabeza y el torác. Sin embargo estos inhibidores pueden ser inocuos en la prueba, si se utilizan métodos de extracción de ADN adecuados.

El mismo autor probó cinco métodos diferentes de extracción de ADN para PCR en anophelinos, utilizando especímenes de cuerpo entero y encontró que las extracciones hechas por algunos métodos, como: Tritón X-100 1% y Dithiothreitol (TD) (Oskam *et al.*, 1996); Chelex-based technique (CH) (Schriefer *et al.*, 1991) y Silica / guanidinium (Chanteu *et al.*, 1994), no inhibían la PCR. Mientras que los métodos: Phenol – Cloroformo (PH) (Snounou *et al.*, 1993) y Lithium – chloride (LC) (Gemmell y Akiyama, 1996) si lo hacían.

Por otro lado, Oskam *et al.* (1996) obtuvieron los mejores resultados con Triton X-100 1% y Dithiothreitol (TD) en comparación de otros métodos de extracción como: Phenol – Cloroformo (PH) (Sambrook *et al.*, 1989) y Silica / guanidinium (Boom *et al.*, 1990) al usar la PCR en la detección de microfilarias L-3 de *Onchocerca sp.* en *Simullium sp.*

Por último, queremos mencionar que los mosquitos al ser colocados en líquido pierden sus escamas, las cuales son muy importantes para la correcta identificación de las especies. De aquí la ventaja del método de extracción utilizado (TD) en comparación con otros como el (PH).

#### **6.b. Iniciadores o primers para *Plasmodium sp.***

El primer intento por estimar la prevalencia de *Plasmodium relictum* por medio de la PCR en aves en Hawai utilizó una pareja iniciadores (primers) (89) y (90) que intentaban amplificar parcialmente el gen que codifica las subunidades 18S de rRNA del género *Plasmodium* (Feldman *et al.*, 1995). Sin embargo, estos iniciadores (primers) producían múltiples bandas. Aparentemente, porque la secuencia del gen que codifica para las subunidades 18s rRNA es muy variable en especies de *Plasmodium* de diversas áreas. Posteriormente, Li *et al.* (1995) diseñaron otros juegos de iniciadores (primers) al identificar regiones muy conservadas en pequeñas subunidades del ARN de *Plasmodium sp.*, utilizándolas con una "Nested – PCR" para detectar la presencia de éstos parásitos.

Sin embargo, los iniciadores utilizados (566, 570 y 841, 844) en estos trabajos fallaron en detectar infecciones por *Haemoproteus* y *Plasmodium* que infectan aves, debido a que fueron obtenidos en base a una cepa de *Plasmodium falciparum* asumiendo su efectividad para amplificar otras especies del mismo género. Además de esto existe más probabilidad de error cuando se hacen dos rondas de amplificación.

Recientemente, Bensch *et al.* (2000) y Richard *et al.* (2002) utilizaron iniciadores (primers) que amplifican regiones muy conservadas en el citocromo b de *Plasmodium*. Éstos fueron más efectivos en detectar infecciones en aves por *Haemoproteus* y *Plasmodium* al no mostrar diferencias significativas entre el número de falsos negativos obtenidos por ambas técnicas. Aunque los protocolos de amplificación son diferentes, la eficiencia de ambos métodos en comparación de la microscopia es considerable.

#### **6.c. Restricción de los productos de PCR.(PCR-RFLP)**

El ADN de un parásito proveniente de biopsias de tejido, sangre o incluso de uno de los vectores de malaria puede ser detectado aún estando en cantidades muy pequeñas (igual a un solo parásito) mediante la amplificación de un fragmento de su secuencia gracias al uso de iniciadores en la reacción de polimerización de una segunda cadena de ADN. El mapeo de restricción es comúnmente utilizado como una vía para verificar la identidad de los productos de PCR. Esta técnica tiene la ventaja de no necesitar la purificación de los productos amplificados previo a la restricción y que muchas enzimas de restricción funcionan de forma óptima en una mezcla de restricción (Carrasco *et al.*, 2001).

La sustitución de bases en una molécula de ADN puede ser detectada utilizando enzimas comúnmente conocidas como endonucleasas de restricción. Éstas son aisladas de bacterias y cortan el ADN en una posición constante dentro de una pequeña, pero muy específica secuencia de reconocimiento, la cual generalmente consta de 4 a 6 pares de bases (pb) (Dowling *et al.*, 1996).

Cuando una molécula de ADN es digerida con una enzima de restricción, dependiendo de la cantidad de sitios de restricción que tenga y el tamaño de los fragmentos producidos, producirá patrones variables, los cuales podrán observarse en un gel. A esto es lo que se conoce como polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción o RFLP's. La sustitución de bases puede crear o eliminar sitios de corte para una enzima en particular y de esa manera alterar el tamaño y número de los fragmentos detectados (Dowling *et al.*, 1996).

En la actualidad cientos de enzimas de restricción han sido aisladas y caracterizadas. El estudio de los RFLP's es una herramienta molecular muy útil, fácil de implementar, rápida y de bajo costo. Ella sirve para identificar los productos amplificados por la PCR. Sin embargo, se necesita escoger una enzima de restricción que produzca fragmentos lo suficientemente grandes para ser observados en un gel de agarosa. Los RFLP's son sensibles a pequeños cambios, ya que una sola molécula de DNAm<sub>t</sub> puede eliminar un sitio de restricción y cambiar totalmente los resultados obtenidos para un producto amplificado en la PCR.

## 7. Método de colecta para Culicidae

En la orientación a corta distancia del mosquito hacia su hospedero, la temperatura y la humedad son elementos importantes. Mientras que a larga distancia la visión y el olfato son los que determinan su comportamiento. El papel de la visión está bien documentado, pero la participación del olfato aún requiere de investigación. Por otro lado, a larga distancia se combinan estímulos químicos, como el CO<sub>2</sub>, emanaciones de la piel, aire exhalado y la orina que influyen en el comportamiento de búsqueda.

En lo que se refiere a estructuras sensoriales o quimiorreceptores de olfato en mosquitos. Estos se localizan en las antenas y las piezas bucales; mientras que los receptores específicos para CO<sub>2</sub> se encuentran en los palpos maxilares (Milver, 1987). De igual manera, un tipo de sensilla para ácido láctico se localiza en el flagelo antenal de *Aedes aegypti* (Davies, 1978).

Los productos olorosos mejor conocidos que atraen a mosquitos están presentes en el sudor humano. Ellos representan emanaciones producidas por glándulas sudoríparas exocrinas, apocrinas y sebáceas. El sudor es una solución acuosa de NaCl de las glándulas sudoríparas, que contienen trazas de compuestos no coloidales del plasma sanguíneo. Mientras que el cebo es un material aceitoso producido por las glándulas sebáceas que contiene ácidos grasos de bajo peso molecular, ésteres de alcoholes primarios (de alto peso molecular), colesterol, albúminas y sales inorgánicas; el sudor es una mezcla de agua y cebo (Braks *et al.*, 2001).

El único compuesto que se ha investigado lo suficiente como para ser considerado una kairomona, es el ácido láctico (Braks y Takken, 1999). Aunque otros como aminoácidos y esteroides también son atrayentes. El ácido láctico fue reportado como atrayente por primera vez en lavados con acetona de la piel humana en *Aedes aegypti*. Sin embargo, sólo funciona en presencia del CO<sub>2</sub>. En el caso de la orina, se ha encontrado que en el tunel de viento ciertas fracciones que contienen difenoles y esteroides son atractivos para los mosquitos, pero no hay más información.

En insectos hematófagos la visión incluye respuestas simples, así como la percepción de objetos. Ella es importante en las principales fases del ciclo de alimentación. Las rutas de vuelo de los mosquitos se ven afectadas por los patrones de vegetación. En base a sus preferencias alimenticias, Galun (1987) los agrupó en especies de bosque (espacios cerrados), de pradera o llanuras (espacios abiertos) y de ecotono entre estas dos.

Las hembras de Culicidae responden más a los colores como el azul y negro, siendo las respuestas más fuertes con el azul – verde y ultravioleta (UV). Está bien demostrado que *Aedes aegypti* es dicromático y que sólo detecta la luz UV y la longitud de onda que corresponde al verde. Menos especies de mosquitos se posan en superficies de color gris y prefieren aquellas de color negro. Además la preferencia es clara por los objetos estacionarios. En cuanto a la forma, los mosquitos prefieren los patrones sólidos a los discontinuos (Muir *et al.*, 1990).

### 7.a. Atrayentes (CO<sub>2</sub> y Octanol)

El CO<sub>2</sub> fue reportado como atrayente por primera vez por Rudolf en 1922. Posteriormente, experimentos realizados por Gillies *et al.* (1987) en África demostraron que la remoción del CO<sub>2</sub> hasta un 94 % del aire humano espirado reducía marcadamente la atracción de los mosquitos.

El mismo autor señala que el CO<sub>2</sub> actúa como un activador del vuelo sostenido y como una kairomona, pero con efecto sinergista en combinación con otras sustancias como el L - ácido láctico. De aquí el principio del CO<sub>2</sub> en las trampas de luz, ya que se puede usar para aumentar las capturas en forma de hielo seco o liberándolo a partir de cilindros a la tasa de espiración natural de diversos hospederos. Por ejemplo, a la tasa de 5000 – 7000 ml/min (equivale al aire expirado por dos becerros) atrae a los mosquitos a distancias de 15 metros (Gillies *et al.*, 1987).

Reeves (1953) probó tres presiones de CO<sub>2</sub> equivalentes a una gallina (25 ml/min), hombre (250 ml/min) y un caballo (2500 ml/min) y colectó en mayor proporción *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* y *Ochlerotatus taeniorrhynchus*, respectivamente. La concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera es de 0.03 – 0.04 %. Mientras que la excreción total a partir de la piel es aproximadamente 0.3 – 11.5 % en función del total expedido por los pulmones. Es necesario mencionar que los niveles atmosféricos varían localmente según la presencia y densidad de la vegetación y hora del día. Los mosquitos son sensibles a los cambios de CO<sub>2</sub> hasta el nivel del 0.01 %.

Es importante mencionar que el CO<sub>2</sub> por sí solo no atrae a los mosquitos, sino en combinación con otros compuestos como el amonio, ácido láctico y ácido carboxílico (Takken y Kline, 1989). Por otro lado, el aire humano espirado contiene al menos 102 compuestos orgánicos diferentes de origen endógeno y exógeno. La concentración promedio del 96 % de estos compuestos cae en el rango de "trazas", que es de 0.06 – 9.5 mg/L. La acetona, el isopreno y el acetonitrilo dan el 51 % de todo el contenido orgánico; mientras, que el CO<sub>2</sub> incluye el 4.5 %. El aire exhalado por bovinos atrae mayor proporción de Culicidae en el campo y en el laboratorio en comparación de CO<sub>2</sub> sólo. Esto condujo al descubrimiento del octanol (1-octen-3-ol) como kairomona (Vale, 1978).

Otro olor asociado es la acetona, un componente normal en el aliento del buey que atrae a los mosquitos, liberado a la intensidad de 15 gr/hr y resulta doblemente efectivo en relación al CO<sub>2</sub> solo. Por otro lado, ambos compuestos liberados a las concentraciones normales sólo son efectivos en un 50 %, en comparación a la atracción natural del aliento del buey. Está claro que hay atrayentes adicionales involucrados, donde uno de estos es el octanol. Recientemente, se encontró que este compuesto incrementa significativamente las capturas de mosquitos en trampas de luz. Este químico se encuentra comúnmente en plantas leguminosas y fue identificado a partir del aliento del buey, probablemente, liberado durante la digestión de éstas plantas (Vale, 1978). Por lo anterior, no es sorprendente que este compuesto sea atrayente para todos aquellos mosquitos que se alimentan sobre bovinos, venados silvestres u cualquier otro herbívoro.

### **7.b. Trampas de luz CDC (incandescente / UV)**

La trampa de luz CDC convencional ha sido muy utilizada debido a su versatilidad y eficiencia para la colecta de mosquitos y otros nematóceros en el campo. Fue diseñada originalmente para la captura de mosquitos transmisores de arbovirus. Su uso se extendió posteriormente a la captura de otros insectos hematófagos.

Está constituida por un cilindro de plexiglás con dos hendiduras para la inserción de dos brazos que sostienen un pequeño motor ventilador. Un bombillo colocado sobre la trampa representa la fuente de luz, la cual es reflejada en un plato metálico que sirve de techo a la trampa (cobertor para la lluvia). La luz de la trampa funciona como atrayente para las especies de Nematócera debido al fototropismo positivo que algunas de estas presentan.

En el otro extremo del cilindro, se fija la manga de tela (malla fina) sostenida por dos aros paralelos. La energía para el funcionamiento del motor es provista por una batería de seis voltios o cuatro pilas de 1.5 voltios cada una. Las especies de Culicidae atraídas por la luz son aspirados dentro de la jaula pasando a través de las aspas del ventilador. La trampa se deja generalmente funcionando durante toda la noche o en el período en que los mosquitos presenten mayor actividad. La trampa de luz ultravioleta (UV) ha sido también probada en la captura de nematóceros hematófagos, variando muy poco de la trampa anterior. Esta usa luz UV como atrayente y una fuente de energía suministrada por una batería de 12 voltios, pero con el mismo principio de la anterior.

Por último, la trampa de CO<sub>2</sub> fue introducida al comprobarse la acción del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como kairomona que orienta la búsqueda de los hospederos, a mediana y corta distancia, en los mosquitos. Esta es una trampa con un principio similar a las dos anteriores, con la diferencia de que la luz utilizada posee una intensidad mucho menor y la cantidad de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es mayor que las utilizadas para cebar los tipos anteriores. El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) actúa como un fuerte atrayente para las hembras de Culicidae. La combinación de dos atrayentes, luz y CO<sub>2</sub> puede obtenerse colocando junto a la trampa de luz CDC, un bloque de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) o hielo seco.

**Capítulo III**  
**Materiales y Métodos**

## 1. Caracterización del área de colecta

La localidad de Gamboa fue el área seleccionada en el presente trabajo para la colecta del material entomológico (Diptera: Culicidae). Esto obedece a los siguientes criterios: los estudios previos realizados por Andrea Gager durante el 2001, 2002 y 2003 (datos no publicados) en Gamboa sobre la incidencia de parásitos (*Haemoproteus*, *Leucocytozoon* y *Plasmodium*) causantes de la malaria en *Turdus grayi* mediante análisis de PCR. Estos sirven de marco conceptual y están estrechamente relacionados con los propósitos de este estudio. De igual forma, la significancia histórica de Gamboa (Antigua Zona del Canal) como laboratorio de campo del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales en estudios de biología tropical. Además, de su accesibilidad y cercanía al laboratorio de biología molecular del STRI en Naos.

La localidad de Gamboa se encuentra ubicada en la provincia de Panamá, distrito de Panamá, corregimiento de Ancón. La comunidad está enteramente rodeada de áreas naturales de un gran valor científico, ecológico, hidrológico e histórico, como el río Chagres y el Parque Nacional Soberanía. Es importante mencionar que Gamboa es uno de los puntos centrales de la Cuenca Hidrográfica del Canal de Panamá; por lo tanto, es un lugar estratégico en el funcionamiento de ésta. En el área encontramos montañas bajas con altitudes relativas entre 100 y 280 msnm, el relieve oscila entre mediana y fuertemente inclinado. La precipitación anual sobrepasa los 2500 mm de agua, su estación seca ocurre generalmente en los primeros tres meses del año, donde la precipitación no sobrepasa los 660 mm, mientras que la temperatura promedio anual es de 27° centígrados.

De acuerdo con el sistema de clasificación de zonas de vida del Mundo o Formaciones Vegetales de Holdridge, el área está clasificada como Bosque Húmedo Tropical (BHT). La vegetación observada en el área es principalmente de Bosque Húmedo Tropical Semidecíduo, pero también se incluyen en la zona herbazales, ciénagas, márgenes de lago, riberas, bosques secundarios y algo de áreas de rastrojo.

## 2. Muestreo de insectos

Las colectas fueron realizadas con ocho trampas de luz CDC incandescente, dos CDC de luz ultravioleta y dos trampas de CO<sub>2</sub> para vigilancia de arbovirosis, cebadas con octanol (Figura 1). En total 12 trampas fueron colocadas cada quince días, entre agosto del 2003 y marzo del 2004 en los alrededores de la comunidad de Gamboa, distribuidas como se aprecia en la (Figura 2). Las mismas fueron colocadas entre uno y dos metros de altura, protegidas de la lluvia por cobertores de metal en estaciones de colecta fijas (Figura 3).

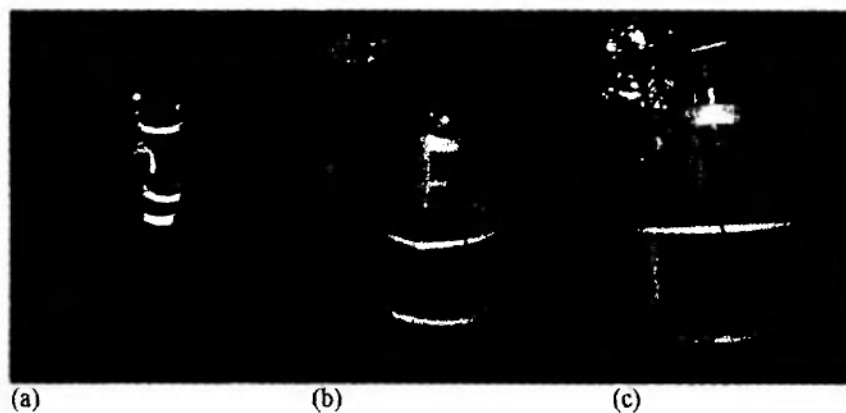


Figura 1. (a) Trampa de CO<sub>2</sub> para vigilancia de arbovirus; (b) Trampa de luz CDC ultravioleta; (c) Trampa de luz CDC incandescente.

