



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Ciencia Básica –PUICB-



**“Variación Métrica inter e intraespecífica en mosquitos del género
Anopheles vectores de la Malaria en Guatemala”.**

Equipo de investigación:

Licda. Marianela Menes Hernández	Coordinadora
Mauricio José García Recinos	Auxiliar de Investigación II
Licda. Antonieta Rodas Retana	Investigadora Asociada
Personal de ETV, Área de Salud de Escuintla	Colaboradores
Personal de ETV, Área de Salud de Sayaxché	Colaboradores

Diciembre 2009

Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –LENAP-
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	6
3. ANTECEDENTES	
3.1 Planteamiento del problema	8
3.2 Las Enfermedades Transmisibles	9
3.3 La Malaria	10
3.4 La Malaria en Guatemala	11
3.5 El control de la Malaria	12
3.6 Los mosquitos y la salud pública	14
3.7 Generalidades de los mosquitos Culicidae	15
3.8 El género Anopheles	16
3.9 Morfometría Tradicional	18
3.10 Consideraciones sobre el Crecimiento, su representación y remoción	19
3.11 Cuantificación del tamaño y su importancia en estudios morfométricos	19
3.12 Tipos de Análisis en Morfometría Tradicional	20
3.13 Morfometría Aplicada a Anophelinos	21
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. OBJETIVOS	25
6. METODOLOGÍA	
6.1 Colecta de especímenes de Anophelinos	26
6.2 Selección y tamaño de muestra	27
6.3 Preparación del material	28
6.4 Datos morfométricos	28
6.5 Distancias morfométricas	29
6.6 Análisis morfométricos	29
7. RESULTADOS	
7.1 Análisis Libres de isometría	33
7.1.1 Análisis interespecíficos	33
7.1.2 Análisis intraespecíficos	36
7.2 Análisis libres de alometría	38
8. DISCUSIÓN	
8.1 Selección de las poblaciones estudiadas	39
8.2 Técnicas de Morfometría	40
8.3 Variación interespecífica	41
8.4 Variación intraespecífica	43
9. CONCLUSIONES	45
10. RECOMENDACIONES	46
11. BIBLIOGRAFÍA	47

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figuras

- Figura 1. Puntos seleccionados en larvas de 4 estadio (L4) de Anophelinos Pág. 28
- Figura 2. Puntos seleccionados en cabezas de larvas L4 de Anophelinos Pág. 29
- Figura 3. Puntos seleccionados en alas de adultos hembras de Anophelinos Pág. 29
- Figura 4. Gráfico de dispersión construido en base a las funciones obtenidas de un AD sobre los 4 primeros componentes principales obtenidos en un ACP sobre 5 variables medidas en larvas L4 de 3 especies de Anophelinos vectores de Malaria en Guatemala. Pág. 34
- Figura 5. Gráfico de dispersión construido en base a las funciones obtenidas de un AD sobre los 4 primeros componentes principales obtenidos en un ACP sobre 6 variables de las cabezas de larvas L4 de 3 especies de Anophelinos vectores de Malaria en Guatemala. Pág. 35
- Figura 6. Gráfico de dispersión construido en base a las funciones obtenidas de un AD sobre los 4 primeros componentes principales obtenidos en un ACP sobre 7 variables de las alas de hembras de *Anopheles albimanus* de Guatemala. Pág. 37

Tablas

- Tabla 1. Poblaciones estudiadas y tamaño de muestra Pág. 27
- Tabla 2. Estadísticos para el análisis libre de isometría en Larvas L4 de diferentes especies de Anophelinos de Guatemala. Pág. 34
- Tabla 3. Resultados de la clasificación obtenida en el Análisis Discriminante en variables de larvas L4 de Anophelinos de Guatemala. Pág. 34
- Tabla 4. Estadísticos para el análisis libre de isometría en cabezas de Larvas L4 de diferentes especies de Anophelinos de Guatemala. Pág. 35
- Tabla5. Resultados de la clasificación obtenida en el Análisis Discriminante en variables de cabezas de larvas L4 de Anophelinos de Guatemala. Pág. 35
- Tabla 6. Estadísticos para el análisis libre de isometría en alas de hembras de *Anopheles albimanus*. Pág. 37
- Tabla 7. Resultados de la clasificación obtenida en el Análisis Discriminante en variables de alas de hembras de *Anopheles albimanus*. Pág. 37

1. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue estudiar la variación métrica de especies de Anophelinos, de importancia médica en Guatemala, tanto a nivel inter como intraespecífico. Para lo anterior, se aplicaron técnicas de morfometría tradicional a mediciones realizadas en especímenes de 3 de las 4 especies involucradas en la transmisión de Malaria en el país. Las estructuras estudiadas fueron Larvas de L4, cabezas de larvas de L4 y alas derechas de hembras.

A nivel interespecífico, se analizaron larvas L4 y cabezas de L4, de una población de *Anopheles pseudopunctipennis*, una de *An. darlingi* y 2 de *An. albimanus*. A nivel intraespecífico se analizaron dos poblaciones de *Anopheles albimanus* provenientes de dos Áreas de Salud del país (Petén Suroccidente y Escuintla) y una población proveniente de un cultivo de laboratorio. La selección de las Áreas para las colectas fue por la importancia epidemiológica que presentan, ya que han reportado la mayor cantidad de casos de Malaria en el país en los últimos años (MSPAS 2006; MSPAS 2008).

Las colectas se realizaron con el apoyo del personal de vectores de las Áreas de Salud visitadas. A cada individuo utilizado, se le asignó un código que permitía identificarlo y conocer su procedencia. La variación inter e intraespecie se estudió en función de las mediciones realizadas en larvas L4, cabezas de larvas L4 y alas de hembras de los insectos. A estas mediciones se les realizaron análisis libres de isometría y análisis libres de alometría, para estudiar la variación métrica a nivel inter e intraespecífico. Estos análisis fueron aplicados con el fin de maximizar, por medio de los análisis discriminantes, las diferencias entre los grupos.

A nivel interespecífico, se observó que las cabezas de L4 fueron las estructuras que permitieron una mejor diferenciación entre las especies (Wilk's lambda 0.2660, $p \leq 0.05$); sin embargo, esta no fue muy clara y no agrupó a las dos poblaciones de *Anopheles albimanus* incluidas en el análisis.

A nivel intraespecífico, para *Anopheles albimanus*, se observó que las alas de hembras diferenciaron claramente a los tres grupos analizados (Wilk's lambda 0.436, $p \leq 0.05$), siendo el grupo de Escuintla, el que presentó una mejor separación. Para dar más poder al resultado, se realizó un análisis libre de alometría, sin embargo, las variables seleccionadas no siguieron el modelo de crecimiento común ($X^2 = 35.934$, $p \leq 0.05$), por lo que no se pudo realizar el análisis.

Los resultados muestran en general, que la morfometría es una herramienta potencial para el estudio inter e intra específico de Anophelinos; sin embargo deben mejorarse los tamaños de muestra y los montajes, así como crearse una colección de referencia de estos insectos en las Áreas de Salud, para contar con material para los estudios, ya que en este caso, las condiciones climáticas no favorecieron la colecta de adultos de las diferentes especies (frío y lluvia).

2. INTRODUCCIÓN

Se reconoce que en las formas y dimensiones del exoesqueleto de un insecto se refleja su forma de vida. Las estructuras externas de los insectos son susceptibles de medición y han sido aplicadas para describir ciclos de vida, estudios ecológicos, sistemática, genética, variación intraespecífica, entre otros (Daly 1985). Una herramienta fenotípica útil y de fácil aplicación es la Morfometría, la cual es la descripción cuantitativa, análisis e interpretación de la forma y la variación de ésta en biología (Rohlf 1990). Ha sido ampliamente utilizada en diversos campos entre los que se encuentra la entomología (Daly 1985; Rohlf 1990).

La Morfometría Tradicional es una aplicación de métodos estadísticos multivariados a colecciones de variables de tamaño o conformación, en la que se definen mediciones con el fin de registrar aspectos biológicos significativos del organismo (Jaramillo & Dujardin 2002). En los estudios de variación intraespecífica, el hallazgo de diferencias poblacionales al interior de una especie, puede tener implicaciones importantes para el diseño de estrategias de control y para las actividades de vigilancia entomológica.

En entomología médica, la morfometría ha sido ampliamente utilizada como un marcador fenético en flebótomos y triatominos (Dujardin *et al.* 2000; Dujardin 2000). Los conocimientos resultantes han sido importantes aportes para el diseño de estrategias de control, tanto regionales como nacionales (IPCA, Iniciativa del Cono Sur). En el caso de los vectores de la Malaria, esta técnica ha sido poco utilizada y se ha dirigido principalmente a taxonomía de especies simpátricas y a la diferenciación entre especies y subespecies (Calle *et al.*, 2002; Petrarca *et al.*, 1998; Yurttas *et al.*, 2005). En Guatemala se conoce poco de la dinámica poblacional de estos insectos y de las variaciones fenotípicas que puedan existir por los procesos de adaptación a cada tipo de hábitat o por las barreras geográficas o aislamiento que van sufriendo las poblaciones.

El objetivo del trabajo fue estudiar la variación métrica inter e intraespecífica en poblaciones de mosquitos Anophelinos de importancia médica en Guatemala, para establecer el potencial de las técnicas Morfométricas como herramientas útiles para estudios taxonómicos y de variación intraespecífica que puedan ayudar a entender la dinámica poblacional de las especies, así como contribuir con los conocimientos de la biología de la especie, que puedan ser de utilidad para respaldar el diseño de estrategias de control, basadas en características propias de cada una de las poblaciones, que ayuden a la reducción de la transmisión de la Malaria en Áreas con alta transmisión. A nivel intraespecífico, ésta información podría ser importante en el diseño de estrategias de control adecuadas, que tomen en consideración características propias de cada población o especie. Desde el punto de vista taxonómico, encontrar diferencias a nivel interespecífico sería de mucha utilidad para posibles problemas de especiación que puedan representar un riesgo por la adaptación de nuevas especies a hábitats específicos.

3. ANTECEDENTES

3.1 Planteamiento del problema

La Malaria es una de las enfermedades de mayor impacto a nivel mundial. Entre las enfermedades vectoriales está considerada como la más importante, tanto a nivel mundial como nacional. A escala global, las estimaciones del Banco Mundial la sitúan como la causa más importante de discapacidad atribuible a las enfermedades parasíticas (World Bank 1993).

Es causada por protozoos del género *Plasmodium* y principalmente transmitida a través de sus vectores, mosquitos culícidos del género *Anopheles*. En Guatemala han sido reportadas 19 especies de Anophelinos, de las cuales únicamente cuatro están involucradas en la transmisión de la enfermedad, siendo *Anopheles pseudopunctipennis*, *An. vestitipennis*, *An. darlingi* y *An. Albimanus* (MSPAS 2007). Esta última especie está considerada como la más importante debido a su amplia distribución.

