



UNAP



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y
DESARROLLO**

TESIS

**BIOECOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Anopheles (Nyssorhynchus)*
darlingi ROOT (1926), VECTOR PRINCIPAL DE MALARIA EN LA
CUENCA AMAZÓNICA.**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

PRESENTADO POR: VÍCTOR MANUEL LÓPEZ SIFUENTES

ASESORA: BLGA. CARMEN FLORES MENDOZA, Dra.

IQUITOS – PERÚ

2019



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Con Resolución Directoral N° 0455-2010-EPG-UNAP, se designa como Jurado evaluador y dictaminador del proyecto de tesis: "BIOECOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* ROOT (1926), VECTOR PRINCIPAL DE MALARIA EN LA CUENCA AMAZÓNICA", a los siguientes profesionales:

MSc. Javier Souza Tecco	Presidente
MSc. Meri del Pilar Ushiñahua Álvarez	Miembro
MSc. Teresa de Jesús Mori del Águila	Miembro

A los dieciocho días del mes de julio del 2013, a horas 06:00 p.m., en el Auditorio de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, se constituyó el Jurado evaluador y dictaminador, para presenciar y evaluar la exposición de la tesis titulada: "BIOECOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* ROOT (1926), VECTOR PRINCIPAL DE MALARIA EN LA CUENCA AMAZÓNICA", presentada por el egresado: VÍCTOR MANUEL LÓPEZ SIFUENTES, como requisito para optar el grado de **MAGÍSTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA Y DESARROLLO SOSTENIBLE**, que otorga la UNAP de acuerdo al Estatuto General y la Ley Universitaria 23733.

Después de haber escuchado la sustentación y luego de formuladas las preguntas, éstas fueron:

..... *Absueltas satisfactoriamente*

El Jurado, después de la deliberación correspondiente en privado, llegó a las siguientes conclusiones:

1. La Sustentación es: *Aprobada por unanimidad*
2. Observaciones :

En fe de lo actuado los miembros del Jurado suscriben la presente acta por cuadruplicado.

Seguidamente, el Presidente de Jurado dio por concluida la sustentación, siendo las *7:30* p.m.

Con lo cual, se le declara al sustentante *Apto* para recibir el Grado Académico de **Magister en Ciencias con mención en Ecología y Desarrollo Sostenible**.

Javier Souza Tecco
MSc. Javier Souza Tecco
Presidente

Meri del Pilar Ushiñahua Álvarez
MSc. Meri del Pilar Ushiñahua Álvarez
Miembro

Teresa de Jesús Mori del Águila
MSc. Teresa de Jesús Mori del Águila
Miembro

TESIS APROBADA EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA EL 10 DE JULIO DEL 2013 EN EL AUDITORIO DE LA ESCUELA DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, EN LA CIUDAD DE IQUITOS-PERU.



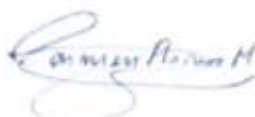
Blgo. JAVIER SOUZA TECCO, MSc
PRESIDENTE



BLGA. MERI DEL PILAR USHINAHUA ALVAREZ, MSc.
MIEMBRO



BLGA. TERESA DE JESUS MORI DEL AGUILA, MSc.
MIEMBRO



BLGA. CARMEN FLORES MENDOZA, PhD
ASESOR

DEDICATORIA

Dedico esta trabajo a mis queridos hijos: Juan Carlos, Luis Fernando, Víctor Manuel y Gabriel Alejandro; nada hubiera sido posible sin la comprensión y la tolerancia que me brindaron, por lo cual, quiero expresarles mi más profundo amor y ternura. Mil gracias.

A mi compañera Karen Hurtado Navarro, madre de mis hijos; ningún proyecto se hubiera completado sin el apoyo de cada día que me brindó, gracias por todo el esfuerzo, tiempo y el cariño que siempre me mostraste.

AGRADECIMIENTOS

Roxanne G. Burrus, PhD; Ex-Jefe del Departamento de Entomología del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos - NAMRU-6 por brindarme el apoyo logístico y económico durante la ejecución del trabajo de tesis.

Frederick M. Stell, PhD; Jefe del NAMRU-6 por brindarme las facilidades para completar este trabajo.

Carmen Flores Mendoza, PhD; Investigadora del NAMRU-6, por compartir sus conocimientos y la revisión del informe final.

Gissella Vásquez Vilchez, PhD; Subdirectora del Departamento de Entomología del NAMRU-6, por la revisión del informe final.

Cuauhtémoc Villarreal Treviño, PhD; Investigador del Instituto de Salud Pública, Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Tapachula, Chiapas, México, por la revisión del informe final.

Al personal del Departamento de Entomología del NAMRU-6; **Blgo. Carlos G. Tong Ríos**, Técnicos: **Miguel A. Vásquez Vargas, Gedin Chávez López, Claider Valderrama Eléspuro y Juan Huayunga Ipushima**, por el apoyo en las colecciones de campo de *Anopheles darlingi* y soporte logístico durante los experimentos.

Patricia Cárdenas García, Bachiller en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – UNAP, quien apoyo en las crías de larvas en el laboratorio y la entrada de datos del estudio.

Rommel Vásquez; Bachiller en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana – UNAP, por el apoyo en el análisis estadístico.

RESUMEN

El estudio de investigación fue realizado en dos insectarios (campo y laboratorio) para evaluar la bio-ecología reproductiva de *Anopheles darlingi* entre marzo a setiembre del 2011. El insectario de campo estuvo ubicado al sur este de la ciudad de Iquitos, en la localidad de Quistococha, distrito de San Juan, provincia de Maynas, Departamento de Loreto; mientras el insectario de laboratorio estuvo ubicado en la ciudad de Iquitos, distrito de Iquitos, provincia de Maynas, Departamento de Loreto. El estudio consistió en comparar el desarrollo de la ovogénesis, ciclo gonotrófico, fotoperiodo y oviposición en ambos insectarios; además se evaluó el desarrollo de inmaduros, tabla de vida de inmaduros y adultos, y la cópula inducida en el insectario de laboratorio. Los resultados demostraron que el patrón de maduración de los huevos de *An. darlingi* en ambos insectario tuvieron un proceso asincrónico, caracterizada por la maduración en etapas de los huevos dentro de los ovarios. El ciclo gonotrófico fue ligeramente más corto en el insectario de laboratorio con respecto al insectario de campo con 4.0 y 4.7 días respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente marcadas en las frecuencias de oviposición de *An. darlingi* entre el día y la noche entre los dos tipos de insectarios. La duración promedio desde la eclosión de las larvas hasta el adulto fue de 17.1 días, con un rango de 10.0 - 27.0 días. La tasa de supervivencia desde la eclosión de la larva hasta el adulto fue de 20%, con una esperanza de vida mayor en los dos primeros estadios larvales (L1, L2) con 1.9 días. La longevidad en adultos fue mayor en las hembras con 31.0 días, a diferencia de los machos con 19.0 días, de igual modo la esperanza de vida fue mayor en las hembras con 16.0 días, mientras en los machos fue de 8.6 días. Se registró mayor porcentaje de inseminación en el experimento con estimulación de luz con 5%, mientras que sólo un 2% fue registrado sin estimulación con luz.

Palabras claves: Ecología, biología reproductiva, *Anopheles darlingi*, malaria

ABSTRACT

Laboratory and field insectaries were used to evaluate the reproductive biology of *Anopheles darlingi* from May to September 2011. Field insectary was located in the San Juan district, Maynas province, Loreto department; while the laboratory insectary was located in the Iquitos district, Maynas province, and Loreto department. A comparison study on the oogenesis, gonotrophic cycle, and photoperiod and oviposition was conducted both insectaries; additionally, the immature development, immature and adult life-table, and induced copulation in *Anopheles darlingi* were evaluated in the laboratory insectary. Results showed that *An. darlingi* does not exhibit a synchronous egg development within the ovaries. The gonotrophic cycle was slightly shorter in the laboratory than in the field insectary with 4.0 d and 4.7 d, respectively. Oviposition frequency of *An. darlingi* was not significantly different between day and night in both insectaries. The average time from larva hatching to adult emergence was 17.1 d, with a range of 10.0 d to 27.0 d. The survival rate from larvae hatching to the adult emergence was 20 %, with a life expectancy higher for L1 and L2 instars both with 1.9 d. The longevity was higher in females than males with 31.0 d and 19.0 d respectively. Similarly the life expectancy was higher in the females than in the males with 16.0 d and 8.6 d respectively. An insemination rate of 5% was recorded in the experiment with light stimulation, while only a 2% was registered without light stimulation.

Key words: Ecology, reproductive biology, *Anopheles darlingi*, malaria.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Páginas
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
HOJA DE APROBACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Antecedentes.....	4
1.2 Bases teóricas	8
1.3 Definición de términos básicos.....	14
CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS.....	17
2.1 Variables y su operacionalización.....	17
2.2 Formulación de la hipótesis.....	18
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	19
3.1 Tipo y diseño de la investigación.....	19
3.2 Población y muestra.....	20

3.3 Técnicas e instrumentos.....	21
3.4 Procedimientos de recolección de datos.....	21
3.5 Técnicas de procesamientos y análisis de datos.....	26
3.6 Aspectos éticos.....	27
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	28
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	37
CAPÍTULO VI: PROPUESTA	44
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES.....	45
CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES.....	46
CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. Duración promedio en días (\pm Desviación estándar) del desarrollo de inmaduros y pupa de <i>Anopheles darlingi</i> en el laboratorio.....	33
2. Tabla de vida de valores promedio para las etapas inmaduras de <i>Anopheles darlingi</i> en el laboratorio.....	33

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
1. Comparación de las fases de desarrollo de los ovarios de <i>An. darlingi</i> entre los insectarios.....	28
2. Comparación del ciclo gonotrófico de <i>An. darlingi</i> entre los insectarios.....	30
3. Tendencia de las oviposiciones diarias de <i>An. darlingi</i> durante la evaluación del ciclo gonotrófico en los insectarios.....	31
4. Comparación de la oviposición de <i>An. darlingi</i> entre el día y la noche para los insectarios de laboratorio y campo.....	32
5. Curva de supervivencia de los estadíos inmaduros y pupas de <i>An. darlingi</i> en el laboratorio.....	34
6. Esperanza de vida de los estadíos inmaduros y pupas de <i>An. darlingi</i> en el laboratorio.....	34
7. Curva de supervivencia de adultos de <i>An. darlingi</i> en el laboratorio.....	35
8. Esperanza de vida de adultos de <i>An. darlingi</i> en el laboratorio.....	35
9. Porcentaje de inseminación de <i>An. darlingi</i> en jaulas con estimulación de luz y sin estimulación de luz.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estadíos del ciclo de vida del mosquito <i>Anopheles</i>	12
2. Diferentes fases de desarrollo del oocito en el ovario de <i>Anopheles darlingi</i>	29
3. Diferenciación de las espermatecas: A) Espermateca no inseminada y B) Espermateca inseminada con presencia de espermatozoides.....	36

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
1. Política sobre las colectas con cebo humano de artrópodos.....	65
2. Área de estudio.....	67
3. Insectario de campo: A) Vista lateral y B) Vista interior.....	67
4. Insectario de laboratorio: A) Vista de frente, B) Cuarto de taxonomía, C) Cuarto de colonia y D) Cuarto de cría.....	68
5. Proceso para el estudio de la ovogénesis.....	69
6. Fases de desarrollo de los oocitos en mosquitos (WHO, 1975).....	70
7. Clasificación de la apariencia abdominal en mosquitos (WHO, 1975).....	71
8. Proceso para el estudio del ciclo gonotrófico.....	72
9. Proceso para el estudio de la oviposición relacionada al fotoperiodo.....	73
10. Proceso del estudio de desarrollo de inmaduros.....	74
11. Proceso para el estudio de la cópula.....	75

INTRODUCCIÓN

Colonizar *Anopheles darlingi* en condiciones controladas constituye un desafío que necesita ser resuelto, por lo tanto, toda información novedosa que se podría generar con estudios básicos sobre la biología reproductiva de esta especie, puede ayudar a resolver este problema.

Hasta la actualidad la mayoría de las investigaciones sobre *An. darlingi* han estado enfocadas a estudios ecológicos, taxonómicos y su infectividad con el parásito (Cova-García y Sutil 1977, Faran 1980, Klein et al. 1991, Charlwood 1996, Harris et al. 2006, Barthi et al. 2006, Reinbold-Wasson et al. 2012), existiendo poca información sobre los patrones reproductivos de esta especie tanto en su medio natural como en el laboratorio.

Conseguir *An. darlingi* libres de infección es una limitante para los investigadores con fines de desarrollar pruebas biológicas referidas a vacunas contra la malaria, resistencia y susceptibilidad a insecticidas. Estas pruebas biológicas podrían ser realizadas a mayor escala si es que se logra colonizar esta especie de mosquito. Por lo tanto, la colonización de *An. darlingi* en condiciones controladas constituye una prioridad para investigadores de malaria, en la actualidad.

Los estudios básicos de *An. darlingi* sobre los patrones de ovogénesis, ciclo gonotrófico, relación del fotoperiodo con la oviposición, ciclo de vida y el comportamiento de la cópula en ambientes controlados; pueden constituir una fuente de información privilegiada para pensar en un corto plazo sobre la posibilidad de establecer una colonia en condiciones controladas o semi-controladas, lo cual tendría un gran valor científico en la medida que sea exitoso. Por lo tanto, los datos que se proveen en este estudio podrían ayudar a esclarecer los mecanismos de transmisión del vector, así como fortalecer los programas de control de la malaria. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue comparar la bioecología reproductiva de *An. darlingi* en un insectario de campo y otro de laboratorio.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La malaria constituye una de las enfermedades de mayor influencia en el ámbito de morbilidad y mortalidad en la salud pública, está considerada por la Naciones Unidas como uno de los objetivos del milenio para reducir su impacto en la salud global, todos los países están comprometidos a desarrollar actividades que conllevan a disminuir la incidencia a nivel local, regional, nacional y mundial. Dentro de ésta perspectiva, las acciones sobre el combate a la malaria no debe sólo enfocarse en el diagnóstico y tratamiento, sino también en el estudio de los agentes que lo transmiten y su relación de éstos con el hombre y la naturaleza. Los estudios básicos de los agentes transmisores constituyen una de las herramientas que conllevan al entendimiento del mecanismo de transmisión de la enfermedad, y nos permite entender los nuevos cambios ecológicos que se debe enfrentar actualmente, con la finalidad de proponer lineamientos a favor del combate de la malaria.

El Agente o el vector principal de transmisión de malaria en la cuenca amazónica es el mosquito (zancudo) *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, se considera que este vector en la última década tuvo un proceso de expansión o colonización hacia nuevas áreas donde nunca fueron reportados y una mayor interrelación hombre-insecto-parásito, considerándose a la deforestación como un factor gravitante, se estima que al año 2000 la amazonía peruana fue deforestada un 9.27% (7'172,554 hectáreas) del total de su territorio (Hubert & Huerta, 2005, <http://svs.gsfc.nasa.gov/vis/>). En efecto se estipula que estos cambios están alterando la bioecología y el comportamiento de estos mosquitos, constituyendo una preocupación en la salud pública, principalmente de la región Amazónica del Perú.

Existen pocos estudios sobre los patrones de reproducción de *Anopheles darlingi* hasta ahora, constituyendo un gran reto para los investigadores en conocer la capacidad reproductiva y el ciclo vida de este importante vector.

En este contexto podríamos desarrollar las siguientes preguntas: ¿Cuáles serán las diferencias sobre los patrones reproductivos de *Anopheles darlingi* bajo una condición de laboratorio y una condición seminatural?, Los parámetros ambientales que se medirán influenciarán significativamente en los patrones de reproducción?.

OBJETIVOS

General

- Evaluar y comparar la bioecología reproductiva del *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, en dos condiciones ambientales.

Específicos

- Describir el desarrollo de la Ovogénesis de *Anopheles darlingi* en dos condiciones ambientales.
- Determinar la duración y la concordancia del ciclo gonadotrófico de *Anopheles darlingi* en dos condiciones ambientales.
- Determinar la relación del fotoperiodo (Periodo circadiano) y la oviposición de *Anopheles darlingi* en dos condiciones ambientales.
- Determinar algunos patrones de copulación y fertilización de *Anopheles darlingi* en dos condiciones ambientales.
- Describir la tabla de vida de *Anopheles Anopheles* en condiciones de laboratorio.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi Root 1926, es considerado como el vector principal de malaria en la cuenca Amazónica (Zimmerman 1992, Lounibos y Conn 2000), fue reportado por primera vez en el Perú por Shannon (1933) en la frontera con Brasil. Desde los años 50 hasta los 70 los reportes de su presencia en el Perú estuvieron registrados en documentos técnicos no publicados por el Ministerio de Salud del Perú a través del Plan de Erradicación de la malaria financiado por la Organización Mundial de la Salud. En estos reportes se menciona que la distribución de *An. darlingi* estuvo básicamente limitada a la la frontera entre el Perú y Brasil en la cuenca Amazónica, indicando una distribución restringida en este periodo. Desde los años 70 hasta los años 90 algunas investigaciones publicaron su distribución y presencia en el Perú, principalmente en la región Amazónica (Morales-Ayala 1971, Calderón et al. 1974, Faran y Linthicum 1981, Linthicum 1988).

Anopheles darlingi fue reportado por primera vez en los alrededores de la ciudad de Iquitos por Fernández et al. (1996), y este reporte fue reafirmado por otros autores (Chan et al. 1999, Pecor et al. 2000, Fernández et al. 2002, León et al. 2003, Jones et al. 2004, Vittor et al. 2009).

El estudio realizado por Schoeler et al. (2003), demostró que *Anopheles darlingi* está establecido dentro de la influencia central del Departamento de Loreto a través de los ríos Nanay, Tigre, Pintuyacu, además menciona que esta especie se ha esparcido dentro de áreas previamente no infestadas de la Amazonía peruana.

Los análisis de laboratorio sobre el diagnóstico de malaria en *Anopheles darlingi*, demostraron que esta especie fue encontrada infectada naturalmente con *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae* en Brazil (Arruda et al. 1986, Tadei y Dutary 2000, Da Silva-Vasconcelos et al. 2002, Soares Gil et al. 2003; Pova et al. 2006, Ribeiro et al. 2007; Da Rocha et al.