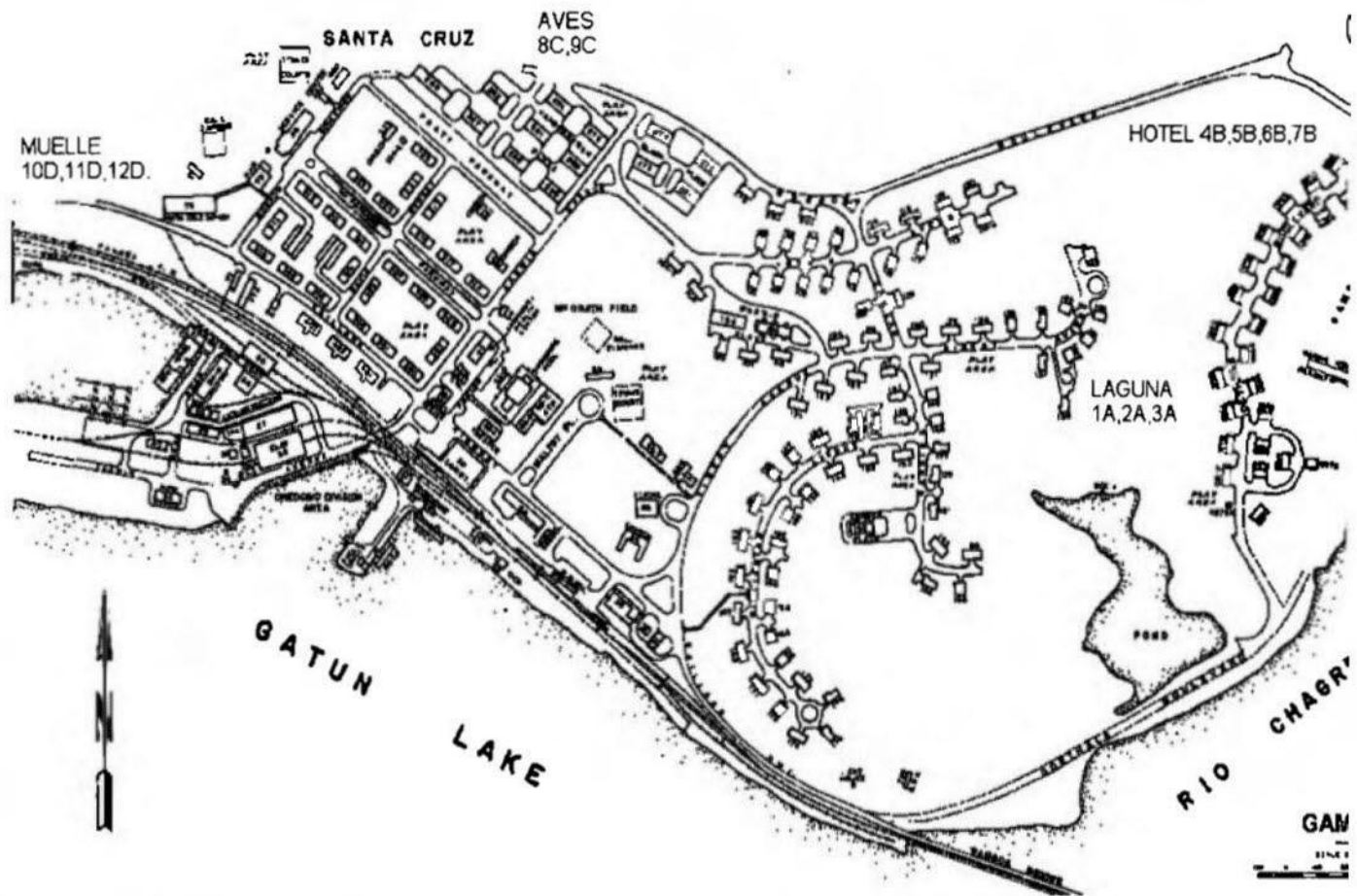


Figura 2. Áreas (Laguna, Hotel, Aves, Muelle) y estaciones de colecta (1A,2A,3A / 4B,5B,6B,7B / 8C,9C / 10D,11D,12D) distribuidas en los alrededores de Gamboa.



Figura 3. Estaciones de colecta fijas en los alrededores de la localidad de Gamba (Trampas de CO<sub>2</sub> para vigilancia de arbovirus, y trampas de luz CDC ultravioleta e incandescente).

Cada trampa era cebadas con (0.5) libras de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) colocado inmediatamente debajo de éstas en recipiente de plástico o una bolsa Ziplock y 20 miligramos de octanol en líquido suministrado por BioQuip, colocado a razón de 36 gotas en una mota de algodón y fijado con cinta adhesiva a la parte superior del cilindro de cada trampa (Figura 4).

Las trampas eran activadas entre las 18h:00 y 19h:00 y retiradas en la mañana siguiente entre las 06h:00 y 07h:00 (Figura 5).

El material colectado era inmediatamente colocado a menos - 20 °C en un congelador en el laboratorio de campo del Smithsonian en Gamboa y luego transportado hasta el laboratorio de biología molecular del mismo Instituto en Naos en una nevera portátil.

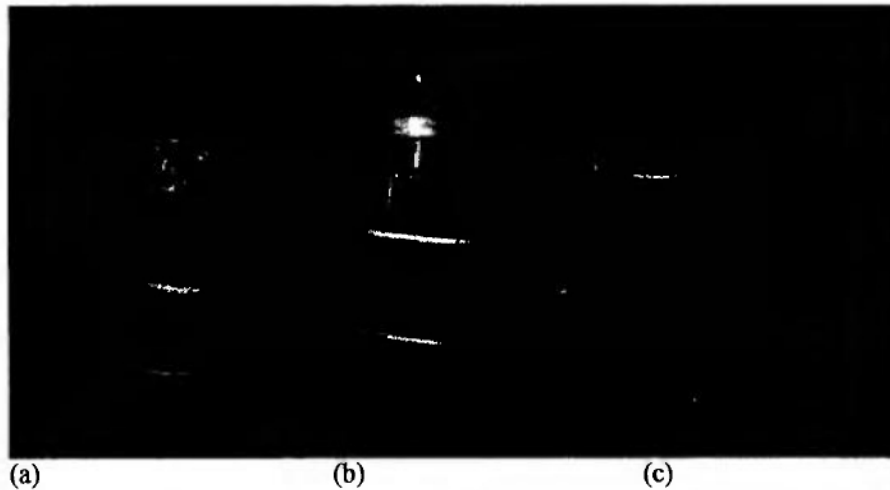


Figura 4. (a) y (b) Trampas de luz cebadas con octanol (20 mg / 36 gotas) (c) Trampa de luz cebada con dióxido de carbono (0.5 libras de  $\text{CO}_2$ ).



Figura 5. Las trampas de luz eran activadas entre las 18h:00 y 19h:00 y retiradas en la mañana siguiente, entre 06h:00 y 07h:00.

Una de las giras de cada mes proporcionaba el material utilizado para el análisis molecular (PCR), siendo éste identificado a nivel de especie y puesto en tubos de extracción debidamente rotulados en grupos de 20 individuos. Estos eran colocados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un congelador hasta el momento de iniciar el protocolo de extracción de ADN (Figura 6). Para cada trampa se contaron los totales por especie. De tal forma que nos permitiera obtener datos de su fluctuación poblacional. Cuando la colecta no era tomada en cuenta para el análisis molecular por PCR, los insectos eran llevados a las instalaciones del Programa Centroamericano de Maestría en Entomología de la Universidad de Panamá matados con cloroformo y montados en alfileres entomológicos para la colección de referencia (corroboración de especies).

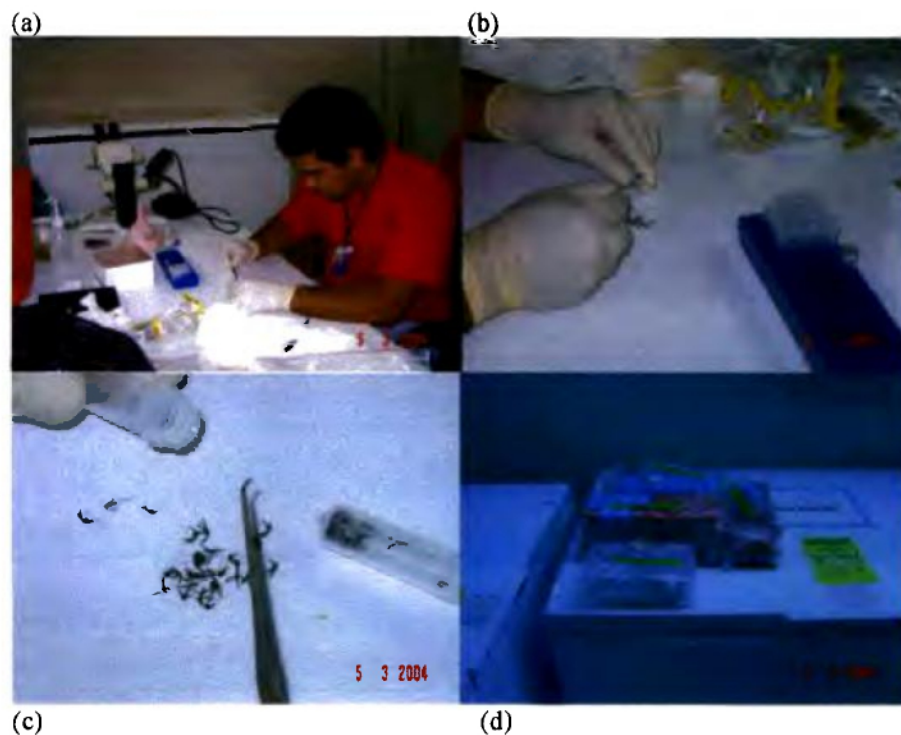


Figura 6. (a) Separación e identificación de especies de Culicidae; (b) y (c) grupos de 20 especímenes por especie; (d) material insectil a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3. Crianza de *Culex melanoconion* sp. y *Anopheles albimanus*

La metodología en esta etapa del trabajo está basada en las investigaciones de crianza y colonización de insectos de importancia médica realizadas por más de 25 años en el Instituto Conmemorativo Gorgas de estudios de la Salud. En este instituto se han levantado colonias para insectos de importancia en salud pública, entre ellos: *Anopheles albimanus*, *Aedes aegypti*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius pallescens*, *Lutzomyia Gomezi*. El señor José Rovira funcionario de dicha institución colaboró en esta parte del trabajo con la cría e identificación de las larvas de cuarto estadio. La cría fue establecida en las instalaciones de la sección de entomología del Instituto Gorgas.

Las larvas de mosquitos fueron colectadas en Gamboa, posteriormente trasladadas al insectario del Instituto Gorgas en recipientes especiales que contenían agua y vegetación acuática proveniente de los criaderos, donde fueron identificadas a especie y criadas hasta su emergencia (Figura 7). Para garantizar la colecta de *Culex melanoconion* sp., se realizaron 4 giras de campo (1 / mes) entre noviembre del 2003 y febrero de 2004. La colecta de larvas y pupas se realizó con cucharón (Dipper), así como por medio de recipientes manuales en sitios de crianza presumibles para este grupo (Figura 8). Una vez emergidos los especímenes de *Culex melanoconion* sp. eran conservados a - 20 °C hasta el protocolo de extracción de ADN, mismos que serían utilizados en el control negativo de la prueba de PCR.

Este procedimiento sirvió también para corroborar la identificación de los adultos capturados en las trampas de luz durante todo el trabajo y para levantar una colección de referencia en base a la preparación de la genitalia de machos, exuvia larval en placa y adultos en alfileres entomológicos. En el caso de *Anopheles albimanus* los especímenes eran tomados de la cría que posee el Instituto Gorgas desde hace muchos años y sometidos al mismo protocolo descrito para *Culex*.

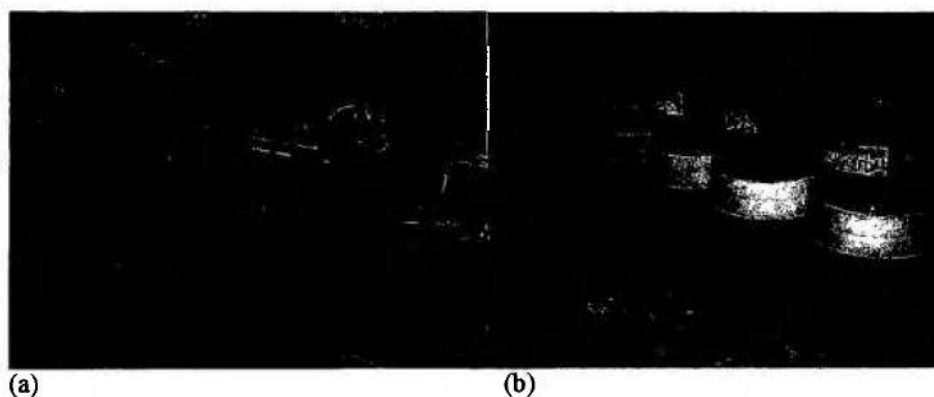


Figura 7. (a) y (b) Cría e identificación de larvas y pupas colectadas en diversos criaderos en los alrededores de Gamboa (control negativo).

#### 4. Identificación de especímenes

Las especies de Culicidae colectadas con las trampas de Luz / CO<sub>2</sub> / Octanol fueron separadas de los demás insectos con la ayuda de un estereoscopio, procediéndose a la identificación de este material, utilizando para esto las claves de Harbach y Knight, 1980; Sallum *et al.*, 1996; Clark – Gil y Darsie, 1983; Pecor *et al.*, 1992; Galindo y Blanton, 1955; Dyar, 1928; Clave para mosquitos del Instituto Gorgas – documento inédito).



Figura 8. Colecta de larvas y pupas en sitios de cría presumibles para Culicidae en los alrededores de la localidad de Gamboa.

Se prepararon más de 250 placas de genitalia de machos y se montó una colección de especímenes adultos en alfileres entomológicos que reposan en la colección de referencia del Programa Centroamericano de Maestría de Entomología de la Universidad de Panamá, el Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBio) y el Instituto Conmemorativo Gorgas de estudios de la Salud. Además, como se describió anteriormente se levantó una cría de *Culex melanoconion sp.*, durante los últimos meses de estudio lo que sirvió también para caracterizar los sitios de cría y corroborar las especies a través de la identificación de larvas de cuarto estadio y pupas colectadas en el área de estudio.

La identificación a nivel de especie del estado adulto de los mosquitos fue corroborada por James Pecor del Walter Reed Army Institute of Research (United States), José Rovira del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (Panamá) y Guillermo Chaverry del INBio (Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica) en visitas realizadas a las colecciones entomológicas nacionales y regionales o al enviar material directamente a los especialistas.

## **5. Infraestructura del laboratorio**

Las técnicas que manejan la amplificación de los ácidos nucleicos presentan la ventaja de ser técnicas altamente sensibles y específicas, pero es necesario tomar precauciones para prevenir resultados erróneos. La contaminación de las muestras de ADN o de los productos amplificados con ADN foráneo es una de las mayores causas de error.

El laboratorio de biología molecular de STRI, a cargo del Dr. Eldredge Birmingham, en Naos posee dos pisos, en el primero se ubica un laboratorio general en donde se separaba el material entomológico, a nivel de especie para luego colocarlo en viales rotulados a - 20 °C en un congelador. Mientras que en el segundo piso esta el área de biología molecular, la cual está dividida en secciones para evitar la contaminación durante la realización de las pruebas moleculares:

1. Área de extracción: al igual que las áreas restantes, estaba ubicada en el segundo piso, aquí se extrajo el ADN de las muestras de Culicidae que previamente habían sido separadas.
2. Área de PCR: ésta área cuenta con el Termociclador en el cual se darían las reacciones de la PCR (Figura 9).
3. Área de confirmación: aquí se analizaron los productos amplificados mediante la electroforesis en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio, éste último es un poderoso mutágeno que requiere de cuidados especiales, debido a esto, los guantes utilizados en esta sección se desechan al abandonarla (Figura 10).

Es necesario el uso de micropipetas exclusivas en cada área de trabajo para evitar la contaminación de las muestras. Toda la cristalería utilizada era autoclavada a 121 °C por 15 minutos previo a su uso. Las puntas una vez utilizadas eran desechadas. En todo momento se utilizó agua destilada y desionizada (con una resistencia de 18 MΩ). Además las superficies de las mesas de trabajo eran limpiadas cuidadosamente con etanol al 70% y agua destilada.

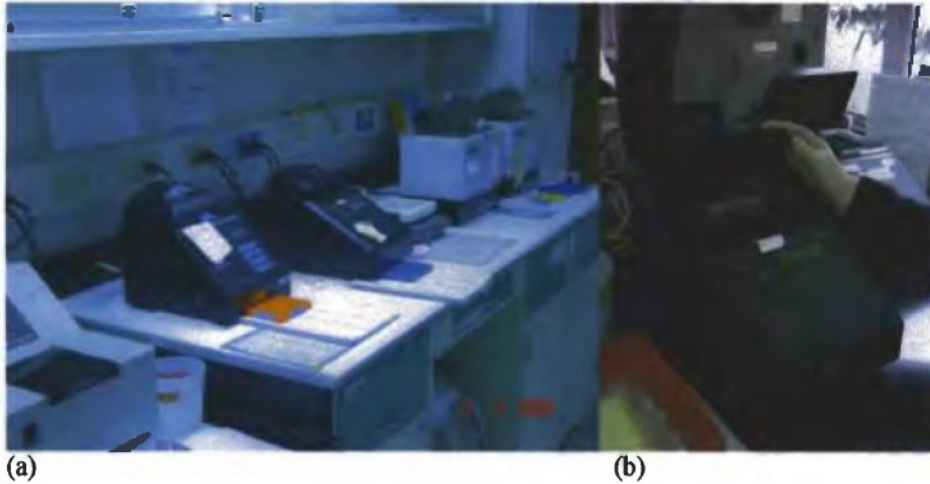


Figura 9. (a) Área de PCR; (b) Termociclador MJ Research PTC - 200 para las reacciones de PCR.