Para el año 2006, se reportaron en el país 73,972 casos de malaria clínico y 23,408 casos confirmados hasta la semana 51. Esta cifra disminuyó con respecto al mismo período en el año 2007, en el cual se presentaron 53,292 casos de malaria clínico y 10184 casos confirmados (Semana Epidemiológica 51, 2007). La disminución en el número de casos puede deberse a la participación del país en iniciativas regionales y proyectos a gran escala financiados por entidades internacionales (OMS y Fondo Global). Las iniciativas actuales de control están dirigidas principalmente al tratamiento oportuno y la prevención contra las picaduras de los insectos, así como la aplicación de métodos alternativos como el control biológico. Aun así, durante el presente año, se han reportado 10,552 casos clínicos y 1,287 confirmados hasta la semana 16 (13-19 de abril) (Semana Epidemiológica 16, 2008). La mayor parte de los casos ha provenido principalmente de las áreas de salud de Escuintla, Petén suroccidente, Alta Verapaz e Izabal (MSPAS 2008).

A pesar del auge que han tenido los métodos de control biológico, el control vectorial con medios químicos continúa siendo la principal estrategia para la reducción de la transmisión. Esto aun cuando las experiencias del pasado han demostrado que debe conocerse a fondo la biología de las especies para evitar futuros problemas de reinfestación que pueden llegar a provocar grandes epidemias.

Uno de los principales problemas para el control de los insectos, es que estos tienen una gran capacidad para adaptarse a cambios, lo cual les hace resistentes y adaptables a nuevas condiciones medioambientales. Estos cambios pueden reflejarse en sus formas y proporciones (Daly 1985), las cuales son factibles de medición y pueden ser estudiadas por medio de técnicas adecuadas, como la morfometría, que permitan separar a las poblaciones y conocer aspectos importantes sobre su biología y dinámica poblacional (OMS 2002; OPS 1998). El contar con marcadores genéticos y fenéticos de fácil aplicación puede permitir conocer características propias de cada población o especie, que brinden información sobre aspectos como capacidad de vuelo, aislamiento poblacional o procesos de especiación; los cuales podrían contribuir al diseño de estrategias de control respaldadas en este tipo de información

3.2 Las Enfermedades Transmisibles

Según las últimas estimaciones de la OMS, las enfermedades infecciosas provocaron 14.7 millones de muertes en 2001, representando el 26% de la tasa de mortalidad global. Tres enfermedades –SIDA, Tuberculosis y Malaria- siguen siendo las causantes de un gran porcentaje (39%) de las muertes atribuibles a enfermedades infecciosas (OMS 2003).

La endemidad de las enfermedades infecciosas, está fuertemente influida por factores medioambientales, como la temperatura, la elevación y las condiciones del terreno, la pluviosidad y otros factores meteorológicos (OMS 2003).

Las enfermedades transmitidas por mosquitos y otros vectores insectívoros continúan representando una carga crítica para las regiones pobres del mundo, particularmente las tropicales y subtropicales; siendo responsables del 17% de la carga mundial de las enfermedades parasitarias e infecciosas. Resultan en problemas de salud y muertes prevenibles, dificultades económicas de las comunidades afectadas y constituyen un serio impedimento del desarrollo. La Malaria continúa siendo la enfermedad vectorial más importante para la salud pública (WHO 2008).

3.3 La Malaria

Actualmente la Malaria es la enfermedad parasítica más importante en el mundo, con un estimado de 300 a 500 millones de personas infectadas con 1 o más especies de parásitos, de las cuales mueren cada año entre 1 a 3 millones (Beaty & Marquardt 1996; Mullen & Durden 2002). Se estima que el 40% de la población mundial (1.6 billones de personas) vive en partes del mundo donde la malaria es endémica (Beaty & Marquardt 1996), encontrándose en riesgo directo de infección vía picadura de mosquito (Mullen & Durden 2002). El grado de endemidad o prevalencia de la enfermedad, depende de una variedad de factores que incluyen la especie de parásito presente, factores ambientales y sociales y las especies de vectores presentes (Mullen & Durden 2002). La Malaria se distribuye principalmente en áreas tropicales húmedas, entre latitudes de 45° N y 40° S, especialmente en África, Asia, Centro y Sur América (Juárez 1992).

La Malaria causa como media una pérdida del 1.3% del crecimiento económico anual en los países donde se da una transmisión intensa. La evidencia acumulada muestra que la enfermedad no es consecuencia de la pobreza, sino causa de pobreza persistente (Centro Nacional de Epidemiología 2007a).

Es una de las enfermedades infecciosas más generalizada y prevalente. Es causada por protozoos del género *Plasmodium* que infectan los tejidos sanguíneos y

otros órganos del cuerpo, principalmente el hígado. Los principales parásitos de malaria humana son *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*, los cuales se encuentran distribuidos en los trópicos. Los vectores de la Enfermedad son mosquitos del género Anopheles, pertenecientes a la familia Culicidae del orden Díptera. (Mullen & Durden 2002).

En América hay transmisión en 9 países de la región que comporten la selva amazónica y 8 países de Centro América y el caribe. Todos los países afectados recurren al rociamiento residual y/o aplicación de larvicidas en zonas de riesgo focalizadas.

En 2000, de los 1.14 millones de casos notificados en las Américas, Guatemala presentó el 5to lugar. En la subregión, unos 89 millones de personas viven en zonas que favorecen la transmisión de la enfermedad. Se calcula que 35.3% viven en zonas de alto riesgo (más de 10 casos por 1000 personas), 28.9 en zonas de riesgo moderado (entre 1 y 9 casos por 1000) y 35.7% en zonas de bajo riesgo (menos de 1 caso por 1000). El número y tasa de casos más importantes fueron: Guatemala 53,311 (42.7%), Honduras 35,122 (28.1%), Nicaragua 24,014 (19.2%); aportando estos tres países el 90% de los casos de la sub región (OPS 2000). Para el 2007, el número de casos de Malaria reportado en las Américas fue de 797,911 representando una reducción de 30.5% en la morbilidad en la región en comparación con el año 2000 (OMS 2008).

3.4 La Malaria en Guatemala

En Guatemala, el comportamiento de la Malaria es endémico. Geográficamente se distribuye en 20 departamentos, únicamente Totonicapán y Sacatepequez no reportan casos (Centro Nacional de Epidemiología 2007a).

En el 2007, se presentaron, hasta la semana 51, 53,292 casos de malaria clínico y 10,184 de malaria confirmado; de éstos, 15,866 provenían de Escuintla; 5,923

de Alta Verapaz y 1,621 de Petén Sur Occidente. Estos tres departamentos presentan el mayor número de casos por *Plasmodium falciparum* (39, 30 y 7 respectivamente) (Centro nacional de Epidemiología 2007b). Hasta la semana del 13 al 19 de abril del 2008, se han presentado 10,552 casos de malaria clínico y 1,287 de malaria confirmado, de los casos confirmados, 638 provienen de Escuintla, 48 de Alta Verapaz y 106 de Petén Sur occidente (Centro Nacional de Epidemiología 2008a; 2008b).

En el país, se han identificado diferentes factores que favorecen la transmisión de la malaria, dentro de los que se encuentran las condiciones ambientales pobres, la migración, los recursos humanos insuficientes, los presupuestos reducidos, la participación comunitaria limitada, la promoción de la salud y educación sanitaria limitada, el presupuesto descentralizado pero insuficiente, así como las amplias zonas ecológicas con condiciones apropiadas (OPS 2000).

3.5 El control de la Malaria

En 1957, WHO dio inicio al programa global de erradicación de la Malaria, planteando como estrategia primaria el uso del insecticida residual DDT para rociar las paredes de casas en áreas endémicas de la enfermedad. El insecticida no fue destinado para reducir las poblaciones de mosquitos sino para interrumpir la transmisión del parásito. El resultados fue satisfactorio matando a las mosquito hembras antes de que los parásitos se volvieran infectivos, controlando así la enfermedad a pesar de que los vectores sobrevivían (Beaty & Marquardt 1996). Esta estrategia junto con la administración de cloroquina a los humanos para prevenir y tratar los casos de la enfermedad y una fuerte campaña, indicaban que se tenía una gran posibilidad de éxito. Sin embargo, esto no sucedió y tan pronto como se pensó que éste se había alcanzado, otras enfermedades de menor impacto empezaron a ganar importancia y el dinero para control se enfocó en ellas, disminuyendo los recursos antes disponibles para el control de la malaria. Aunado a esto, la evolución intervino y los mosquitos desarrollaron resistencia a los insecticidas y los organismos de la malaria se volvieron resistentes a la cloroquina (Beaty & Marquardt 1996).

El resurgimiento de la malaria en áreas donde el control había sido exitoso coincidió con una serie de eventos. Uno de los principales problemas fue la aparición de la resistencia a los insecticidas en las poblaciones de vectores que aunado a otros factores económicos y políticos marcaron el final de el esfuerzo global de erradicación. La propagación de la resistencia y el requerimiento de insecticidas mas caros pero menos persistentes hicieron que muchos de los programas fracasaran (Beaty & Marquardt 1996).

En 1998, con el objetivo de reducir significativamente el nivel mundial de malaria, la OMS lanzó la iniciativa "Roll back Malaria", en asociación mundial con otras organizaciones y los gobiernos nacionales de países donde la enfermedad es endémica. Los elementos básicos subrayaban la necesidad de la prevención, la investigación operativa y la coordinación entre los diferentes grupos y organizaciones que luchan contra la enfermedad (OPS 2000).

En la subregión endémica, compuesta por Centro América, México, Haití y República Dominicana, la iniciativa fue lanzada en noviembre del 2000. Los países emprendieron un examen de su situación epidemiológica y prepararon planes de acción nacionales y conjuntos. Los principios de la iniciativa incluían asociaciones en los niveles locales, uso eficaz de los recursos, la toma de decisiones basada en pruebas, la aplicación de actividades coordinadas para el control de los reservorios humanos de la enfermedad y los vectores y la utilización de los datos epidemiológicos, al tiempo que se fortalecen los servicios de salud (OPS 2000).

Actualmente, el rociamiento de las viviendas con insecticidas residuales continúa siendo practicado en muchos países y si es implementado apropiadamente, la malaria puede ser controlada, aunque en general, el uso de insecticidas para el control de los Anophelinos ha probado ser económicamente insostenible y medioambientalmente inaceptable.

La epidemiología de la Malaria y la biología de sus vectores están fuertemente entrelazadas. Los factores ambientales también juegan un papel importante, afectando el comportamiento del vector, el hospedero vertebrado y el parásito mismo. Consecuentemente, se puede presentar una amplia variedad en cuanto al número de especies o poblaciones de anophelinos que pueden desarrollarse como vectores eficientes en diversos hábitats, cada uno con su propio set único de requerimientos biológicos y ecológicos (Beaty & Marquardt 1996). El primer requerimiento es siempre la presencia de agua para sostener el desarrollo de la fase acuática del mosquito (larva y pupa) (Beaty & Marquardt 1996).

Muchas de estas especies han sido encontradas siendo miembros de un complejo de especies. Cada complejo consistente en varias especies crípticas, morfológicamente iguales; aunque no todas con la misma capacidad de transmisión de malaria (Beaty & Marquardt 1996).

3.6 Los mosquitos y la salud pública

Los mosquitos son de gran significancia en la salud pública, debido a su capacidad para alimentarse de sangre humana (Mullen & Durden 2002). La hematofagia está presente en un gran número de familias de dípteros, siendo muy importantes desde el punto de vista médico. Los patógenos que pueden transmitir son causantes de varias de las más importantes causas, pasadas y presentes, de mortalidad y morbilidad humana. Actualmente, las 4 especies de parásitos causantes de malaria, así como otros parásitos como *Wuchereria* y *Brugia* continúan entre las principales causas de mortalidad y morbilidad humana en el mundo (Beaty & Marquardt 1996).