2008), Perú (Flores-Mendoza et al. 2004; Reinbold-Wasson et al. 2012), Venezuela (Magris et al. 2007), y Guyana Francesa (Girod et al. 2008). Estudios de infecciones experimentales en Brasil, Perú y Belice determinaron su alto grado de susceptibilidad a *Plasmodium* spp. (Klein et al. 1991, Toledo et al. 1999, Grieco et al. 2005, Da Silva et al. 2006, Barthelemy et al. 2006), esta eficiente capacidad vectorial fue demostrada con un registro máximo de malaria en el 1997 en la región amazónica del Perú con 158,115 casos reportados, principalmente en el Departamento de Loreto, registrándose como histórico el número de casos de malaria en esta región (Aramburu et al. 1999). En la actualidad el Ministerio de Salud continúa reportando casos de malaria en Loreto, lo que indica que la transmisión de esta enfermedad es continua (MINSA-DGE, 2010, 2011).

Diversos estudios realizados en América del sur se han centrado en determinar el estatus taxonómico de *Anopheles darlingi*, basado sobre las descripciones morfológicas (Cova-García y Sutil 1977, Faran 1980, Faran y Linthicum 1981, Linthicum 1988, Delgado y Rubio-Palis 1993, Consoli y Lourenco-de-Oliveira 1994, Rubio-Palis et al. 1997, Rubio-Palis 1998 y 2000).

Aspectos sobre la ecología relacionada a su dinámica de poblaciones adultas, han sido estudiados por varios autores, los cuales encontraron que los patrones de alimentación sanguínea pueden variar desde uno a tres durante una noche, los mismos que varían según localidades como es reportado por Hudson (1984) y Rozendal (1990) en Surinam; por Forattini (1987), Charlwood (1996), Tadei et al. (1998), Voorham (2002), Guimaraes et al. (2004), Zeilhofer et al. (2007) y Mouthinho et al. (2011) en Brasil, por Achee et al. (2006) en Belice, por Harris et al. (2006) en Bolivia, por Magris et al. (2007) en Venezuela, por Girod et al. (2008) en Guyana Francesa, y por Vittor et al. (2006) y Reinbold-Wasson et al. (2012) en Perú.

La descripción de criaderos de esta especie fue reportada por Manguin et al. (1996) y Achee et al. (2006) en Belice, por Rejmánková et al. (1999), Rubio-Palis et al. (2005) y Berti-Moser et al. (2008) en Venezuela, y por León et al. (2003) y Vittor et al. (2009) en el Perú; mientras que su capacidad de

adaptación hacia nuevas áreas previamente no colonizadas como consecuencia de las actividades antrópicas principalmente por el uso de la tierra fue descrita por Vittor et al. (2006, 2009) en Perú, mientras que Hiwat y Bretas (2011) hacen una descripción general de la adaptabilidad de esta especie en los diferentes países de América del sur y central donde se reportaron históricamente.

La variabilidad en el comportamiento de esta especie aún no está clara, lo cual ha llevado a extensos estudios de variación genética y cambios en su estructura poblacional en país de América del sur y central como Bolivia, Brasil, Belice, Colombia, Guatemala, Guyana Francesa, Perú y Venezuela (Charlwood, 1996, Conn 1998, Manguin et al. 1999, Pinedo-Cancino et al. 2006, Mirabello y Conn 2006, Conn et al. 2006, Gonzáles et al. 2007, Angella et al. 2007, Scarpassa y Conn 2007, Gutiérrez et al. 2010), por lo que su condición de vector se hace más relevante, aspecto que necesita ser estudiado con más detalle.

El conocimiento del análisis bioquímico y morfológico de las estructuras como las glándulas salivales y estómago en *An. darlingi* ha tomado interés porque ha permitido entender el ciclo del parásito de la malaria en el vector (Moreira-Ferro et al. 1999, Okuda et al. 2005).

Los estudios sobre la bioecología reproductiva del género *Anopheles* en las Américas está reflejada en la información recopilada y presentada por Forattini (1962) en su libro de "Entomología Médica" y en Consoli y Lourenco-de-Oliveira (1994) en su libro "Principais Mosquitos de importancia Sanitaria no Brazil", consideradas en la actualidad una fuente de información valiosa para la consulta de algunos temas referidos al ciclo gonadotrófico, ovogénesis, copula y algunas observaciones del comportamiento reproductivo de los mosquitos del género *Anopheles*; sin embargo, los logros del conocimiento sobre la biología reproductiva de las especies de anofelinos amazónicos son pocos conocidos.

Estudios diversos fueron realizados para conocer los patrones de reproducción y ciclo vida de algunos anofelinos neotropicales como *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. albitarsis*, *An. punctimacula*, *An.*

aquasalis (Delgado 1998, Gomez y Osborn 2002, Rúa et al. 2005, Grieco et al. 2003, Kakitani y Forattini 2000, Dos santos et al. 2002, Ulloa et al. 2006).

El estudio sobre la bioecología reproductiva de *Anopheles darlingi* es considerado casi nulo, pocas investigaciones hasta ahora estuvieron enfocadas en conocer los patrones de reproducción de ésta especie, tanto en el medio natural como en ambientes controlados. Los intentos de colonización de *Anopheles darlingi* y algunas observaciones del ciclo biológico en condiciones controladas fueron iniciadas hace décadas atrás (Freire y Faria 1947, Bates 1947, Giglioli 1947, Mendes dos Santos et al. 1981, Buralli y Bergo 1988, Bergo et al. 1990, Gerberg et al. 1994). Así mismo, las primeras observaciones de campo para conocer el ciclo gonadotrófico y desarrollo ovogénico de ésta especie fueron realizadas por Robert et al. (1983), Lounibos et al. (1998) y recientemente por Ahumada et al. (2011), quienes presentaron datos preliminares sobre la longitud del ciclo gonotrófico bajo condiciones de laboratorio controladas, pero es poco lo que se conoce sobre el ciclo de vida y los patrones de cópula de esta especie; por lo que hasta ahora no se ha logrado conseguir una colonización debido a la falta de información básica sobre la biología reproductiva de este vector.

El Programa de Entomología del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales - NAMRU-6 en Iquitos, viene criando y tratando de colonizar esta especie desde el año 1999, informaciones no publicadas han servido para conocer algunos patrones sobre el desarrollo larvario y algunas observaciones sobre su colonización en el laboratorio. Una de las barreras por lo cual la colonización no ha sido exitosa es el escaso conocimiento de su biología reproductiva y las exigencias ambientales que necesitan para su ciclo de vida. Por lo tanto, toda información referida al estudio básico de *Anopheles darlingi* ayudaría a entender los patrones reproductivos, con la finalidad de buscar en un tiempo breve la colonización permanente en el laboratorio.

1.2. Base teóricas

DE LA ESPECIE: *Anopheles darlingi*

Clasificación taxonómica:

Reino: Animal

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Familia: Culidae

Sub-Familia: Anophelinae

Género: *Anopheles*

Especie: *Anopheles darlingi* (Root, 1926)

Biología

Consoli y Lourenco-de-Oliveira (1994), describe que *Anopheles darlingi* utiliza las grandes colecciones de agua para el desarrollo de sus formas inmaduras tales como: lagos, represas, represas formadas en las curvas de los ríos donde hay poca corriente, sus criaderos son por excelencia, de aguas profundas, limpias, poco turbias y soleadas o parcialmente sombreadas, donde sus larvas y pupas habitan en las márgenes, escondidas en la vegetación emergente o flotante y detritos vegetales caídos en la superficie del agua. Estos criaderos son utilizados indiscriminadamente, durante todo el año y, por ser permanentes, funcionan como focos de resistencia durante la estación más seca. Sin embargo, durante la estación lluviosa, pueden emplear una gran variedad de colección de agua de tamaño y profundidades menores tales como: zanjas, charcos y huellas de pata de animales.

Es considerado el Anofelino indígena más antropofílico y de comportamiento endófilo más acentuado, en las áreas rurales de la amazonía; por ejemplo puede atacar mamíferos grandes cuando estos pernoctan dentro del domicilio, pero lo hace comparativamente menor con respecto al hombre. Acostumbra picar al hombre dentro de las casas, incluso en las horas más altas de la noche, en elevada densidad, en las inmediaciones de las casas en las primeras horas de la noche.

Del mismo modo, **Forattini (2002)** describe que *Anopheles darlingi*, que sus criaderos están representados por colecciones de aguas limpias, con cierta profundidad, sombreadas, dotadas de vegetación flotante y emergente y pobres en sales y materia orgánica. En épocas lluviosas, las formas inmaduras pueden ser encontradas en varios tipos de colecciones, como diversas depresiones de terrenos, zanjas, pantanos, charcos y pantanos en campos abiertos. Sin embargo, este mosquito tiene elevada sensibilidad a los niveles bajos de humedad, desaparecen en cuanto cesan las lluvias. De esta manera, en condiciones naturales, los hábitats de las formas inmaduras son más comúnmente encontrados en remansos de ríos y cursos de agua de porte variable. Debido a esto, *Anopheles darlingi* es considerado como el anofelino "fluvial", es decir, acompañado por los ríos.

Todo indica que la actividad hematofágica de las hembras se encuentran en la dependencia del contenido de la humedad y de la temperatura de los ambientes. Sobre tales condiciones, se vuelven particularmente abundantes y muestran acentuada endofilia y endofagia.

Como aspecto general, común a los demás anofelinos, la actividad hematofágica de *Anopheles darlingi* es crepuscular y nocturna. En el entorno del domicilio, se extiende hasta la noche con aumento progresivo hasta alrededor de las 24:00 horas.

Así mismo, <https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-darlingi>, menciona que los hábitats larvarios de *Anopheles darlingi* pueden caracterizarse como cuerpos de agua naturales, como lagunas, lagos y corrientes o ríos de flujo lento, con agua clara y sombreada asociada con vegetación sumergida, como las raíces de bambú que sobresalen del bambú

espinoso. Las larvas se encuentran con mayor frecuencia en partes de detritos flotantes a lo largo de los márgenes de los ríos. Hay ejemplos de larvas que se encuentran en lugares poco característicos, como en aguas ligeramente salobres; en cantidades bajas en agua turbia y contaminada (pozos de ladrillo). Es un mosquito ribereño, generalmente confinado en zonas rurales, bosques de tierras bajas. La deforestación y otros cambios ambientales impulsados por el ser humano pueden crear hábitats que son favorables, según los registros, *Anopheles darlingi* se encuentra en densidades más altas en áreas con cobertura forestal limitada, que en aquellas predominantemente forestales.

An. darlingi tiende a descansar al aire libre, independientemente de dónde haya ingerido sangre. Los adultos pican durante la noche y el grado de endo y exofagia de esta especie varía de un lugar a otro, al igual que su preferencia de hospedador. Se ha sugerido que el patrón de picada puede representar una adaptación al comportamiento humano.

Ciclo de vida

Hay cuatro estadíos en el ciclo de vida de un mosquito (*Anopheles*): huevo, larva, pupa y adulto, durante su ciclo de vida el mosquito sufre dos cambios (metamorfosis), de larva a pupa y de pupa de adulto. **Manual de Capacitación en Entomología de la Malaria (2012).**

Estadío de huevo

- Las hembras adultas de *Anopheles* copulan una vez y continúan poniendo huevos a lo largo de su vida.
- Las hembras deben tomar una ingesta sanguínea cada 2-3 días. La sangre es necesaria para el desarrollo de los huevos. Las hembras ponen una tanda de huevos antes de la siguiente alimentación con sangre.
- Los huevos son depositados en el agua (pozas de lluvia, lagunas, riberas de ríos, lagos, etc.) en tandas de 50 a 200 huevos.
- El tiempo que transcurre para que los huevos eclosionen en larvas depende en gran parte de la temperatura:

- A unos 30°C, los huevos eclosionan en larvas en unos 2-3 días.
- En zonas templadas (16°C), en unos 7-14 días.

Estadío de larva

- La larva tiene una cabeza bien desarrollada con "cepillos bucales" utilizados para la alimentación (filtradores). La larva se alimenta de microorganismos (p. ej. algas, bacterias) y materia orgánica en el agua donde se crían.
- La larva de Anopheles no tiene sifón respiratorio. Se coloca paralelo a la superficie del agua para respirar.
- Hay cuatro etapas en el desarrollo de larva, conocidos como instares (denotado como L1 a L4, Fig. 1).
- El desarrollo de larva a pupa tarda cerca de 5-10 días en temperaturas tropicales normales, dependiendo de la especie. La temperatura del agua afecta el tiempo necesario para el desarrollo, el cual es más corto en aguas más cálidas.

Estadío de pupa

- La pupa tiene la forma de una coma y permanece en la superficie del agua.
- Tiene un par de trompetas respiratorias a través de las cuales respira cuando está en la superficie.
- No se alimenta durante este estadio, pero la pupa es móvil y responde a los estímulos.
- Esta es la fase de reposo o inactividad durante la cual ocurre una gran transformación de vivir en el agua para emerger a vivir fuera del agua.
- La etapa de pupa dura unos 2-5 días.

Estadío adulto

- El adulto usualmente emerge de la pupa al atardecer.
- Después de emerger de la pupa, el mosquito adulto reposa por un corto período de tiempo con el fin de endurecer su cuerpo.

- Los mosquitos se aparean poco después de emerger (Fig. 2). Al atardecer los machos forman grandes enjambres, y las hembras vuelan dentro de los enjambres para aparearse.
- Tanto los mosquitos machos como las hembras se alimentan de néctar para obtener energía.
- Después de aparearse, los mosquitos hembra salen en búsqueda una ingesta sanguínea, necesaria para el desarrollo de sus huevos. Para algunas especies una alimentación es suficiente para desarrollar los huevos. En otras especies se requieren dos alimentaciones, al menos para el desarrollo de la primera tanda de huevos.
- El tiempo que transcurre en *Anopheles* de huevo a adulto puede variar entre 7 días a 31°C y 20 días a 20°C.

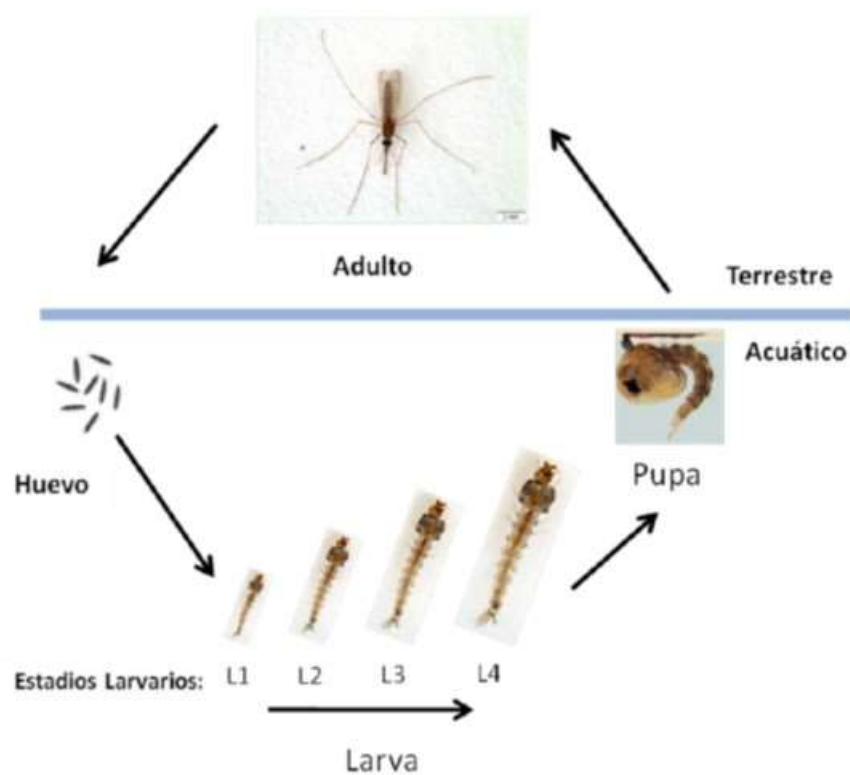


Figura 1. Estadios del ciclo de vida del mosquito *Anopheles*

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Consoli y Lourenco-de-Oliveira (1994), describe que *Anopheles darlingi* es encontrado en áreas de bajas latitudes casi siempre asociado a los grandes cursos de agua y bosques del interior, pero también pasa en la costa. Esta ampliamente distribuido en el territorio sudamericano, al este de los Andes en Colombia, Venezuela, Bolivia, Peru, Paraguay, Argentina, Brasil y en las Guyanas; al oeste de los Andes, solo fue encontrado en el Chaco y Colombia. Su distribución es discontinua por el norte de Venezuela, incluso ha sido encontrado en áreas centroamericanas entre el sur de México, Belize, Honduras y Guatemala.

De la misma manera **Forattini (2002)** menciona que *Anopheles darlingi* es un mosquito predominantemente sudamericano, existiendo una población que se distribuye por America Central, abarcando desde el sur de México (Chiapas) hasta Nicaragua, en especial, en el lado del atlántico de la región. En América del sur es encontrado en Colombia y al este de la cordillera de los Andes, aunque ausente en el extremo noreste de Brazil. En el sur se encontra hasta el norte de Argentina (Chaco y Misiones), en la región de la boca de Iguazu, en el Brazil (Parana).

<https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-darlingi> describe de manera general que *Anopheles darlingi* está distribuido con poblaciones desde el sur de México hasta Argentina.

Capacidad vectorial

De acuerdo con **Dean et al. (1948)** and **Hiwat & Bretas (2011)** *An. darlingi* es capaz de mantener una transmisión relativamente alta de malaria incluso cuando es encontrado en bajas densidades. La especie de mosquito se considerado un buen vector, a pesar de sus tasas de infección que tienden a ser baja, incluso en áreas de malaria de alto riesgo.

De igual modo <https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-darlingi> menciona que *An. darlingi* es considerado como uno de los vectores más eficientes de malaria en la región neotropical.

Así mismo, **Forattini (2002)** indica que *An. darlingi* es reconocido como el principal anofelino sudamericano vector de la malaria humana, y su competencia vectorial es reconocido por muchos datos históricos, tanto en condiciones naturales como en el laboratorio.

Por otro lado, **Faran & Linthicum (1981)** describen *An. darlingi* es un vector muy eficiente de malaria, incluso se sospecha que es un vector de filaria humana.