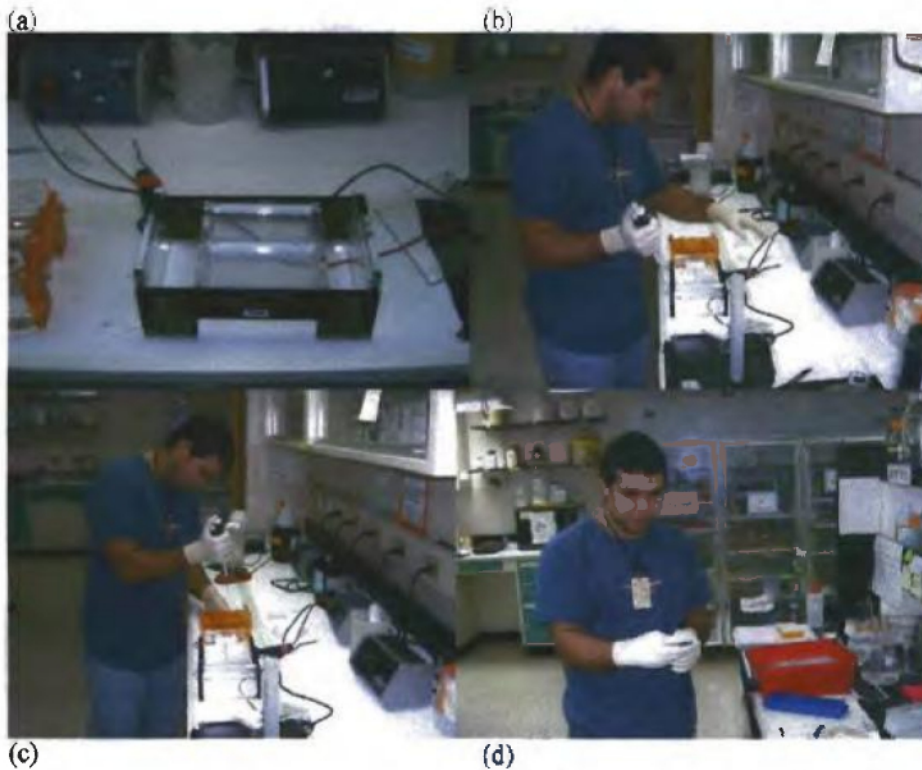


Figura 10. (a) cámara de electroforesis; (b), (c) y (d)) Área de confirmación y análisis de los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa.

## 6. Extracción del ADN de las muestras de Culicidae

### 6.a. Protocolo de extracción (Oskam *et al.*, 1996)

1. Primero colocamos grupos de 20 especímenes por especie en tubos cónicos de 1.5 ml debidamente rotulados, a los que agregamos 500  $\mu$ l de Buffer de Lysis (50 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris- HCl pH 7.4) que contenía además 1% de Triton X - 100, 10 mM DTT y dos bolitas de cerámica. Los viales eran colocados en una centrifuga por espacio de 45 segundos a mediana velocidad (maceración).
2. Luego los tubos eran colocados en un recipiente de metal y se pasaban por cuatro ciclos de 15 segundos en nitrógeno líquido y 1:30 minutos en baño húmedo a 60 °C respectivamente (Figura 11).
3. Posteriormente, colocamos los tubos en incubación a 60 °C por una hora.
4. Luego el sobrenadante era trasvasado a nuevos tubos cónicos de 1.5 ml, previamente rotulados, conteniendo 1000  $\mu$ l de Buffer de Lysis (descrito en el paso 1) Proteinasa K y 1% de Triton X - 100 a razón de 200 mg/ml y dejados en incubación a 60 °C por tres horas.
5. Posteriormente, los tubos eran colocados en una centrifuga a 13,200 Rpm por espacio de 10 minutos y sacados cuidadosamente evitando que el material se mezclará. El sobrenadante era trasvasado a nuevos tubos cónicos 1.5 ml con la ayuda de pipetas de vidrio desechables.
6. Finalmente, la muestra podía guardarse a - 20 °C para usarse el día siguiente o diluir el material de cada tubo en una alcuota de 1:10 en agua Sigma y luego

colocarlos en agua hirviendo por 10 minutos y con esto completar la solución de trabajo para la prueba de PCR en la cantidad requerida.



Figura 11. (a) y (b) Ciclos en nitrógeno líquido y baño húmedo a 60 °C, corresponde al paso número dos del protocolo de extracción de ADN.

## 7. Evaluación del proceso de extracción de ADN

Para evaluar el proceso de extracción de ADN de los grupos de Culicidae se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa y confirmar así la presencia de bandas de ADN en las muestras procesadas. Además se hizo una prueba de PCR con iniciadores o primers para amplificar el gen que codifica para el citocromo b de los miembros del Orden Diptera.

La electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio es el método más comúnmente utilizado en el análisis de los productos de PCR. Un gel de agarosa al 1.5% es el adecuado para el análisis de productos con tamaños comprendidos entre 150 y 1000 pares de bases (pb) (Carrasco *et al.*, 2000).

### 7.a. Electroforesis en gel de agarosa

1. Preparamos agarosa al 1.5 % en buffer 1X TBE (Solución stock 5x: 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0.5M - pH 8.0) y se llevo a 1000 ml con ddH<sub>2</sub>O de Sigma Co. La agarosa fue depositada en un erlenmeyer limpio y seco de 200 ml de capacidad, a razón de 0.8 g por cada 55 ml de buffer (Sambrook *et al.*, 1989).
2. Calentamos por 1:30 minutos en un horno microondas y revolvimos gentilmente, repitiendo este paso por 1:00 minuto más.
3. Luego de la disolución de la agarosa, añadimos solución de bromuro de etidio 10 mg/ml (Sambrook *et al.*, 1989) a razón de 1  $\mu$ l por 55 ml de solución.
4. Servimos el gel dentro de una cámara de electroforesis, previamente preparada con sus peinillas y la dejamos enfriar por 40 minutos, dentro de un refrigerador a 4 °C.
5. Una vez endurecido el gel, rellenamos la cámara de electroforesis con buffer 1X TBE (descrito en el paso 1) retirando con mucho cuidado las peinillas para no romper el gel.
6. Utilizando una micropipeta servimos en cada pocillo 10  $\mu$ l de la extracción del ADN; mezclados previamente con 3  $\mu$ l de buffer de corrida Bromofenol - Sucrosa, 0.25% de azul de bromofenol, 40% (W/V) sucrosa disuelta en ddH<sub>2</sub>O (Sambrook *et al.*, 1989).
7. Colocamos la tapa de la cámara de electroforesis, verificamos la posición correcta de los polos y encendimos la cámara. Corrimos el gel a 96 Voltios por 25 minutos.

8. Culminada la electroforesis, sacamos el gel y lo observamos en una cámara de luz ultravioleta (UV) para visualizar fragmentos de ADN amplificados, captando la imagen de la corrida mediante un ordenador con el programa Kodak ID 2.0.2 instalado junto al sistema 120 de documentación y análisis de electroforesis Kodak Digital Science (Figura 12).
9. Comprobamos la extracción, al observar bandas de ADN en la imagen.



(a)

Figura 12. (a) Cámara de luz ultravioleta (UV) para visualizar fragmentos de ADN amplificados, captando la imagen de la corrida mediante un ordenador con el programa Kodak ID 2.0.2 instalado junto al sistema 120 de documentación y análisis de electroforesis Kodak Digital Science.

### 7.b. Amplificación del ADN de Culicidae

1. En cada tubo para PCR (tubo cónico de 0.2 ml) añadimos las siguientes soluciones, para un volumen final de 10  $\mu$ l.

- 1.0  $\mu$ l de 10X Buffer II para PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris - HCl, pH 8.3).
- 1.0  $\mu$ l de dNTP s (deoxinucleótido trifosfato).
- 3.45  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O estéril (Sigma co.).
- 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>
- 0.05  $\mu$ l de AmpliTaq, ADN polimerasa (Applied Biosystems Inc., California)
- 1.0  $\mu$ l de ADN blanco (paso # 6 del protocolo de extracción de ADN)
- 1.0  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores *cyt + bF* / *cyt + bR* para amplificar el citocromo b de los miembros del Orden Diptera (Lyman *et al.*, 1999).

Para minimizar errores al usar las micropipetas (al servir ínfimas cantidades) y de contaminación de los reactivos, se hizo primero una mezcla de reactivos, añadiendo el volumen total de los reactivos que se van a utilizar para preparar todos los tubos (sin incluir el ADN blanco), repartiendo 9 microlitos de la mezcla en cada tubo de PCR. Por último se adicionó 1  $\mu$ l de ADN blanco. Además de los tubos de las muestras, adicionamos un tubo de control, éste contenía 9  $\mu$ l de mezcla más 1  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O (control negativo). Utilizamos dos iniciadores (primers) *cytbF* (5'-GGACAAATATCATTGAGGAGGAACAG-3') y *cytbR* (5'-ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG-3') (Lyman *et al.*, 1999) para la amplificación parcial del citocromo b de los organismos del Orden Diptera.

Una vez añadida la mezcla y el ADN dentro de los tubos cónicos de 0.2 ml para PCR, éstos fueron colocados en un termociclador MJ Research PTC-200, con el siguiente protocolo de amplificación:

1. 94 °C por 2 minutos (desnaturalización)
2. 94 °C por 60 segundos (desnaturalización)
3. 50 °C por 60 segundos (anidamiento)
4. 72 °C por 45 segundos (extensión)
5. Regresar al paso 2 por 4 veces
6. 94 °C por 45 segundos (desnaturalización)
7. 50 °C por 45 segundos (anidamiento)
8. 72 °C por 1 minuto y 30 segundos (extensión)
9. Regresar al paso 6 por 25 veces
10. 4 °C por siempre
11. Fin

#### **7.c. Visualización de los productos de PCR con ADN de Culicidae**

1. Para la visualización de los productos amplificados se preparó un gel de agarosa al 1.5 % en TBE 1X ( Procedimiento descrito anteriormente).
2. Utilizando una micropipeta servimos en el primer pocillo 3 µl de una escala de peso (123 Kb, 100 pb o cualquier escala comercial). En el resto de los pocillos del gel servimos 13 µl de la solución contenida en cada tubo cónico de 0.2 ml para PCR (1.0 µl del ADN blanco más 9 µl de la mezcla de reactivos)

mezclados previamente con 3  $\mu$ l de buffer de corrida Bromofenol – Sucrosa, 0.25% de azul de bromofenol, 40% (W/V) sucrosa disuelta en ddH<sub>2</sub>O (Sambrook *et al.*, 1989).

3. Colocamos la tapa de la cámara de electroforesis, verificamos la posición correcta de los polos y encendimos la cámara. Corrimos el gel a 100 Voltios por 25 minutos.
4. Posteriormente sacamos el gel de la cámara de electroforesis y lo observamos en una cámara de luz ultravioleta, captando la imagen de la corrida mediante un ordenador con el programa Kodak ID 2.0.2 instalado junto al sistema 120 de documentación y análisis de electroforesis Kodak Digital Science.
5. Los resultados positivos son puestos en evidencia mediante la aparición de bandas de ADN en la imagen, correspondientes a 460 pares de bases (pb).

#### **8. Amplificación del ADN del parásito (Haemosporina: Plasmodiidae)**

En la reacción de PCR para la amplificación del ADN de parásitos (Haemosporina: Plasmodiidae) se utilizaron puntas con filtro. Las micropipetas fueron de uso exclusivo en la preparación de las reacciones de PCR. Cada grupo de amplificación consistía de 38 muestras, un control negativo y un control positivo. Los tubos de reacción eran rotulados antes de iniciar la preparación de la mezcla. El control negativo utilizado en las pruebas de PCR era ADN extraído de *Anopheles albimanus* y *Culex melanoconion sp.*, no alimentados, procedente de una colonia de laboratorio levantada en el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud. Por consiguiente, libre de infecciones por protozoarios del género *Plasmodium sp.* Además, de agua estéril (Sigma co.).

El control positivo contenía ADN extraído de la sangre de *Turdus grayi* en cautiverio infectada con *Plasmodium sp.* (previa comprobación por PCR de la sangre del ave y frotis en colorante Giemsa). En cada tubo para PCR (tubo cónico de 0.2 ml) añadimos las siguientes soluciones, para un total de 10  $\mu$ l.

- 1.0  $\mu$ l de 10X Buffer II para PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris - HCl, pH 8.3).
- 1.0  $\mu$ l de dNTPs (deoxinucleótido trifosfato).
- 3.45  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O estéril (Sigma co).
- 1.5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>
- 0.05  $\mu$ l de AmpliTaq ADN polimerasa (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California)
- 1  $\mu$ l de solución de trabajo o ADN blanco (paso # 6 del protocolo de extracción de ADN)
- 1  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores HAEMF / HAEMR2 (Bensch *et al.*, 2000).

De igual forma que en el resto de las pruebas de PCR realizadas en este trabajo, se preparó primero una mezcla de reactivos (no incluía el ADN blanco), repartiendo 9 microlitos de la mezcla en cada tubo cónico de 0.2 ml para PCR y por último se adicionaba 1  $\mu$ l de ADN blanco (Figura 13). Utilizamos dos iniciadores o primers HAEMF (5' - ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG - 3') y HAEMR2 (5' - GCATTATCTGGATGTGATAATTGGT - 3') (Bensch *et al.*, 2000) para amplificar el *cyt b* de organismos del *Filo Apicomplexa*, Suborden Haemosporina, Familia Plasmodiidae. La presencia de un fragmento de aproximadamente 380 pares de bases (pb) indica un resultado positivo.

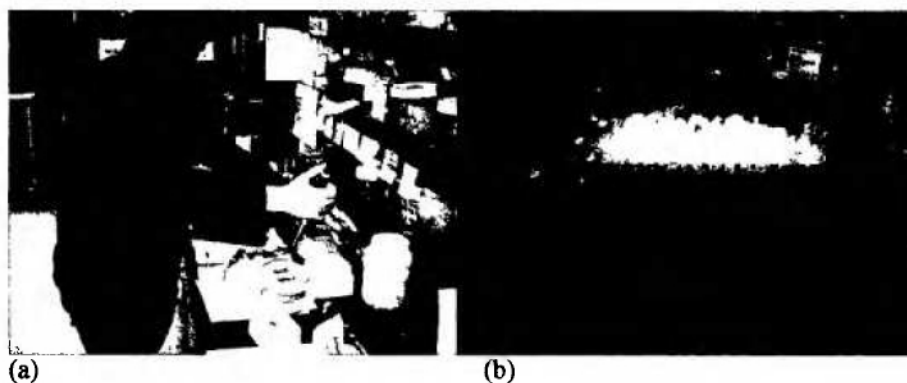


Figura 13. (a) Area de PCR; (b) Mezcla de reactivos y preparación de los tubos para PCR *Plasmodium sp.*

Una vez añadida la mezcla y el ADN dentro de los tubos cónicos de 0.2 ml para PCR, éstos eran mezclados suavemente, tapados y colocados en el plato del termociclador MJ Research PTC-200, con el siguiente protocolo de amplificación:

1. 94 °C por 3 minutos (desnaturalización)
2. 94 °C por 30 segundos (desnaturalización)
3. 55 °C por 30 segundos (anidamiento)
4. 72 °C por 45 segundos (extensión)
5. Regresar al paso 2 por 4 veces
6. 94 °C por 45 segundos (desnaturalización)
7. 55 °C por 45 segundos (anidamiento)
8. 72 °C por 1 minuto y 30 segundos (extensión)
9. Regresar al paso 6 por 35 veces
10. 4 °C por siempre
11. Fin

## 9. Visualización de productos amplificados de PCR con ADN del parásito

1. Para la visualización de los productos amplificados se preparó un gel de agarosa al 1.5 % en TBE 1X (Procedimiento descrito anteriormente).
2. Utilizando una micropipeta servimos en el primer pocillo 3  $\mu$ l de una escala de peso (123 Kb, 100 pb o cualquier escala comercial). En el resto de los pocillos del gel servimos 13  $\mu$ l de la solución contenida en cada tubo cónico de 0.2 ml para PCR (1  $\mu$ l del ADN blanco más 9  $\mu$ l de la mezcla de reactivos) mezclados previamente con 3  $\mu$ l de buffer de corrida Bromofenol - Sucrosa 0.25% de azul de bromofenol, 40% (W/V) sucrosa disuelta en ddH<sub>2</sub>O.
3. Seguidamente ver los pasos del 13 a 14 del procedimiento previamente descrito en la sección 7 (verificación de la extracción de ADN).
4. La presencia de una banda de ADN de aproximadamente 380 pb indica un resultado positivo, es decir existe ADN de *Plasmodium* en la muestra.

## 10. Identificación de los productos amplificados

Los grupos de Culicidae (20 individuos por especies) que resultaban positivos para la amplificación de ADN de *Plasmodium sp.* eran enviados a la sección de secuenciación del laboratorio de biología molecular en Naos, a cargo de la doctora Oris Sanjur. Previo a esto se realizaba una prueba de confirmación con una segunda prueba de PCR y se corrían las muestras en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1.2% en Buffer 1X TAE (Solución stock 50X Tris - acetato EDTA: 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 20 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 y lo llevamos a 1000 ml con H<sub>2</sub>Odd).

Posteriormente se cortaban las bandas de ADN y se digería la agarosa con gelasa. Las muestras fueron secuenciadas por miembros del mismo departamento utilizando para esto, los materiales y equipos del laboratorio. Una vez conocida la secuencia completa del parásito se utilizaba el programa ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software versión 3.3 (Applied Biosystems; Perkin – Elmer, 1998b) para observar la imagen en un ordenador.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa PAUP versión 4.0b3a (Swofford, 2000) y los árboles filogenéticos se construyen con el mismo programa. Las secuencias se identifican por grado de similitud respecto de otras que han sido previamente depositadas en Genbank. Todos los procedimientos de corte de bandas de ADN amplificado, digestión de agarosa en gelasa, purificación y secuenciación del producto amplificado realizados en esta sección, son descritos en (Jaramillo, 2000; Sambrook *et al.*, 1989).

# **Capítulo IV**

## **Resultados**

## 1. Colecta de Culicidae

Un total de 147,455 individuos, pertenecientes a 31 especies distribuidas en 12 géneros de la familia Culicidae, fueron colectadas con trampas de luz CDC cebadas con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y octanol, entre agosto del 2003 y marzo del 2004 en la localidad de Gamboa, Provincia de Panamá (Cuadro 1). Durante ocho meses de estudio, se colocaron en total 192 trampas de luz (12 trampas cada 15 días), equivalentes a 2,304 horas / trampa de muestreo en 16 muestreos. Se colectaron 136,356 (♀) hembras de Culicidae que corresponde al 92.48 % del total colectado.

El género de mosquitos más representado y abundante fue *Culex*, con un total de 102,323 individuos distribuidos en 10 especies, lo que corresponde al 71.7 % del total de colecta, seguido por *Mansonia* y *Anopheles* con cinco y tres especies, para un total de 10,726 (7.7 %), y 2,612 (1.9 %) individuos, respectivamente. En los géneros *Uranotaenia*, *Coquillettidia* y *Ochlerotatus*, se colectaron dos, dos y tres especies para un total de 7,692 (5.3 %), 3,092 (2.2 %) y 614 (0.48 %) individuos, en su orden (Figura 14).