Desde tiempos antiguos, los piquetes o los hábitats de mosquitos han sido asociados a enfermedades humanas, y, en 1878, fueron los primeros artrópodos incriminados formalmente como hospederos intermediarios de parásitos de

vertebrados. Durante el siglo pasado, fue establecido que son los artrópodos más importantes que afectan la salud humana. Alcanzan su mayor impacto como vectores de organismos que causan enfermedades como la Malaria, Filariasis, Fiebre Amarilla y Dengue. Estas afecciones son especialmente severas en regiones en desarrollo de los trópicos. Causan muerte temprana y debilidad crónica, con agotamiento de recursos en los servicios de salud y reducción de la productividad humana a través del perpetuamiento de la situación económica precaria (Mullen & Durden 2002).

3.7 Generalidades de los mosquitos Culicidae

El ciclo de vida de los mosquitos es holometábolo y es completado en dos diferentes ambientes: Uno acuático y otro aéreo (Mullen & Durden 2002). Todos tienen 4 estadios larvales y un estadio pupal que se desarrollan en un amplio rango de hábitats acuáticos; típicamente toman de 2 a 4 días para completar su metamorfosis a la siguiente fase. Los adultos presentan un remarcado dimorfismo sexual (Beaty & Marquardt 1996; Juárez 1992).

Los adultos mosquitos son esbeltos con patas delgadas y angostas y alas alongadas. La superficie del cuerpo está cubierta por escamas, setas y pelos finos que crean las marcas y colores característicos de cada especie. Poseen ojos compuestos, antenas elevadas entre los ojos que son largas y filamentosas. La probóscide es prominente proyectada anteriormente (Mullen & Durden 2002). Las hembras son generalmente más largas y poseen partes bucales adaptadas para penetrar, los machos tienen partes bucales adaptadas para alimentarse con líquidos azucarados como néctar de plantas y poseen largas antenas plumosas utilizadas para detectar hembras para aparearse (Beaty & Marquardt 1996; Mullen & Durden 2002).

La búsqueda de sangre para su alimentación es la actividad primaria de las hembras y es uno de los primeros pasos que determinan su rol como vectoras de enfermedades. La misma importancia para determinar su rol es la selección de sus hospederos; la mayoría de los vectores más importantes son antropofílicos, es decir,

que prefieren comer del hospedero humano (Beaty & Marquardt 1996; Mullen & Durden 2002).

Debido a que las hembras son anautogénicas, requieren de al menos una comida de sangre para cada oviposición producida. (Beaty & Marquardt 1996). Usualmente cada una puede producir entre 50 y 200 huevecillos 2 ó 3 días después de la alimentación con sangre (Beaty & Marquardt 1996). Los huevecillos presentan flotadores, característicos de la especie.

Las larvas carecen de sifón; otra característica del género con respecto a otras especies de mosquitos de importancia médica (*Aedes* y *Culex*) (Beaty & Marquardt 1996; Mullen & Durden 2002).

3.8 El género *Anopheles*

Clase	Insecta
Orden	Díptera
Suborden	Nematocera
Familia	Culicidae
Subfamilia	Anophelinae
Tribu	Anophelini
Género	<i>Anopheles</i>

(Beaty & Marquardt 1996; Juárez 1992).

En 1977 se habían descrito 375 especies de *Anopheles*, desde entonces este número se ha incrementado a casi 500 especies en seis diferentes subgéneros, principalmente por el descubrimiento de que muchas de las especies morfológicamente identificadas y reconocidas en estudios previos, son actualmente complejos de especies crípticas o morfológicamente indistinguibles (Collin y Paskewitz en Beaty &

Marquardt 1996). Muchas de éstas especies son vectores competentes de Malaria, aunque en general la mayoría de especies del género no han sido incriminadas en su transmisión (Mullen & Durden 2002).

En Guatemala se han reportado 19 especies, de las cuales únicamente 4 están incriminadas en la transmisión de la Malaria; siendo estas *Anopheles albimanus*, *An. vestitipennis*, *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi* (Clark & Darsie 1983; MSPAS 2007; Juárez 1992).

El subgénero *Nyssorhynchus* (con más de 40 especies) incluye la mayoría de los más importantes vectores de malaria en América Central y del Sur. Dentro de éste se encuentran *Anopheles Albimanus* y *Anopheles Darlingi* (Beaty & Marquardt 1996; Mullen & Durden 2002). *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles vestitipennis* se encuentran clasificados dentro del subgénero *Anopheles* (Mullen & Durden 2002; Juárez 1992).

En partes de América Central el vector primario es *Anopheles albimanus*. Esta especie es mayormente zoofílica y las hembras rara vez se encuentran infectadas por esporozoitos. Mantiene la transmisión, probablemente por sus altas densidades poblacionales (Beaty & Marquardt 1996). En Guatemala, es el principal vector de la enfermedad, seguido en importancia por *An. vestitipennis* y *An. pseudopunctipennis* (Mullen & Durden 2002; Juárez 1992).

Anopheles albimanus es considerado un vector primario de malaria en las Américas. Dada su importancia médica ha sido necesario profundizar en el conocimiento de su bionomía, en especial sobre la ecología de sus criaderos (González, 2005). Se reproduce en una gran variedad de hábitats acuáticos. La calidad del agua va desde clara a moderadamente turbia, puede ser salobre o fresca, relativamente limpia o con moderada polución. La vegetación en sus criaderos es diversa (González 2005). Se caracteriza por poseer hábitats con alta exposición al sol (Grieco et al., 2006). Su distribución altitudinal corresponde básicamente a tierras

bajas litorales del trópico de las Américas, generalmente a elevaciones menores de 400 metros, más común entre 0-100 metros de elevación. Los mayores registros de elevación han sido reportados en la ciudad de Guatemala a 1372 metros, Amatitlán (Guatemala) a 1200 y Morelia (México) a 1941 (González y Martínez 2006).

Las hembras de *Anopheles* se infectan con los parásitos de Malaria cuando se alimentan de sangre infectada con gametocitos (producto de la fase asexual en el hospedero vertebrado). En el mosquito se da la fase sexual que pasa por una serie de etapas hasta que los esporozoitos se encuentran en las glándulas salivales, siendo ya en ese momento infectivas. Los esporozoitos entran al humano al ser picados por una hembra infectada (Mullen & Durden 2002).

La infección con Malaria en el humano puede resultar en una enfermedad severa o incluso la muerte. La forma más severa de Malaria es causada por *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium vivax* causa casos menos severos y rara vez ocurren muertes (Mullen & Durden 2002; OPS 2000). Ambos parásitos se encuentran en Guatemala, siendo *Plasmodium vivax* el principal responsable de los casos reportados.

3.9 Morfometría Tradicional

La Morfometría Tradicional es una aplicación de métodos estadísticos multivariados a colecciones arbitrarias de distancias entre puntos sobre el organismo con el objetivo de registrar aspectos biológicos significativos de éste.

El objetivo de los análisis es estudiar por separado la conformación y el tamaño, relacionando estos componentes morfométricos con el entorno interno y externo de las poblaciones, suponiendo que ambos son modificados por razones biológicas diferentes. (Jaramillo & Dujardin 2002). Parte de medir distancias entre puntos de referencia. A partir de matrices de varianza-covarianza construidas con distancias convertidas a logaritmos naturales, utiliza los análisis multivariados para hacer combinaciones lineales de todas las variables originales en unas pocas no relacionadas

entre sí, cada una de las cuales da cuenta de una porción de la variación original. Los análisis convencionales se dividen en: los utilizados para el análisis de muestras únicas, sin una asignación "a priori" de los individuos en grupos previamente definidos (Análisis de Componentes Principales, ACP) y los utilizados para el análisis de dos o más muestras (Análisis de Componentes Principales Comunes, ACPC, y Análisis de la Función Discriminante, AFD). (Jaramillo & Dujardin 2002)

Las nuevas variables derivadas de la Morfometría Tradicional corresponden a nuevos factores con propiedades que significan que al resumir los datos iniciales en unas pocas dimensiones, pero sin perder la información original, se puede representar de la mejor manera los objetos de estudio y sus relaciones en función de los caracteres estudiados (Pimentel 1992).

3.10 Consideraciones sobre el Crecimiento, su representación y remoción, en los estudios de Morfometría Tradicional

El objetivo de los análisis de Morfometría Tradicional es estudiar por separado la conformación y el tamaño. Para esto existen ciertas interpretaciones matemáticas de los conceptos de tamaño y crecimiento, en base a las cuales se puede llegar a separar cuantitativamente, el tamaño y la conformación. Esta separación ha sido importante en estudios de variación cuantitativa intraespecífica, ya que en teoría permite reducir la influencia que la variación por crecimiento (o tamaño, ya sea este crecimiento representado de forma alométrica o isométrica), tiene sobre la conformación.

3.11 Cuantificación del Tamaño y su importancia en estudios morfométricos

Para la representación del tamaño isométrico (TAISO), Darroch & Mosimann (1985) proponen utilizar el promedio de todas las distancias medidas para un individuo. Por otro lado, en el caso del crecimiento alométrico, Klingenberg (1996) propone que la variable de tamaño global o vector de crecimiento corresponde al Primer Componente

Principal Común (CPC1) derivado de un Análisis de Componentes Principales Comunes (ACPC); el término global se refiere a que no se hace distinción entre diferencias de tamaño debidas a diferencias de crecimiento o a diferencias genéticas. Es decir que el CPC1 indica la dirección de crecimiento de los individuos por lo cual es un estimador del cambio alométrico del tamaño (Dujardin 2000).

Una vez se han identificado los vectores de crecimiento, CPC1 y TAISO, los cuales dan cuenta del cambio de tamaño se pueden definir matemáticamente variables de "forma" y "conformación" (Jaramillo & Dujardin 2002).

3.12 Tipos de Análisis en Morfometría Tradicional

A partir de los vectores de crecimiento, se pueden realizar los análisis de Morfometría Tradicional, los cuales corresponden a análisis libres de tamaño alométrico (forma) y análisis libres de tamaño isométrico (conformación), los cuales persiguen reducir los efectos ambientales y enfatizar el estudio del trasfondo genético responsable de la variación métrica.

El análisis de la forma significa remover tentativamente los cambios alométricos debidos al crecimiento. La condición de este análisis es que no haya diferencia significativa en la manera de crecer de diferentes individuos. Si existen varios grupos con diferentes alometrías de crecimiento es lógicamente, poco probable encontrar un eje común de crecimiento entre todos (Dujardin 2000). Sin embargo, es posible encontrar diferentes maneras de crecer (alometrías divergentes) entre poblaciones geográficas y ecológicas de la misma especie, aunque no se sabe con que frecuencia y hasta qué niveles. La razón es que la separación alopátrida produce divergencia genética que va aumentando de manera gradual a medida que la separación permanece en el tiempo (Dujardin 2000, Jaramillo & Dujardin 2002)

La conformación es la geometría del individuo o de una estructura anatómica. Es su configuración, su apariencia, su aspecto. En morfometría tradicional, el uso de una proporción o de un ángulo puede lograr eliminar el cambio isométrico de tamaño. En los análisis convencionales se obtienen variables de conformación o libres de tamaño isométrico mediante tratamientos estadísticos simples; por ejemplo, sustrayendo una variable de tamaño global de las variables que definen a los organismos, transformadas a logaritmos naturales (Darroch & Mosimann 1985).