1.3 Definición de términos básicos

- **Vector:** Los vectores son organismos vivos que pueden transmitir enfermedades infecciosas entre personas, o de animales a personas. Muchos de esos vectores son insectos hematófagos que ingieren los microorganismos patógenos junto con la sangre de un portador infectado (persona o animal), y posteriormente los inoculan a un nuevo portador al ingerir su sangre.
- **Bioecología:** es la ciencia que tiene como objeto de estudio a los seres vivos y, más específicamente, su origen, su evolución y sus propiedades: nutrición, morfogénesis, reproducción, patogenia, etc. Se ocupa tanto de la descripción de las características y los comportamientos de los organismos individuales como de las especies en su conjunto, así como de la reproducción de los seres vivos y de las interacciones entre ellos y el entorno. De este modo, trata de estudiar la estructura y la dinámica funcional comunes a todos los seres vivos, con el fin de establecer las leyes generales que rigen la vida orgánica y los principios explicativos fundamentales de esta.
- **Ovogénesis:** Es el proceso de formación de los óvulos o gametos femeninos que tiene lugar en los ovarios de las hembras. Las células germinales diploides generadas por mitosis, llamadas ovogónias, se localizan en los folículos del ovario, crecen y tienen modificaciones, por lo que reciben el nombre de ovocitos primarios. Éstos llevan a cabo la

primera división meiótica, dando origen una célula voluminosa u ovocito secundario que contiene la mayor parte del citoplasma original y otra célula pequeña o primer cuerpo polar. Estas dos células efectúan la segunda división meiótica; del ovocito secundario se forman otras dos células: una grande, que contiene la mayor parte del citoplasma original, y otra pequeña o segundo cuerpo polar. Los cuerpos polares se desintegran rápidamente, mientras que la otra célula se desarrolla para convertirse en un óvulo maduro haploide.

- **Ciclo gonotrófico:** Es el periodo de tiempo que va desde la toma de sangre, ovopostura, hasta que vuelve a tomar la siguiente alimentación. Un ciclo gonotrófico normal consiste en una toma de sangre, seguido de la digestión de sangre, maduración de los ocistos y la oviposición. El tiempo para la digestión de la sangre y su consecuencia producción de huevos varía de 3 a 5 días dependiendo de la temperatura ambiental.
- **Periodo circadiano:** El ciclo circadiano es el reloj biológico que regula y programa las funciones fisiológicas del organismo en un período de un día o 24 horas. En biología, el ciclo circadiano, reloj circadiano o reloj biológico es la repetición diaria de los fenómenos fisiológicos de los organismos vivos.
- **Copulación:** Es la unión sexual del macho y la hembra de una especie; acción de copularse, de unirse por parejas dos gametos: apareamiento, coito, cópula. La copulación es el acoplamiento y, más particularmente, el proceso por el cual los elementos sexuales masculinos se ponen en contacto con los elementos sexuales femeninos en el interior de los órganos genitales correspondientes: relación sexual. La duración de la cópula es variable, en algunos insectos dura fracciones de minutos o minutos, en otras especies varias horas. En muchos insectos se efectúa una sola vez, en otros se repite varias veces.
- **Fertilización:** Es la unión del óvulo y el espermatozoide. La formación de los productos sexuales femeninos y masculinos ocurre en individuos de

sexos diferentes, no obstante la fecundación se realiza siempre en el cuerpo de la hembra y la fusión de estos productos sexuales da origen al ovulo fecundado.

- **Tabla de vida:** Son una forma de describir las tasas de mortalidad y supervivencia específicas a una edad, para una población o resume la probabilidad de que los organismos de una población vivan, mueran o se reproduzcan en las diferentes etapas de sus vidas.
- **Malaria:** También conocida como paludismo; es una enfermedad infecciosa parasitaria, causada por protozoarios del género *Plasmodium* y es transmitida al hombre por la picadura del mosquito del género *Anopheles* (hembra). Los síntomas de la malaria pueden incluir agotamiento extremo, dolor de cabeza, dolores musculares y articulaciones, escalofrío, sudor profuso, fiebre, vómito, diarrea.

CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS

2.1. Variables y su operacionalización

X1: Desarrollo de la ovogénesis

X2: Ciclo y concordancia gonotrófico

X3: Periodo circadiano

X4: Copulación y fertilización

X5: Tabla de vida

Variables	Indicadores	Índices
Variables		
X1. Desarrollo de la ovogénesis	- Grado de maduración de los oocitos	-Tasa en días, para el desarrollo de los oocitos. - Valores numéricos y porcentuales
X2: Ciclo y concordancia gonotrófico	- Periodo entre la alimentación con sangre y oviposición	-Tasa en días. - Promedio porcentual por ciclo.
X3: Periodo circadiano	- Frecuencia de oviposición en relación al foto periodo.	- Número y Promedio porcentual.
X4: Copulación y fertilización	- Patrones de copulación - Fertilidad	- Valores numéricos - Tasa de fertilidad
X5: Tabla de vida	- Cuantificación y emergencia de huevos - Desarrollo larvario - Periodo de pupación - longevidad del adulto.	- Número y Promedio porcentual. - Promedio en días por estadío. - Promedio en días y porcentual. - Promedio en días y porcentual.

2.2. Formulación de la hipótesis

La bioecología reproductiva y el ciclo vida de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* en condiciones de laboratorio no tienen diferencia con ensayos en condiciones seminaturales.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

2.1. Tipo y diseño de la investigación

2.1.1. Tipo de investigación

El estudio fue conducido en el Departamento de Loreto, ciudad de Iquitos, Perú (Anexo 2), localizado a 120 m.s.n.m. en la selva amazónica (73.2°W y 3.7°S). Dos insectarios fueron utilizados para los estudios (Anexo 3 y 4); (1) Insectario de campo, ubicado en la localidad de Quistococha a 5 km al sur de la ciudad de Iquitos, distrito de San Juan, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, con medidas de 6 m de largo, 4 m de ancho y 6 m de alto, construido sobre una estructura de fierro y revestido todo el contorno con malla plástica y con el techo sin cobertura, en su interior había plantas arbustivas y herbáceas que le dieron un aspecto natural; (2) Insectario de Laboratorio, ubicado en la ciudad de Iquitos dentro de las instalaciones de la Clínica Naval, distrito de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto; con medidas de 13 m largo y 8 m de ancho, construido totalmente de concreto con 4 laboratorios (Taxonomía, cría, colonización e infección), la condiciones ambientales fueron manejados en el interior de los cuartos.

En los dos insectarios se registraron datos de temperatura (°C), humedad relativa (%) utilizando un termo-higrómetro (Max-Min Clock, EXTECH Instruments Corporation, NH, USA). La temperatura en el insectario de laboratorio tuvo un rango entre 23 a 29°C, con un promedio de 26°C, la humedad relativa tuvo un rango entre 58 a 88% con un promedio de 77% para el cuarto de adultos; mientras que para el cuarto de cría la temperatura tuvo un rango entre 22 a 33 °C, con un promedio de 26 °C, la humedad relativa tuvo un rango entre 31 a 90 %, con un promedio de 73%. En el insectario de campo el rango de temperatura fue entre 20°C a 31°C, con un promedio de 25°C, la humedad relativa tuvo un rango entre 63 a 92%, con un promedio de 84%.

El fotoperiodo en el insectario de campo y laboratorio se consideró la condición natural con 12:12 (luz: oscuridad).

2.1.2. Diseño de la investigación

Este estudio fue descriptivo y explicativo que nos permitió describir los aspectos reproductivos y ecológicos de *Anopheles darlingi* en dos condiciones ambientales diferentes. Mediante el análisis estadístico se trató de identificar los factores intrínsecos (desarrollo biológico) o extrínsecos (temperatura, humedad, luz, precipitación) que estaban asociados a la reproducción del *Anopheles darlingi* en dos condiciones diferentes; 1) Laboratorio, insectario fue completamente cerrado sin ningún tipo de conexión al medio externo, y las condiciones de temperatura y humedad fueron controlados, dentro de esto se utilizó dos ambientes para el proyecto de 3m² cada uno: un cuarto para las crías y otro para el mantenimiento de los adultos emergidos y su colonización; 2) Seminatural, este insectario estuvo instalado dentro de una zona con vegetación, el ambiente fue revestido con mallas plásticas sobre una estructura de metal de 6x4x6 metros, el área tuvo conexión directa con el medio externo, las condiciones de temperatura, humedad y luz fue de acuerdo al medio natural, Los resultados obtenidos durante este estudio serán útiles para los Programas de malaria en la Amazonía Peruana.

2.2. Población y muestra

Los mosquitos adultos utilizados para los experimentos tuvieron dos procedencias, muestras silvestres obtenidas a través de capturas con cebo humano de las localidades (Zungarocha, Lupuna, Libertad), y muestras de laboratorio cuya descendencia fue a partir de madres silvestres.

Una muestra total de 513 hembras silvestres fueron utilizados para los estudios sobre: 1) ovogénesis, 2) ciclo gonotrófico, 3) oviposición relacionada al fotoperiodo y 4) desarrollo de inmaduros. Otra muestra de 700 mosquitos adultos (hembras y machos) de generación F0 nacidos en el laboratorio fueron utilizados para los estudios sobre: 5) tabla de vida de adultos y 6) cópula.

2.3. Técnicas e instrumentos

Los estudios sobre 1) ovogénesis, 2) ciclo gonotrófico, 3) oviposición relacionada al fotoperiodo, desarrollo de inmaduros, tabla de vida de inmaduros y adultos, y cópula fueron registrados en fichas de registro específico para cada estudio.

2.4. Procedimientos de recolección de datos

2.4.1. Colecta de mosquitos de campo

Los mosquitos fueron colectados usando cebo humano protegido por personal técnico entrenado del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de Estados Unidos - NAMRU-6 entre las 18:00 a 20:00 horas. Las colectas de campo fueron realizadas de acuerdo al memorándum emitido por el Departamento de Entomología del NAMRU-6 sobre política acerca de las colectas de artrópodos con cebo humano [01 de Marzo del 2007] (ver anexo 01). Los lugares de colecta fueron 3 sitios en el Departamento de Loreto: 1) Zungarococha (S: 3° 49' 32.45", W: 73° 21' 01.28") un poblado situado en la carretera Zungarocha a 7 Km al sur de la ciudad de Iquitos y ubicado al borde de la influencia del río Nanay, las colectas fueron realizados en las fechas [03/03/2011, 24/03/2011]; 2) Lupuna (S: 3° 44' 35.43", W: 73° 19' 36.94") ubicado a la margen izquierda del río Nanay, sólo una colecta fue realizada en la fecha [02/06/2011]; 3) Libertad (S: 3° 29' 38.01'S, W: 73° 14' 22.88") ubicado en la margen derecha del río Mazan, las colectas fueron realizadas en las fechas [21/06/2011, 28/06/2011, 07/07/2011, 18/07/2011, 26/07/2011, 02/08/2011, 09/07/2011, 25/08/2011]. Los mosquitos colectados fueron transportados vivos a los insectarios.

2.4.2. Ovogénesis

Se colectaron hembras en el campo y colocadas en vasos de cartón (12 oz., marca Solo KH12A-J8000, USA) cubiertos con mallas, al momento se les proporcionó alimentación de agua azucarada al 20% (SOP NAMRU-6, 2012) embebido en algodón; luego los vasos fueron acondicionados dentro de una caja de tecnopor con toallas húmedas y transportados a los dos insectarios. Los mosquitos fueron mantenidos por un periodo de 5 días dentro de los insectarios para completar el desarrollo de la ovogénesis de previas alimentaciones que pudieran haber obtenido en el campo, de modo que no existan vestigios de sangre en los estómagos. Después de este periodo los mosquitos fueron alimentados con sangre de pollo vivo, solamente los que lograron alimentarse completamente fueron considerados para el estudio; luego estas hembras fueron colocadas en contenedores plásticos de 12.5 cm de alto por 2.5 cm de ancho (Idiesa^{MR}), los cuales contenían una base de algodón y papel toalla humedecidos para dar condiciones apropiadas. Cada 12 horas después de la alimentación un grupo entre 3 a 5 hembras fueron disecadas al azar para evaluar el desarrollo de los oocitos, este consistía en adormecer a las hembras en un frasco letal con Actetato de Etilo (99%), y con la ayuda de agujas de disección (0.15, 0.20 mm pins montados sobre hisopos de madera) se realizaba cortes laterales entre la unión del séptimo y octavo segmento abdominal para romper y extraer los ovarios del interior del abdomen, luego los pares de ovarios eran colocados sobre láminas portaobjetos conteniendo solución salina, con ayuda de las agujas de disección los ovariolos fueron desprendidos de ambos ovarios y mezclados en la solución salina (0.85%), de esta mezcla, 20 ovariolos fueron observados al microscopio a 200X (Olympus CX41, USA) para determinar la fase de desarrollo de los oocitos a través de la clasificación descrita por Christophers 1911, WHO 1975 (ver anexo 5 y 6). El monitoreo del desarrollo de los oocitos fue realizado por 5 días consecutivos.

2.4.3. Ciclo gonotrófico

Al igual que el estudio anterior, se revisaron visualmente la apariencia abdominal de los mosquitos hembras capturados en el campo, de acuerdo a la clasificación descrita por WHO (1975), para descartar alguna alimentación reciente (ver Anexo 7), de modo que no interfiera con el estudio sobre el ciclo gonotrófico. Las hembras fueron alimentadas en el campo y transportadas a los dos insectarios de acuerdo a la descripción del primer estudio; cada hembra fue colocada dentro de los insectarios individualmente en contenedores plásticos (descritas en el primer estudio) cuya base contenía algodón y papel toalla humedecidos para dar condiciones a la oviposición de los huevos (ver anexo 8). Las hembras fueron evaluadas diariamente por un periodo de 7 días, y se registró el periodo del ciclo gonotrófico; además se suministró una segunda alimentación a las hembras que previamente colocaron sus huevos, para registrar si había o no concordancia gonadotrófica en *Anopheles darlingi* (Consoli y Lourenço-de Oliveira. 1994).

2.4.4. Oviposición relacionada al fotoperiodo

En otro experimento y siguiendo la misma secuencia descrita para el segundo experimento, desde la colecta, transporte hacia los insectarios hasta la alimentación con sangre; se utilizaron contenedores plásticos con las mismas características y condiciones del estudio anterior para la postura de huevos (ver anexo 9). La evaluación de las hembras y el registro de los huevos se realizaron a las 0600 h y 1800 h cada día, durante 8 días consecutivos. Este estudio nos permitió evaluar la ovoposición de *An. darlingi* con respecto al fotoperiodo natural.

2.4.5. Desarrollo de inmaduros

Las hembras silvestres de *An. darlingi* fueron colectadas y alimentadas en el mismo lugar de colecta, luego fueron transportadas al laboratorio en vasos de cartón, después de 48 h las hembras fueron anestesiadas con Acetato de Etilo y cortadas un ala para estimularlas a la oviposición, cada individuo fue colocado en tubos plásticos (9 dram 26x67mm, BioQuip Products, USA) cuya base contenía algodón humedecido y una cobertura de papel filtro para facilitar las condiciones de la oviposición. Una vez contabilizado el número de huevos por hembra, estos fueron colocados en una bandeja de plástico, para su eclosión y seguimiento de su desarrollo larval desde el nacimiento hasta la emergencia del adulto, diariamente se registró el proceso de desarrollo de los estadios desde L1 hasta L4, pupas y emergencia de los adultos (ver anexo 10). El alimento suministrado a las larvas fue de acuerdo a lo descrito por López-Sifuentes et al. (2008), que consistió en una mezcla de harina de trigo y harina de pescado a proporciones iguales, la dieta a las larvas fue como sigue: 0-2 días (0.14 mg/larva), 3 días (0.20 mg/larva), 4 días (0.26 mg/larva), 5 días (0.40 mg/larva), 6 a más días (0.5 mg/larva). En las bandejas de cría se registraron datos de temperatura (°C) y pH utilizando un equipo portátil (HANNA Instruments, HI 991300, USA). La temperatura tuvo un rango entre 24°C a 28.3°C con un promedio de 26.5°C y el pH tuvo un rango entre 5.8 a 7.15 con un promedio de 6.3.

2.4.6. Tabla de vida de inmaduros y adultos

Los registros diarios del desarrollo de los inmaduros sirvió para calcular la tabla de vida de acuerdo a las ecuaciones descritas por Rabinovich (1980) donde:

a_x = Número de organismos al inicio de cada grupo de edad.

l_x = Proporción de la cohorte original que sobrevive a cada grupo de edad cuya proporción es estandarizada a un valor inicial de 1.

dx = Proporción de la cohorte original que muere durante cada grupo de edad: se obtiene de la diferencia entre l_x y l_{x+1} .

q_x = tasa de mortalidad específica por edad, se obtiene considerando una fracción entre dx/l_x .

e_x = Esperanza de vida, se calcula de acuerdo a la ecuación:

$e_x = T_x / L_x$, donde:

L_x = Probabilidad promedio de supervivencia entre dos edades sucesivas.

T_x = Número total de días que le quedan por vivir a los sobrevivientes que han alcanzado la edad x .

La tabla de vida de los adultos también fue calculada utilizando las mismas ecuaciones descritas para los inmaduros. Para este experimento se utilizaron hembras y machos de generación (F0) nacidas en el laboratorio con una edad de 24 horas, estas fueron colocadas en jaulas plegables de 46x46x46cm (1450C Bioquip Products, CA, USA) según sexo, diariamente fueron evaluados la mortalidad de los adultos hasta registrar el último individuo en morir, las hembras recibieron alimentación con sangre cada semana mientras que los machos recibieron una alimentación con solución azucarada al 20% cada 2 días.

2.4.7. Cópula

El estudio de la cópula fue realizada a través de la comparación de dos experimentos en laboratorio en forma simultánea, utilizándose mosquitos producidos en el laboratorio de generación (F0) entre 24 a 48 h de edad. Los experimentos fueron como sigue: Cuatro grupos de mosquitos adultos [50 machos y 50 hembras] fueron

colocados en jaulas de 61x61x61cm (1450D Bioquip Products, CA, USA) y cubiertas con toallas húmedas dentro del laboratorio, dos grupos no recibieron ninguna estimulación para la cópula, mientras que los otros dos recibieron una estimulación de luz con ayuda de una linterna manual (Princeton Tec Quad Headlamp, USA) a través de la emisión intermitente de un flujo automático de luz de 84 veces por minuto por un lapso 10 minutos entre las 1800 – 1900 h. Los cuatro grupos recibieron una alimentación de solución azucarada (20%) para los machos, y sangre para las hembras. El proceso de inducción de las hembras comenzó después de los 48-72 horas de vida, fue realizado por un periodo entre 15 a 21 días consecutivos y en dos periodos de tiempo diferentes; diariamente por cada experimento se colectaban las hembras caídas para disecarlos y evaluar en un microscopio a 200X de aumento (Olympus CX41, USA) la presencia de espermatozoides dentro de las espermatecas, de acuerdo al Manual sobre Métodos en Investigación de *Anopheles* (NIAID, 2010) (ver anexo 11); también algunas hembras de las jaulas fueron colocados en ovitrampas para estimular a la ovoposición, los huevos colocados fueron sometidos a la eclosión para concretar su desarrollo.