Una sola especie fue colectada en los géneros *Haemagogus*, *Psorophora*, *Limatus*, *Sabethes* y *Wyeomyia*, con un total en conjunto de 209 individuos, lo cual equivale a 0.2 % de la colecta. Por otro lado, *Aèdeomyia squamipennis*, especie monotípica de este género, ocupa el 2.7 %, con un total de 3,840 individuos colectados.

Las especies de mosquitos más abundantes fueron *Culex (melanoconion) erraticus*, *Culex (culex) nigripalpus* y *Culex (melanoconion) ocosa*, con un total de 13,741 (9.3 %), 21,840 (14.8 %) y 64,753 (44 %) individuos, respectivamente (Figura 15). Mientras que *Mansonia flaveola*, *Haemagogus sp.* y *Wyeomyia abebela* registraron las cantidades más bajas de individuos colectados.

Los meses de mayor colecta fueron octubre y noviembre con 41,393 (28.1%), y 39,168 (26.7 %), respectivamente, mientras que la menor cantidad de individuos se registró durante el mes de febrero, con 6,146 (4.2 %) (Cuadro 1).

Por otro lado, las trampas de luz CDC incandescentes colectaron 105,729 individuos en total, lo que equivale a 71.8 %, mientras que las trampas CDC de luz ultravioleta y CO<sub>2</sub> colectaron 30,828 (29.8 %) y 10,898 (7.3 %) individuos, respectivamente (Cuadro 2).

El área A (Laguna) presentó el mayor número de individuos colectados con 59,474 en total, equivalentes al 40.3 % (Cuadro 3). De igual manera, las estaciones de colecta con mayor número de individuos durante todo el estudio, fueron la 1-A, 2-A y 4-B con 60,367 (41 %) individuos en conjunto (Figura 2). En el área C (Aves), se registró la colecta más baja con 22,589 individuos (15.3 %). Igualmente, en las estaciones 11-D y 12-D se colectaron el menor número de mosquitos durante el trabajo, con un total en conjunto de 14,663 individuos correspondiente al 10.1 % colectado (Cuadro 4).

adro 1. Número de individuos de Culicidae colectados en trampas de luz CDC, cebadas con CO<sub>2</sub> y octanol, en Gamboa.

	2003										2004						Total
	Agosto		Septiembre		Octubre		Noviembre		Diciembre		Enero		Febrero		Marzo		
pecies de mosquitos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
<i>deomyia squamipennis</i>	141	123	146	160	193	242	363	276	190	208	136	351	426	278	387	220	3840
<i>opheles albimanus</i>	97	136	66	135	115	60	75	81	99	84	71	77	67	63	102	69	1397
<i>opheles punctimacula</i>	0	8	6	7	12	17	2	6	8	3	1	0	0	0	0	0	70
<i>opheles triannulatus</i>	43	62	59	50	79	54	72	86	80	56	76	77	95	87	78	91	1145
<i>lex c. coronator</i>	8	12	0	2	14	12	0	6	1	1	1	21	31	30	12	5	156
<i>lex c. declarator</i>	5	7	0	8	4	0	0	0	0	0	0	7	6	7	5	1	50
<i>lex c. nigripalpus</i>	144	507	604	2920	2460	4752	3710	3500	2309	518	258	45	32	25	11	45	21840
<i>lex c. quinquefasciatus</i>	44	40	42	54	91	74	30	24	26	24	18	34	48	24	10	27	610
<i>lex c. spp.</i>	18	13	9	38	67	75	100	38	30	0	0	0	0	0	0	0	388
<i>lex m. conspirator</i>	8	18	0	13	20	6	5	3	2	0	0	0	0	5	0	0	80
<i>lex m. erraticus</i>	221	383	432	1712	1928	2650	2041	2302	1245	429	138	113	30	18	44	55	13741
<i>lex m. ocosa</i>	505	979	1039	7122	6625	15519	8851	11192	9621	939	602	598	262	235	310	354	64753
<i>lex m. seteki</i>	5	22	6	30	15	28	17	19	11	0	3	0	0	0	0	0	156
<i>lex m. sp.</i>	161	311	297	757	614	1024	520	951	406	168	168	123	17	18	27	91	5653
<i>lex m. tacmarsii</i>	15	22	8	24	28	20	5	12	0	0	0	0	0	2	1	0	137
<i>lex m. taeniopus</i>	0	5	6	1	10	5	7	6	13	0	1	0	0	0	0	0	54
<i>quillettidia nigricans</i>	115	104	53	78	151	90	105	133	97	72	86	192	415	340	421	273	2725
<i>quillettidia venezuelensis</i>	30	20	12	36	25	18	11	21	33	6	8	30	11	20	38	15	334
<i>temagogus sp.</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0	6
<i>nathus durhami</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	5	3	6	0	19
<i>ansonina dyari</i>	99	88	104	50	98	118	106	120	148	96	98	286	508	476	681	406	3482
<i>ansonina flaveola</i>	0	0	0	0	1	0	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6
<i>ansonina indubitans</i>	95	76	117	59	71	134	98	101	132	5	92	53	181	60	94	28	1396
<i>ansonina pseudotitillans</i>	16	4	4	0	3	1	1	10	0	0	0	0	0	0	2	0	41
<i>ansonina titillans</i>	159	173	128	159	182	160	142	176	288	158	150	522	697	631	1547	515	5787
<i>chlerotatus angustivittatus</i>	11	6	16	21	14	4	7	11	12	5	4	0	0	0	0	0	111
<i>chlerotatus fulvus</i>	0	3	1	0	0	0	0	0	3	0	0	1	3	8	2	6	27
<i>chlerotatus serratus</i>	44	57	48	64	56	46	32	45	34	22	22	5	1	0	0	0	476
<i>orophora ciliata</i>	49	22	46	15	16	1	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	163
<i>ibethes cyaneus</i>	0	3	0	1	3	0	0	0	1	0	0	3	0	0	1	0	12
<i>anotaenia apicalis</i>	231	294	210	527	474	404	343	1433	968	526	424	128	114	74	109	172	6431
<i>anotaenia lowi</i>	49	67	40	111	97	62	59	385	237	69	54	3	5	3	9	11	1261
<i>yeomyia abebela</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	1	3	9
<i>achos</i>	561	494	285	1245	928	1520	718	880	655	314	1544	331	426	356	441	401	11099
Total	2876	4061	3784	15399	14394	27096	17429	21823	16653	3705	3956	3006	3382	2764	4339	2788	147455

Cuadro 2. Número de individuos colectados por tipo de trampa, en Gamboa, entre Agosto 2003 y Marzo 2004.

Especie de mosquitos	COD. sp.	CDC luz Incand.	CDC luz UV	CO <sub>2</sub> Arbovirosis	Total
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Ad.sq.	2706	745	389	3840
<i>Anopheles albimanus</i>	An.ab.	1051	201	145	1397
<i>Anopheles punctimacula</i>	An.pt.	55	15	0	70
<i>Anopheles triannulatus</i>	An.ts.	816	195	134	1145
<i>Culex c. coronator</i>	Cc.ct.	113	30	13	156
<i>Culex c. declarator</i>	Cc.dc.	39	8	3	50
<i>Culex c. nigripalpus</i>	Cc.ns.	15920	3851	2069	21840
<i>Culex c. quinquefasciatus</i>	Cc.qs.	468	87	55	610
<i>Culex c. spp.</i>	Cc.sp.	314	57	17	388
<i>Culex m. conspirator</i>	Cm.cp.	49	18	13	80
<i>Culex m. erraticus</i>	Cm.er.	9856	2622	1263	13741
<i>Culex m. ocosa</i>	Cm.os.	47783	13860	3110	64753
<i>Culex m. seteki</i>	Cm.sk.	98	41	17	156
<i>Culex m. sp.</i>	Cm.sp.	4067	1006	580	5653
<i>Culex m. tacmarsi</i>	Cm.tc.	103	15	19	137
<i>Culex m. taeniopus</i>	Cm.tp.	41	12	1	54
<i>Coquilletidia nigricans</i>	Co.ns.	1991	499	235	2725
<i>Coquilletidia venezuelensis</i>	Co.vz.	239	78	17	334
<i>Haemaphysalis sp.</i>	Hq.sp.	3	2	1	6
<i>Limathus durhami</i>	Li.dh.	17	2	0	19
<i>Mansonia dyari</i>	Ms.dy.	2433	702	347	3482
<i>Mansonia flaveola</i>	Ms.fv.	3	3	0	6
<i>Mansonia indubitans</i>	Ms.ib.	1027	276	93	1396
<i>Mansonia pseudotitillans</i>	Ms.pd.	22	10	9	41
<i>Mansonia titillans</i>	Ms.ts.	4011	1089	687	5787
<i>Ochlerotatus angustivittatus</i>	Oc.ag.	74	26	11	111
<i>Ochlerotatus fulvus</i>	Oc.fu.	23	1	3	27
<i>Ochlerotatus serratus</i>	Oc.sr.	374	63	39	476
<i>Psorophora ciliata</i>	Ps.cl.	133	10	20	163
<i>Sabethes cyaneus</i>	Sb.cy.	5	5	2	12
<i>Uranotaenia apicalis</i>	Ur.ap.	4434	1371	626	6431
<i>Uranotaenia lowi</i>	Ur.lw.	886	256	119	1261
<i>Wyeomyia abebela</i>	Wy.ab.	3	6	0	9
Machos	♂	6612	3706	781	11099
Total		105769	30868	10818	147455

Cuadro 3. Número de individuos colectados por área, en Gamboa, entre Agosto 2003 y Marzo 2004

		LAGUNA (A)	HOTEL (B)	AVES (C)	MUELLE (D)	Total
Especie de mosquitos	Cod. sp.	1A/2A/3A	4B/5B/6B/7B	8C/9C	10D/11D/12D	
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	<i>Ad.sq.</i>	1298	1124	718	700	3840
<i>Anopheles albimanus</i>	<i>An.ab.</i>	433	430	229	305	1397
<i>Anopheles punctimacula</i>	<i>An.pt.</i>	23	19	21	7	70
<i>Anopheles triannulatus</i>	<i>An.ts.</i>	388	349	201	207	1145
<i>Culex c. coronator</i>	<i>Cc.ct.</i>	19	31	37	69	156
<i>Culex c. declarator</i>	<i>Cc.dc.</i>	6	5	4	35	50
<i>Culex c. nigripalpus</i>	<i>Cc.ns.</i>	7326	6059	3915	4540	21840
<i>Culex c. quinquefasciatus</i>	<i>Cc.qs.</i>	140	156	109	205	610
<i>Culex c. spp.</i>	<i>Cc.sp.</i>	198	97	14	79	388
<i>Culex m. conspirator</i>	<i>Cm.cp.</i>	44	18	8	10	80
<i>Culex m. erraticus</i>	<i>Cm.er.</i>	4992	4275	2038	2436	13741
<i>Culex m. ocoosa</i>	<i>Cm.os.</i>	30490	18617	8121	7525	64753
<i>Culex m. seteki</i>	<i>Cm.sk.</i>	86	50	16	4	156
<i>Culex m. sp.</i>	<i>Cm.sp.</i>	1991	1676	938	1048	5653
<i>Culex m. tacmarsii</i>	<i>Cm.tc.</i>	75	54	7	1	137
<i>Culex m. taeniopus</i>	<i>Cm.tp.</i>	25	18	6	5	54
<i>Coquillettidia nigricans</i>	<i>Co.ns.</i>	916	733	494	582	2725
<i>Coquillettidia venezuelensis</i>	<i>Co.vz.</i>	117	85	61	71	334
<i>Haemagogus sp.</i>	<i>Hg.sp.</i>	2	2	2	0	6
<i>Limathus durhami</i>	<i>Li.dh.</i>	0	3	6	10	19
<i>Mansonia dyaari</i>	<i>Ms.dy.</i>	1063	954	616	849	3482
<i>Mansonia flaveola</i>	<i>Ms.fv.</i>	2	0	3	1	6
<i>Mansonia indubitans</i>	<i>Ms.ib.</i>	510	364	302	220	1396
<i>Mansonia pseudotitillans</i>	<i>Ms.pd.</i>	23	10	4	4	41
<i>Mansonia titillans</i>	<i>Ms.ts.</i>	1705	1777	1153	1152	5787
<i>Ochlerotatus angustivittatus</i>	<i>Oc.ag.</i>	32	22	29	28	111
<i>Ochlerotatus fulvus</i>	<i>Oc.fu.</i>	8	10	1	8	27
<i>Ochlerotatus serratus</i>	<i>Oc.sr.</i>	121	110	100	145	476
<i>Psorophora ciliata</i>	<i>Ps.cl.</i>	57	55	21	30	163
<i>Sabethes cyaneus</i>	<i>Sb.cy.</i>	6	2	4	0	12
<i>Uranotaenia apicalis</i>	<i>Ur.ap.</i>	2254	2019	981	1177	6431
<i>Uranotaenia lowi</i>	<i>Ur.lw.</i>	490	389	169	213	1261
<i>Wyeomyia abebela</i>	<i>Wy.ia.</i>	9	0	0	0	9
Machos	♂	4733	2431	2261	1674	11099
<b>Total</b>		<b>59582</b>	<b>41944</b>	<b>22589</b>	<b>23340</b>	<b>147455</b>

\* Áreas de Colecta (Figura 2 y 3)

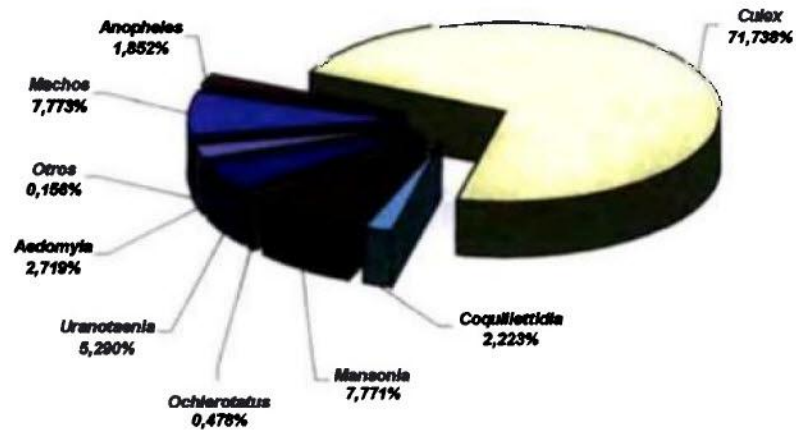


Figura 14. Porcentaje de individuos colectados por Géneros de CULICIDAE en Gamboa (Agosto 2003 - Marzo 2004)

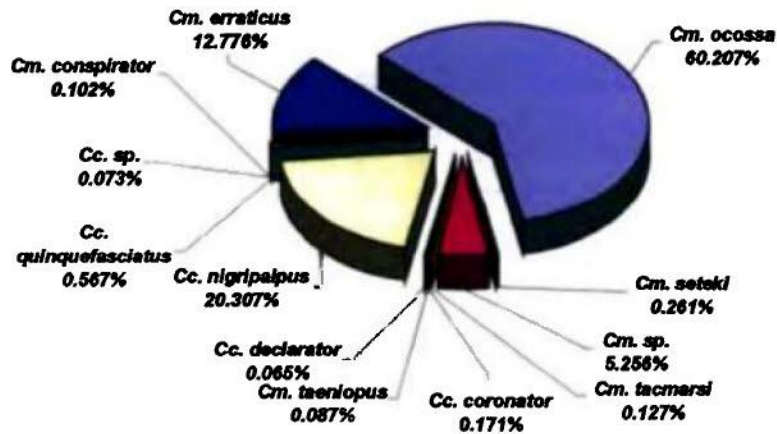


Figura 15. Porcentaje de individuos colectados por especie, Género Culex en Gamboa (Agosto 2003 - Marzo 2004)

## 2. Cría de *Culex melanoconion sp.* y *Anopheles albimanus*

Se colectaron en total 368 individuos en estados de larva y pupa, pertenecientes a ocho especies y seis géneros de la familia Culicidae en diversos sitios de cría presumibles para *Culex melanoconion sp.* en los alrededores de Gamboa (Cuadro 5). De los cuales emergieron 222 individuos para un 60.4 % de emergencia, de los cuales 78.0 % fueron hembras (♀). Las especies más abundantes en estado de larva fueron: *Anopheles triannulatus*, *Aedeomyia squamipennis* y *Culex melanoconion sp.* con 100 (27.2 %), 80 (21.7 %), y 93 (25.7 %) individuos, respectivamente. Mientras que, *Uranotaenia apicalis* y *Mansonia titillans* sólo se colectaron esporádicamente. Por otro lado, la mayor cantidad de individuos se registró en la estación seca durante marzo de 2004 con un total de 171 (46.5%) individuos.

La mayor colecta de larvas y pupas se registró en sitios de cría permanentes asociados con plantas acuáticas como *Pistia stratiotes*, con un total de 6 especies y 276 (75 %) individuos, mientras en sitios de cría semipermanentes se colectaron sólo tres especies y 92 (25 %) individuos en total. Es importante recordar que los especímenes emergidos (sólo las hembras) de *Culex melanoconion sp.* fueron la fuente de ADN de vectores libre de esporozoarios del género *Plasmodium* utilizados para el control negativo de la prueba de PCR y eran inmediatamente congelados hasta el protocolo de extracción de DNA. Mientras que los individuos de *Anopheles albimanus* requeridos para el control negativo eran suministrados por la cepa patrón que posee el Instituto Gorgas para Estudios de la Salud.

Cuadro 5. Estados inmaduros de especies de mosquitos (Culicidae), colectados con cucharón o Dipper, en Gamboa (2003 - 2004).									
Especie (larvas y pupas)	Noviembre		Diciembre		Febrero		Marzo		Total
	PER	SEM	PER	SEM	PER	SEM	PER	SEM	
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	25	0	15	0	20	0	20	0	80
<i>Anopheles triannulatus</i>	11	0	22	0	45	0	22	0	100
<i>Culex m. sp.</i>	40	7	23	5	13	1	4	0	93
<i>Coquillettidia nigricans</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Mansonia indubitans</i>	15	0	12	0	3	0	14	0	44
<i>Mansonia titillans</i>	0	0	4	0	17	0	15	0	36
<i>Uranotaenia apicalis</i>	5	0	4	0	1	0	1	0	11
<i>Uranotaenia lowi</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	2
Total	53	13	59	10	62	0	171	0	368
PER / Criadero permanente	Maleza acuática ( <i>Pistia stratiotes</i> ) / siempre con agua								
SEM / Criadero semipermanente	Charcos y pequeños riachuelos / secos en verano								

### 3. Extracción del ADN de Culicidae colectados en el campo

El método de extracción fue evaluado sometiendo el ADN extraído a una electroforesis en gel de agarosa para visualizar la presencia del ADN en las muestras de Culicidae. Para tal propósito se tomaban de manera aleatoria 10 muestras en cada ronda de PCR, las cuales eran sometidas a la electroforesis, observando en todas las muestras analizadas la presencia de bandas de ADN (Figura 16). Por otro lado, también se realizó una prueba de PCR utilizando iniciadores o primers para la amplificación parcial del citocromo *b* de los miembros del Orden Diptera. De igual forma las muestras sometidas a este protocolo de amplificación eran seleccionadas aleatoriamente en cada ronda de PCR. Una vez finalizadas las reacciones de PCR las muestras eran sometidas a la electroforesis en gel de agarosa, observándose en todas las muestras analizadas la presencia de una banda de ADN equivalente a 460 pares de bases (pb) (Figura 17). De esta forma se pudo corroborar la eficacia del método de extracción en este trabajo.



Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa, 1 – 14 muestras de especies de Culicidae (ver cuadro 6, orden descendente).

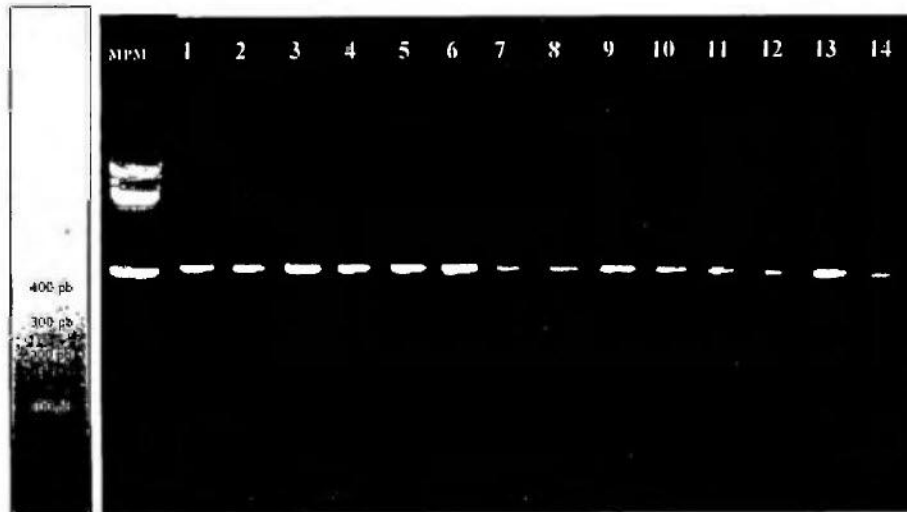


Figura 17. Evaluación del método de extracción de ADN de Culicidae mediante prueba de PCR, para amplificar el ADN del insecto, (MPM - marcador de peso molecular), 1 – 14 muestras de especies de Culicidae (ver cuadro 6, orden descendente).

#### 4. Amplificación del ADN de *Plasmodium sp.* en muestras de Culicidae

De las 31 especies de mosquitos (Culicidae) colectados entre agosto del 2003 y marzo del 2004 en Gamboa, sólo 14 fueron escogidas para la amplificación del ADN de *Plasmodium sp.*, mismas que correspondían a las más numerosas y constantes durante todo el estudio. 409 grupos o "pools" de trabajo correspondientes a 8,920 individuos fueron sometidos a la prueba de PCR para amplificar el citocromo b de *Plasmodium sp.* (Cuadro 6). La cantidad de grupos por especie fue seleccionada en base a la colecta recabada durante la correspondiente salida de campo. Solo dos especies de mosquitos mostraron bandas de ADN similares a las que amplifican los iniciadores o primers utilizados en la prueba de PCR para parásitos de género *Plasmodium*.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de PCR para *Plasmodium sp.*, en especies de mosquitos (Culicidae) colectados en, Gamboa.

Grupos / Mes / Positivos / Totales / Porcentaje														
Especie	OCT (+)	NOV (+)	DIC (+)	FEB (+)	MAR (+)	Grupos	Individuos	Total (+)	%					
<b>Ad.sq.</b>	8	0	14	5	9	3	4	1	5	1	40	800	10	25
An.ab.	5	0	2	0	1	0	2	0	2	0	12	240	0	0
An.ts.	2	0	0	0	1	0	1	0	3	0	7*	140	0	0
Cc.nx.	19	0	20	0	21	0	6	0	0	0	66	1320	0	0
Cm.err.	8	0	21	1	22	0	0	0	0	0	51	1020	0	0
<b>Cm.oss.</b>	26	4	12	2	12	0	15	1	2	1	67	1340	8	12
Co.ng.	8	0	8	0	3	0	2	0	11	0	32	640	0	0
Co.vz.	1	0	1	0	0	0	2	0	0	0	4*	80	0	0
M.dy.	0	0	5	0	5	0	25	0	15	0	50	1000	0	0
M.ib.	3	0	2	0	1	0	5	0	4	0	15*	300	0	0
M.ps.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1*	20	0	0
M.ts.	3	0	7	0	3	0	23	0	20	0	56	1120	0	0
U.ap.	6	0	20	0	3	0	3	0	2	0	34	680	0	0
U.lw.	4	0	6	0	1	0	0	0	0	0	11*	220	0	0
<b>Total</b>	86	4	115	8	77	3	68	2	44	2	409	8920	18	4.4

\* Especies de Culicidae con menos de 20 grupos sometidos a la prueba de PCR

*Culex melanoconion ocosa* (Cm.oss) y *Aedeomyia squamipennis* (Ad.sq) resultaron positivos para la amplificación del citocromo *b* de los parásitos causantes de malaria en aves del género *Plasmodium*, mostrando bandas de ADN de aproximadamente 380 pares de bases (pb) (Figura 18). La especie con mayor número de grupos positivos fue *Aedeomyia squamipennis*, seguida por *Culex melanoconion ocosa*. Ninguna de las 12 especies restantes obtuvo resultados positivos en la PCR - *Plasmodium*. La especie *Aedeomyia squamipennis* resultó positivo en 10 de 40 grupos de trabajo para un 25.0 % y 800 individuos en total. Mientras que *Culex melanoconion ocosa* obtuvo 8 positivos en 67 grupos para un 12.0 % y 1,340 individuos en total.



Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa para PCR - *Plasmodium* sp. Especificidad de la reacción de PCR con los iniciadores HAMF y HAEMR2. (MPM; marcador de peso molecular, 1. *Aedeomyia squamipennis* 2. *Culex ocosa* 3. Control positivo 4. *Culex nigripalpus* 5. *Uranotaenia apicalis* 6. *Mansonia titillans* 7. *Anopheles triannulatus* 8. Control negativo.

## 5. Identificación de los productos de PCR

De todos los grupos de mosquitos que resultaron positivos en la prueba de PCR (18 en total) y que fueron posteriormente secuenciados se obtuvieron nueve secuencias diferentes de parásitos del género *Plasmodium*, cuatro de éstas han sido previamente reportadas para Gamboa. Sin embargo, cinco de las secuencias identificadas podrían corresponder a nuevos reportes para el área o a posibles nuevas especies dentro del género *Plasmodium*. En total, seis de las nueve secuencias encontradas fueron aisladas exclusivamente de *Aedeomyia squamipennis*, mientras las tres restantes se aislaron de *Culex melanoconion ocosa* (Figura 19 y 20).

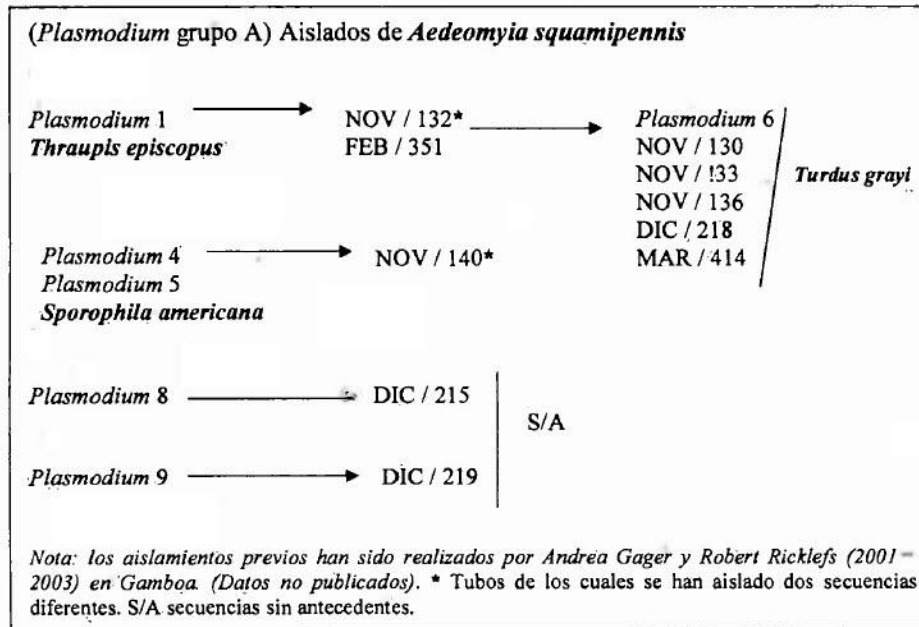


Figura 19. Secuencias de *Plasmodium* (Grupo A) aisladas de *Aedeomyia squamipennis* mediante la prueba de PCR, se incluye el mes de colecta del aislamiento, número de muestra y la especie de ave de la cual se aislaron anteriormente.

<i>(Plasmodium</i> grupo B) Aislados de <i>Culex melanoconion ocosa</i>		
<i>Plasmodium</i> 2	→ SEP / Previa OCT / 71 OCT / 76 NOV / 108 NOV / 124	S/A
<i>Plasmodium</i> 3	→ OCT / 83	→ <i>Turdus grayi</i>
<i>Plasmodium</i> 7	→ FEB / 330 MAR / 390	S/A

*Nota: los aislamientos previos han sido realizados por Andrea Gager y Robert Ricklefs (2001– 2003) en Gamboa. (Datos no publicados). S/A secuencias sin antecedentes.*

Figura 20. Secuencias de *Plasmodium* (Grupo B) aisladas de *Culex melanoconion ocosa* mediante la prueba de PCR, se incluye el mes de colecta del aislamiento, el número de muestra y la especie de ave de la cual se aislaron anteriormente.

La secuencia *Plasmodium* 6 fue aislada en seis ocasiones de *Aedeomyia squamipennis*. Igualmente *Plasmodium* 2 se aisló en cinco ocasiones de *Culex melanoconion ocosa*. Por otro lado, *Plasmodium* 4, 5, 8, 9 y 3 se aislaron sólo una vez de *Aedeomyia squamipennis* y *Culex melanoconion ocosa*, respectivamente. Finalmente ambas secuencias correspondientes a *Plasmodium* 1 y *Plasmodium* 7 fueron aisladas en dos ocasiones de *Aedeomyia squamipennis* y *Culex melanoconion ocosa*, en su orden.

La especie *Culex melanoconion ocosa* fue positiva durante casi todos los meses en que se realizó la prueba de PCR, con excepción de diciembre. De igual forma lo fue *Aedeomyia squamipennis* excluyendo el mes de octubre (Cuadro 6).

## 6. Fluctuación poblacional de *Aedeomyia squamipennis* y *Culex ocosa*

Las dos especies de mosquitos que resultaron positivas en la prueba de PCR fueron constantes en las colectas durante todo el estudio. La especie, *Aedeomyia squamipennis* se colectó en todos los meses, al igual que *Culex melanoconion ocosa*. Igualmente *Aedeomyia squamipennis* mantuvo un comportamiento más estable, con un notable descenso durante el período de transición entre invierno y verano, en el mes de diciembre, y un leve incremento durante la estación seca, entre febrero y marzo del 2004 (Figura 21). Mientras que *Culex m. ocosa* fue mucho más abundantes, mostrando un abrupto incremento durante la última fase de la estación lluviosa, entre septiembre y diciembre del 2003, para luego disminuir considerablemente durante la estación seca del 2004 (Figura 22).

Los datos de colecta quincenal para ambas especies fueron correlacionados con datos de precipitación pluvial acumulada quincenal suministrados por la estación meteorológica de la ACP en Gamboa, por medio del Software Statistica. La especie *Aedeomyia squamipennis* no mostró relación lineal alguna con la precipitación. Sin embargo *Culex melanoconion ocosa* sí mostró una fuerte relación lineal positiva con la lluvia (coef reg. 0.6,  $P = < 0.05$ ). El coeficiente de determinación en este análisis fue de 0.45, lo que indica que la lluvia explica un 45% de esta asociación, atribuyéndose el resto de la variación a factores no tomados en cuenta en este trabajo.

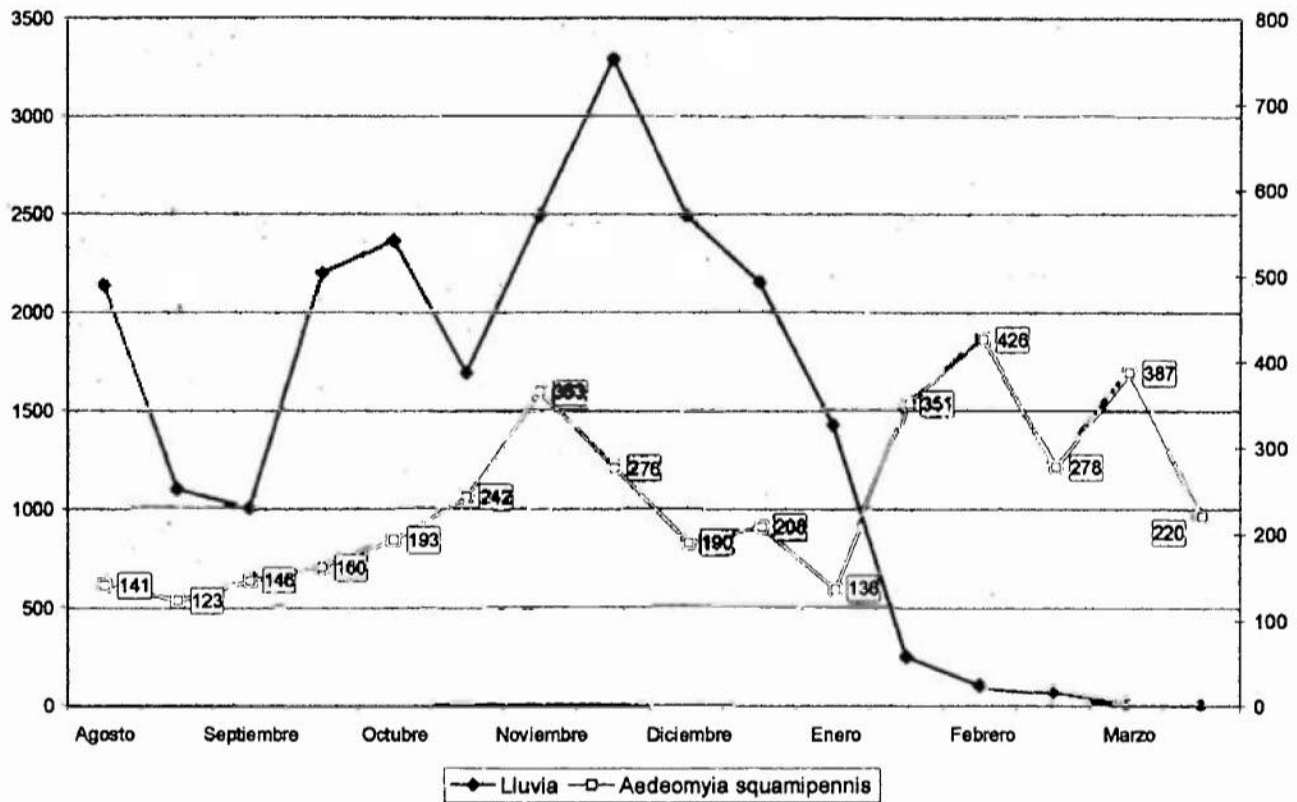


Figura 21. Fluctuación poblacional de *Aedeomyia squamipennis* en relación a la precipitación pluvial acumulada en Gamboa, Panamá.

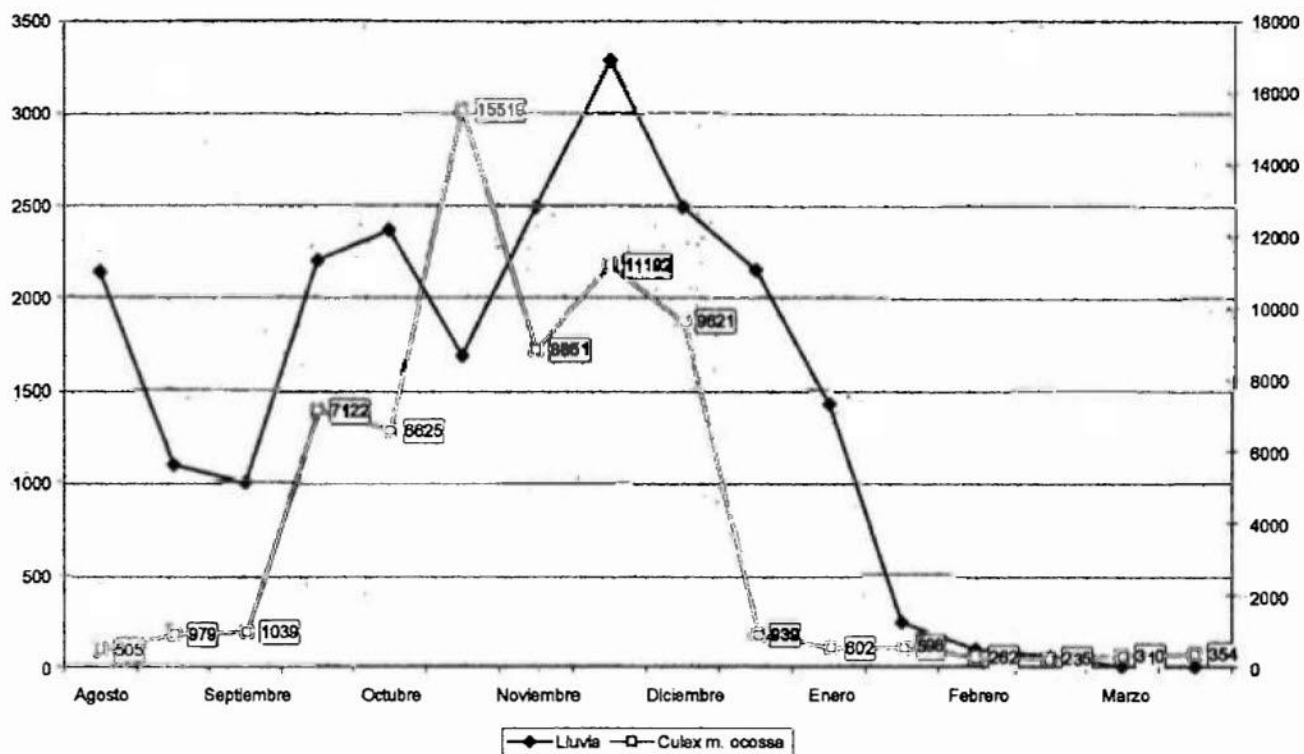


Figura 21. Fluctuación poblacional de *Culex ocosa* en relación a la precipitación pluvial acumulada en Gamboa, Panamá.