3.13 Morfometría Aplicada a Anophelinos

La morfometría ha sido utilizada para estudios poblacionales y taxonómicos. Manoukis et al. (2006), utilizaron morfometría multivariada para estudiar el posible efecto de las densidades poblacionales sobre el tamaño de los adultos de *Anopheles gambiae*, y la influencia de éste en el grado de transmisión de la malaria en áreas irrigadas y poco irrigadas. Los resultados mostraron que a pesar de que no fue concluyente la relación del tamaño con el patrón de transmisión, los individuos adultos, sobrevivientes en áreas no irrigadas y con mayor transmisión, fueron más grandes.

Yurttas et al. (2005), utilizaron la morfometría para comparar poblaciones de *Anopheles sacharovi*, presentes en diferentes subregiones ecológicas en altitudes entre 353-1126, encontrando diferencias entre las poblaciones, las cuales se separaron en dos clusters, en los cuales las mayores diferencias se observaron en la población ubicada a mayor altitud.

Petrarca et al. (1998), utilizaron la morfometría para comparar especies hermanas del complejo *Anopheles gambiae*, que viven en simpatria y coinciden en la mayor parte de su distribución aunque muestran diferencia en su involucramiento en la transmisión de la malaria. El estudio se hizo con el fin de buscar una herramienta de aplicación más sencilla que las disponibles (molecular), que permitiera establecer por medio de las diferencias parámetros epidemiológicos de las especies. A pesar de que

morfológicamente ambas especies son muy similares, el análisis morfométrico mostró una alta reclasificación de especímenes en su grupo original, concluyéndose que puede ser una herramienta útil de diferenciación en esta especie.

Calle et al. (2002), utilizaron la morfometría para evaluar la discriminación en hembras adultas del subgénero *Nyssorhynchus*, para estudios epidemiológicos de diferenciación de especies relacionadas con los humanos. Los análisis mostraron diferenciación entre las cinco especies estudiadas, con niveles de confiabilidad del 90%, concluyendo que la morfometría es útil para la diferenciación inter grupo en este subgénero.

En Venezuela, Rubio-Palis (1998), utilizó la morfometría para contribuir con el esclarecimiento de la taxonomía de *Anopheles darlingi*, comparando poblaciones de 8 localidades, encontrando que había variaciones significativas en varios de los caracteres estudiados.

4. JUSTIFICACIÓN

La Malaria es la más seria enfermedad vectorial que afecta a los humanos (Beaty & Marquardt 1996). Su epidemiología y la biología de los vectores están fuertemente entrelazadas. Los factores ambientales también juegan un papel importante, afectando el comportamiento del vector, el hospedero vertebrado y el parásito mismo. Consecuentemente, se puede presentar una amplia variedad en cuanto al número de especies o poblaciones de anophelinos que pueden desarrollarse como vectores eficientes en diversos hábitats, cada uno con su propio set único de requerimientos biológicos y ecológicos (Beaty & Marquardt 1996).

En 1998, con el objetivo de reducir significativamente el nivel mundial de malaria, la OMS lanzó la iniciativa "Roll back Malaria", en asociación mundial con otras organizaciones y los gobiernos nacionales de países donde la enfermedad es endémica. En la subregión endémica de Centro América, México, Haití y República Dominicana, la iniciativa fue lanzada en noviembre del 2000. Los 4 principios técnicos de la estrategia mundial son: diagnóstico temprano y tratamiento inmediato de la enfermedad, aplicación de medidas de protección y prevención, desarrollo de la capacidad para predecir y contener epidemias, y el fortalecimiento de la capacidad local en investigación básica y aplicada (OPS 2000).

Muchas especies de anophelinos pueden encontrarse en la misma área geográfica y presentar un alto grado de similitud morfológica en el estadio adulto, particularmente entre las hembras. Muchas de estas especies han sido encontradas siendo miembros de un complejo de especies. Cada complejo consistente en varias especies crípticas, morfológicamente iguales; aunque no todas con la misma capacidad de transmisión (Beaty & Marquardt 1996). Esto junto con el hecho de que las claves disponibles no toman en cuenta la gran variabilidad morfológica de cada especie, puede producir confusión al momento de diferenciarlas (Calle et al., 2002).

Algunas características como el efecto de factores inherentes al criadero, pueden reflejarse en la reducción o abundancia de una especie de mosquito. Estos factores en las condiciones de ciertos criaderos pueden verse limitados a temperatura, disponibilidad de alimento, relación con patógenos y depredadores y características de la vegetación litoral (González 2005). Partiendo del supuesto de que se reconoce que en las formas y dimensiones del exoesqueleto de un insecto se refleja su forma de vida y las estructuras externas de los insectos son susceptibles de medición, el uso de herramientas fenotípicas podría ser muy útil para estudios de las diferencias inter e intrapoblacionales, que reflejen el efecto de estos factores en cada población. Esta información podría servir de apoyo al momento de plantear las estrategias de control que debe seguir el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, para lograr la interrupción de la enfermedad. Dentro de las herramientas disponibles que pueden ser utilizadas, se encuentra la morfometría tradicional, la cual además de ser de fácil aplicación, puede contribuir a resolver problemas taxonómicos e intraespecíficos. Además, este método ha mostrado ser útil para distinguir insectos de importancia médica que presentan problemas en su identificación (Calle et al., 2002).

A nivel de la investigación básica es importante la búsqueda de herramientas de fácil aplicación que nos permitan diferenciar tanto poblaciones como especies simpátricas de Anophelinos, con el fin de conocer aspectos sobre su biología. Independiente de la similitud morfológica en especies hermanas, estas muestran contrastes ecológicos y de comportamiento, que les dan diferencias en su capacidad vectorial, por lo que es importante distinguirlas y estudiarlas (WHO 1989). Desde el punto de vista intraespecífico, *Anopheles albimanus* es considerado un vector primario de malaria en las Américas, y en Guatemala presenta una amplia distribución. Dada su importancia médica ha sido necesario profundizar en el conocimiento de su bionomía, en especial sobre la ecología de sus criaderos (González, 2005); además de que las tácticas para las actividades de control vectorial deben ser decididas con base en el conocimiento de la biología, comportamiento y grado de susceptibilidad de cada especie y sus poblaciones a los insecticidas (WHO 1989).

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la variación métrica inter e intraespecífica en especies de *Anopheles* vectoras de Malaria en Guatemala.

5.2 Específicos

1. Determinar si existen diferencias fenotípicas significativas entre especies de *Anopheles* vectoras de Malaria en Guatemala
2. Determinar si existen diferencias fenotípicas entre poblaciones geográficas y epidemiológicas de *Anopheles albimanus*, principal vector de Malaria en Guatemala.
3. Establecer el potencial de las técnicas Morfométricas como herramientas útiles para estudios taxonómicos y de variación intraespecífica, que sirvan de apoyo al diseño de estrategias de control.
4. Contribuir con los conocimientos sobre la biología y dinámica poblacional de los vectores de Malaria en Guatemala.

6. METODOLOGÍA

6.1 Colecta de especímenes de Anophelinos:

Las colectas se realizaron en las Áreas de Salud de Escuintla y Sayaxché. Los viajes de campo se realizaron en los meses de septiembre y octubre, respectivamente. En ambas giras se contó con el apoyo del personal de vectores del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de cada Área.

La colecta del material se realizó en criaderos productivos (con presencia de larvas L4), en la Aldea San Juan La Noria, Tiquisate, Escuintla; y, en la Finca Sayaxché y la aldea San Lucas, Sayaxché, Petén. Las localidades se seleccionaron según las recomendaciones del personal de vectores de cada área. Para la colecta se utilizaron larveros especiales utilizados por el personal de vectores, y con la ayuda de palanganas blancas donde se colocaba la muestra, se extraían las larvas por medio de pipetas plásticas. En el caso de las larvas colectadas en Escuintla (de diferentes estadíos), éstas fueron trasladadas al Bioterio del LENAP y colocadas en bandejas especiales, dentro de jaulas especiales para mosquitos. En el caso de las larvas colectadas en Petén, estas fueron fijadas en etanol y trasladadas al LENAP.

Los adultos se colectaron en abrigo animal. Las colectas se realizaron en Versalles y Violetas del municipio de Masagua en Escuintla y en Los Olivos, Sayaxché, Petén. En el caso de Escuintla, las colectas se realizaron en la noche durante la actividad de picadura (en corrales de animales) y por la mañana en reposo. En ambos casos, las colectas fueron bajas, debido a que la presencia de lluvia disminuyó la actividad.

En Escuintla se colectaron larvas y adultos de *Anopheles albimanus*, mientras que en Sayaxché se colectaron larvas de *Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis* y *An. darlingi*, y adultos de *Anopheles albimanus*. En este lugar únicamente se colectó una hembra de *Anopheles vestitipennis* y no se colectaron

larvas de la misma, por lo que no se incluyó en los análisis. El estatus taxonómico de los especímenes se corroboró utilizando la clave de Clark & Darsie (1983) para larvas de cuarto estadio y adultos.

6.2 Selección y tamaño de muestra:

Para las técnicas de morfometría tradicional, cada grupo o población estudiada debe tener al menos el doble de individuos que de variables medidas en un Análisis Discriminante. En este caso se esperaba contar con al menos 30 especímenes por cada grupo; sin embargo, no se logró alcanzar estos tamaños de muestra debido a que por lo delicado y pequeño del material biológico, la mayor parte de los especímenes se destruyeron al montar las estructuras. Por esta misma razón no se pudo realizar el análisis de Asimetrías Morfométricas, ya que la mayor parte de las alas izquierdas se destruyeron al tratar de quitar lo más completas posibles las alas derechas (las cuales se utilizaron para los análisis de morfometría tradicional).

La primera selección del material se realizó durante el montaje, descartando las estructuras que se destruían y posteriormente se realizó otra selección una vez ingresadas las imágenes, descartando las imágenes que presentaban a las estructuras incompletas o con defectos en el montaje. Los grupos utilizados y los tamaños de muestra se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Poblaciones estudiadas y tamaños de muestra.

Procedencia	Especie	Tamaño de muestra		
		Larvas L4	Cabezas L4	Alas Hembras
Tiquisate, Escuintla	<i>Anopheles albimanus</i>	11	13	
Masagua, Escuintla	<i>Anopheles albimanus</i>			12
Sayaxché, Petén	<i>Anopheles albimanus</i>	33	38	20
Sayaxché, Petén	<i>Anopheles pseudopunctipennis</i>	12	12	
Sayaxché, Petén	<i>Anopheles darlingi</i>	3	3	
Cultivo*	<i>Anopheles albimanus</i>			12

*Material proporcionado por la Sección de Entomología Médica del MSPAS, Guatemala

6.3 Preparación del material:

A cada hembra le fueron removidas las cabezas y las alas con ayuda de pinzas de disección. En el caso de las cabezas, estas se arruinaban y botaban sus partes al momento de remover las alas por lo que ya no fueron utilizadas. Las alas de cada insecto se montaoán entre porta y cubreobjetos utilizando como medio la solución de Hoyer (Borror *et al.* 1989). Cada lámina fue debidamente identificada con un código correspondiente al individuo. El mismo medio se utilizó para el montaje de las larvas de 4to estadio.