2.5. Técnicas de procesamientos y análisis de datos

Para determinar si existían diferencias significativas para la ovogénesis, ciclo gonotrófico y fotoperiodo estudiados en los insectarios de laboratorio y campo, se aplicó un test para-métrico de análisis de varianza (ANOVA tipo III), los cuales fueron expresados mediante gráficos boxplot, además se utilizó la estadística descriptiva para desarrollar gráficos específicos de las variables.

Se utilizó el programa estadístico SPSS 19.0, 2010 (IBM Corporation Armonk, NY).

Se calcularon las tablas de vida horizontal (supervivencia, mortalidad, esperanza de vida) de los estadios inmaduros y adultos de acuerdo a las ecuaciones propuestas por Rabinovich (1980), se realizó la prueba t-student para comparar la medias y determinar la relación sexual entre los adultos emergidos (machos y hembras) usando el formato Excel (2007).

2.6. Aspectos éticos

Las personas que participaron en las colecciones de *Anopheles darlingi* en la naturaleza, participaron voluntariamente basado en la “Política sobre las colectas de artrópodos con cebo humano”, emitido como un MEMORANDUM por NAMRU-6 (2007), el cual representaba un documento estándar que se usaba para asegurar que todo los participantes estaban de acuerdo en su participación, el cual fue voluntario, y que se podía retirarse de la actividad cualquier momento de la actividad, sin causa legal o administrativa, ver Anexo 1.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Ovogénesis

Un total de 115 hembras de campo fueron disecadas para comparar el grado de desarrollo del ovario de *Anopheles darlingi* entre el insectario de laboratorio (n=63) y el insectario de campo (n=52). El grado de maduración de los oocitos dentro de los ovarios con relación al tiempo para ambos insectarios fue estadísticamente variable (g.l=5, F=14.01, p=0.0001); es decir que *An. darlingi* no presenta un proceso sincrónico en la maduración de sus huevos dentro los ovarios (Gráfico 1 y Figura 2). Sin embargo, cuando se relacionó estadísticamente si éste patrón de ovogénesis tenía variación entre ambos insectarios, los resultados demostraron que fueron similares (g.l=1, F=0.049, p=0.85).

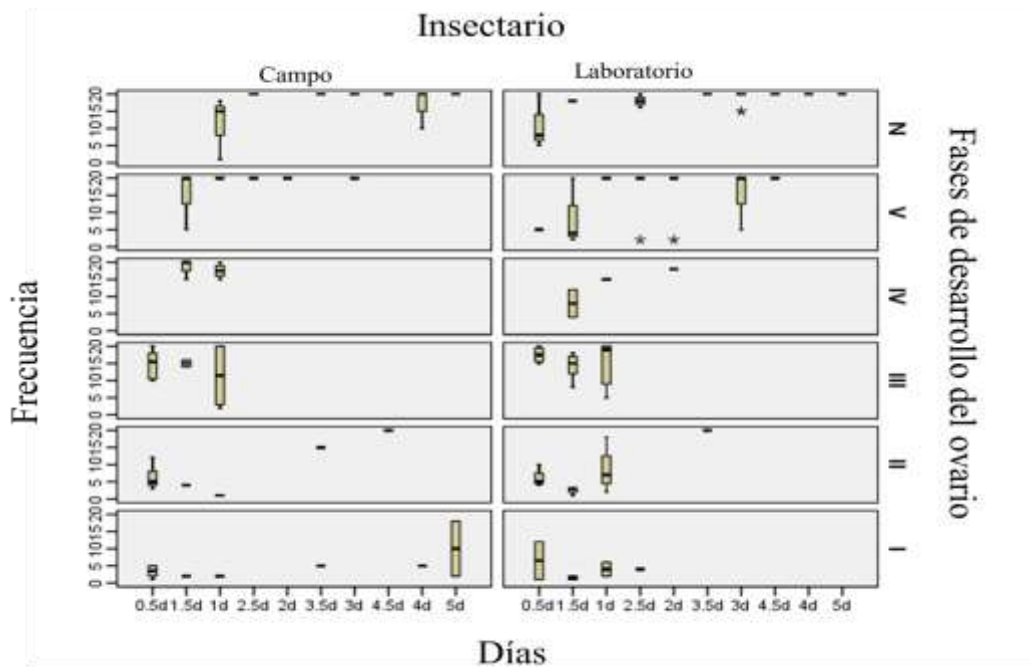


Gráfico 1. Comparación de las fases de desarrollo de los ovarios de *An. darlingi* entre los insectarios

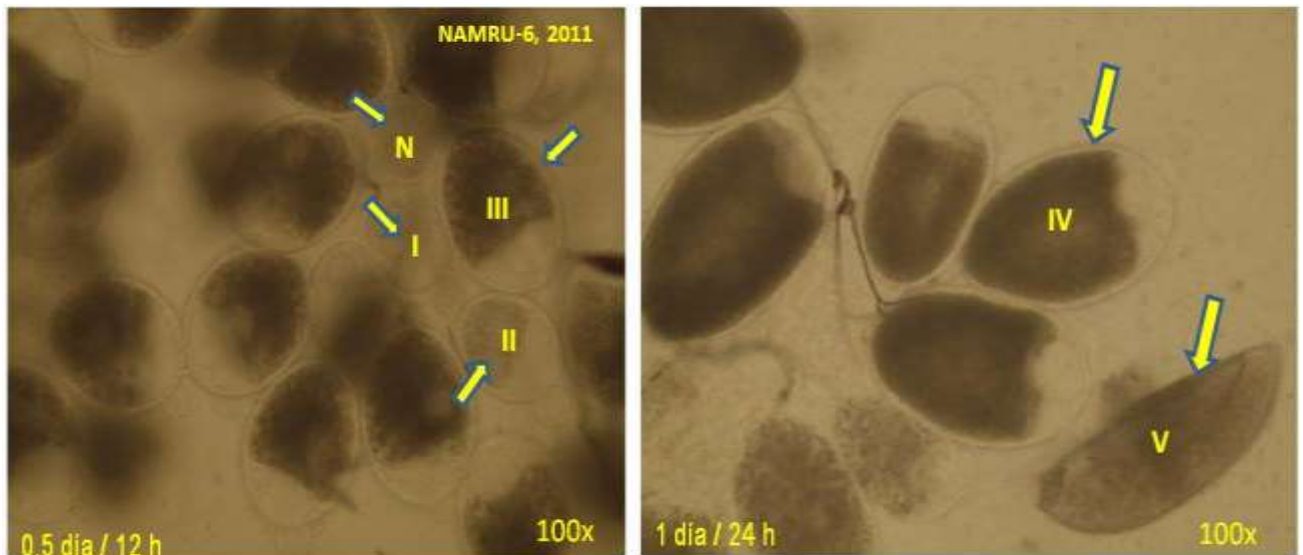


Figura 2. Diferentes fases de desarrollo del oocito en el ovario de *Anopheles darlingi*.

En ambos insectarios se encontró al menos un individuo que alcanzó el estado final del desarrollo del oocito después de 1 día post-alimentación, el cual estuvo caracterizado por la presencia de los flotadores completamente formados Christophers' fase V (ver anexo 3). La mayor frecuencia en la desincronización del desarrollo de los oocitos fue encontrada en ambos insectarios entre 1– 1.5 días post-alimentación, el cual se ve reflejada en el encuentro de todas las etapas de desarrollo Christophers' fase I, II, III, IV, V. Sin embargo, entre 2 a 3 días el desarrollo de los oocitos tiende a homogenizarse, esto se ve reflejado por el encuentro sólo de las fases V y N, lo que indica la maduración total de los oocitos y la presencia de oocitos no diferenciados como consecuencia del inicio de otro periodo de ovogénesis después de la descarga de los huevos de algunos especímenes. También se observó que entre los 3.5 a 5.0 días los oocitos de los ejemplares disecados sólo se desarrollaron hasta la fase II.

4.2. Ciclo Gonotrófico

La duración del ciclo gonotrófico corresponde al periodo entre la alimentación con sangre y la oviposición. Un total de 178 hembras de campo fueron usados para evaluar el ciclo gonotrófico de *An. darlingi*, de los cuales 122 lograron colocar huevos, 60 en el insectario de laboratorio y 62 en el insectario de campo. La longitud de ciclo gonotrófico fue ligeramente mayor en el insectario de campo con una mediana de 4.7 d, mientras que para el insectario de laboratorio fue de 4.0 d ($g.l=1$, $F=4.33$, $p=0.042$) (Gráfico 2).

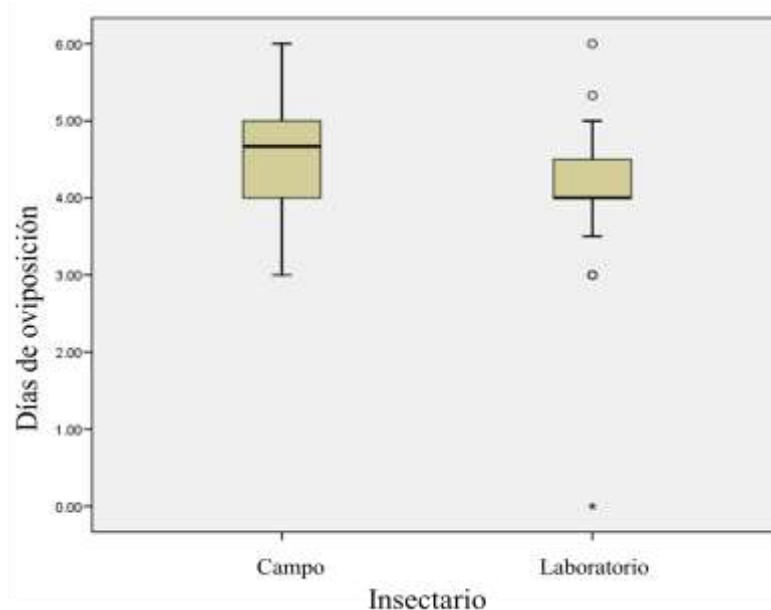


Gráfico 2. Comparación del ciclo gonotrófico de *An. darlingi* entre los insectarios.

Los datos registrados en ambos insectarios demostraron que el rango de oviposiciones de las hembras fue similar entre los insectarios, el cual sucedió entre los 2 a 7 días post alimentación. Sin embargo, existieron diferencias en las tendencias de las oviposiciones diarias entre los insectarios. La mayor tendencia de oviposiciones en el insectario de laboratorio sucedió a los 4 días con un 45.0% (27/60), y a los 5 días con un 21.0% (13/60) post-alimentación; mientras que para el insectario de

campo, la tendencia de oviposición fue casi similar tanto para los 4 y 5 días con un 34.0% (21/62) y 37.0% (23/62) respectivamente (Gráfico 3).

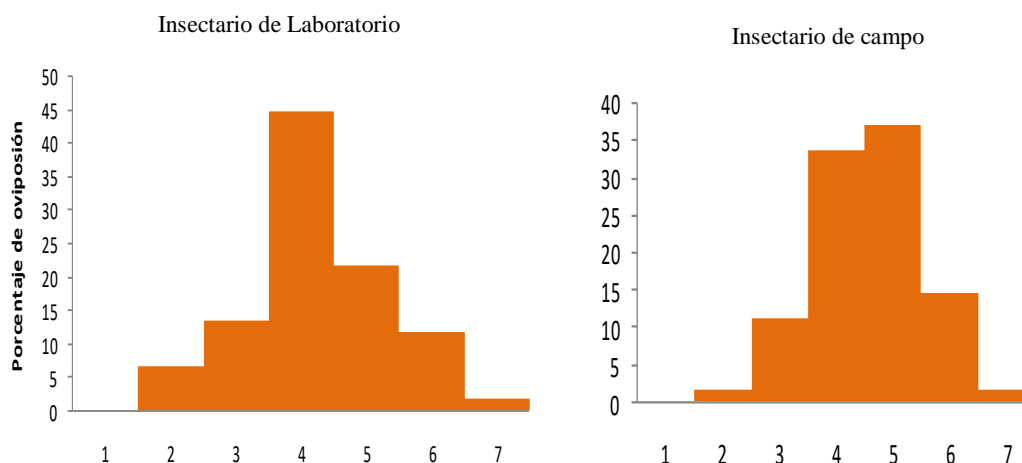


Gráfico 3. Tendencia de las oviposiciones diarias de *An. darlingi* durante la evaluación del ciclo gonotrófico en los insectarios.

Durante este estudio se registró la postura de huevos de 3 hembras en dos veces consecutivas a partir de una misma alimentación entre los 4 a 7 días post-alimentación; también se demostró que *An. darlingi* presenta concordancia gonotrófica, debido a que el 100.0% de los especímenes que colocaron huevos, sólo necesitaron una alimentación sanguínea para la oviposición, registrándose sólo el 1.6% (2/122) ejemplares con dos ciclos gonotrófico, los cuales fueron precedidos por cada alimentación.

4.3. Oviposición relacionada la fotoperiodo

Un total de 180 mosquitos hembras de campo fueron usados para evaluar el fotoperiodo, de las cuales 129 lograron colocar huevos: a) 61 en el Insectario de Laboratorio y b) 68 en el insectario de campo. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la relación del fotoperiodo y tiempo de oviposición para ambos tipos de insectarios, es

decir, *An. darlingi* colocó sus huevos tanto en el día como en la noche (g.l=1, F=0.64, p=0.425) (Gráfico 4).

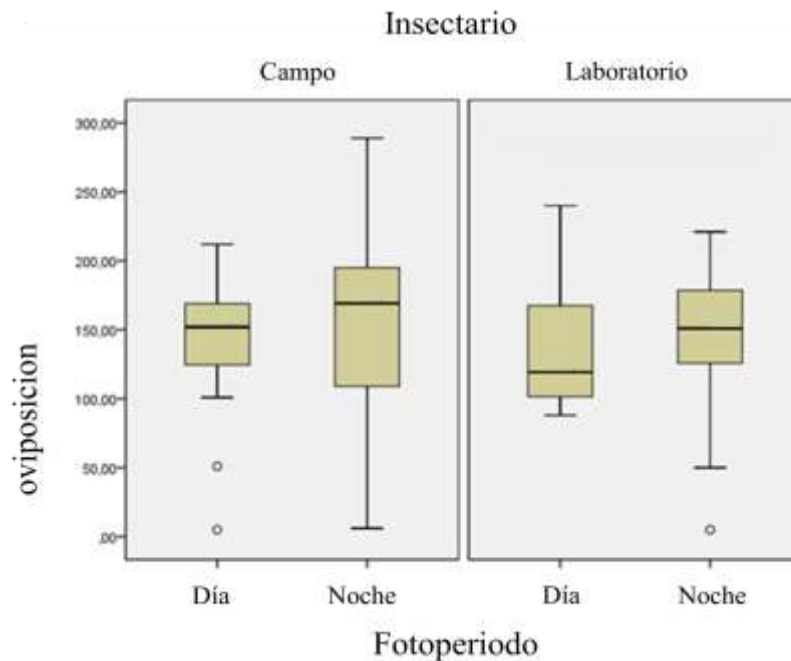


Gráfico 4. Comparación de la oviposición de *An. darlingi* entre el día y la noche para los insectarios de laboratorio y campo.

A pesar que estadísticamente no se encontró diferencias entre los insectarios; sin embargo, se registró ligeras tendencias en las oviposiciones; por ejemplo, en el insectario en laboratorio la tendencia de oviposición fue mayor durante el día con 55.7% (34/61) y menor durante la noche con 44.3% (27/61), mientras que para el insectario en campo la tendencia fue mayor durante la noche con 54.4% (37/68) y menor durante el día con 45.6% (31/68) respectivamente.

4.4. Desarrollo de inmaduros

La duración relativa de los estadios larvales y pupas hasta la emergencia del adulto fue calculado a partir del desarrollo de 40 progenies, observándose que el periodo promedio de larva L1 hasta el adulto fue de 17.1 días, considerando el criterio del 50.0% + 1 de individuos que pasan de un estadio a otro (Tabla. 1), el rango mínimo

de duración de L1 a adulto fue de 10 días y el máximo de 27 días. Se registró que la etapa de desarrollo larval entre L1 a L2 es la de menor tiempo con 2.6 días, mientras que entre L4 a pupa es el de mayor tiempo con 5.4 días. La proporción sexual de adultos emergidos fue de 1.3 hembras por 1 macho, lo cual no representa ninguna diferencia significativa de una relación 1:1 en las proporciones sexuales ($t= 0.60$).

Tabla 1. Duración promedio en días (\pm Desviación estándar) del desarrollo de inmaduros y pupa de *An. darlingi* en el laboratorio.

Etapa	Larva I	Larva II	Larva III	Larva IV	PUPA	Total
a	3.7 (1.1)	5.0 (1.5)	6.0 (2.5)	9.0 (3.5)	1.8 (0.3)	25.7
b	2.6 (0.8)	3.5 (1.4)	4.0 (1.4)	5.4 (2.3)	1.6 (0.3)	17.1

a = Cuando el total de individuos pasaron a la siguiente etapa de desarrollo

b = Cuando 50% + 1 de los individuos pasaron a la siguiente etapa de desarrollo

4.5. Tabla de vida de inmaduros y adultos

La tabla de vida horizontal de inmaduros fue calculada a partir del promedio del desarrollo larval de 40 progenies criadas en el laboratorio. La mayor mortalidad fue registrada entre el cambio del estadio del LI a LII con 40.0% del cohorte inicial de la población, mientras que la mayor supervivencia fue registrada entre el cambio de estadio de LIII a LIV con 100% respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla de vida de valores promedio para las etapas inmaduras de *An. darlingi* en el laboratorio.