# **Capítulo V**

## **Discusión**

Uno de los mayores obstáculos que encuentran los entomólogos, epidemiólogos e investigadores de la malaria es la determinación de las especies transmisoras en un área endémica. Por lo tanto, al encontrar mosquitos naturalmente infectados con el patógeno e identificar la especie del parásito, sumado a otros datos de interés epidemiológico, como el índice de infección en la población del insecto, la fluctuación poblacional y sus sitios de cría, es posible comprender mejor la dinámica de la transmisión. Además de esto, al descifrar el tiempo y lugar en donde existe la mayor probabilidad de que ocurra el evento biológico estudiado (la transmisión del esporozoario por la picada del mosquito infectado a un ave u hospedero susceptible), podemos definir el riesgo de adquirir la enfermedad en un área determinada.

Gogolin *et al.* (1986) puntualizaron la escasez de trabajos que se han realizado para esclarecer la epizootiología de la malaria en aves, principalmente, en lo que respecta a la dinámica de transmisión. Por otro lado, muchas han sido las especies de mosquitos incriminadas como posibles transmisores de malaria en aves. Al respecto Lourenco y Alves de Castro (1991); Meyer *et al.* (1975); Huff (1965) y Nayar *et al.* (1981) señalan la participación de al menos 22 especies de mosquitos como vectores de esta enfermedad. Sin embargo, tales afirmaciones son producto de trabajos de susceptibilidad realizados en el laboratorio, aislándose muy pocos parásitos de mosquitos colectados en el campo.

La alta sensibilidad de la prueba de PCR para el diagnóstico de *Plasmodium sp.*, que infectan aves, ha sido ampliamente demostrada (Jarvi *et al.*, 2001; Fallon *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2002).

Consecuentemente muchas secuencias de parásitos del género *Plasmodium* presentes en diversas especies de aves son bien conocidas en la actualidad. Sin embargo, pocos estudios han intentado aplicar la técnica de PCR para conocer los vectores de éstas secuencias en la naturaleza. La implementación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección e identificación de parásitos causantes de malaria aviar en sus vectores no tiene antecedente en Panamá.

En Gamboa, un área de interés científico, cultural e histórico y ecoturístico, se amplificó el ADN de *Plasmodium sp.*, en 18 de 409 grupos sometidos a la prueba de PCR en total. Esto valida la técnica de PCR para amplificar el ADN de *Plasmodium sp.*, sobre mosquitos colectados en campo.

Durante la aplicación de la técnica pudimos comprobar la especificidad de los iniciadores (primers) que reporta (Bensch *et al.*, 2000) utilizados para amplificar el citocromo *b* de los parásitos del género *Plasmodium sp.* al no encontrar falsos positivos en los grupos de amplificación, encontrándose nueve secuencias diferentes, todas pertenecientes al género *Plasmodium*. Esto es muy importante, ya que al encontrar mosquitos infectados con el parásito en su ambiente natural, estamos incriminando por primera vez en nuestro país a dos especies de mosquitos como posibles transmisores de malaria en aves.

Los resultados obtenidos en Gamboa son muy representativos de la zona, ya que Gager (comunicación personal, 2003) utilizando la técnica de PCR, con el mismo par de iniciadores, había aislado previamente cuatro de las secuencias encontradas en mosquitos durante nuestro trabajo de la sangre de *Turdus grayi*,

*Thraupis episcopus* y *Sporophila americana*. Sin embargo, las otras cinco secuencias encontradas en nuestro estudio, no han sido aisladas anteriormente en la zona y creemos que pueden ser especies no reportadas o posibles nuevas especies dentro del grupo.

A pesar del considerable número de especies y grupos sometidos a la prueba de PCR, sólo dos resultaron positivas para el ADN de *Plasmodium sp.* (Cuadro 6). Esto, debido a los diferentes grados de asociación que muestran las especies de Culicidae con sus hospederos (fuentes de sangre), así como por su comportamiento alimenticio, además de su susceptibilidad al parásito.

En este trabajo se aislaron seis secuencias diferentes de *Plasmodium* de *Aedeomyia squamipennis* obteniéndose el mayor número de grupos positivos en 10 de 40 veces, para un 25 %. La participación de mosquitos del género *Aedeomyia* como posibles transmisores de malaria en aves ha sido anteriormente reportada. Al respecto Crewe (1976) encontró a *Aedeomyia africana* y *Aedeomyia fufurea* portando oocistos y esporozoitos de *Plasmodium vaughani* y *P. Circumflexum*, luego de alimentarse en trampas cebadas con *Streptopelia senegalensis* previamente infectadas con éstos parásitos. Esta autora, recalcó igualmente la marcada preferencia de ambas especies de mosquitos por la sangre de aves en comparación a otros hospederos.

Por otro lado, Calisher *et al.* (1981) señalan la importancia de *Aedeomyia squamipennis* en la transmisión horizontal y posterior amplificación del virus Gamboa en las aves, luego de aislar 24 variantes de éste virus en mosquitos colectados en Argentina, Ecuador y Panamá. Es obvio que, el hábito alimenticio estrictamente

ornitofílico de *Aedeomyia squamipennis*, le permite transmitir diversos patógenos a las poblaciones de aves en áreas donde se cría permanentemente. Esto ha sido confirmado por Christensen *et al.* (1996), quienes señalan que *Aedeomyia squamipennis* colectada en Juan Mina, Panamá, en trampas sin cebo se alimentó en un 86.6 % de aves; 7.3 % en reptiles - anfibios y sólo 6.1 % en mamíferos. Este investigador realizó su estudio en un área muy cercana a la nuestra, lo que apoya de manera sustancial los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Aunque es prematuro considerar a *Aedeomyia squamipennis* como vector de malaria aviar, está claro que esta especie ya cumple con los tres requisitos más importantes para ser considerada como especie transmisora de *Plasmodium*.

De todas las secuencias de *Plasmodium* (Grupo A) aisladas de *Aedeomyia squamipennis*, *Plasmodium* 6 fue la más frecuente, con seis aislamientos, cuatro de ellos en noviembre, uno en diciembre y otro en marzo. Es posible que la transmisión de ésta especie de parásito sea mayor durante la estación lluviosa, debido a un aumento en el contacto ave susceptible – mosquito infectado, dada la regularidad de ésta especie de mosquito. De manera similar, *Plasmodium* 8 y 9 se aislaron una sola vez en el mes de diciembre, al igual que *Plasmodium* 1, 4 y 5 en noviembre (Figura 19).

Aunque pareciera que existe un mayor número, tanto de aislamiento como de secuencias de *Plasmodium* en *Aedeomyia squamipennis* durante la estación lluviosa, es posible que esto se deba, a una menor cantidad de grupos analizados para esta especie mediante la prueba de PCR durante la estación seca (Cuadro 6). Es posible que la transmisión de *Plasmodium* sea mayor en un determinado período de tiempo.

Ricklefs (comunicación personal - 2004) indica que la transmisión puede elevarse (epizootia) durante el anidamiento de las aves, período en donde los adultos protegen los nidos de depredadores, permaneciendo ligados día y noche a las crías, mientras que los pichones son totalmente vulnerables a la picada de los mosquitos.

Tres de las secuencias aisladas de *Aedeomyia squamipennis*, *Plasmodium* 1, 5 y 6 han sido aisladas previamente de *Turdus grayi*, *Thraupis episcopus* y *Sporophila americana* respectivamente Gager (comunicación personal - 2004) (Figura 19). En este momento, sólo podemos decir, que éstos parásitos causantes de parasitemia en estas tres especies de aves, circulan en la sangre ingerida por ésta especie de mosquito, por lo cual es posible que *Aedeomyia squamipennis* se alimente de éstas tres especies de aves en Gamboa.

Es importante aclarar que la detección del ADN de *Plasmodium* en una especie de mosquito mediante la prueba de PCR no garantiza su papel como vector de malaria. Debido a que esta prueba no distingue la presencia de las diversas etapas del parásito en el insecto. De tal forma que la prueba de PCR detectará el *Plasmodium* en las etapas de gametocitos, cigoto, oocineto, oocisto y esporozoitos, sin que el insecto necesariamente soporte el desarrollo del ciclo completo. De aquí la importancia del seguimiento y corroboración de los resultados obtenidos en este trabajo, mediante estudios de capacidad vectorial a realizarse en el laboratorio para *Aedeomyia squamipennis*.

Lo anterior podría explicar la escasa prevalencia de las secuencias de *Plasmodium* (4, 5, 8, 9) y (3) aisladas una sola vez en *Aedeomyia squamipennis* y *Culex m. ocosa* respectivamente (Figura 19 y 20). Es posible que los parásitos estuvieran presente en el insecto debido a una ingesta de sangre incompleta, sólo durante las primeras etapas de desarrollo, sin poder completar el ciclo en el insecto. De igual forma algunos parásitos atacan un amplio rango de hospederos; mientras que otros son muy específicos.

En algunas especies de mosquito la tasa de infección de malaria es más baja, ya sea por su comportamiento oportunístico de alimentación, al alimentarse de un amplio rango de hospederos silvestres, diluyendo así en la naturaleza su capacidad para transmitir las especies de *Plasmodium* que infectan aves. Esto podría explicar el menor número de secuencias y grupos positivos obtenidos de *Culex m. ocosa* en nuestro estudio.

Tres secuencias de *Plasmodium* fueron aisladas de *Culex m. ocosa* en este trabajo. Al respecto, *Culex m. ocosa* antes *aekenii*, ha sido incriminado como transmisor del virus de la encefalitis equina venezolana en Panamá (EEV) y en otras regiones de Centro y Sur América. Esta enfermedad supone la participación de algunas especies de aves en la amplificación del virus durante su ciclo silvestre (Galindo y Grayson, 1971).

Según Tempelis y Galindo (1975), *Culex m. ocosa* se alimenta tanto de aves como de mamíferos y en ocasiones de animales de sangre fría. Por otro lado, Christensen *et al.* (1996) en trabajos realizados en las riberas del río Chagres, en

Panamá, señalan que *Culex m. ocosa* obtiene sangre de una gran variedad de animales, entre ellos: aves, anfibios y reptiles. Ésta claro que esta especie posee un amplio rango de hospederos, lo que explica en cierto grado, la menor cantidad de secuencias de *Plasmodium* aisladas en ella, en comparación de *Aedeomyia squamipennis*.

De las tres secuencias de *Plasmodium* (Grupo B) aisladas en *Culex ocosa*, *Plasmodium 2* fue la más constante, con cinco aislamientos, todos en la época lluviosa; mientras que *Plasmodium 3*, se aisló sólo una vez en el mes de octubre. Esta última especie fue anteriormente aislada de la sangre de *Turdus grayi* Gager (comunicación personal - 2004). Por otro lado, *Plasmodium 7* fue aislada en dos ocasiones durante la estación seca. Es posible que la aparición de *Plasmodium 7* exclusivamente en época seca, se deba a que el vector se alimente en varias especies de aves, participando así en varias cadenas de transmisión que se atenúan cuando la asociación se diluye en el tiempo (Figura 20).

Condit *et al.* (2002) señalan que la mayor cantidad de especies de aves encontradas en la cuenca del canal ocurren en las tierras bajas del río Chagres y en el Parque Nacional Soberanía, debido a la diversidad de biotopos y a la convergencia entre los bosques secundarios, primarios y otros ecosistemas. Estos mismos autores indican que durante el verano las aves del sector pacífico migran hacia el atlántico debido a la escasez de insectos, mientras que las del atlántico hacen lo contrario debido al período de floración y formación de frutos que se da en el sector pacífico.

En este sentido, las aves que llegan a Gamboa durante la época seca podrían introducir especies de *Plasmodium* no habituales en la zona y cuya transmisión ocurrirá sólo en el período, en donde aves infectadas y mosquitos compartan el mismo hábitat.

En ambas especies de mosquitos la prevalencia de *Plasmodium* es baja, 25% y 12% para *Aedeomyia squamipennis* y *Culex m. ocosa*, respectivamente. Esto es aún más notable al analizar por separado, la prevalencia de cada una de las secuencias encontradas. Antes esto era atribuido a las deficiencias técnicas que conllevaban el examinar un gran número de mosquitos en busca de esporozoitos y oocistos en un microscopio compuesto de luz. Sin embargo, la técnica empleada en este trabajo suponía una mayor prevalencia de parásitos en los insectos, debido a su alta especificidad y sensibilidad.

Es posible que sólo una pequeña porción de la población de los vectores participe activamente en la transmisión. También es posible que el método de colecta empleado en nuestro trabajo subestime la verdadera prevalencia de *Plasmodium* en sus vectores. Esto debido a que muchas de las hembras colectadas en las trampas de luz podrían estar en su primera ingesta de sangre, y consecuentemente libres de todo esporozoario. Igualmente, nosotros creemos que nuestra muestra para PCR no es representativa de la población total de hembras que vuelan en búsqueda de sangre en una noche en Gamboa.

El poder de emergencia de Gamboa es enorme, esto es demostrado en nuestras colectas. Por ejemplo un promedio de 700 hembras por trampa para el mes de octubre. De aquí que la baja prevalencia de *Plasmodium* en mosquitos es atribuible al escaso número de insectos analizados para PCR respecto de la población total de hembras.

Las dos especies de mosquitos que resultaron positivo para el ADN de *Plasmodium* realizan su actividad de picada en horas crepusculares y nocturnas, período en el que la gran mayoría de las aves dormitan en sus nichos, exponiéndose así a la picada de los mosquitos Ricklefs (comunicación personal - 2004). En este punto, la selección de los sitios de reposo, el grado de hacinamiento y los mecanismos de defensa del ave, juegan un rol importante en el riesgo de infección: En este sentido *Turdus grayi*, *Thraupis episcopus* y *Sporophila americana* pertenecen al Orden Passeriforme, muchas de éstas especies descansan desde muy temprano e inician su actividad muy de mañana, coincidiendo en gran parte con el período de actividad de los mosquitos.

Sería prematuro descartar a *Culex c. nigripalpus* y *Culex m. erraticus* como vectores de malaria aviar, dada la abundancia y representatividad de éstas especies en el área de estudio, aún cuando no se halla aislado el ADN de *Plasmodium* en 66 y 51 grupos respectivamente. Está bien documentado que *Culex m. erraticus* se alimenta principalmente en anfibios y reptiles (Christensen *et al.*, 1996). En tanto que *Culex c. nigripalpus* varía mucho su comportamiento hematófago de acuerdo a la disponibilidad de hospederos y la época del año (Edman, 1974). Es posible también que la tasa de infección en *Culex nigripalpus* sea muy baja o que su hábito de picada extremadamente oportunístico contribuya a diluir su asociación con las aves.

Al respecto, Nayar *et al.* (1982) documentaron la transmisión de *Plasmodium hermani* por *Culex nigripalpus*, de patos a aves silvestres y viceversa, asumiendo la posible participación de reservorios silvestres para esta especie de parásito. Igualmente, Edman y Taylor (1968) confirman la participación de *Culex nigripalpus* como vector del virus del Nilo Occidental, señalando el importante papel que desempeñan algunas especies de aves en el ciclo de esta enfermedad.

Es importante resaltar que cada especie de mosquito portaba un grupo de secuencias exclusivas, esto reafirma la naturaleza obligatoria y específica de la asociación parásito – hospedero principal. Por otro lado, aunque en este momento no podemos decir nada definitivo respecto a la transmisión de los *Plasmodium* aislados en este trabajo, la mayor frecuencia de aislamiento obtenidos por *Plasmodium 6* y *Plasmodium 2* en *Aedeomyia squamipennis* y *Culex ocosa*, respectivamente, supone un mayor contacto entre las aves y los mosquitos que forman parte del ciclo de vida de éstas especies de *Plasmodium*, en el área de nuestro estudio.

Aunque en la actualidad se consideré a los mosquitos del género *Culex* como los principales vectores de malaria en aves a nivel mundial, es posible que *Aedeomyia squamipennis* sea un vector más eficaz en áreas donde se críe abundantemente, dado su preferencia por la sangre de aves.

Los datos sobre las especies *Anopheles albimanus*, *Anopheles triannulatus*, *Uranotaenia lowi*, *Mansonia pseudotitillans*, *Mansonia indubitans* y *Coquillettidia venezuelensis* no deben ser tomados como representativos, debido a la poca cantidad de grupos para PCR (menos de 20) analizados respecto a las otras especies.

Es necesario aclarar que existe material de estas especies debidamente conservado en el laboratorio. Sin embargo, por razones de tiempo estos grupos no fueron sometidos a la prueba de PCR y han sido pospuesto para realizarse en los próximos meses.

Wolda y Galindo (1981) señalan que las poblaciones de mosquitos fluctúan de acuerdo a los patrones de precipitación que se presentan en un área determinada. De aquí que en zonas donde el régimen de lluvias es marcadamente estacional, las poblaciones de mosquitos varían de acuerdo a la disposición de los sitios de cría (agua de lluvia estancada). Sin embargo, en áreas donde los sitios de cría son constantes y permanentes, existe muy poca estacionalidad.

A pesar de que Gamboa se encuentra en la vertiente del pacífico, en donde existe una regular estacionalidad en el clima con una marcada estación seca durante los primeros meses del año y una estación lluviosa durante los restantes nueve meses, los sitios de cría abundan en el área y se encuentran disponibles durante todo el año. Las particularidades geográficas de Gamboa, donde convergen el río Chagres y el Canal de Panamá, han permitido a través de los años el establecimiento de un gran número y diversidad de especies de mosquitos, asociadas con la gran variedad de biotopos que se encuentran en el área y principalmente al sistema hidrológico que brinda constante suministro de agua dulce al canal.