6.4 Datos morfométricos

Las imágenes de las larvas y alas fueron captadas utilizando un sistema de video (Cámara Olympus OLY-750, conectada a un estereoscopio Olympus SZ-ST5). Las imágenes captadas se transmitieron a una computadora y fueron captadas por medio del software TVR (Life View Fly Video 2003). Para la toma de puntos se utilizó el programa tpsDig® (Rohlf, 2001) el cual permite obtener las coordenadas de los puntos que el investigador seleccione. Se obtuvieron las coordenadas de los diferentes puntos seleccionados (Figuras 1, 2 y 3).

Todo el procedimiento para la colecta de los datos morfométricos fue realizado por el mismo investigador para evitar sesgos. Las imágenes captadas serán transmitidas a una computadora y captadas por medio del software especializado TVR (Life View Fly Video 2003).

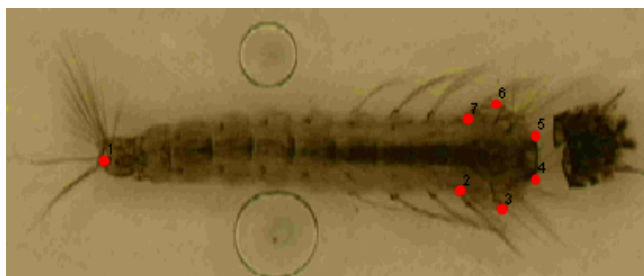


Figura 1. Puntos seleccionados en larvas de 4 estadio (L4) de Anophelinos

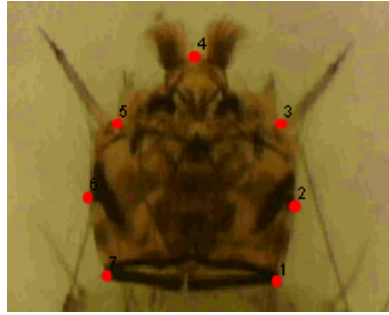


Figura 2. Puntos seleccionados en las cabezas de Larvas L4 de Anophelinos

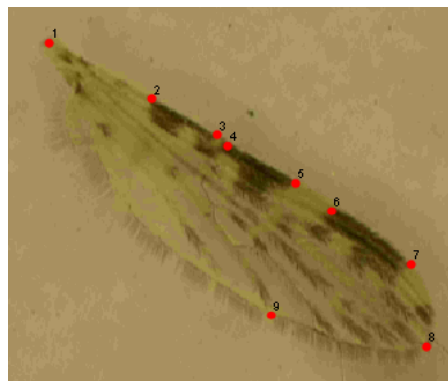


Figura 3. Puntos seleccionados en las alas de adultos hembra de *Anopheles albimanus*

6.5 Distancias Morfométricas

Utilizando las coordenadas de cada uno de los puntos seleccionados, se obtuvieron las mediciones morfométricas. Para esto, se utilizó el programa TETwin (Dujardin, JP), para calcular todas las distancias posibles entre los puntos y convertirlas en sus logaritmos naturales. Con los datos se construyeron las matrices de varianza-covarianza utilizadas para los análisis.

6.6 Análisis Morfométricos

En morfometría tradicional se utilizan dos aproximaciones para analizar los datos: análisis libre de isometría y análisis libre de alometría.

Análisis libre de alometría (Jaramillo & Dujardin, 2002; Dujardin 2000): aplica el método propuesto por *Klingenberg* (1996) para la corrección del tamaño e indica que la eliminación del efecto del crecimiento implícito en los datos multivariados (tamaño) se logra proyectando los puntos de datos sobre un espacio que es ortogonal al vector de crecimiento. Este análisis se aplicó a las alas de hembras de *Anopheles albimanus*, ya que debe aplicarse a una misma especie y en un mismo contexto. Se utilizaron 5 variables. Las variables fueron las distancias entre los puntos 1-8, 1-9, 2-3, 4-5 y 6-7 (ver figura 3). Para que este método pudiera ser aplicado a un conjunto de variables, era necesario probar en primer lugar la compatibilidad de los datos con el modelo de un eje alométrico común, es decir, el modelo de los componentes principales comunes (Dujardin & Le Pont, 2000) por medio de una prueba de Chi cuadrado (X^2) de bondad de ajuste. Este análisis es muy riguroso en cuanto al número de variables que pueden ser utilizadas, ya que se recomienda usar la mitad del número de individuos del grupo más pequeño a ser analizado.

El conjunto de variables seleccionado no siguió el modelo necesario, por lo que se procedió a realizar el segundo análisis.

Análisis libre de isometría (Jaramillo & Dujardin, 2002; Dujardin, 2000): Aplica el método de *Mossiman* y también se denomina *Análisis de la Conformación* (1970, citado por Dujardin 2000), e indica que la conformación C puede ser definida de la siguiente manera:

$$C = X/T$$

donde X es un conjunto de distancias entre puntos, y T es una variable de tamaño global. Si esta ecuación se transforma en logaritmos se obtiene:

$$\log C = \log (X/T) = \log X - \log T$$

Este análisis no requiere una asignación a priori de los grupos, por lo que se considera a todos los individuos como un mismo grupo. Se seleccionó un total de 6 distancias para las larvas L4: 1-3, 1-4, 1-7, 2-6, 3-4, 3-5 (ver figura 1); 5 distancias en las cabezas de las L4: 1-4, 2-4, 2-7, 3-6, 4-5 (ver figura 2); y 7 distancias en las alas: 1-2, 1-8, 1-9, 2-3, 4-5, 6-7, 8-9 (ver figura 3). Estas medidas se seleccionaron tratando de

representar anchos y largos de la estructura, o manchas presentes que permitieran la visibilidad de los puntos para que fueran reproducibles de un espécimen a otro.

A partir de las distancias se obtuvieron *variables de conformación o variables libres de tamaño isométrico* al restarles el valor de la variable de tamaño global, denominada *tamaño isométrico* (promedio de las mediciones de cada individuo). Las variables de conformación fueron sometidas a un análisis de componentes principales (ACP), debido a que después de retirar el tamaño isométrico se pierde un grado de libertad, ya que la suma de los valores de las variables de conformación para un individuo siempre suma cero (Dujardin 2000). Los primeros 4 componentes principales que contribuyeron con la mayor parte del porcentaje de variación pasaron a denominarse *componentes de conformación o variables libres de isometría* y se utilizaron como datos en un análisis discriminante. Los individuos se proyectaron en diagramas sobre los primeros dos factores discriminantes para examinar la diferenciación de los grupos.

Los análisis discriminantes -AD- se acompañaron de un test de significancia que indica que tan separadas están las medias (centroides) de los grupos después de la discriminación. El estadístico *Wilks' Lambda* se utilizó para probar la hipótesis que las medias de los grupos (centroides) son iguales. Lambda tiene valores entre 0 y 1, valores pequeños indican fuertes diferencias entre grupos, valores cercanos a 1, no hay diferencias (SPSS® Base 10.0 Applications Guide 1999). Los análisis también se acompañaron del estadístico *Kappa (K)*, el cual proporciona una medición del acuerdo entre la clasificación original de los insectos en grupos, y la reclasificación producida por el AD, es decir que cuando un individuo o caso es asignado en categorías por distintos medios, el investigador quiere saber si las asignaciones están completamente en acuerdo entre sí, o si las asignaciones no muestran acuerdo y parecen ser al azar. (SPSS 1999, Siegel & Castellan 1988). Kappa tiene valores entre 0 y 1. Valores entre 0 y 0.20 indican una concordancia leve (cercana al azar); entre 0.21 y 0.40, regular; entre 0.41 y 0.60, moderada; entre 0.61 y 0.80, sustancial y mayor de 0.80, casi perfecta (Landis y Koch 1977, citado en Pinto Soares et al 1999).

Los paquetes estadísticos utilizados fueron:

SPSS for Windows 15.0 (SPSS Inc. 2006): Análisis de Componentes Principales, Análisis Discriminante.

NTSys pc 2.02j (Applied Bioestistics Inc. 1998): Modelo de componentes principales comunes.

TET_05 (Jean Pier Dujardin): cálculo de distancias.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis Libres de Isometría

7.1.1 Análisis Interespecíficos.

Los análisis libres de isometría fueron realizados utilizando distancias tomadas sobre larvas L4 y cabezas de L4 de especímenes de *Anopheles albimanus*, *An. Pseudopunctipennis* y *An. Darlingi*. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 4-5. En las tablas 2 y 4 se presentan los valores de los estadísticos Wilk's Lambda y Kappa con sus respectivas significancias (valor p), así como el porcentaje de contribución de los 4 primeros componentes principales –cp-, a partir de los cuales se realizaron los análisis discriminantes y el porcentaje de variación que representan los 2 primeros factores discriminantes (funciones), en base en los cuales están construidos los gráficos de dispersión.

Los resultados obtenidos entre las larvas L4 y las cabezas de las L4 variaron fuertemente, mostrando que las medidas tomadas en el cuerpo de las larvas de L4, no son buenos parámetros de diferenciación entre especies, presentando valores de significancia mayores a 0.05 para los estadísticos Wilk's lambda y Kappa, lo cual indica que no hubo ninguna diferencia entre las especies estudiadas y que la agrupación que presentan es cercana a una clasificación por azar. Por el otro lado, las cabezas de estas mismas larvas, pero medidas por separado y a una mayor escala, son mejores estructuras para la diferenciación morfométrica, ya que presentaron valores de significancia estadística menores a 0.05. En el caso de Wilk's lambda, este valor nos indica que al menos uno de los grupos es significativamente diferente de los demás. En el caso del Kappa, el valor obtenido (0.561) nos indica que la reclasificación producida por el análisis fue moderada. Las tablas 3 y 5 muestran los porcentajes de reclasificación producidos en el Análisis Discriminante. En la tabla 3 se puede observar que en el caso del grupo 2 (*Anopheles albimanus* de Sayaxché, Petén), únicamente el 3% de los especímenes medidos se reclasificó en su grupo original.

Tabla 2. Estadísticos para el análisis libre de isometría en Larvas L4 de diferentes especies de Anophelinos de Guatemala.