Grupo edad	ax	lx	dx	qx	ex
L I	94.2	1.0	0.4	0.4	1.9
L II	56.1	0.6	0.2	0.3	1.9
L III	36.7	0.4	0.0	0.0	1.6
L IV	36.6	0.4	0.1	0.2	0.7
Pupa	29.6	0.3	0.1	0.3	0.3
Adulto	20.6	0.2			

ax = número de organismos al inicio de cada grupo de edad.

lx = proporción de la cohorte original que sobrevive a cada grupo de edad.

dx = proporción de la cohorte original que muere durante cada grupo de edad.

qx = tasa de mortalidad.

ex = Esperanza de vida

La función de supervivencia (l_x) con respecto al grupo de edad en los estadios inmaduros tuvo una tasa de mortalidad (d_x) constante en el tiempo (Gráfico 5) sugiriendo una curva de tipo II, lo que significa que un número constante de larvas mueren entre cada estadio por unidad de tiempo, independientemente del número de larvas que han sobrevivido. Así mismo, la máxima esperanza de vida (e_x) se presentó en los dos primeros estadios LI y LII con 1.9 y 1.9 días, seguidamente fue disminuyendo hasta pupa (Gráfico 6).

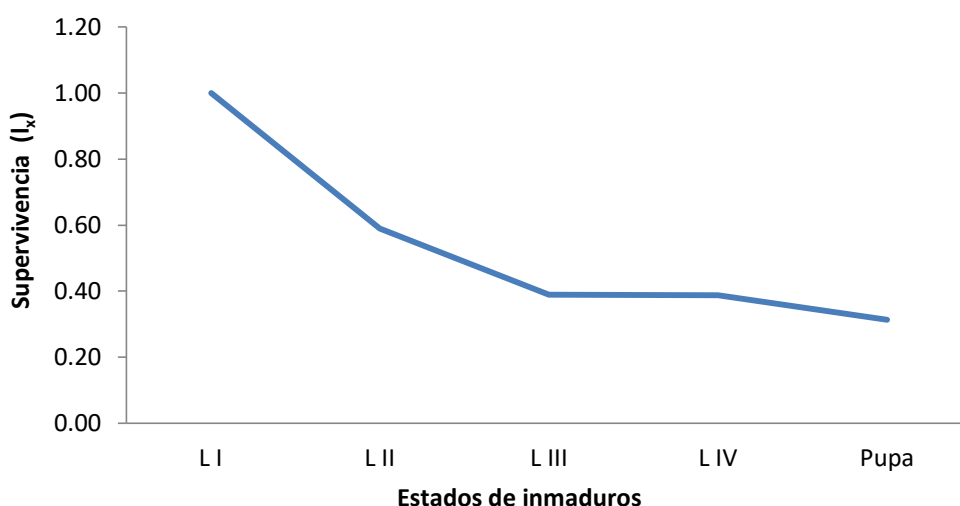


Gráfico 5. Curva de Supervivencia de los estadios inmaduros y pupas de *An. darlingi* en el laboratorio.

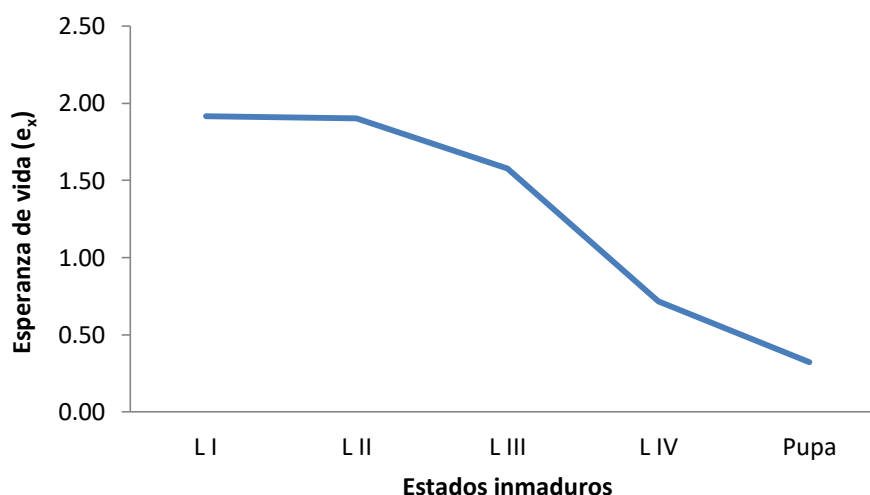


Gráfico 6. Esperanza de vida de los estadios inmaduros y pupas de *An. darlingi* en el laboratorio.

La tabla de vida de los adultos determinó que la supervivencia fue mayor en las hembras con 31 días, mientras que en los machos fue de 19 días. La curva de supervivencia fue similar al de los estados inmaduros, es decir el de tipo II para el cual hay una tasa relativamente constante de individuos que sobreviven conforme transcurre el tiempo (Gráfico 7). La esperanza de vida de las hembras después de la emergencia fue de 16 días, mientras que para los machos fue de 8.6 días, registrándose un descenso progresivo de la esperanza de vida a medida que se incrementa la edad de los adultos (Gráfico 8).

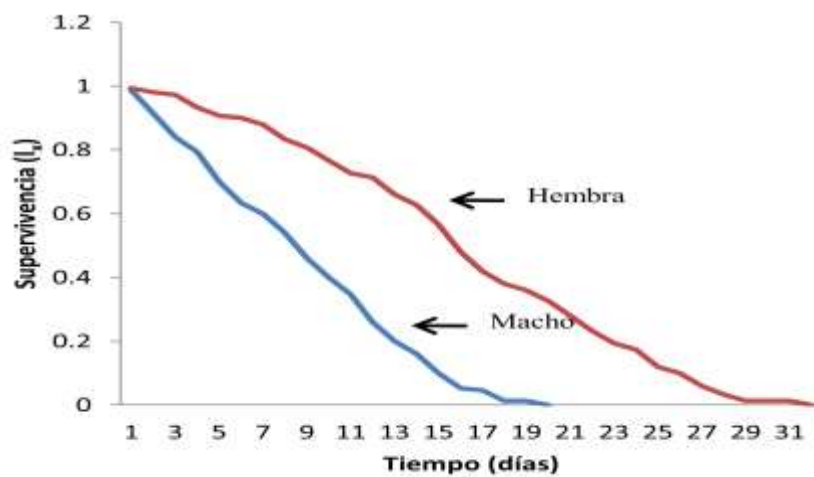


Gráfico 7. Curva de Supervivencia de adultos de *An. darlingi* en el laboratorio.

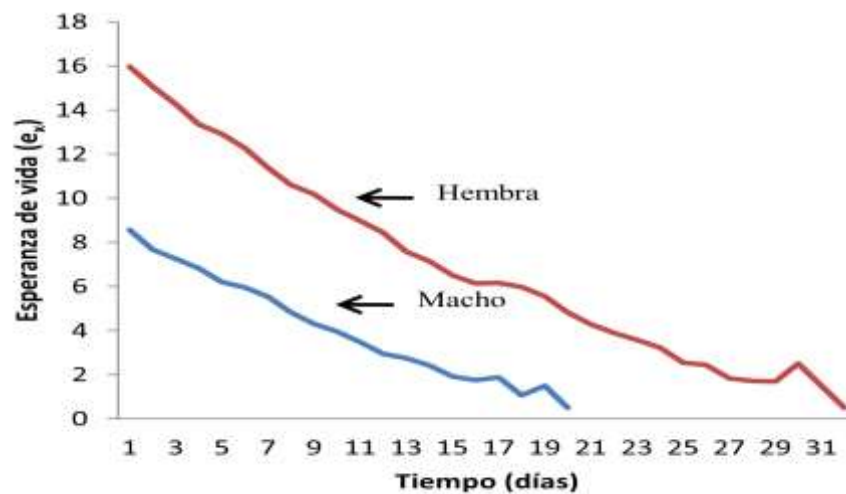


Gráfico 8. Esperanza de vida de adultos de *An. darlingi* en el laboratorio.

4.6. Cópula

Observaciones de las espermatecas y ovoposiciones de las hembras, fueron usadas para calcular el porcentaje de inseminación en el experimento de cópula realizado en jaulas dentro del insectario en laboratorio. Se determinó que el porcentaje de inseminación con estimulación de luz fue de 5.0% (5/100), mientras que sin estimulación de luz fue de 2.0% (2/100) (Gráfico 9 y Figura 3).

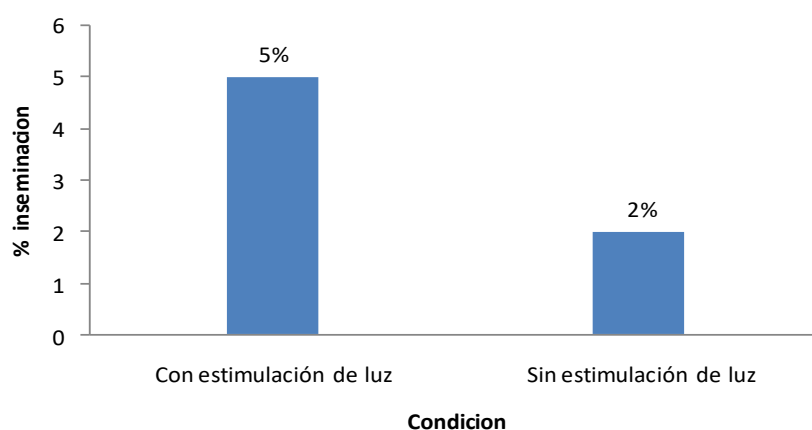


Gráfico 9. Porcentaje de inseminación de *An. darlingi* en jaulas con estimulación de luz y sin estimulación de luz.

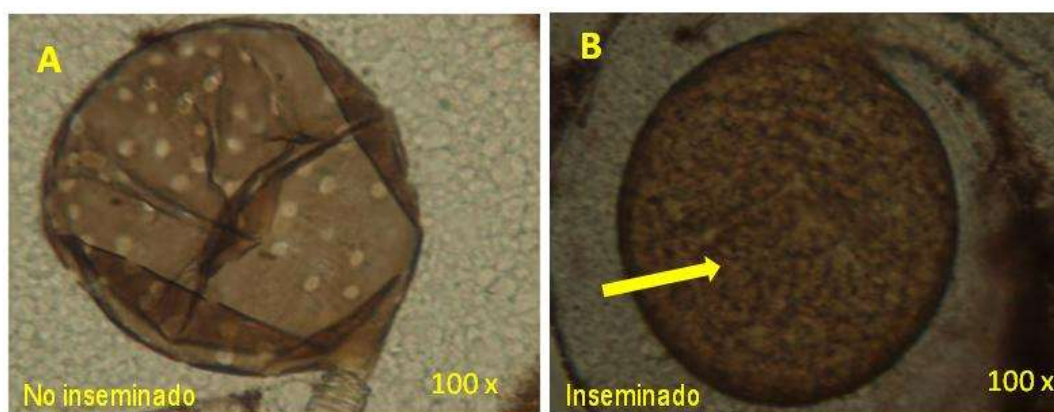


Figura 3. Diferenciación de las espermatecas: A) Espermateca no inseminada y B) Espermateca inseminada con presencia de espermatozoides.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El estudio presenta resultados de la comparación de la bioecología reproductiva de *An. darlingi* silvestres, los cuales fueron mantenidos cautivos en dos insectarios (laboratorio y campo). Así mismo, presenta datos sobre el desarrollo larval y la tabla de vida de los estados inmaduros (larva y pupa) y adultos bajo condiciones controladas. Se podría considerar que una de las limitaciones de este trabajo fue el número relativamente pequeño de mosquitos evaluados, debido a las diferentes variables que se estudiaron; sin embargo, la información que se presenta provee datos importantes que ayudan a esclarecer, parcialmente, los patrones reproductivos de esta especie.

Los resultados demostraron que el desarrollo de los oocitos dentro de los folículos en los ovarios de *An. darlingi* tuvieron un proceso asincrónico, reflejado por la maduración de los huevos en diferentes etapas, a partir de una sola alimentación, patrón registrado en ambos insectarios. Estos resultados se asemejan a las observaciones realizadas por Rúa et al. (2005) en otra especie de anofelino neotropical como es *Anopheles albimanus*, cuando evaluaron el desarrollo de los oocitos bajo condiciones controladas, encontrando que esta especie tuvo un proceso asincrónico en la maduración de sus huevos.

En este estudio también demostramos que a las 48 horas (2 días) post – alimentación la totalidad de los oocitos habían completado la fase V, de acuerdo a la escala de Christopher`s (WHO, 1995); resultados que se asemejan a las observaciones de campo realizadas por Forattini (1962), Charlwood y Wilkes (1979), Robert et al. (1983) y Lounibos et al. (1998), que determinaron que la ovogénesis de *An. darlingi* es completada a las 48 horas. Este mismo resultado fue encontrado para otros vectores de malaria en la cuenca amazónica como en *An. rondoni* y *An. triannulatus* (Lounibos et al. 1998). Similares resultados se encontraron en otras especies de anofelinos potenciales vectores de malaria en las Américas como *An. albimanus* (Rodríguez et al. 1992, Rúa et al. 2005), *An. vestitipennis*

(Arredondo-Jimenez et al. 1998), y *Chagasia bonneae* (Wilkes y Charlwood 1979). Sin embargo, esos resultados difieren con las observaciones realizados en *An. punctimacula*, *An. pseudopunctipennis* (Fernandez et al. 1994, Ulloa et al. 2006), el cual su ovogénesis fue estimado entre las 62-72 horas (2.5-3 d) post-alimentación.

Los datos del presente estudio demostró que el 100% de las hembras que colocaron huevos en ambos insectarios sólo necesitaron de una alimentación con sangre para completar un ciclo gonotrófico, estos resultados son similares a otros resultados de otras especies del subgénero *Nyssorhynchus* de Sudamérica (Lounibos y Conn 1991, Lounibos et al. 1998 a), con excepción de *An. nuneztovari* (Lounibos y Conn 1991) y en *An. cruzii* (Dalla Bona y Navarro-Silva 2010) que necesitan más de una alimentación para completar un ciclo gonotrófico; Sin embargo, en un estudio reciente realizado por Dantas de Oliveira et al. (2012) determinaron que *An. darlingi* necesita de dos o más alimentaciones de sangre para completar su primer ciclo gonotrófico, dependiendo su estado nutricional durante el desarrollo larval.

En el presente estudio, también se comprobó que *An. darlingi* tiene concordancia gonotrófica debido a que se logró observar al menos dos especímenes (3.2%) que completaron dos ciclos gonotróficos consecutivos en el insectario de campo precedidas por cada alimentación con sangre. Sin embargo, este ciclo puede presentar ciertas modificaciones antes de completarlo, por ejemplo, en este estudio se registró 3 individuos (2.5%) del total de ovoposiciones evaluadas en ambos insectarios que colocaron sus huevos hasta en dos oportunidades a partir de una misma alimentación, comportamiento puede estar relacionado con la desincronización en la maduración de los oocitos en el ovario.

El periodo del ciclo gonotrófico de *An. darlingi* en este estudio fue ligeramente mayor en el insectario de campo con 4.7 días con temperatura que varió entre 20 a 31 °C y humedad entre 63 a 92%, a comparación de los 4.0 días en el insectario de laboratorio con temperaturas que varió entre 23.0 a 29.0 °C y una humedad entre 55 a 88 °C. Los resultados son comparables

con las observaciones realizadas por Ahumada et al. (2011), quien realizó estudios en condiciones de laboratorio y con temperaturas controladas que varió entre 24.0 a 30.0 °C, aunque la humedad no es reportada, ellos registraron que el ciclo gonotrófico de *An. darlingi* varió entre 3.6 a 5.0 días, rango que también fue observado en *An. nuneztovari*, *An. punctimacula* y *An. albimanus* (Panday 1977; Rodriguez et al. 1992 y Ulloa et al. 2006). Pero estos datos difieren de las observaciones realizadas por Charlwood y Wilkes (1979); Roberts et al. (1983); y Rivera et al. (1993) quienes mencionan que el ciclo gonotrófico de *An. darlingi* en el medio natural es entre 2.0 - 3.0 días post-alimentación, resultados que también se observó en otras especies de anofelinos neo-tropicales como *An. albitarsis* s.l., *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. homunculus*, *An. bellator*, *An. vestitipennis* (Fernandez-salas et al. 1994; Chadee et al. 1998; Arredondo-Jiménez et al. 1998; Chadee 1999, Kakitani y Forattini 2000; Dos Santos et al. 2002; Rua et al. 2005; y Lardeux et al. 2008), esta diferencia se daría por que nuestras observaciones se hicieron en ambientes controlados, el cual podría haberse generado cierto estrés en los mosquitos, y este daría consecuencia en la descarga de los huevos.

A pesar de que el periodo del ciclo gonotrófico en el insectario de laboratorio y campo tuvieron un promedio de 4.0 y 5.0 días, el rango de la longitud varió entre los 2.0 a 7.0 días en ambos insectarios, esta amplitud podría haberse dado debido a dos factores como: responder al instinto de supervivencia en condiciones no naturales dando consecuencia la rápida oviposición, y a la retención de los huevos en los ovarios debido a que los lugares de postura utilizados en este estudio fueron distintos al medio natural. Dos Santos et al. (2002), en un estudio comparativo determinó que el ciclo gonotrófico de *An. albitarsis* s.l fue mayor en el laboratorio con respecto al campo, y postula que este resultado podría estar influenciado por el espacio limitado y otras condiciones relacionados al confinamiento el cual afectado negativamente el periodo del ciclo gonotrófico y contribuyó a la prolongación del periodo, Lardeux et al. (2008), determinó que la longitud del ciclo gonotrófico de *Anopheles albimanus* estaba influenciado por los cambios de estaciones climatológicas del área.

En la mayoría de las observaciones realizadas tanto en medio natural como en lugares confinados, el patrón de oviposición de *Anopheles* neotropicales ocurren durante el periodo nocturno (Cardozo et al. 2002 y Da Silva et al. 2006), este patrón puede ser principalmente crepuscular y con dos picos de oviposición durante la noche como, *An. albitarsis*, *An. bellator*, *An. homunculus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus* y *An. freeborni* (Chadee et al. 1993; Chadee 1995, 1999; Villarreal et al. 1997 y Chadee et al. 1998). La comparación que se hizo en este estudio sobre el fotoperiodo y oviposición con relación a los insectarios (campo y laboratorio) en *An. darlingi*, tuvieron resultados diferentes a los reportados por los autores arriba mencionados, debido que en este estudio no se encontró un patrón marcado de las oviposiciones entre el día y la noche; sólo se registró una ligera tendencia a ovipositar durante el día en el insectario de laboratorio con el 56.0%, mientras que en el insectario de campo esta ligera tendencia de oviposición fue durante la noche con el 54.0%.