Por lo tanto, no es extraño que la gran mayoría de las especies de culicidos colectadas en este trabajo, hayan sido previamente asociadas a plantas acuáticas que se desarrollan en los márgenes del río Chagres. Al respecto *Pistia stratiotes*, *Jussiaea*

*natans*, *Salvinia rotundifolia*, *Eichornia crassipes*, *Ludwigia helminorrhiza*, y *Heteranthera reniforme*, todas bien representadas en Gamboa, han sido reportadas como sitios potenciales de cría para larvas de mosquitos en Panamá (Galindo y Adames, 1973; Aguila *et al.*, 1987). La preferencia de cada especie de mosquito por las especies de malezas acuáticas no son muy claras. Es obvio que la fluctuación poblacional de los mosquitos en Gamboa, dependerá de la relación entre el hábito de oviposición, la especificidad por una especie de maleza acuática en particular y consecuentemente por la fenología de la planta.

Dunn (1934) describe la dependencia de las larvas de mosquitos de los géneros *Mansonia* y *Coquillettidia* por la lechuga de agua *Pistia stratiotes*, cuyas poblaciones brindan alojamiento, protección y oxígeno. Este último tomado directamente del aerenquima de las raíces por una adaptación en el sifón respiratorio de las larvas, que penetra la raíz y absorbe el oxígeno directamente de la planta.

Otras especies de Culicidae han sido también asociadas constantemente a plantas acuáticas en diversas áreas de Panamá. Entre ellas: *Anopheles albimanus*, *Aedeomyia squamipennis*, *Anopheles triannulatus*, *Uranotaenia apicalis*, *Culex melanoconion erraticus*, *Culex nigripalpus* y *Culex melanoconion ocosa* (Galindo, 1972; Aguila *et al.*, 1987). Sin embargo, las larvas de éstas y otras especies no toman oxígeno directamente de la planta, sino que utilizan el hábitat que está inmediatamente debajo de ésta para tomar refugio, alimento y protección de sus depredadores, siendo esta asociación inespecífica y menos estrecha.

En este sentido, *Aedeomyia squamipennis* ha sido asociada en innumerables ocasiones a diversas especies de malezas acuáticas. Entre ellas: *Jussiaea natans*, *Salvinia rotundifolia*, *Pistia stratiotes*, *Ludwigia helminthorhiza* (Aguila *et al.*, 1987). Esta especie no mostró ninguna relación lineal con los datos de precipitación pluvial acumulada, para el área de estudio.

Esta claro que las variaciones poblacionales de *Aedeomyia squamipennis*, no son afectadas directamente por los sitios de cría semipermanentes que se forman con la lluvia, pero si por la influencia que pueda tener ésta sobre las comunidades de plantas acuáticas que se desarrollan en Gamboa. Nosotros consideramos que *Aedeomyia squamipennis* está presente en Gamboa durante todo el año con un comportamiento bastante regular tanto en época seca como lluviosa. Y que los descensos obtenidos por esta especie durante los muestreos de diciembre y enero, se deben a factores ambientales que influyeron sobre la trampa, el día de la colecta (Figura 21).

Galindo (1972) en estudios realizados en Gamboa indica que las larvas y pupas de *Culex m. aikenii* y otras especies de *Culex* son marcadamente dependientes de *Pistia stratiotes*. De aquí que los picos poblacionales de esta especie están relacionados con los periodos en donde la planta es más abundante. El mismo autor señala que *Pistia stratiotes* es una planta flotante que requiere de gran cantidad de luz solar y aguas de curso lento, con abundante materia orgánica en suspensión, condiciones que se registran durante el verano.

Esto explica claramente el incremento poblacional de las especies del género *Coquillettidia* y *Mansonia* en nuestro trabajo, durante enero, febrero y marzo. Sin embargo, no explica el incremento poblacional de *Culex m. ocosa* obtenido en nuestro estudio durante la estación lluviosa (Figura 22).

En este trabajo *Culex m. ocosa* mostró un notable incremento poblacional durante la época lluviosa, en donde las nubes disminuyen la cantidad de luz incidente diaria y las copiosas precipitaciones generan fuertes corrientes que lixivian el río Chagres, dispersando las semillas y desfavoreciendo el desarrollo continuo de las poblaciones de *Pistia stratiotes* de Gamboa. Por otro lado, las variaciones poblacionales de esta especie en nuestro estudio evidencian una fuerte relación lineal positiva con los datos de precipitación acumulada; sin embargo, la lluvia sólo explica el 45% de esta relación.

Existen varios factores que podrían aclarar este incremento. Nosotros analizamos que *Culex m. ocosa* utiliza igualmente otras especies de plantas acuáticas para su desarrollo larval. Muchas de estas malezas tienen su mayor crecimiento durante la época lluviosa. Al respecto, Pecor *et al.* (2002) indican que en ausencia de *Pistia*, las larvas de *Culex m. ocosa* se han encontrado asociadas a otras plantas como: *Nymphaea ampta*, *Typha domingensis* y *Cyperus rotundus*. Por otro lado, Galindo (1972) indica que el mismo sistema creado por *Pistia* para albergar las poblaciones de *Culex m. aikenii* ha sido reportado para las comunidades de *Ludwigia sp.* y *Azolla sp.*

Sallum *et al.* (1996), en estudios realizados en Brasil, encontraron a *Culex m. ocosa* en áreas cercanas a los poblados, criándose en una gran variedad de sitios, incluso en sitios semipermanentes que se forman durante los periodos de mayor precipitación. Está claro que ésta especie posee hábito de oviposición muy versátiles que les permiten criarse en una variedad de sitios, diferentes a *Pistia stratiotes*. Como por ejemplo, otras especies de plantas acuáticas que proliferan en época lluviosa e incluso en los criaderos semipermanentes formados en Gamboa durante los meses de mayor precipitación.

Es importante mencionar, que además de las poblaciones de plantas acuáticas que se desarrollan en la riberas del río Chagres, contiguas al poblado de Gamboa, existen también en el área muchas lagunas y pequeños lagos con abundante agua y plantas acuáticas durante todo el año, que no son influenciados por las fuertes corrientes que se generan en el río Chagres durante la época de lluvia. De aquí, que las especies de mosquitos tendrían sitios alternativos de cría que podrían explicar en cierto modo los incrementos poblacionales en momentos no esperados.

Además de esto, las fuertes corrientes que se generan en la época lluviosa a lo largo del Chagres arrastran gran cantidad de maleza acuática. Entre ellas *Pistia stratiotes*, mismas que se depositan en Gamboa, aumentando las posibilidades de crianza para las especies de mosquitos presentes en dicha área. Aunque en años anteriores la Comisión del Canal controlaba la maleza acuática por medios químicos y mecánicos en gran parte de Gamboa, evitando su paso hacia el canal, las nuevas reglamentaciones implementadas por el Gamboa Resort Hotel podrían afectar los patrones de fluctuación poblacional que se han visto durante los últimos años en las

especies de mosquitos de Gamboa, al proveer las condiciones ideales de crianza para aquellos que se crían en maleza acuática.

En resumen consideramos que *Culex melanoconion ocosa* utiliza diversos sitios de cría, entre ellos, los más habituales son las plantas acuáticas. Sin embargo, es posible que ésta especie también aproveche los sitios semipermanentes que se forman en Gamboa durante la estación lluviosa, o que el efecto de la lluvia sea indirecto, al favorecer la proliferación de malezas y vegetación herbácea en los criaderos permanentes, aumentando las posibilidades de cría para esta especie. *Culex ocosa* aumentan considerablemente su densidad poblacional durante la estación lluviosa, misma que vuelve a equilibrarse por la menor cantidad de cuerpos de agua durante el verano y por la acción de otros factores limitantes en sus sitios de cría habituales (malezas acuáticas) que no han sido contemplados en este estudio (Figura 22).

# **Capítulo VI**

## **Conclusiones**

De la interpretación, análisis y discusión de los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir lo siguiente:

1. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) puede ser aplicada sobre un gran número de especies de la familia Culicidae para detectar e identificar los parásitos causantes de malaria en aves *Plasmodium sp.*, sin que sea necesaria la disección de los insectos.
2. Dos especies de mosquitos, *Aedeomyia squamipennis* (10 / 40 grupos) y *Culex melanoconion ocosa* (8 / 67 grupos) resultaron positivas en la amplificación parcial del citocromo *b* de *Plasmodium sp.* que infectan aves, en Gamboa, Panamá.
3. Se aislaron nueve secuencias diferentes de parásitos del género *Plasmodium sp.*, cuatro de las cuales, han sido aisladas previamente de la sangre de *Turdus grayi*, *Thraupis episcopus* y *Sporophila americana* en la mismas área de estudio.
4. Seis de las secuencias de *Plasmodium sp.* encontradas en este trabajo fueron aisladas exclusivamente de *Aedeomyia squamipennis*, igualmente, las restantes tres se encontraron sólo en *Culex melanoconion ocosa*.
5. Todos los grupos de trabajo correspondientes a *Culex nigripalpus*, *Culex erraticus*, *Mansonia titillans*, *Mansonia dyari*, *Coquillettidia nigricans*, *Uranotaenia apicalis* resultaron negativos para la amplificación del ADN de *Plasmodium sp.*

6. Los resultados negativos observados en los grupos de Culicidae pertenecientes a las especies: *Anopheles triannulatus*, *Anopheles albimanus*, *Mansonia pseudotitillans*, *Mansonia indubitans*, *Uranotaenia lowi* y *Coquillettidia venezuelensis* no son concluyente debido al reducido número de grupos analizados (menos de 20).
  
7. Tanto *Aedeomyia squamipennis*, como *Culex melanoconion ocosa* son especies representativas y constantes durante la estación lluviosa e inicio de la estación seca en Gamboa.

# **Capítulo VI**

## **Recomendaciones**

1. Estimular el seguimiento de los estudios relacionados con parásitos y vectores de malaria en aves en Panamá.
2. Abrir un archivo de parásitos para las secuencias de ADN de *Plasmodium sp.*, aisladas en mosquitos, que no han sido reportadas previamente para nuestro país.
3. Realizar un mayor número de grupos por especie para PCR – *Plasmodium*, para confirmar los resultados obtenidos en nuestro trabajo.
4. Establecer de forma más contundente la dinámica de población de *Aedeomyia squamipennis* y *Culex melanoconion ocosa*, además de sus sitios de cría, preferencia hospedera y hábitos de picada, en Gamboa.
5. Realizar trabajos de laboratorio para confirmar la capacidad vectorial de *Aedeomyia squamipennis* y *Culex melanoconion ocosa* en la transmisión de *Plasmodium* causantes de malaria en aves.

## **Bibliografía**

- Adames, A. J., y Galindo, P. 1972. Colonization of *Culex melanoconion aikenii* (Aiken y Rowland, 1906) in Panama. Mosq. News. 32, 196-200.
- Adames, A. J., y Galindo, P. 1973. Ecological profiles of *Culex (melanoconion) aikenii* (Diptera: Culicidae), vector of endemic Venezuelan encephalitis in Panama. Environ. Ent. 2:81 – 86.
- Aguila, Y. 1987. Efecto inmediato de dos herbicidas sobre las larvas de *Mansonia* y *Coquillettidia* (Diptera: Culicidae) al ser aplicados a cinco malezas acuáticas. Tesis de Maestría. Universidad de Panamá. 64 pag.
- Aikawa, M., Carter, R., Ito, Y., y Nijhout, M. M. 1984. New observations on gametogenesis, fertilization and zygote transformation in *Plasmodium gallinaceum*. J. Protozool. 31: 403-413
- Aikawa, M., Huff, C. G., y Strome, C. P. A. 1970. Morphological study of microgametogenesis of *Leucocytozoon simondi*. J. Ultrastruct. Res. 32: 43-68
- Allan, S. A. y Edman J. D. 1987. Visual ecology of biting flies. A. Rev. Entomol. 32:287 – 316.
- Applegate, J. E. 1971. Spring relapse of *Plasmodium relictum* infections in a experimental field population of English sparrows *Passer domesticus*. J. Wild. Dis. 7:37-42.
- Atkinson, C. T. y Van Riper, C. III. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian Hemmatozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. In Bird – Parasite Interactions: Ecology, Evolution and Behaviour (J. E. Loye and M. Zuk, eds.), pp. 19 – 48. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Aragao, H. B. 1908. Über den entwicklungsang und die ubertragung von *Haemoproteus columbae*. Arch. Protistenkd. 12:154-167.
- Arez, A. P., Lopes J. P., Franco S. A., Snounou G. y do Rosario V. E. 2000. *Plasmodium* sp. optimal protocols for PCR detection of low parasite numbers from mosquito (Anopheles) samples. Experimental Parasitology 94: 269-272.
- Ball, G. H. y Chao, J. 1964. Temperature stresses on the mosquito phase of *Plasmodium relictum*. J. Parasitol. 57:391 – 395.
- Ball, G. H. 1964. In vitro culture of the mosquito phase of avian malaria. J. Parasitol. 50:3 – 10.

- Beier, J. C., Perkins, P. V. y Wirtz, R. A. 1988. Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. *J. Med. Entomol.* 25:9-16.
- Beier, M. S., Schwartz, I. K., Beier, P. V., Onyango, F., Koros, J. K., Campbell, G. H., Andrysiak, P. M. y Brandling-Bennet, A. D. 1988. Identification of malaria species by ELISA in sporozoite and oocyst infected *Anopheles* from Western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 39: 323-327.
- Bennett G. F., Lucera, Woodworth – Lynas, C. y Whiteway, M. 1982. Bibliography of the Avian Blood -Inhabiting Protozoa. Suppl. 1, pp. 1-33. Memorial University of Newfoundland. Press, St. John's, Newfoundland, Canada.
- Bennett, G. F., Pierce, M. A. y Earle, R. A. 1994. An annotated checklist of the valid species of *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* (Apicomplexa: Haemosporida) and hepatozoon (Apicomplexa: Haemogregarinidae). *Syst. Parasitol.* 29:61-73.
- Bensch, S., Stjernman M., Hasselquist D., Ostman O., Hansson B., Westerdahl H. y Torres-Pinheiro R. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proc. R. Soc. Lond. B., Biol. Sci.* 267: 1583-1589.
- Brady, J., Parker M. J. y Gibson. 1990. Odour plume shape and host finding by Tsetse. *Insect Sci. Applic.* 11:377 – 384.
- Braks, M. A. H. y W. Takken. 1999. Incubated human sweat but not fresh sweat attracts the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto*: *Ecol.* 663–672. 25.
- Braks, M. A. H., Meijerink, J. y Takken, W. 2001. The role of human sweat components, ammonia and L-lactic acid, in the behavior of the anthropophilic malaria mosquito, *Anopheles gambiae* (Culicidae): *Physiol. Entomol.* 142–148. 26.
- Calisher, C. H., Lazuick J. S., Justines G, Francy D.B., Monath T.P., Gutierrez E., Sabattini M.S., Bowen G. S. y W. L. Jakob. 1981. Viruses isolated from *Aedeomyia squamipennis* mosquitoes collected in Panama, Ecuador and Argentina: establishment of the Gamboa Serogroup. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 (1) 219-223.
- Carrasco, R. 2001. Diagnóstico molecular de *Leishmania sp.* en *Lutzomyia sp.* Tesis de Maestría. Universidad de Panamá. 101 pag.
- Chanteau, S., Luquiaud, P., Failloux, A. B. y Williams, S. A. 1994. Detection of *Wuchereria bancrofti* larvae in pools of mosquitoes by the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Soc. Of.Trop. Medicine and Hygiene.* 88: 783-788.

Christensen, H. A., de Vasquez, A. M. y Boreham, M.M. 1996. Host-feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Central Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 55 (2): 202-208.

Clark-Gil, S., Darsie, R. F. 1983. The mosquitoes of Guatemala, their identification, distribution and bionomics. *Mosq. Syst.* 15: 151-284.

Clements, A. N. 1992. The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction. Chapman and Hall, University Press, Cambridge, England, 495 p.

Collins, F. H., Sakai, R. K., Vernick, K. D., Paskewitz, S., Seeley, D. C., Miller, L.H., Collins, W. E., Campbell, C. C. y Gwadz, R. W. 1986. Genetic selection of a *Plasmodium* refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* 234: 607-609.

Condit, R., Douglas, R., Ibañez, R., Aguilar, S., Sanjur, A., Martinez, R., Stallard, R. F., García, T., Angerh, G. R., Petit, L., Wright, J. S., Robinson, T. R. and Heckadon, S. 2002. The status of the Panama Canal watershed and its biodiversity at the beginning of the 21<sup>st</sup> Century. 4. *Bioscience*. 51: 5.389-398.

Corradetti, A., Garnham, P. C. C. y Laird, M. 1963. New classification of the avian malaria parasites. *Parasitología*. 5:1-4.

Crewe, M. S. 1976. *Aedeomyia* a possible new vector of avian malaria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 70:4.

Danilewsky, B. 1891. Contribution a l'étude de la microbiose malarique. *Annals. Inst. Pasteur Paris* 5:758-782.

Darsie, R. F. y Ward, R. A. 1981. Identification and geographical distribution of the mosquitoes of North America north of Mexico. *Mosq. Syst. Supplement*. 1:1-313.

Davies, D. M. 1978. Ecology and behavior of adult black flies (Simuliidae): a review. *Quaest. Entomol.* 14:3 – 12.

Dowling, T. E., Moritz, C., Palmer J. D. y Rieseberg L. H. 1996. Nucleic acids III: Analysis of fragments and restriction sites. En: D.M. Hillis, G. Moritz y B. K. Mable (Eds.) *Molecular Systematics*, 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

Dunn, L. H., 1934. Note on the water lettuce *Pistia stratiotes* Linn as a nursery of insect life. *Ecology* 15: 329 – 331.

Dyar, H. G. 1928. Mosquitoes of the Americas Publication 387. Washington, D.C: Carnegie Institution of Washington.