Estadístico	valor	p
%información 4 componentes principales	100.00	---
%variación Factor discriminante 1	89.7	---
%variación Factor discriminante 2	6.7	---
Wilk`s Lambda	0.859	0.509
% de reclasificación AD	18.6	---
Kappa	0.004	0.945

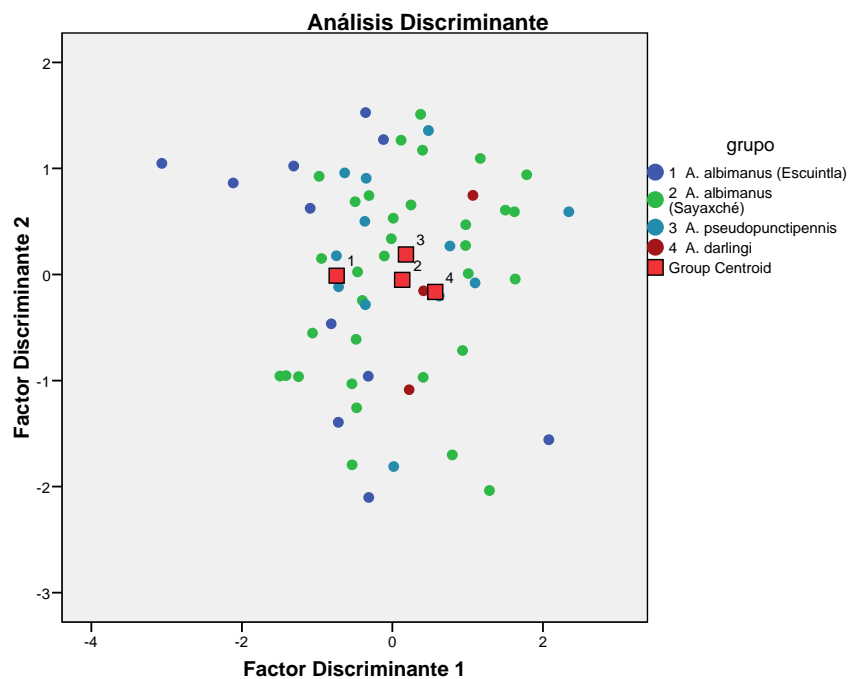


Figura 4. Gráfico de dispersión construido en base a las funciones obtenidas de un AD sobre los 4 primeros componentes principales obtenidos en un ACP sobre 5 variables medidas en larvas L4 de 3 especies de Anophelinos vectores de Malaria en Guatemala.

grupo			Predicted Group Membership				Total
			1	2	3	4	
Original %	1		54.5	18.2	18.2	9.1	100.0
	2		36.4	3.0	27.3	33.3	100.0
	3		25.0	16.7	25.0	33.3	100.0
	4		.0	33.3	33.3	33.3	100.0

Tabla 3. Resultados de la clasificación obtenida en el Análisis Discriminante en variables de larvas L4 de Anophelinos de Guatemala.

Tabla 4. Estadísticos para el análisis libre de isometría en cabezas de Larvas L4 de diferentes especies de Anophelinos de Guatemala.

Estadístico	valor	p
%información 4 componentes principales	99.348	---
%variación Factor discriminante 1	96.5	---
%variación Factor discriminante 2	3.0	---
Wilk's Lambda	0.260	0.000<0.05
% de reclasificación AD	71.2	---
Kappa	0.561	0.000<0.05

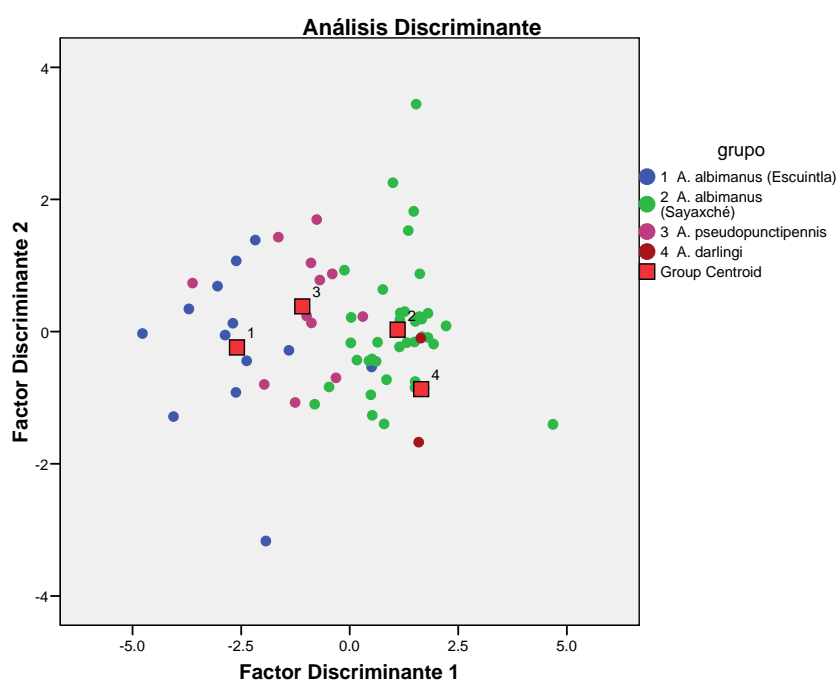


Figura 5. Gráfico de dispersión construido en base a las funciones obtenidas de un AD sobre los 4 primeros componentes principales obtenidos en un ACP sobre 6 variables de las cabezas de larvas L4 de 3 especies de Anophelinos vectores de Malaria en Guatemala.

grupo	Predicted Group Membership				Total
	1	2	3	4	
Original %					
1	69.2	7.7	23.1	.0	100.0
2	.0	71.1	10.5	18.4	100.0
3	16.7	8.3	75.0	.0	100.0
4	.0	33.3	.0	66.7	100.0

Tabla 5. Resultados de la clasificación obtenida en el Análisis Discriminante en variables de cabezas de L4 de Anophelinos de Guatemala.

7.1.2 Análisis intraespecífico

El análisis libre de isometría se realizó utilizando distancias tomadas sobre alas de hembras de *Anopheles albimanus* colectadas en localidades de Escuintla y Petén. Se incluyó un grupo de hembras de cultivo de varias generaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. En la tabla 6 se presentan los valores de los estadísticos Wilk's Lambda y Kappa con sus respectivas significancias (valor p), así como el porcentaje de contribución de los 4 primeros componentes principales –cp-, a partir de los cuales se realizó el análisis discriminantes y el porcentaje de variación que representan los 2 primeros factores discriminantes (funciones), en base en los cuales están contruidos los gráficos de dispersión.

Los resultados muestran que al menos unos de los grupos presentó diferencias significativas con respecto a los otros (Wilk's lambda de 0.436, $p < 0.05$). El valor de Kappa (0.615) muestra que la concordancia entre la clasificación original y la producida por el análisis discriminante fue sustancial, siendo este el análisis en el que se observó una mejor separación de los grupos estudiados.

El gráfico muestra que, a pesar que las nubes de datos presentan cierto traslape, en el factor discriminante 1 (86.4% variación) se observa una clara separación entre el centroide del grupo de Escuintla con respecto a los centroides de los grupos de Sayaxché y de cultivo. Siendo el primero el grupo más grande, en cuanto a tamaño. En la tabla 7 se puede observar que el grupo de Escuintla fue el que mejor se discriminó, reclasificándose el 91.7% de los especímenes en su grupo original.

Tabla 6. Estadísticos para el análisis libre de isometría en alas de hembras de *Anopheles albimanus* de Guatemala.

Estadístico	Valor	p
%información 4 componentes principales	98.783	---
%variación Factor discriminante 1	86.4	---
%variación Factor discriminante 2	13.6	---
Wilk`s Lambda	0.436	0.000<0.05
% de reclasificación AD	75.0	---
Kappa	0.615	0.000<0.05

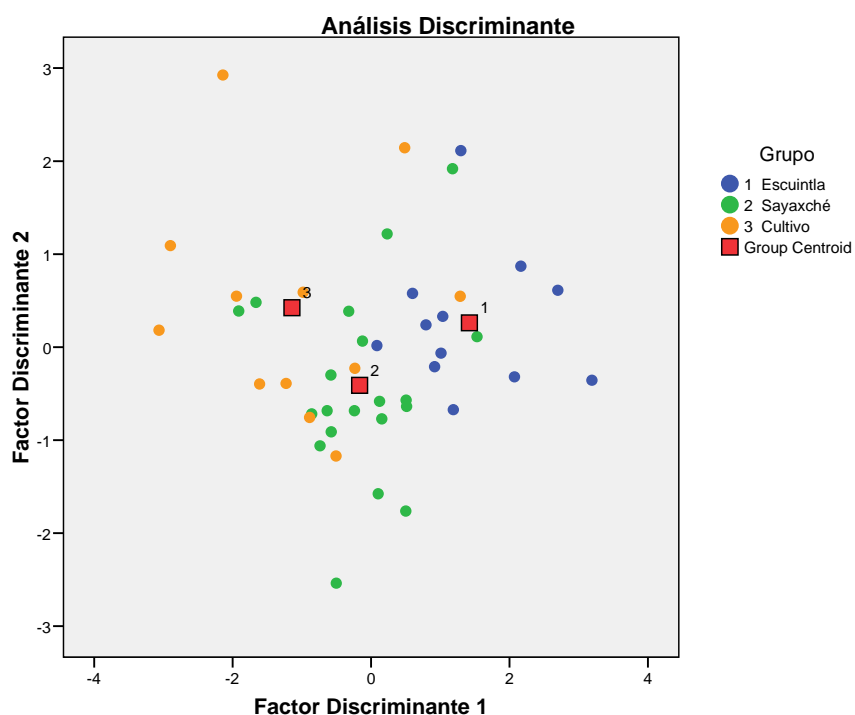


Figura 6. Gráfico de dispersión construido en base a las funciones obtenidas de un AD sobre los 4 primeros componentes principales obtenidos en un ACP sobre 7 variables de las alas de hembras de *Anopheles albimanus* de Guatemala.

Grupo	Predicted Group Membership			Total
	1	2	3	
Original %	1	2	3	1
	91.7	8.3	.0	100.0
	15.0	75.0	10.0	100.0
	16.7	25.0	58.3	100.0

Tabla 7. Resultados de la clasificación obtenida en el Análisis Discriminante en variables de las alas de hembras de *Anopheles albimanus* de Guatemala.

7.2 Análisis Libres de Alometría

Los análisis libres de alometría eliminan el efecto del crecimiento (tamaño) sobre las variables medida, lo cual se logra eliminando el componente principal común 1 -cpc 1-, considerado como la variable de estimación del tamaño global, por lo cual al excluirlo se dejan únicamente las variables de forma (Jaramillo & Dujardin, 2002). Los análisis libres de alometría se utilizan para estudios de variación intraespecífica aplicados en un mismo contexto: misma especie, mismo rango geográfico; pues se espera que los individuos tengan una misma manera de crecer. Es por esto que para poder realizar este análisis, es necesario probar la compatibilidad de las variables con el modelo de componentes principales comunes ($p \geq 0.05$). Se utilizaron 5 variables de las alas de hembras de *Anopheles albimanus* colectadas en Escuintla y Petén, además de un grupo de hembras de cultivo de varias generaciones. Sin embargo, no siguieron el modelo necesario, presentando un valor de $X^2 = 35.93436$, con un $p = 0.01566$ (< 0.5).

8. DISCUSIÓN

8.1 Selección de las poblaciones estudiadas

El comportamiento de la Malaria en Guatemala es endémico, distribuyéndose geográficamente en 20 departamentos del país, exceptuando Sacatepéquez y Totonicapán, donde no se han reportado casos de la Enfermedad (CNE, 2007a).