Mendes et al. (1981), menciona que *An. darlingi* se cría con dificultades en condiciones experimentales, lo cual es influenciado por factores como alimentación, temperatura, crecimiento de hongos que influyen en el desarrollo de las larvas contribuyendo a una alta mortalidad y mayor duración del ciclo de vida. Observaciones realizadas en el laboratorio demostraron que el tiempo entre la eclosión de las larvas hasta la emergencia de los adultos en *An. darlingi* tuvo un rango de 12.8 a 14.0 días (Giglioli 1947; Mendes et al. 1981; Buralli y Bergo 1988; Bergo et al. 1990). En este estudio se registró que el tiempo requerido desde la eclosión de las larvas hasta la emergencia del adulto fue de 17.1 días, considerando el criterio del 50.1% + 1 de larvas que pasan de un estadio a otro, mismo criterio tomado para las pupas durante el proceso de emergencia al adulto. Estos resultados difieren casi entre 3.0 – 4.0 días con respecto a los datos reportados por los autores arriba mencionados, sugiriendo que esta diferencia se deba al tipo de alimento utilizado, tipo agua, parámetros químicos del criadero y la metodología de cría utilizada.

Las evaluaciones individuales del desarrollo de los estadios inmaduros en el presente estudio registró que el estadio L1 y pupa son los de menor tiempo,

mientras que L4 es el de mayor tiempo, criándose en un medio con temperatura promedio de 28.3 C y un pH de 6.3, datos similares a los reportados por Mendes et al. (1981); Buralli y Bergo (1988).

El porcentaje de sobrevivencia de L1 hasta la emergencia del adulto fue de 22.0 %, este resultado es bajo si comparamos con los datos reportados por Giglioli (1947); Mendes et al. (1981); Buralli y Bergo (1988); Bergo et al. (1990), los cuales reportaron una supervivencia entre 57.0 – 95.0%; la diferencia podría haberse dado debido a las pequeñas poblaciones evaluadas por los autores mencionados. Mientras que en este trabajo refleja el seguimiento individual de 40 progenies, datos que sustentan lo reportado por Mendes et al. (1981), el cual menciona que *An. darlingi* se cría con dificultad en condiciones experimentales. También se sugiere que ésta reducida supervivencia se deba a otros factores como la competencia por alimento y el grado de canibalismo que presenta esta especie durante el proceso de desarrollo larvario.

El resultado de 17.1 días desde eclosión de L1 hasta la emergencia de los adultos en *An. darlingi* fue mayor con respecto a otras especies de *Anopheles* de las Américas reportadas, por ejemplo en *An. aequalis* reportaron 16,2 días (Delgado 1998, Gómez y Osborn 2002), en *An. nuneztovari* se reportó 10 días (Panday 1977), en *An. albimanus* se reportó entre 8.6 a 12.4 días (Mahmood 1997 y Grieco et al. 2003) y en *An. vestitipennis* 14.2 días (Grieco et al. 2003).

El estudio de longevidad realizado a los adultos de *An. darlingi* en el laboratorio, determinó que 19.0 días fue el tiempo máximo que sobrevivió el macho, mientras que las hembras sobrevivieron hasta los 31.0 días; así mismo, la esperanza de vida (e_x) fue menor en el macho con 8.6 días en relación a los 16.0 días de las hembras. Estos últimos datos de esperanza de vida son diferentes a los observados en *An. albimanus* con 14.1 días en machos y 18.8 días en hembras (Mahmood 1997), y en *An. vestitipennis* con 19.6 días en machos y 24.2 días en hembras (Grieco et al. 2003); la diferencia podría ser debido a que en este estudio se evaluó individuos de generación (F0) a partir de poblaciones de campo, mientras que los autores

mencionados utilizaron individuos procedentes de poblaciones ya colonizados en el laboratorio.

Reisen y Mahmood (1980), mencionan que para transmitir malaria los anofelinos deben tener un tiempo de sobrevivencia entre 7.0 – 14.0 días, además Grieco et al. (2003) mencionaron que la supervivencia de los mosquitos adultos es una herramienta importante para comprender el potencial de cualquier vector de malaria, debido a que el parásito necesita un periodo de tiempo suficiente para completar su ciclo de vida esporogónico. Basado en los resultados del presente estudio, *An. darlingi* cumple con los requisitos, debido a que el tiempo de supervivencia de las hembras fueron mayores a los datos reportados por los autores mencionados arriba, por lo que esta información ayuda a entender la alta capacidad vectorial de esta especie, por lo que se considera como uno de los vectores más importante de malaria en el mundo.

Uno de los grandes desafíos que existe para los entomólogos es tratar de colonizar *Anopheles darlingi* en condiciones controladas. Esta especie es el principal vector asociado a la transmisión de malaria en la cuenca amazónica y responsable del mayor número de casos de malaria en las Américas; sin embargo, ha existido pocos intentos de colonización de esta especie hasta ahora. Una de las experiencias que se reporta con mayor éxito fue la que realizó Giglioli (1947), el cual consiguió obtener hasta 35 generaciones en un laboratorio de campo en Guyana Británica; sin embargo, la metodología descrita no es clara con respecto al seguimiento de las generaciones dentro del laboratorio; por lo tanto, consideramos que esta información necesitaría ser verificada, además las herramientas para una clasificación taxonómica en esa época eran insuficientes, este daría la posibilidad de que la especie colonizada podría tratarse de otra diferente. Otro de los mayores esfuerzos fue realizado por Buralli y Bergo (1988) cuando diseñaron una instalación para establecer una colonización permanente de esta especie en el laboratorio, consiguiendo colonizar sólo hasta la segunda generación. Uno de los principales problemas que se desconoce, es el rol de los estímulos necesarios para lograr el apareamiento de *An. darlingi* en condiciones controladas. Se considera que la formación de

enjambres es muy común en mosquitos como los del género *Anopheles* y probablemente un componente importante en el comportamiento del apareamiento en algunas especies, donde los machos deben cumplir un rol importante en el apareamiento en espacios confinados (Lima et al. 2004). Esta teoría es la más aceptada, debido a que la mayoría de los anofelinos son considerados especies eurígamas, por lo que necesitan grandes espacios para la copula. Sin embargo, Lounibos et al. (1998 b) en un estudio de campo liberó *An. darlingi* vírgenes y consideró que la copula ocurrió a través de interacciones individuales y sin la formación de enjambres, por lo que sugiere, que esta especie tiene estrategias de copula flexible.

Uno de las técnicas que ha funcionado en *An. pseudopunctipennis* para lograr apareamiento en ambientes confinados, fue a través de la estimulación con luz artificial dentro de jaulas (Baerg 1971; Villareal et al. 1997, 1998 y Lardeux et al. 2007), esta misma técnica fue utilizada por Villareal et al. (2001) para aparear *An. darlingi* en jaulas, logrando conseguir hasta 7 generaciones en un insectario de Chiapas en México. Los resultados encontrados en este trabajo demostraron que los especímenes que fueron inducidos con luz lograron una tasa de inseminación de 5.0% en las hembras a diferencia de aquellos no inducidos con sólo 2.0%. Estos datos están por debajo a los reportados por Villareal et al. (2001), este podría darse por los números de especímenes empleados y por la técnica utilizada. Sin embargo, la estimulación con luz puede ser un mecanismo que ayuda a la colonización de esta especie en el futuro, por lo que se recomienda, utilizar mayores densidades dentro de los espacios confinados para lograr el enjambre o la mayor interacción sexual entre los especímenes, de modo que se pueda obtener una mayor tasa de inseminación.

CAPÍTULO VI: PROPUESTA

La malaria es una enfermedad muy antigua en nuestra región, a pesar de su gran impacto en la morbilidad y mortalidad , hasta ahora no se logró erradicarlo sostenidamente, esto se debe a que las autoridades gubernamentales sólo tienen una visión, que se centra básicamente en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad, pero no se enfoca la lucha de una manera conjunta, donde se involucra a la enfermedad y los mecanismos de transmisión, es por eso que casi nada se conoce sobre la naturaleza del vector y el entorno ambiental donde habita y se da el ciclo de transmisión.

Considerándose que *Anopheles darlingi* es el vector primario de la malaria en nuestra región, el cual constituye un serio problema en la salud pública, todos los esfuerzos que se podrían hacer a través de las investigaciones básicas sobre el vector y la enfermedad constituirán herramientas fundamentales para diseñar nuevas estrategias sobre la vigilancia y el control de la malaria. Por lo tanto, este estudio aporta nuevas informaciones o herramientas que ayuden a las autoridades de salud a mejorar y fortalecer los planes de vigilancia y control de la malaria en nuestra región, desde un punto de vista más integral.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

1. *An. darlingi* no presenta un proceso sincrónico en la maduración de sus huevos, éste patrón de ovogénesis fue similar entre los insectarios de laboratorio y campo.
2. El ciclo gonotrófico de *An. darlingi* fue ligeramente más corto en el insectario de laboratorio con respecto al insectario de campo con promedio de 4.0 y 4.7 días respectivamente, con un rango de 2 a 7 días.
3. No se encontraron diferencias estadísticas significativas sobre la preferencia de oviposición de *An. darlingi* entre el día y la noche en ninguno de los insectarios evaluados.
4. No se encontraron diferencias estadísticas significativas sobre la preferencia de oviposición de *An. darlingi* entre el día y la noche en ninguno de los insectarios evaluados.
5. El promedio del desarrollo larval desde el estadio L1 hasta el adulto fue de 17.1 días, con un rango de 10.0-27.0 días.
6. La tasa de supervivencia total desde larva hasta adulto fue de 22.0%, la esperanza de vida fue mayor en los dos primeros dos estadios larvales (L1, L2) con 1,9 y 1, 9 días; mientras que la longevidad en adultos fue mayor en las hembras con 31.0 días, a diferencia de los machos con 19.0 días, de igual modo la esperanza de vida fue mayor en las hembras con 16.0 días, mientras en los machos fue de 8.6 días.
7. El mayor porcentaje de inseminación fue registrada en el experimento con estimulación con luz con 5.0% a diferencia del 2.0% sin estimulación de luz.

CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES

1. Desarrollar experimentos con un mayor número de individuos, de modo que se tenga más datos para su interpretación.
2. Continuar con las observaciones sobre el patrón de oviposición de *An darlingi*, tanto en ambientes controlados como en la naturaleza.
3. Optimizar la metodología de cría de *An. darlingi* en el laboratorio, respecto a la densidad larval, dietas alimenticias y evaluación de los parámetros físico-químico del agua, de modo que se logre mejores resultados en la obtención de ejemplares adultos.
4. Seguir con los estudios de cópula inducida, para lograr mejores resultados en la inseminación de las hembras, con la finalidad de lograr colonizaciones sustentables de esta especie.
5. Desarrollar estudios sobre las condiciones fisiológicas y los requerimientos nutricionales de los mosquitos adultos, con la intención de mejorar la expectativa de vida en el laboratorio, de modo que se puedan optimizar estudios sobre pruebas de vacunas y/o otras pruebas biológicas.

CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHEE N.L., J.P. GRIECO, P. MASUOKA, R. G. ANDRE, D.R. ROBERTS, J. THOMAS, I. BRICENO, R. KING, E. REJMANKOVA. 2006. Use of Remote Sensing and Geographic Information System to Predict Location of *Anopheles darlingi* -Positive Breeding Site with the Sibun River in Belize, Central America. *J Med Entomol* 43(2): 382-392.
2. ACHEE N.L., J.P. GRIECO, R. G. ANDRE, D.R. ROBERTS, E. REJMANKOVA. 2006. Experimental evaluation of overhanging bamboo in *Anopheles darlingi* larval habitat selection in Belize, Central America. *J Vector Ecol* 31(1): 145-151.
3. ACHEE N.L., J.P. GRIECO, E. REJMÁNKOVÁ, R.G. ANDRE, E. VANZIE, J. POLANCO, I. BRICENO, R. KING, D.R. ROBERTS. 2006. Biting patterns seasonal densities of *Anopheles* mosquitoes in the Cayo District, Belize, Central America with emphasis on *Anopheles darlingi*. *J Vector Ecol* 31(1): 45-57.
4. AHUMADA M.L., P. GUTIERREZ, L.I. ORJUELA, D. RUÍZ, M.L. QUIÑONEZ. 2011. The length of the gonotrophic cycle of *Anopheles darlingi* under controlled laboratory conditions. *J Am Mosq Control Assoc* 27(3): 290.
5. ANGELLA A.F., L.H. GIL, L.H. DA SILVA, P.E. RIBOLLA. 2007. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Rondonia, Brazilian Amazon, based on mitochondrial DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(8): 953 - 958.
6. ARAMBURU J., C.R. ASAYAG, R. WITZIG. 1999. Malaria Reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerging Infectious Diseases*. 5(2): 209-215.

7. ARREDONDO-JIMÉNEZ J.I., M.H. RODRÍGUEZ, R.K. WASHINO. 1998. Gonotrophic Cycle and Survivorship of *Anopheles vestitipennis* (Diptera: Culicidae) in two different Ecological Areas of Southern Mexico. *J Med Entomol* 35(6): 937-942.
8. ARRUDA M.E., M.B. CARVALHO, R.S. NUSSENZWEIG, M. MARACIC, A.W. FERREIRA, A.H. COCHRANE. 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immunoassay. *Am J Trop Med Hyg* 35: 873-881.
9. BARTHI A.R., R. CHUQUIYAURI, K.C. BROUWER, J. STANCIL, J. LIN, A. LLANOS-CUENTAS, J.M. VINETZ. 2006. Experimental Infection of the Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 75(4): 610-616.
10. BATES M. 1947. The Laboratory colonization of *Anopheles darlingi*. *J Nat Malar Soc* 6(3): 155 -158.
11. BAERG D.C. 1971. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* in Panama. *J Med Entomol* 8(2): 180-182.
12. BERGO E.S., G.M. BURALLI, J.L. FERREIRA, S. MELLO. 1990. Avaliação do desenvolvimento larval de *Anopheles darlingi* criado em laboratório sob diferentes dietas. *Rev Saúde públ* 24(2): 95-100.
13. BERTI-MOSER J., J. GONZÁLES -RIVAS, E. NAVARRO. 2008. Fluctuaciones estacionales y temporales de la densidad larvaria de *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) y familias de insectos asociados al habitat en el Grazón, Parroquia San Isidro, municipio Sifontes del estado de Bolívar, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 48(2): 177-189.

14. BURALLI G.M., E.S. BERGO. 1988. Manutenção de colônia de *Anopheles darlingi* Root, 1926 em laboratório. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 30 (3): 157-164.
15. CALDERÓN, G., A. CURACA, J. LLANCARI, M. NAPÁN, F. SIPÁN. 1974. Distribución geográfica de los vectores de la malaria en el Perú. *Rev Per Med Trop Univ. San Marcos* 2(2): 88-91.
16. CARDOZO S., A.J. MARTINS, J.B. PEREIRA, D. VALLE. 2002. Temperature influence on embryonic development of *Anopheles albitarsis* and *Anopheles aquasalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(8): 1117- 11120.
17. CHADEE D.D., C. MENDIS, J.C. BEIER. 1993. Diel oviposition periodicity of Anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Americas: *Anopheles albimanus* Wiedemann y *Anopheles freeborni* Aitken. *An Trop Med and Parasitol* 87(5): 501-507.
18. CHADEE D.D. 1995. Diel oviposition patterns of *Anopheles albitarsis* in Trinidad, West Indies. *J Am Mosq Control Assoc* 11(1): 103-106.
19. CHADEE D.D., J.C. BEIER, R.T. MOHAMMED. 1998. Laboratory studies of diel oviposition, fecundity, survival, and gonotrophic cycles in *Anopheles homunculus*. *J Am Mosq Control Assoc* 14(2): 153-158.
20. CHADEE D.D. 1999. Laboratory studies of diel oviposition, fecundity, survival, and gonotrophic cycles of *Anopheles bellator* Dyar and Knab in Trinidad, West Indies. *J Vector Ecol* 24(1):83-90.
21. CHAN A.S.T., J.R. RYAN, M.D. ZYZAK, C. CALAMPA, A.J. MAGILL. 1999. Seasonal abundance, distribution and biting patterns of the Anopheline (Diptera: Culicidae) populations of Iquitos Peru and their relations to the incidence of malaria. Abstracts of the 48h. Meeting of Am J Trop Med Hyg No. 809.

22. CHARLWOOD J.D. 1996. Biological Variation in *Anopheles darlingi* Root. Mem Inst Oswaldo Cruz 91(4): 391-398.
23. CHARLWOOD J.D., T.J. WILKES. 1979. Studies on the age-composition of samples of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in Brazil. Bull Ent Res 69: 337-342.
24. CHRISTOPHERS S.R. 1911. The development of the egg follicle in Anophelines. Paludism 2: 73-89.
25. CONN J.E. 1998. Systematics and population level analysis of *Anopheles darlingi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 93(5): 647-650.
26. CONN J.E., J.H. VINEIS, J.P. BOLLBACK, D.Y. ONYABE, R. WILKERSON, POVOA M.M. 2006. Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-Endemic region of eastern Amazonian Brazil. Am J Trop Med Hyg 74(5): 798-806.
27. CONSOLI R.A.G.B., LOUREÇO-DE-OLIVEIRA. 1994. Principais mosquitos de importação Sanitaria no Brasil. Rio de Janeiro, Instituto Fiocruz 228p.
28. COVA-GARCÍA P., E. SUTIL. 1977. Claves gráficas para la clasificación de Anofelinos de Venezuela. Publicaciones de la División de Endemias rurales. Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. MSAS. Maracay. Venezuela 65p.
29. DALLA-BONA A.C., M.A. NAVARRO-SILVA. 2010. Physiological age and longevity of *Anopheles (Kerteszia) cruzi* Dyar & Knab (Diptera: Culicidae) in the Atlantic Forest of Southern Brazil. Neotropical Entomology 39(2): 282-288.
30. DANTAS DE OLIVEIRA C., W. P. TADEI, F. CAMARGO, P. F. PAOLUCCI, O. MARINOTTI. 2012. Multiple blood meals in *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). Journal of Vector Ecology 37(2): 351-358.