- Edman, J. D., and Taylor, D.J. 1968. *Culex nigripalpus*: Seasonal shift in the bird – mammal feeding ratio in a mosquito vector of human encephalitis. *Science* 161: 67-68.
- Edman, J. D., 1974. Host feeding patterns of Florida mosquitoes III. *Culex* and *Neoculex*. *J. Med. Ent.* 11(1):95-104
- Escalante, A. A., Freeland, D. E., Collins, W. E. y Lal, A. A. 1998. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8124-8129.
- Escalante, A. A. y Ayala, F. J. 1995. Evolutionary origin of human and primate malarias: Evidence from the circumsporozoite protein gene: *Molecular biology and evolution.* 12: 616-626.
- Fallon, S., Eldredge B. y Ricklefs R. E., 2003. Island and taxon effects in parasitism revisited: Avian malaria in the lesser Antilles. *Evolution*, 57(3): 606– 615.
- Feldman, R. A., Freed, L. A. y Cann, R. L. 1995. A PCR test for avian malaria in Hawaiian bird: *Molecular Ecology.* 4: 663-673.
- Fix, A. S., Waterhouse, C., Greiner, E. C. y Stoskopf, M. K. 1988. *Plasmodium relictum* as a cause of avian malaria in wild-caught Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of Wildlife Diseases* 24: 610-619.
- Forattini, O. P. 1962. *Entomología Médica*, Vol. 1. Faculdade de Higiene e Saude Publica Universidade de Sao Paulo.
- Garnham, P. C. 1966. *Malaria parasites and other Haemosporida*. Blackwell Scientific, Oxford, p. 60-84.
- Galindo, P. y Adames, A. J. 1973. Ecological profiles of *Culex (melanoconion) aikenii* (Diptera: Culicidae), vector of endemic Venezuelan encephalitis in Panama. *Environ. Ent.* 2:81–86.
- Galindo, P., 1972. Endemic Vectors of Equine Encephalitis. Pan American Health organization. Scientific Publication. 243: 249– 253.
- Galindo, P. y Grayson, M. A. 1971. *Culex (melanoconion) aikenii* natural vector in Panama of endemic Venezuelan encephalitis. *Science* 172:594 – 95.
- Galun, R. 1987. Regulation of blood gorging. *Insect Sci. Applic.* 8:623 – 625.
- Graham, H. A., Palczuk, N. C. y Stauber, L. A. 1973. Immunity To Exoerythrocytic Forms Of Malaria Part 2 Passive Transfer Of Immunity To Exoerythrocytic Forms. *Experimental Parasitology.* 34(3): 372-381.

- Gemmell, N. J. y Akiyama, S. 1996. An efficient method for the extraction of DNA from vertebrate tissues. *Trends in Genetics* 12: 338-339.
- Gillies, M. T. y Coetzee, M. 1987. Supplement to the *Anophelinae* of Africa south of the Sahara (Afrotropical Region). Publication of the South African Institute of Medical Res., Johannesburg. 55.
- Goebel, A.M., Donnelly, J.M. y Atz, M.E. 1999. PCR primers and amplification methods for 12S Ribosomal DNA, the Control Region, Cytochrome Oxidase I, and Cytochrome b in bufonids and other frogs, and overview of PCR primers which have amplified DNA in amphibians successfully. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11 (1):163-199.
- Graham, H. A., Stauber, L. A., Palczuk, N. C. y Barnes, W. D. 1973. Immunity to exoerythrocytic forms of malaria. I. Course of infection of *Plasmodium fallax* in turkeys. *Exp. Parasitol.* 34:364-371.
- Greiner, E. C., Bennett, G. F., White, E. M. y Coombs, R. F. 1975. Distribution of avian hematozoa of North America. *Can. J. Zool.* 53:1762-1787.
- Graves, P. M., Wirtz, R. A., Carter, R., Burkot, T. R. Looker, M. y Targett, G. A. T. 1988. Naturally Occurring Antibodies To An Epitope On *Plasmodium falciparum* Gametes Detected By Monoclonal Antibody Based Competitive Elisa. *Infection and Immunity.* 56(11): 2818-2821.
- Graves, P. M., Burkot, T. R., Carter, R., Cattani, J. A., Lagog, M., Parker, J., Brabin, B. J., Gibson, F. D., Bradley, D. J. y Alpers, M. P. 1988. Measurement Of Malarial Infectivity Of Human Populations To Mosquitoes In The Madang Area Papua New Guinea. *Parasitology.* 96(2): 251-264.
- Gogolin, L. R. y Freier, J. E. 1986. Avian Malaria Among House Sparrows A Survey Of Disease and Mosquito Vectors Diptera Culicidae In Reed City Michigan Usa. *Great Lakes Entomologist.* 19(1): 43-50.
- Goff, M. L. y Van Riper, C. III. 1980. Distribution Of Mosquitoes Diptera Culicidae On The East Flank Of Mauna-Loa Volcano Hawaii Usa. *Pacific-Insects.* 22(1-2):178-188.
- Haywoth, A.M., van Ripper, C. y Weathers, W. W. 1987. Effects of *Plasmodium relictum* on the metabolic rate and body temperature in canaries (serinus canaries). *Jour. of Paras.* 80:60-66.
- Huchzermeyer, F. W. 1988. Avian pulmonary hypertension syndrome. IV. Increase right ventricular mass in turkeys experimentally infected with *plasmodium durae*: Onderstepoort. *Jour. Of Vet. Research.* 55: 107-108.

- Huff, C. G. 1931. The inheritance of natural immunity to *Plasmodium cathemerium* in two species of *Culex*. J. Prev. Med. 5:249–259.
- Huff, C. G. 1935. Susceptibility of mosquitoes to avian malaria. Exp. Parasitol. 16:107–132.
- Jaramillo, C. A. 2000. Confirmación de la existencia de especies crípticas, agrupadas dentro de los taxa E. Diastema y E. Vocator (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), en Panamá y Costa Rica, por medio del análisis de ADNmt. Tesis de Maestría. Universidad Santa María La Antigua. 123 pag.
- Jarvi, S. I., Atkinson, C. T. y Fleischer, R. C. 2001. Immunogenetics and resistance to avian malaria *Plasmodium relictum* in Hawaiian honeycreepers (Drepanidinae). En: Evolution, ecology, conservation and management of Hawaiian birds: A vanishing avifauna. Studies in Avian Biology. 22:254-263.
- Kissinger, J. C., W. E. Collins, J. L. y T. F. McCutchan. 1998. *Plasmodium inui* is not closely related to other quartan *Plasmodium* species: Journal of Parasitology. 84:278-282.
- Knight, K. L. y Stone, A., 1977. A catalog of the mosquitoes of the world, volume 6. The Thomas Say Foundation, p. 69.
- Kreier, J. P., Mohan, R., Seed, T. y Pfister, R. M. 1972. Studies Of The Morphology And Survival Characteristics Of Erythrocytes From Mice And Rats With *Plasmodium berghei* Infection. Zeitschrift Fuer Tropenmedizin und Parasitologie. 23(3):245-255.
- Krzwinski, J., Wilkerson, C. R. y Besansky, J. N. 2001. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in *Anophelinae* (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. Molecular phylogenetics and evolution. 18 (3):479-487.
- Levine, N. D. 1985. Phylum II. Apicomplexa Levine, 1970. An Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologists, Lawrence, KS. 322–374.
- Levine, N. D. 1988. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. J. Protozool. 35:518-520.
- Li, J., McConkey, R. A., Sattabongkot, J., Waters, A. P., Rogers, M. J. y McCutchan, T. F. 1995. *Plasmodium*: Genus-conserved primers for species identification and quantification: Experimental Parasitology. 81:182-190.
- Lourenco de Oliveira, R. y Fabio Alves de Castro. 1991. *Culex saltensis* Dyar, 1928 – Natural vector of *Plasmodium juxtannucleare* in Rio de Janeiro, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 86 (1): 87-94.

- Lyman, D. F., Monteiro, F. A., Escalante, A. A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D.M., Dujardin, J. P. y Beard, C.B. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am. J. Tropical Evol.* 9:278-280.
- MacCallum, W. G. 1898. On the haematozoan infections of birds. *J. Exp. Med.* 3:117-137.
- Majiwa, P. A. O., Thatthi, R., Moloo, S. K., Nyeko, J. H. P., Otieno, L. H., y Maloo, S. 1994. Detection Of Trypanosome Infections In The Saliva Of Tsetse Flies And Buffy Coat Samples From Antigenaemic But Aparasitaemic Cattle. *Parasitology.* 108(3):313-322.
- Manwell, R. D. 1957. Intraspecific variation in parasitic protozoa. *Syst. Zool.* 6:1-6.
- Martin, S. K., Miller, L. H., Nijhout, M. y Carter, R. 1978. *Plasmodium gallinaceum*: Induction Of Male Gametocyte Exflagellation By Phosphodiesterase Inhibitors. *Experimental Parasitology.* 44(2):239-242
- McClure, H. E., Poonswad, P., Greiner, E. C. y Laird, M. 1978. Haematozoa in birds of eastern and southern Asia. Memorial University of Newfoundland, St. Johns, Newfoundland, Canada.
- McConkey, G. A., Li, J., Rogers, M. J., Douglas, C. S., Thaddeus, K. G., Michael, R. C. y McCutchan. 1996. Parasite diversity in an endemic region for avian malaria and identification of a parasite causing penguin mortality. *J. Euk. Microbiol.* 43(5):393-399.
- Melver, S. B. 1987. Sensilla of haematophagous insects sensitive to vertebrate hosts – associated stimuli. *Insect Sci. Applic.* 8:627-635.
- Meyer, C. L. y Bennett, G. F. 1976. Observations On The Sporogony Of *Plasmodium circumflexum* And *Plasmodium polare* In New-Brunswick Canada. *Canadian Journal of Zoology.* 54(2):133-141
- Mendoza, J., Alavi, Y., Arai, M., Tufet, B. M., Sinha, R., Fowler, K., Billker, O., Franke, F. B., Janse, C. J., Waters, A. y Sinden, R. E. 2003. The Dynamics Of Interactions Between Plasmodium And The Mosquito: A Study Of The Infectivity Of *Plasmodium Berghei* And *Plasmodium Gallinaceum*, And Their Transmission By *Anopheles Stephensi*, *Anopheles Gambiae* And *Aedes Aegypti*. *International Journal for Parasitology.* 33(9): 933-943
- Mendoza, M., Santiago, S. B., Lanz, M., Humberto, H., y Martinez, R. 2002. A Putative Receptor For Dengue Virus In Mosquito Tissues: Localization Of A 45 Kda Glycoprotein. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 67(1):76-84

- Meredith, S. E. O. y Henry, M. C. 1991. The Onchocerciasis Focus At Kinsuka Kinshasa Zaire In 1985 Entomological Aspect, *Annals Of Tropical Medicine and Parasitology*. 84(4):369-380.
- Meredith, S. E. O. y Boakye, D. A. 1993. Introgression between members of the *Simulium damnosum* complex: Larvicidal implications. *Medical and Veterinary Entomology*. 7(4):393-397
- Merino, S. L., Moreno, J. J. Sanz y Arreiro. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild. A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceeding of the Royal Society of London, B*. 267:2507-2510.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. En: Hochachka and Mommsen (eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Vol. 2. Elsevier Science Publishers B. V. Academic Publishing Division.
- Mitchel, C. J., Monath T. P., Sabattini, M. S., Christensen H. A., Darsie, R. F. Jr, Jakob ,W.L. y Daffner, J. F. 1987. Host-feeding patterns of Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected during and after an epizootic of western equine encephalitis. *J. Med. Entomol.* 24:260-267.
- Mok, F. F. 1952. Transmisión of *Plasmodium relictum* by *Anopheles freeborni*. *Science*. 113:485.
- Muir, L.E., Thorne, M. J. y Kay, B. H. 1990. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vision: spectral sensitivity and other perceptual parameters of the female eye. *J. Med. Entomol.* 29:278-281.
- Muir, L.E., Thorne, M. J. y Kay, B. H. 1992. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vision: response stimuli from de optical environment. *J. Med. Entomol.* 29:445-450.
- Nayar, J. K., Knight, J. W. y Telford, S. R. Jr. 1998. Vector ability of mosquitoes for isolates of *Plasmodium elongatum* from raptors in Florida. *J. Parasitol.* 84:542-546.
- Nayar, J. K., Young, M. D. y Forrester, D. J. 1981. *Plasmodium hermani*: experimental transmission by *Culex salinarius* and comparison with others susceptible Florida mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 51:431- 437
- Nayar, J. K., Young, M. D. y Forrester, D. J. 1982. Experimental transmission by mosquitoes of *Plasmodium hermani* between domestic turkeys and hen – reared bobwhites. *J. Parasitol.* 68(5):874-878.
- Nijhout, M. M. 1979. *Plasmodium gallinaceum*: exflagellation stimulated by a mosquito factor. *Exp. Parasitol.* 48:75-80.

- Oskam, L., Schoone, G. J., Kroon, C. C. M., Lutjan, R. y Davies, J. B. 1996. Polymerase chain reaction for detecting *Onchocerca volvulus* in pools of Blackflies. *Tropical Medicine and International Health*. 1:522-527.
- Pecor, J., Mallampalli, V., Harbach, R. E. y Peyton, E. L. 1992. Catalog and illustrated review of the subgenus *Melanoconion* of *Culex*. *Contrib Am. Entomol. Inst. (Gainesville)* 27(2):1-228.
- Perkins, S. L., Osgood, S. M. y Schall, J. J. 1998. Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria: Implications for epizootiology: *Molecular Ecology*. 7:1587-1590.
- Perkins, S. L. 2000. Species concepts and malaria parasites: detecting a cryptic species of *Plasmodium*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 267:2345-2350.
- Ponnudurai, T., Billingsley, P. F. y Rubin, W. 1988. Differential infectivity of *Plasmodium* for mosquitoes. *Parasitol. Today*. 4:319-321.
- Reeves, W. C. 1953. Quantitative field studies on carbon dioxide chemotropism of mosquitoes. *Am. J. Trop. Med.* 2:325- 331.
- Richard, F. A., Sehgal, R. N. M., Jones, H. I. y Smith, T. B. 2002. A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria: *Journal of Parasitology*. 88:819-822.
- Rosmarie, K. y Edman, J. 1992. Multiple transmission of *Plasmodium gallinaceum* (Eucoccida: Plasmodiidae) during serial probing by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) on several hosts. *J. Med. Entomol.* 29(2):329-331.
- Rosenberg, R., Wirtz, R. A., Schneider, I. y Burge, R. 1990. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84:209-212.
- Ross, R. 1898. Report on the cultivation of *Proteosoma*, Labbé, in grey mosquitoes. *Indian Med.* 33:401-408;448-451.
- Sallum, A. M. y Forattini, O. 1996. Revision of the spissipes section of *Culex* (melanoconion) (Diptera: Culicidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12(3):517-600.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: Nolan, C. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2d ed. Cold Spring Harbord , NY. 59:9-9.

- Schriefer, M. E., Sacci, J. B., Jr., Wirtz, R. A. y Azad, A. F. 1991. Detection of polymerase chain reaction-amplified malarial DNA in infected blood and individual mosquitos. *Experimental Parasitology*. 73:311-316.
- Simon, C., Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Lui y Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86:228-238.
- Sinden, R. E. 1984. The biology of *Plasmodium* in the mosquitos. *Experientia*. 40:1330-1342.
- Snounou, G., Pinheiro, L., Goncalves, A., Fonseca, L., Dias, F., Brown, K. N. y do Rosario, V. 1993. The importance of sensitive detection of malaria parasites in the human and insect hosts in epidemiological studies, as shown by the analysis of field samples from Guinea-Bissau. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 87:649-653.
- Sluiters, J. F., Visser, P. E. y Van Der Kaay, H. J. 1986. The Establishment Of *Plasmodium berghei* In Mosquitoes Of A Refractory And A Susceptible Line Of *Anopheles-Atroparvus*. *Zeitschrift Fuer Parasitenkunde*. 72(3):313-322.
- Soni, J. L. y Cox, H. W. 1974. Pathogenesis Of Acute Avian Malaria Part I Immunologic Reactions Associated With Anemia Splenomegaly And Nephritis Of Acute *Plasmodium gallinaceum* Infections Of Chickens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 23:577-585.
- Sutcliffe, J. F. 1987. Distance orientation of biting flies to their hosts. *Insect Sci. Applic.* 8:611-616.
- Swofford, D. L. 2000. PAUP: Phylogenetics Analysis Using Parsimony, version 4.0 b 3a. Sinauer Associates, Inc.-Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Tempelis C. H. y Galindo P. 1970. Feeding habits of five species of *Deinocerites* mosquitoes collected in Panama. *J Med. Entomol.* 7:175-179.
- Tempelis, C. H. y Galindo, P. 1975. Host feeding patterns of *Culex (melanoconion)* and *Culex (aedinus)* mosquitoes collected in Panama. *J. Med. Ent.* 12(2):205-209.
- Takken, W. y Kline, D. L. 1989. Carbon dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants: *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 5:311-316.
- Van Riper, C. 1991. The impact of introduced vectors and avian malaria on insular passeriform birds populations in Hawaii. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 16:59-83.

- Van Riper, S. G. y Van Riper, C. III. 1985. A summary of known parasites and diseases from the avifauna of the Hawaiian islands. *Ecol. Monogr.* 56:326-344.
- Vale, G. A. 1978. Field responses of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) to odours of men, lactic acid and carbon dioxide: *Bull. Entomol. Res.* 69:459-467.
- Vinetz, J. M., Dave, S. K., Specht, C. S., Brameld, K. A., Xu, B., Hayward, R. E. y Fidock, D. A. 1991 *Proc. Natl. Acad. Scienc. U.S.A.* 96:14061-14066.
- Waters, A. P., Higgins, D. G. y Mc Cutchan, T. E. 1991. *Plasmodium falciparum* appears to have arisen as a result of lateral transfer between avian and human hosts. *Proc. Ntl. Acad. Sci. USA.* 88:3140-3144.
- White, F. M., Greiner, E. C., Bennett, G. F. y Herman, C. M. 1978. Distribution of the hematozoa of neotropical birds. *Rev. Biol. Trop.* 26:43-102.
- Wright, R. H. y Kreier, J. P. 1969. *Plasmodium gallinaceum* Chicken Erythrocyte Survival As Determined By Sodium Radio Chromate-51 And Di Isopropylfluoro Phosphate-32 Labeling. *Experimental Parasitology.* 25(1-3): 339-352.
- Wolda, H., and Galindo, P., 1981. Population fluctuations of mosquitoes in the nonseasonal tropics. *Ecological Entomology.* 6:251-280.
- Work, T. M., Washino, R. K. y Van Riper, C. 1990. Comparative suceptibility of *Culex tarsalis*, *Anopheles franciscanus*, and *Culiseta inornata* (Diptera: Culicidae) to *Plamodium relictum* (Haemosporidia: Plasmodiidae): *Journ. of Med. Ento.* 27:68-71.