En Guatemala se han identificado 4 especies de Anophelinos involucrados en la transmisión de la Malaria. El vector más ampliamente distribuido es *Anopheles albimanus*, el cual se encuentra en la mayor parte de las Áreas del país. Los demás vectores tienen una distribución más restringida, pero debe tomarse en cuenta que debido al cambio climático, muchos vectores se han ido adaptando y colonizando nuevos hábitats, cómo en el caso de *Aedes aegypti*, cuya distribución reportada alcanzaba los 1200msnm y actualmente se ha ampliado su rango, encontrándose en alturas por encima de los 1600msnm (Comunicación Personal, Lic. Jaime Juárez, OPS, Guatemala). Esta situación ya ha sido reportada también en *Anopheles albimanus* en Colombia, dónde reportaron la presencia de este vector a 995 msnm, siendo su distribución altitudinal generalmente por debajo de los 400msnm (González, R & Martínez, L 2006). Esto hace que sea importante el estudio y monitoreo de las especies de importancia médica, ya que su llegada a hábitats donde la gente es más susceptible a una enfermedad representa un grave riesgo. En el caso de la Malaria, los estudios de morfometría permitirían conocer que posible especie está llegando al lugar y esta información sirve para plantear las medidas de control que deben llevarse a cabo.

A pesar de la amplia distribución de *Anopheles albimanus*, sus poblaciones presentan importantes diferencias a nivel epidemiológico. Las Áreas de Salud que generalmente reportan el mayor número de casos de Malaria son Escuintla y Petén Suroccidente (Sayaxché) (MSPAS 2007; MSPAS 2008), por lo cual estas poblaciones fueron seleccionadas para los estudios morfométricos. El área de salud de Sayaxché

también fue seleccionada, ya que en ella se encuentran localidades con criaderos en los que llegan a convivir las 4 especies de Anophelinos involucradas en la transmisión de la Enfermedad.

En el país existen pocos estudios sobre los vectores de la Malaria; sin embargo, es importante desarrollar estudios en este campo, ya que en otros países han encontrado que especies de *Anopheles*, consideradas como poblaciones de una misma especie, representan en realidad complejos de especies, que pueden ser diferenciados por medio de distintas técnicas genéticas y fenéticas (Rubio-Palis 1998; Calle *et al.*, 2002). Obtener información a este nivel es importante desde el punto de vista de la taxonomía, ya que clarificar el estatus taxonómico de las poblaciones puede ayudar a comprender mejor la dinámica de la especie. Desde el punto de vista de control, también representa información importante, ya que el conocimiento de la biología y dinámica de la especie, puede ayudar al planteamiento de estrategias exitosas basadas en el conocimiento de aspectos específicos de las poblaciones, como ha sucedido en otras enfermedades vectoriales como Chagas en Guatemala (Datos Laboratorio de Entomología Aplicada y parasitología, USAC 2009).

8.2 Técnicas de Morfometría

En el país se han realizado pocos estudios relacionados con la dinámica poblacional y el comportamiento de los Anophelinos de importancia médica, así como de su taxonomía. Se ha reportado para especies vectoras de Malaria, en otros países, que las claves disponibles para Anophelinos, no alcanzan a diferenciar algunas especies que han sido identificadas por medios moleculares, ya que no alcanzan a tomar en cuenta la gran variabilidad morfológica que hay en algunas especies (Calle *et al.*, 2002). Es por esto que es necesario estudiar las poblaciones de Anophelinos y buscar marcadores genéticos y fenéticos que nos permitan alcanzar este objetivo.

Debido a la importancia de los estudios poblacionales para Anophelinos, se han aplicado diferentes técnicas para su estudio. Entre los marcadores moleculares, se ha

utilizado los ITS2 (Sedaghat *et al.*, 2003; Linton *et al.*, 2003) y Microsatélites (Mirabello *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos por esta técnica han brindado información importante sobre el estatus taxonómico de poblaciones de distintas especies; sin embargo los métodos moleculares son laboriosos y costosos, por lo que es necesario aplicar herramientas más sencillas que nos permitan alcanzar el mismo objetivo.

Dentro de las herramientas no moleculares, un marcador fenético de fácil aplicación es la morfometría, la cual se ha utilizado ampliamente en estudios de vectores de enfermedades (Dujardin 2000). Esta herramienta ha sido utilizada para estudios taxonómicos en especies de Anophelinos, brindando información importante sobre la presencia de complejos de especies (Calle *et al.*, 2002; Calle *et al.*, 2008; Fajardo *et al.*, 2008; Rubio-Palis 1998). La morfometría multivariada puede contribuir a resolver problemas taxonómicos, además de que ha mostrado ser un método útil para diferenciar insectos de importancia médica que presentan problemas en su identificación (Calle *et al.*, 2002).

8.3 Variación interespecífica

El ambiente y las enfermedades tropicales en humanos están unidos por el comportamiento humano, tanto en actividades personales como en organización social (WHO, 2002). De acuerdo con Gratz (1999) en Barreto *et al.*, (2006), un aspecto muy importante de la epidemiología de las enfermedades transmitidas por artrópodos es la información relacionada con los vectores, y uno de los primeros pasos que deben realizarse es la identificación de las especies que se encuentran en determinadas zonas.

Algunos vectores son generalmente encontrados en la misma área geográfica y presentan un alto grado de similitud morfológica en el estadio adulto, particularmente entre las hembras, lo cual puede dar lugar a confusión en cuanto a su clasificación (Calle *et al.*, 2002).

Los resultados de los análisis libres de isometría para el estudio de las variaciones interespecíficas, mostraron que las cabezas de larvas L4 de Anophelinos, presentan algunos caracteres que podrían servir para diferenciar entre algunas especies. En el análisis que incluyó 3 especies diferentes de Anophelinos de importancia médica, el análisis discriminante produjo una reclasificación, en la que el 71.2% de los especímenes fueron reclasificados en su grupo original. El grupo que presentó una mejor reclasificación fue *Anopheles pseudopunctipennis* (75%) seguido de las poblaciones de *Anopheles albimanus* de Sayaxché (71%) y Escuintla (69.2%). Estas dos últimas poblaciones, a pesar de estar taxonómicamente identificadas como una misma especie, presentaron diferencias morfométricas importantes que las separan completamente a una de la otra, inclusive a nivel de otra especie (ver Figura 5). Ambas especies se diferenciaron en el primer factor discriminante, el cual da cuenta del 96.5 % de la variación que presentan las poblaciones. Estas diferencias podrían deberse a que el rango geográfico es amplio y a que estas poblaciones han podido irse adaptando a sus medios particulares e ir diferenciándose una de la otra, tomando en cuenta que estos insectos presentan ciclos de vida muy cortos y esto puede favorecer que las adaptaciones que van sufriendo, aceleren los procesos de especiación. Debe tenerse en cuenta también, que este estudio no alcanzó a tomar en cuenta otros aspectos como la productividad de los criaderos. El efecto de factores inherentes al criadero, puede reflejarse en la reducción o abundancia de una especie, y se ha sugerido que la alta densidad de especímenes en un criadero y la competencia por alimentación, podría influir en la disminución del tamaño de los especímenes (González 2005), situación que debe ser tomada en cuenta en estudios futuros. En el caso de *Anopheles darlingi*, este se diferenció de las demás especies, sin embargo, el tamaño de muestra fue muy pequeño, lo que no permite hacer inferencias importantes.

Contrario al caso de las cabezas de L4, las mediciones realizadas en las larvas L4 de los Anophelinos, no presentaron diferenciación significativa para ninguno de los grupos. Debido a los tamaños de muestra de los grupos estudiados, no fue posible incluir un gran número de variables; sin embargo, en estudios futuros, si se ampliaran los tamaños de muestra, podrían estudiarse más variables. Los valores de

reclasificación en este análisis fueron muy bajos y el estadístico Kappa indicó que la concordancia fue cercana al azar.

8.4 Variación intraespecífica

Anopheles albimanus es considerado como un vector primario de malaria en las Américas (González 2005). En Guatemala, es el vector de mayor importancia. A pesar de no ser el mejor vector, está ampliamente distribuido en el país (Juárez 1992). Dada la importancia médica de este vector, ha sido necesario profundizar en el conocimiento de su bionomía y su ecología (González 2005). El desconocimiento de ciertos aspectos básicos de la ecología de los vectores ha impedido el uso adecuado de las medidas de control disponibles (Juárez 1992). En Guatemala se han realizado pocos estudios sobre la ecología de este vector.

Los resultados obtenidos en los análisis libres de isometría en esta especie, mostraron que las mediciones realizadas en las alas de hembras, fueron buenos parámetros para diferenciar entre poblaciones. Los centroides de los tres grupos estudiados se diferenciaron en el primer factor discriminante (86.4% de la variación). El grupo que fue mejor discriminado fue el de Escuintla, la clasificación producida por el análisis discriminante reclasificó un 91.7% de los especímenes en su grupo original. El grupo de Sayaxché se reclasificó en un 75%, mientras que el grupo de cultivo se reclasificó en un 58.3%. Los resultados de las alas, respaldan los resultados encontrados para las cabezas de las L4 en estos mismos grupos de *An. Albimanus*, indicando nuevamente a que estas diferencias podrían deberse a adaptaciones de las poblaciones a sus hábitats particulares. El estadístico Kappa mostró que la concordancia entre las clasificaciones fue sustancial. Estos resultados indican que la morfometría tradicional utilizada demostró ser útil para separar tres poblaciones de *Anopheles albimanus* de Guatemala.

Los análisis libres de alometría no pudieron ser llevados a cabo, ya que las variables estudiadas no siguieron el modelo de crecimiento común necesario para poder realizarlo. Esto indica que las poblaciones estudiadas, presentan diferentes formas de crecer, lo cual no es esperado dentro de una misma especie. Sin embargo, es posible encontrar diferentes maneras de crecer (alometrías divergentes) entre poblaciones geográficas y ecológicas de la misma especie, aunque no se sabe con qué frecuencia y hasta qué niveles. La razón es que la separación alopátrida produce divergencia genética que va aumentando de manera gradual a medida que la separación permanece en el tiempo (Dujardin 2000, Jaramillo & Dujardin 2002). La evidencia encontrada en este estudio nos indica la importancia de profundizar en los estudios sobre las poblaciones de esta especie (Calle *et al.*, 2002). Es necesario incluir más poblaciones que abarquen el rango de distribución, mejorar los tamaños de muestra y coleccionar en las épocas adecuadas; con el fin de clarificar el estatus taxonómico de este grupo, para saber si se está tratando con una misma especie o con un complejo de especies.

9. CONCLUSIONES

9.1 A nivel interespecífico, las mediciones realizadas en las cabezas de larvas de L4 de tres especies de *Anopheles*, de importancia médica en Guatemala, mostraron ser buenos parámetros de diferenciación morfométrica.

9.2 Los Análisis Morfométricos aplicados a nivel interespecífico, separaron claramente a *Anopheles pseudopunctipennis* de las poblaciones de *Anopheles albimanus* de Escuintla y Sayaxché, las cuales a su vez, se separaron una de otra, mostrando importantes diferencias morfométricas.

9.3 Las mediciones realizadas en larvas L4 de Anophelinos, no mostraron ninguna diferenciación entre las especies en los análisis de morfometría tradicional.

9.4 a nivel intraespecífico, *Anopheles albimanus* presentó diferencias morfométricas significativas entre los tres grupos estudiados.

9.5 Las alas de las hembras de *Anopheles albimanus*, presentan características morfométricas que permiten separar poblaciones de importancia epidemiológica.

9.6 Las poblaciones de *Anopheles albimanus* estudiadas, presentaron importantes diferencias de forma, mostrando diferentes formas de crecer en el interior de la especie.