31. DA ROCHA J.A.M., S. B. DE OLIVEIRA, M. M. POVOA, L.A. MOREIRA, A. U. KRETTLI. 2008. Malaria vectors in Areas of Plasmodium falciparum Epidemic Transmission in the Amazon region, Brazil. Am J Trop Med Hyg 78(6): 872 - 877.
32. DA SILVA-VASCONCELOS A., M.Y. NEVES, E. NEVES, R. TADEU, R.N. DA LUZ, A. SIBAJEV, P. TSOURIS, M.M. PÓVOA, H. MOMEN, M. G. ROSA-FREITAS. 2002. Biting Indices, Host-seeking Activity and Natural Infection Rates of Anopheline Species in Boa Vista, Roraima, Brazil from 1996 to 1998. Mem Inst Oswaldo Cruz 97(2): 151-161.
33. DA SILVA A.N.M., C.C.B. DOS SANTOS, R.N.L. LACERDA, E.P. SANTA ROSA, R.T.L. DE SOUZA, D. GALIZA, I. SUCUPIRA, J.E. CONN, M.M. POVOA. 2006. Laboratory colonization of Anopheles aquasalis (Diptera: Culicidae) in Belém, Para, Brazil. J Med Entomol 43(1): 107-109.
34. DA SILVA A.N.M., C.C.B. SANTOS, R.N. LACERDA, R.L.D. MACHADO, M.M. POVOA. 2006. Susceptibility of Anopheles aquasalis and An. darlingi to Plasmodium vivax VK210 and VK247. Mem Inst Oswaldo Cruz 101(5): 547-550.
35. DEANE LM, CAUSEY OR, DEANE MP. 1948: Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. Rev Serv Espec Saude Publ, 1:827-965.
36. DELGADO N., Y. RUBIO-PALIS. 1993. Identificación de Anopheles (Nyssorhynchus) (Diptera: Culicidae) occurring in western Venezuela. Mosq Sist 25: 222-230.
37. DELGADO N. 1998. Parámetros demográficos de las fases inmaduras de Anopheles aquasalis Curry (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Bol Entomol Venez 13(1): 27-43.

38. DOS SANTOS R., O.P. FORATTINI, M.N. BURATTINI. 2002. Laboratory and Field Observations on Durations of Gonotrophic Cycle of *Anopheles albitarsis* s.l. (Diptera: Culicidae) in Southeastern Brazil. *J Med Entomol* 39(6): 926-930.
39. FARAN M.E., K.J. LINTHICUM. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst* 13(1): 1-81.
40. FARAN M.E. 1980. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revisión of the *Albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*, Contributions to the American Entomological Institute, Ann Arbor 15(7): 1-214.
41. FREIRE S.A., G.S. FARÍA. 1947. Criação e Alguns dados sobre a biología do *Anopheles* (*N.*) *darlingi*. *Rev Brasil. Biol* Río de Janeiro 7(1): 57-66.
42. FERNÁNDEZ R., G.B. SCHOELER, F. CARBAJAL, C. FLORES. 2002. Updated Listing of the Mosquitoes Species. 68h Meeting of AMCA. Poster Presentation No. 15.
43. FERNÁNDEZ R., F. CARBAJAL, J. QUINTANA, H. CHAUCA, D.M. WATTS. 1996. Presencia de *A. (N) darlingi* (Diptera: Culicidae), en alrededores de la ciudad de Iquitos, Loreto-Perú. *Boletín de la Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales* 5: 10-20.
44. FERNANDEZ-SALAS I., M.H. RODRIGUEZ, D.R. ROBERTS. 1994. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) in the Tapachula foothills of southern Mexico. *J Med Entomol* 31(3): 340-347.
45. FLORES-MENDOZA C., R. FERNÁNDEZ, K.S. ESCOBEDO-VARGAS, Q. VELA, G.B. SCHOELER. 2004. Natural *Plasmodium* infections in

- Anopheles darlingi and Anopheles benarrochi (Diptera: Culicidae) from eastern Perú. J Med Entomol 41: 489-494.
46. FORATTINI O. P. 1962. Entomologia Médica. Vol I. Parte General, Diptera, Anopheline. Faculdade de Higiene e Saúde Pública. São Paulo, 662p.
47. FORATTINI O.P. 1987. Exophilic behavior of Anopheles darlingi Root in a southern region of Brazil. Rev Saúde Publica 21(4): 291-304.
48. FORATTINI O.P. 2002. Culicidología Médica, Volumen 2: Identificación, Biología, Epidemiología. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 860 p.
49. GERBERG E.J., D. R. BARNARD, R.A. WARD. 1994. Manual for mosquito Rearing and Experimental Techniques. Am Mosq Contr Assoc. Bull # 5 98p.
50. GIGLIOLI G. 1947. Laboratory colony of Anopheles darlingi. J Natl Malar Soc 6(3): 159-164.
51. GIROD R., P. GABORIT, R. CARINCI, J. ISSALY, F. FOUQUE. 2008. Anopheles darlingi bionomics and transmisión of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and Plasmodium malariae in Amerindian villages of the Upper-Maroni Amazonian forest, French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz 103(7): 702-710.
52. GÓMEZ C., F. OSBORN. 2002. Efectos de diferentes concentraciones Salinas sobre el desarrollo de larvas y pupas de Anopheles aquasalis Curry, 1932 (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Entomotropica 17(2): 121-127.
53. GONZÁLES R., R. WILKERSON, M.F. SUÁREZ, F. GARCÍA, G. GALLEGO, H. CÁRDENAS, C.E. POSSO, M.C. DUQUE. 2007. A population genetics study of Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae) from

- Colombia based on random amplified polymorphic DNA-polymerase Chain reaction and amplified fragment length polymorphism markers. Mem Inst Oswaldo Cruz 102(3): 255-262.
54. GRIECO J.P., N.L. ACHEE, D.R. ROBERTS, R. G. ANDRE. 2005. Comparative Susceptibility of three species of Anopheles from Belize, Central America, to Plasmodium falciparum (NF-54). J Am Mosq Control Assoc 21(3): 279-290.
55. GRIECO J.P., N.L. ACHEE, I. BRICENO, R. KING, R. ANDRE, D. ROBERTS, E. REJMANKOVA. 2003. Comparison of life table attributes from newly established colonies of Anopheles albimanus and Anopheles vestitipennis in the northern Belize. J Vector Ecol 28(2): 200-2007.
56. GUIMARAES A.E., C. GENTILE, J. ALENCAR, C. MACEDO, R. PINTO. 2004. Ecology of Anopheline (Diptera, Culicidae), malaria vectors around the Serra da Mesa Reservoir, State of Goiás, Brazil. 1- Frequency and climatic factor. Cad Saúde Pública 20(1): 291-302.
57. GUTIÉRREZ L.A., G.F. GÓMEZ, J.J. GONZÁLES, M. I. CASTRO, S. LUCKHART, J.E. CONN, M.M. CORREA. 2010. Microgeographic Genetic Variation of the Malaria Vector Anopheles darlingi Root (Diptera: Culicidae) from Córdoba and Antioquia, Colombia. Am J Trop Med Hyg 83(1): 38-47.
58. HIWAT H., G. BRETAS. 2011. Ecology of Anopheles darlingi Root with respect to vector importance: a review. Parasites & Vectors 4: 177.
59. HARRIS A.F., A. MATIAS-ARNÉZ, N. HILL. 2006. Biting time of Anopheles darlingi in the Bolivian Amazon and implications for control of malaria. Royal Soc of Trop Med and Hyg 100: 45-47.
60. <https://www.vectorbase.org/organisms/anopheles-darlingi>.

61. HUDSON J.E. 1984. *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in the Surinam rain forest. *Bull Ent Res* 74: 129-142.
62. JONES, W. J., M. J. TURELL, M. R. SARDELIS, D. M. WATTS, E. C. RUSSELL, R. FERNÁNDEZ, F. CARBAJAL, J. E. PECOR, C. CALAMPA, T.A. KLEIN. 2004. Seasonal Distribution, Biology, and Human Attraction Patterns of Culicine Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a Forest near Puerto Almendras, Iquitos, Peru. *J Med Entomol* 41(3): 349-360.
63. KAKITANI I., O.P. FORATTINI. 2000. Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albitarsis* L. em área de agroecossistema irrigado. *Rev Saúde públ* 34(1): 33-38.
64. KLEIN T.A., J.P. LIMA, M.S. TADA, R. MILLER. 1991. Comparative susceptibility of Anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection with *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 45(4): 463-470.
65. LARDEUX F.J., V. QUISPE, R. TEJERINA, R. RODRÍGUEZ, L. TORREZ, B. BOUCHITÉ, T. CHÁVEZ. 2007. Laboratory colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* (Diptera: Culicidae) without forced mating. *C.R. Biologies* 330: 571-575.
66. LARDEUX F.J., R.H. TEJERINA, V. QUISPE, T.K. CHÁVEZ. 2008. A physiological time analysis of the duration of the gonotrophic cycle of *Anopheles pseudopunctipennis* and its implications for malaria transmission in Bolivia. *Malaria Journal* 7:141 doi: 10.1186/1475-2875-7-141.
67. LEÓN W., J. VALLE, R. NAUPAY, E. TINEO, A. ROSAS, M. PALOMINO. 2003. Comportamiento estacional del *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *darlingi* Root 1926 en localidades de Loreto y Madre de Dios, Perú 1999 - 2000. *Rev Perú Med Exp Salud Pública* 20(1): 22-27.

68. LIMA J.B.P., D. VALLE, A.A. PEIXOTO. 2004. Adaptation of a South American malaria vector to laboratory colonization suggests faster-male evolution for mating ability. *BMC Evolutionary Biology* 4:12, <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/4/12>.
69. LINTHICUM K.J. 1988. A revisión of the *Argyritarsis* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Mosquito Syst* 20(2): 101-271.
70. LÓPEZ - SIFUENTES V., K. ESCOBEDO-VARGAS, C. TONG, J. RAMÍREZ, D. FLORIN, J. VINETZ. 2008. Laboratory colonization of *Anopheles darlingi* and *An. benarrochi* (Diptera: Culicidae) for experimental infections with parasites of *Plasmodium* spp. in the Amazon Region, Iquitos-Peru. *Amer Mosq Control Assoc*, 2- 6 March. Poster N° P-37.
71. LOUNIBOS L.P., J. CONN. 1991. Fecundity, Parity, and adult feeding relationship among *Nyssorhynchus malaria* vectors from Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86(1): 57-66.
72. LOUNIBOS L.P., D. COUTO-LIMA, R. LOURENCO-DE-OLIVERA, R.L. ESCHER, N. NISHIMURA. 1998a. Egg Maturation in Neotropical Malaria Vectors: one blood meal is usually enough. *J Vector Ecol* 23(2): 195-201.
73. LOUNIBOS L.P., D. COUTO-LIMA, R. LOURENCO-DE-OLIVERA. 1998b. Prompt mating of released *Anopheles darlingi* in western Amazonian Brazil. *J Am Mosq Control Assoc* 14(2): 210-213.
74. LOUNIBOS L.P., J.E. CONN. 2000. Malaria vector heterogeneity in South America. *Am Entomol* 46: 238-249.
75. MAGRIS M., Y. RUBIO-PALIS, C. MENARES y L. VILLEGAS. 2007. Vector bionomics and malaria transmission in the Upper Orinoco River, Southern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(3): 303-311.

76. MAHMOOD, F. 1997. Life-table attributes of *Anopheles albimanus* (Weidemann) under controlled laboratory conditions. *J Vector Ecol* 22: 103-108.
77. MANGUIN S., R.C. WILKERSON, J.E. CONN, Y. RUBIO-PALIS, J. A. DANOFF-BURG, D.R. ROBERTS. 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic marker. *Am J Trop Med Hyg* 60(3): 364-376.
78. MANGUIN S., D.R. ROBERTS, R.G. ANDRE, E. REJMANKOVA, S. HAKRE. 1996. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) Larval habitats in Belize, Central America. *J Med Entomol* 33(2): 205-2011.
79. MANUAL DE CAPACITACIÓN EN ENTOMOLOGÍA DE LA MALARIA. 2012. Para Técnicos en Entomología y Control Vectorial (Nivel Básico). Agencia Para el Desarrollo Internacional de los Estados Unidos de América. 83 p.
80. MENDES J.M., E.P. CONTEL, W.E. KERR. 1981. Biología de anofelinos amazónicos, 1-Ciclo biológico, postura e estádios larvais de *Anopheles darlingi* Root 1926 (Diptera: Culicidae) da Rodovia Manaus - Boa Vista. *Acta Amazonica* 11(4): 797-789.
81. MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ - DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA [MINSA - DGE]. 2010. *Bol Epidemiol* 19(52): 1095-1128.
82. MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ - DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA [MINSA - DGE]. 2011. *Bol Epidemiol* 20(52): 1098-1141.

83. MIRABELLO L., J.E. CONN. 2006. Molecular populations genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity* 96: 311-321.
84. MOUTINHO P.R., L.H. SOARES, R.B. BASTOS, P. E. MARTINS. 2011. Populations dynamics, structure and behavior of *Anopheles darlingi* in a rural settlement in the Amazon rainforest of Acre, Brazil. *Malaria Journal* 10: 174.
85. MOREIRA-FERRO C.K., M. MARINOTTI, M.T. BIJOVSKY. 1999. Morphological and biochemical analyses of the salivary glands of the malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Tissue & Cell* 31(3): 264-273.
86. MORALES-AYALA F. 1971. A list of the Mosquitoes of Perú (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst Newsletter* 3(3): 138-145.
87. NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES (NIAID). 2010. *Methods in Anopheles Research USA*.
88. OKUDA K., A. CAROCI, P. RIBOLLA, O. MARINOTTI, A. G. DE BIANCHI, A.T. BIJOVSKY. 2005. Morphological and enzymatic analysis of the midgut of *Anopheles darlingi* during blood digestion. *J Insect Physiology* 51: 769-776.
89. PANDAY R.S. 1977. *Anopheles nuneztovari* and malaria transmission in Surinam. *Mosquito News* 37(4): 728-737.
90. PECOR, J.E., J. JONES, M.J. TURELL, R. FERNÁNDEZ, F. CARBAJAL, M. O'GUINN, M. SARDALIS, D. WATTS, M. ZYZAK, C. CALAMPA, T. KLEIN. 2000. Annotated checklist of the mosquito species encountered during arboviral studies in Iquitos, Perú (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc* 16(3): 210-218.
91. PINEDO-CANCINO V., P. SHEEN, E. TARAZONA-SANTOS, W.E. OSWALD, C. JERI, A.Y. VITTOR, J. A. PATZ, R.H. GILMAN. 2006.

Limited diversity of *Anopheles darlingi* in the Peruvian Amazon Region of Iquitos. *Am J Trop Med Hyg* 75(2): 238-245.

92. PÓVOA M.M., R.T.L. DE SOUZA, R.N.L. LACERDA, E.S. ROSA, D GALIZA, J.R. DE SOUZA, R.A. WIRTZ, C.D. SCHLICHTING, J.E. CONN. 2006. The importance of *Anopheles albitarsis* and *An. darlingi* in human malaria transmission in Boa Vista, state of Roraima, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(2): 163-168.
93. RABINOVICH J. 1980. *Introducción a la Ecología de Poblaciones animales*. CECSA. Comp. Edit. Continental. México. 313 pp.
94. REINBOLD-WATSSON D.D, M.R. SARDELIS, J.W. JONES, D. M. WATTS, R. FERNANDEZ, F. CARBAJAL, J. E. PECOR, C. CALAMPA, T.A. KLEIN, M.J. TURELL. 2012. Determinants of *Anopheles* Season Distribution Patterns across a Forest to Peruvian Gradient near Iquitos, Perú. *Am J Trop Med Hyg* 86(3): 459-463.
95. REJMÁNKOVÁ E., Y. RIBIO-PALIS, L. VILLEGAS. 1999. Larval Habitats of Anopheline Mosquitoes in the Upper Orinoco, Venezuela. *J Vector Ecol* 24(2): 130-137.
96. RIBEIRO A.K, M. ARRUDA, A.A.R. D'ALMEIDA, R. WIRTZ, L.P. LOUNIBOS, R.H. ZIMMERMAN. 2007. Malaria vector incrimination in three rural riverine villages in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 76(3): 461-469.
97. RIVERA L., D. CANALES, M. NELSON. 1993. Observations of the gonotrophic cycle of Anophelines (Diptera: Culicidae) in Honduras. *J Am Mosq Control Assoc* 9(4): 442.
98. ROBERTS D.R., W.D. ALECRIN, A.M. TAVARES, K.M. MCNEILL. 1983. Field observations on the gonotrophic cycle of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 20(2): 189-192.

99. RODRIGUEZ M.H., D.N.BOWN, J.I. ARREDONDO-JIMENEZ, C.VILLARREAL E.G. LOYOLA, C.E. FREDERICKSON. 1992. Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) in southern Mexico. *J M Entomol* 29(3): 395-399.
100. ROZENDAAL J.A. 1990. Observations on the distribution of Anophelines in Surinam with particular reference to the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(2): 221-234.
101. RÚA G.L, M.L. QUIÑONES, I.D. VÉLEZ, J.S. ZULUAGA, W. ROJAS, G. POVEDA, D. RUÍZ. 2005. Laboratory estimation of effects of increasing temperatures on the duration of gonotrophic cycle of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(5): 515-520.
102. RUBIO-PALIS Y., S. MANGUIN, C. AYESTA, H. GUZMÁN, J.M. ARCIA, J. J.R. GONZALES, E. PEREZ. 1997. Revisión taxonómica de los anofelinos vectores de malaria en el sur de Venezuela. *Bol Dir Malariol San Amb* 37: 35-48.
103. RUBIO-PALIS Y. 1998. Caracterización Morfométrica de poblaciones del vector de malaria *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Bol Entomol Venez* 13(2): 141-172.
104. RUBIO-PALIS Y. 2000. *Anopheles (Nyssorhynchus)* de Venezuela: Taxonomía, Bionimia, Ecología e Importancia Médica. Publicación de la Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental "Dr. Arnoldo Gabaldon", Maracay. Venezuela. 120p.
105. RUBIO-PALIS Y., C. MENARE, A. QUINTO, M. MAGRIS, M. AMARISTA. 2005. Caracterización de criaderos de anofelinos (Diptera: Culicidae) vectores de malaria del Alto Orinoco, Amazonas, Venezuela. *Entropica* 20(1): 29-38.