9.7 La morfometría tradicional es una herramienta útil para el estudio de la dinámica poblacional de Anophelinos.

10. RECOMENDACIONES

10.1 se debe profundizar en el estudio de los Anophelinos de importancia médica en Guatemala, ya que actualmente en el país se están ejecutando diversas estrategias para controlar la enfermedad y sus vectores.

10.2 Se debe incluir poblaciones de diferentes localidades que abarquen el rango de distribución de las especies, para esto es necesario contar con el apoyo del personal de vectores de las Áreas de Salud para que se realicen colectas sistemáticas y se conserve el material colectado, creando colecciones de referencia.

10.3 Se debe mejorar el tamaño de muestra de cada una de las poblaciones a estudiar.

10.4 se recomienda continuar con los estudios morfométricos de este género, ya que esta información puede ser de utilidad para el diseño de estrategias de control.

10.5 se recomienda reforzar los estudios aplicando técnicas de Morfometría geométrica, que preserven la anatomía de las estructuras estudiadas.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Barreto, M. Burbano, M. Barrerto, P. 2006. Registros de Lutzomyia (Diptera:Psychodidae) en nuevas localidades de Colombia. Colombia Médica Vol. 37(1): 39-45.
2. Beaty, B; Marquardt, W. 1996. The Biology of Disease Vectors. USA. 632 pp.
3. Bookstein, F. 1982. *Foundations of Morphometrics*. Ann. Rev. Ecol. Syst. 13:451-470.
4. Borror, D.J. Triplehorn, C. A. Johnson, N.F. 1989. *An introduction to the study of Insects*. 6 ed. Saunders College Publishers. USA. 875 pp.
5. Bustamante, DM. Monroy, C. Menes, M. Rodas, A. Salazar-Schettino, PM. Rojas, G. Pinto, N. Guhl, F. Dujardin, JP. 2004. *Metric Variation among Geographic Populations of the Chagas Vector Triatoma dimidiata (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and Related Species*. J. Med. Entomol. 41(3): 296-301.
6. Calle, D. Quiñonez, M. Erazo, H. Jaramillo, N. 2002. *Morphometric Discrimination of females of five species of Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus from southern and northwest Colombia*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 97 (8):1191-1195.
7. Calle, D. Quiñonez, M. Erazo, H. Jaramillo, N. 2008. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de Anopheles (Nysorhynchus) presentes en Colombia. Biomédica 28: 371-385.
8. Centro Nacional de Epidemiología. 2007a. *Semana Epidemiológica en Guatemala, No. 7*. MSPAS, Guatemala. Año IX, No. 474.
9. Centro Nacional de Epidemiología. 2007b. *Semana Epidemiológica en Guatemala, No. 51*. MSPAS, Guatemala. Año IX, No. 504.
10. Centro Nacional de Epidemiología. 2008a. *Semana Epidemiológica en Guatemala, No. 4*. MSPAS, Guatemala. Año X, No. 509.
11. Centro Nacional de Epidemiología. 2008b. *Semana Epidemiológica en Guatemala, No. 16*. MSPAS, Guatemala. Año X, No. 521.
12. Clark, S; Darsie, R. 1983. *The Mosquitoes of Guatemala*. Mosquito Systematic, Vol 15 (3): 283 pp.

13. Daly, H. 1985. *Insect Morphometrics*. Ann. Rev. Entomol. 30: 415-38.
14. Daniel, Wayne. 1999. *Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud*. Editorial Limusa, México. 878 pp.
15. Darroch, JN; Mossimann, JE. 1985. *Canonical and Principal components of shape*. Biometrika, 72: 241-252.
16. Dujardin, JP. 2000. *Introducción a la Morfometría* (Con énfasis en Phlebotominae y Triatominae). Inédito.
17. Fajardo, M. Gonzalez, R. Suárez, M. López, D. Wilkerson, R. Mureb, M. 2008. Morphological analysis of three populations of Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari Gabaldón from Colombia. Mem Ins Oswaldo Cruz, Vol. 103(1): 85-92.
18. Falconer, DS. 1981. *Introduction to quantitative genetics*. Longman Inc. London and New York. 300 pp.
19. Footitt, R. Sorensen, J. 1992. *Ordination Methods: Their Contrast to Clustering and Cladistic Techniques*. En Sorensen JT, Footitt R, editors. Ordination in the study of Morphology, Evolution and Systematics of insects: Applications and quantitative genetic rationals. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B V. pp 1-10.
20. Gonzáles, R. 2005. *Efecto del criadero sobre la duración del ciclo de vida y productividad de Anopheles albimanus Wiedmann*. Colombia. Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle, 6 (1):1-6.
21. Gonzáles, R. Martínez, M. 2006. *Nuevo registro de distribución altitudinal de Anopheles albimanus en Colombia*. Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle 7(2):19-23.
22. Grieco, J. Johnson, S. Achee, N. Masuoka, P. Pope, K. Rejmankova, E. Vanzie, E. Andre, R. Roberts, D. 2006. *Distribution of Anopheles albimanus, Anopheles vestitipennis, and Anopheles crucians associated with land use in Northern Belize*. Journal of medical entomology Vol. 43(3):614-622.
23. Jaramillo, N. 2000. *Partición en tamaño y forma de los caracteres métricos y su interés en los estudios poblacionales aplicados a los Triatominae*. Tesis de doctorado. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

24. Jaramillo, N. Dujardin, JP. 2002. *Análisis Morfométrico: significado biológico del tamaño y la conformación*. Colombia. Inédito.
25. Jolicoeur, P. 1963. *The multivariate generalization of the allometry equation*. Biometrics 19, 497-499.
26. Juárez, J. 1992. *Incriminación de especies Anofelinas transmisoras de Malaria en la región norte de Guatemala*. USAC, Guatemala. 68 pp.
27. Kiszewski *et al.*, 2004. *Global distribution (Robinson projection) of dominant or potentially important malaria vectors*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70(5):486-498. En: <http://www.cdc.gov/Malaria/biology/map.htm>. Consultado en junio 2008.
28. Klingenberg, CP. 1996. *Multivariate allometry*. En LF Marcus, M Conti, A Loy, GJ Naylor, DE Slice (editores). Advances in morphometrics, NATO ASI, Series A: Life Sciences. New York, Plenum Press, Volume 284, pp 23-49.
29. LifeView Fly Video. 2003. Animation Technologies Inc.
30. Linton, Y. Smith, L. Koliopoulos, G. Samanidou, A. Zounos, A. Harbach, R. 2003. Morphological and molecular characterization of *Anopheles maculipennis* Meigen, type species of the genus and nominotypical member of the Maculipennis complex. Systematic entomology 28: 39-55.
31. Manoukis, N. Touré, M. Sissoko, I. Doumbia, S. Traoré, S. Diuk-wasser, M. Taylor, C. 2006. *Is vector body size the key to reduced Malaria transmission in the irrigated Region of Niono, Mali?*. Journal of Medical Entomology. Vol 43(5): 820-827.
32. Mirabello, L. Vineis, J. Yanoviak, S. Scarpassa, V. Pova, M. Padilla, N. Achee, N. Conn, J. 2008. Microsatellite data suggest significant population structure and differentiation within the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. BMC Ecology 8: 3
33. Monroy, C. Bustamante, D. Rodas, A. Rosales, R. Mejía, M. Tabaru, Y. 2003. *Geographic Distribution and Morphometric Differentiation of Triatoma nitida Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Guatemala*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(1): 37-43.

34. Moller, A; Swaddle, J. 1997. *Asymmetry, developmental stability, and evolution*. Oxford University Press, Oxford. 291 pp.
35. MSPAS. 2006. *Memoria anual de informática y vigilancia epidemiológica, 2005*. Centro Nacional de Epidemiología, Guatemala. 575 pp.
36. MSPAS. 2007. *Manual operativo para la vigilancia y control de las fases inmaduras de los vectores de malaria en Guatemala*. Guatemala. 45 pp.
37. MSPAS. 2008. *Memoria anual de vigilancia epidemiológica 2007*. Centro Nacional de Epidemiología, Guatemala. 546 pp.
38. Mullen, G; Durden, L. 2002. *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier Science. USA. 597 pp.
39. OMS. 2003. *Defensa global contra la amenaza de enfermedades infecciosas*. OMS/CDS/2003.15.
40. OPS. 2001. *Informe de la situación de los programas regionales de malaria en las Américas*. CD43/INF/1. 13pp.
41. OPS. 2008. *142nd session of the executive committee, Malaria: Progress report*. Washington, USA. CE142/16. 7 pp.
42. Palmer, A. Strobeck, C. 1986. *Fluctuating Asymmetry (Measurement, Analysis, Patterns)*. Ann. Rev. Ecol. Syst. 17: 391-421.
43. Petrarca, V. Sabatinelli, G. Touré, Y. Di Deco, M. 1998. *Morphometric Multivariate Analysis of field samples of adult Anopheles arabiensis and An. Gambiae s.s. (Diptera: Culicidae)*. Journal of Medical Entomology, Vol 35(1):16-25.
44. Pimentel, RA. 1992. *An introduction to ordination, principal components analysis and discriminant analysis*. En: RG Footitt and JT Sorensen editors. *Ordination in the study of morphology, evolution and systematics of insects: applications and quantitative genetic rationales*. Elsevier, New York. 418 pp.
45. Rohlf, J. 1990. *Morphometrics*. Rev. Ecol. Syst. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, USA.
46. Rohlf, J. Marcus, L. 1993. *A Revolution in Morphometrics*. Trends in Ecology and Evolution. Vol. 8, No. 4. 129-132.

47. Rohlf, J. 1998. *NTSYSpc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0) Users Guide*. Exeter Software. New York.
48. Rohlf, J. 2001. tpsDig, version 1.27. Ecology and Evolution. State University of New York, Stony Brook, NY.
49. Rubio-Palis. 1998. *Caracterización morfométrica de poblaciones del vector de Malaria Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi en Venezuela*. Boletín de Entomología Venezolana. Vol 13(2):141-172.
50. Sedaghat, M. Linton, Y. Nicolescu, G. Smith, L. Koliopoulos, G. Zounos, A. Oshaghi, M. Vatandoost, H. Harbach, R. 2003. Morphological and molecular characterization of *Anopheles sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the middle east. *Systematic Entomology* 28: 241-256.
51. Siegel, S. Castellan, NJ. 1988. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2d ed. Mc Graw-Hill Book Company. USA. 399 pp.
52. SPSS® Base 15.0. 2006. *Applications Guide*. SPSS Inc. USA.
53. West-Eberhard, MJ. 1989. *Phenotypic Plasticity and the origins of Diversity*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20: 249-278.
54. WHO. 1989. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. Geneva. WHO/VCB/89.967.
55. WHO. 2002. Urbanization: an increasing risk factor for Leishmaniasis. *Weekly epidemiological record*. No. 44(77):365-372.
56. WHO. 2008. *Weekly epidemiological record: WHO position statement on integrated vector management*. Geneva. 83:177-184.
57. World Bank. 1993. *World Development Report 1993 Investing in Health*. Oxford University Press, New York. 329 pp.
58. Yurttas, H. Alten, B. Aytakin, A. 2005. *Variability in natural populations of Anopheles sacharovi (diptera: Culicidae) from southeast Anatolia, revealed by morphometric and allozymic analyses*. *Journal of Vector Ecology*, Vol 30(2): 206-212.