106. SCARPASSA V.M., J.E. CONN. 2007. Population genetic structure of the major malaria vector *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using microsatellite markers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(3): 319-327.
107. SCHOELER G.B., C. FLORES-MENDOZA, R. FERNÁNDEZ, J. REYES, M. ZYZAK. 2003. Geographical Distribution of *Anopheles darlingi* in the Amazon Basin Region of Perú. *J Am Mosq Control Assoc* 19(4): 286-296.
108. SHANNON R. C. 1933. Anophelines of the Amazon Valley, *Proc Ent Soc Wash* 35(7). 117-143.
109. SOARES GIL L. H., F. P. ALVES, H. ZIELER, J. M. B. SALCEDO, R.R. DURLACHER, R.P.A. CUNHA, M. S. TADA, L.M.A. CAMARGO, E.P. CAMARGO, L. H. PEREIRA- DA-SILVA. 2003. Season malaria transmission and variation of Anopheline density in two distinct endemic areas in Brazilian Amazonia. *J Med Entomol* 40(5):636 - 641.
110. STANDARD OPERATING PROCEDURES - SOP. 2012. Methodology for the rearing and maintenance of *Anopheles darlingi* colony in the laboratory. Naval Medical Research Unit Six (NAMRU-6), Entomology Department, Iquitos Peru.
111. TADEI W. P., B. DUTARY. 2000. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 42(2): 87-94.
112. TADEI W.P., B. DUTARY, J.M.M. SANTOS, V.M. SCARPASSA, I.B. RODRIGUES, M. SILVA. 1998. Ecologic observations on Anopheline vector of malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 59(2): 325-335.

113. TOLEDO M.T., N.A. HONORIO, C. FLORES-MENDOZA, R. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, O. MARINOTTO, J.K. KLOETZEL. 1999. Comparative susceptibility of two members of the *Anopheles oswaldoi* complex, *An. oswaldoi* and *An. konderi*, to infection by *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93:381-384.
114. ULLOA A., L. GONZALEZ-CERON, M.H. RODRIGUEZ. 2006. Host Selection and Gonotrophic cycle length of *Anopheles punctimaculata* in southern Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 22(4): 648-653
115. VILLARREAL C., J.I. ARREDONDO-JIMENEZ, RODRIGUEZ 1997. Establishment of a mating colony of *Anopheles pseudopunctipennis* in Chiapas, southern Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 13(2): 118.
116. VILLARREAL C., J.I. ARREDONDO-JIMENEZ, M.H. RODRIGUEZ, A. ULLOA. 1998. Colonization of *Anopheles pseudopunctipennis* from Mexico. *J Am Mosq Control Assoc* 14(4): 369-372.
117. VILLARREAL C., J.I. ARREDONDO-JIMENEZ, I. R. MALO, M.H. RODRIGUEZ 2001. Colonization of *Anopheles darlingi* from the Lacandon Forest, Chiapas, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc*, Abstract Book, 12LB02:20-21.
118. VITTOR A.Y., R.H. GILMAN, J. TIELSCH, G. GLASS, T. SHIELDS, W. SÁNCHEZ, V. PINEDO-CANCINO, J. PATZ. 2006. The Effect of Deforestation on the Human-Biting rate of *Anopheles darlingi*. The primary vector of falciparum malaria in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 74(1): 3-11.
119. VITTOR A.Y., W. PAN, R.H. GILMAN, J. TIELSCH, G. GLASS, T. SHIELDS, W. SÁNCHEZ-LOZANO, V. V. PINEDO, E. SALAS-COBOS, S. FLORES, J. PATZ. 2009. Linking Deforestation to Malaria in the Amazon: Characterization of the Breeding Habitat of the Principal Malaria Vector, *Anopheles darlingi*. *Am J Trop Med Hyg* 81(1): 5-12.

120. VOORHAM J. 2002. Intra-population plasticity of *Anopheles darling's* (Diptera, Culicidae) biting activity patterns in the state of Amapá, Brazil. *Rev Saúde Pú* 36(1): 75-80.
121. WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 1975. Manual on Practical Entomology in Malaria. Part II: Methods and Techniques, Geneva, 197 p.
122. WILKES T.J., J.D. CHARLWOOD. 1979. A rapid gonotrophic cycle in *Chagasia bonneae* from Brazil. *Mosquito News* 39(1): 137-139.
123. ZIMMERMAN R.H. 1992. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87(Suppl III): 371-383.
124. ZEILHOFER P., E. SOARES, A. L.M. RIBEIRO, R. D. MIYAZAKY, M. ATANAKA. 2007. Habitat suitability mapping of *Anopheles darlingi* in the surroundings of the Manso hydropower plant reservoir, Mato Grosso, Central Brazil. *International Journal Health Geographics* 6: 7, doi: 10.1186/1476-072X-6-7.

ANEXOS

**Anexo 1. Política sobre las colectas con cebo humano de artrópodos,
NAMRU-6, 2007**

1o de marzo de 2007

MEMORANDUM

DE: Director del Programa de Entomología NMRCD Lima

PARA: Personal de Entomología

ASUNTO: POLÍTICA SOBRE LAS COLECTAS CON CEBO HUMANO DE
ARTROPODOS

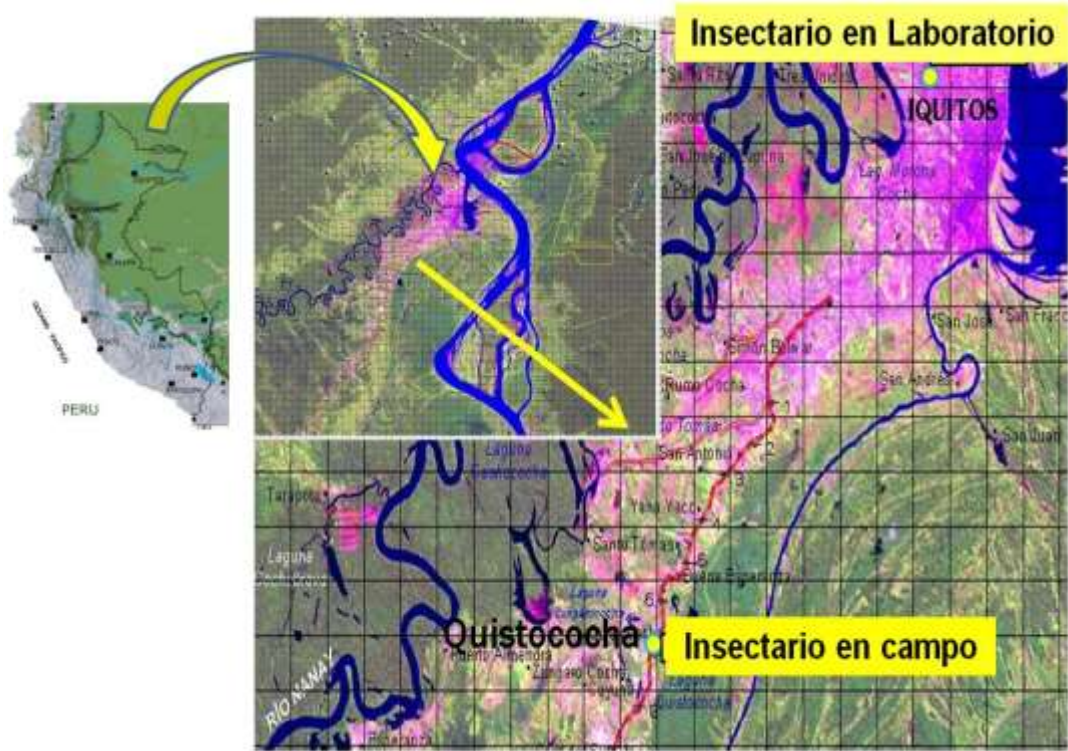
1. Las colectas con cebo humano (sigla en inglés: HLCs) constituyen una técnica valiosa para la colecta de ciertas especies de artrópodos tales como los mosquitos Anopheles que no son atraídos por la luz o por las trampas con cebo CO₂. Sin embargo, las colectas con cebo humano implican cierto riesgo de transmisión de la enfermedad a las personas que están conduciendo las colectas. Por ejemplo, durante la colecta de mosquitos Anopheles en una zona endémica de malaria, existe cierto riesgo de transmisión de malaria al (los) colector(es) ya que es posible que los mosquitos reposen, se alimenten de sangre y transmitan parásitos antes que sean colectados. Por lo tanto, es importante que todo el personal de entomología de NMRCD conozca los siguientes lineamientos de la política sobre las colectas con cebo humano:
 - a. Nunca se le pondrá al personal de entomología de NMRCD en la situación en que la participación en las colectas con cebo humano sea obligatorio. Las colectas con cebo humano siempre serán totalmente voluntarias. Si es que el empleado decide no participar en las colectas con cebo humano, el desenvolvimiento y evaluación de su trabajo nunca tendrá impacto adverso alguno. El personal que participe en las colectas con

cebo humano no recibirá ningún tipo de reconocimiento monetario adicional ni otro tipo de incentivo por su participación. Se aplicará una tarifa de pago normal durante la tarea de colecta; sin embargo, al personal que exceda las horas de trabajo establecidas mientras que dirige las colectas con cebo humano, se le otorgará tiempo libre en compensación.

- b. Se instruirá a los doctores de Medicina Ocupacional de NMRCO antes de conducir cualquier colecta con cebo humano. Si es que ellos consideran que el riesgo de transmisión patógena/parásito en una tarea específica es demasiado alto, entonces no se llevará a cabo dicha colecta con cebo humano en particular. Si es que el doctor de Medicina Ocupacional de NMRCO lo recomienda, se le hará profilaxis a los equipos de las colectas con cebo humano con la finalidad de reducir el riesgo de transmisión de parásito.
2. En caso que tuviera alguna pregunta, por favor no dude en llamarme o enviarme un correo electrónico.

D. A. FLORIN

Anexo 2. Área de estudio



Fuente: Imagen satelital Landsat TM de la carta nacional 8P 2001.

Anexo 3. Insectario en campo: A) Vista lateral y B) Vista interior



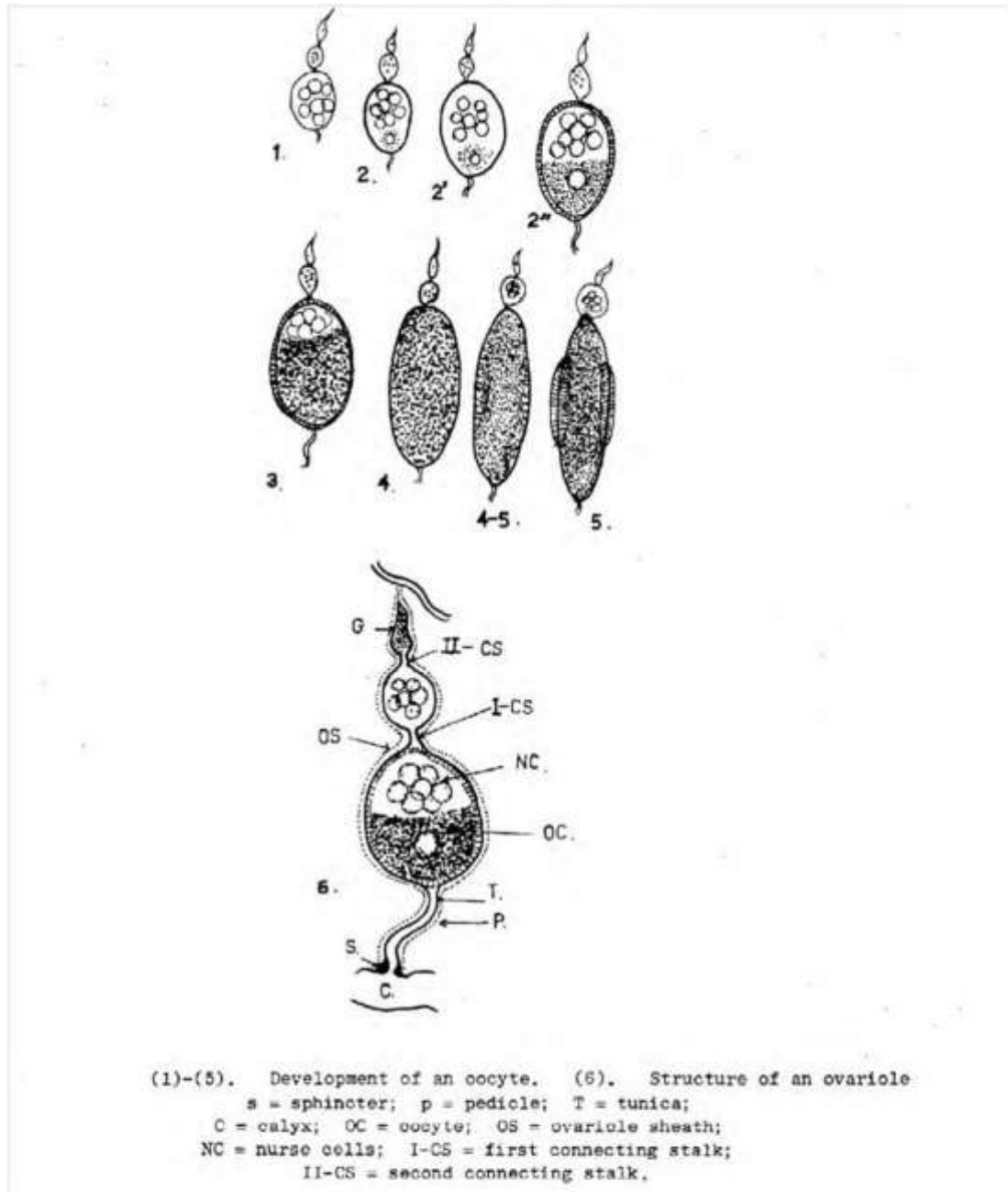
Anexo 4. Insectario en laboratorio: A) Vista de frente, B) Cuarto de taxonomía, C) Cuarto de adultos y D) Cuarto de cría.



Anexo 5. Proceso para el estudio de la ovogénesis

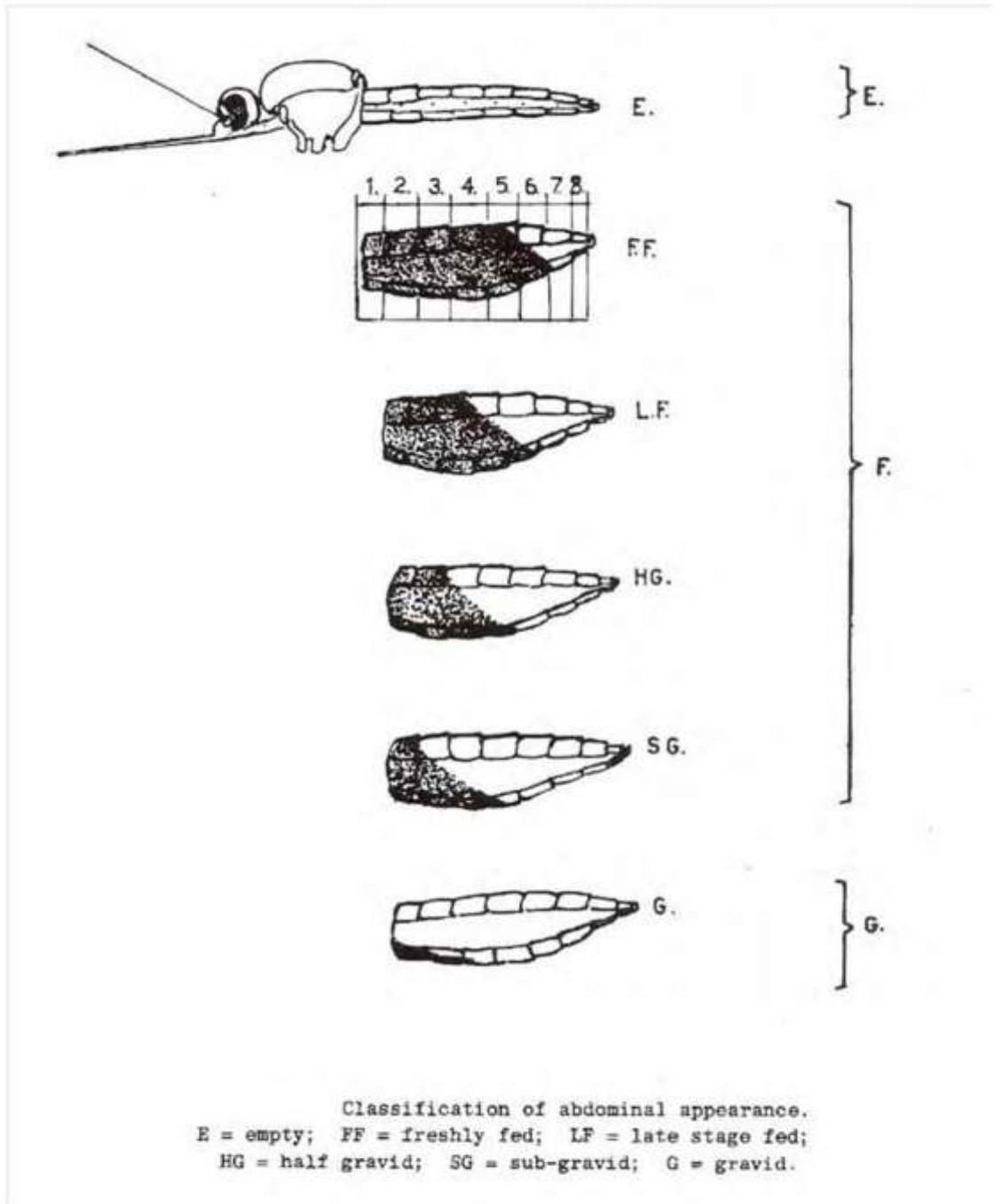


Anexo 6. Fases de desarrollo de los oocitos en mosquitos (WHO, 1975)



(1) – (5). Desarrollo de un oocito, (6). Estructura de un ovariole
s = esfínter; p = pedículo; T = túnica; C= cáliz,; OC = oocito; OS = vaina del ovario;
NC = células trofocitos; I-CS = primer tallo de conexión; II-CS = segundo tallo de conexión.

Anexo 7. Clasificación de la apariencia abdominal en mosquitos (WHO, 1975)



Clasificación de la apariencia abdominal.
 E = vacío; FF = recién alimentado; LF = alimentación en etapa posterior;
 HG = medio grávido; SG = sub-grávido; G = Grávido.

Anexo 8. Proceso para el estudio del ciclo gonotrófico



Colección de *An. darlingi*



Transporte



Vaso para la oviposición de huevos



Insectario de Laboratorio



Insectario de campo



Anexo 9. Proceso para el estudio de la oviposición relacionada al fotoperiodo.



Anexo 10. Proceso del estudio de desarrollo de inmaduros.



Anexo 11. Proceso para el estudio de la cópula

