

Estudio comparativo de la susceptibilidad de poblaciones de *Anopheles aquasalis* a la infección con *Plasmodium vivax* en Venezuela

Jorge E. Moreno, Jesús A. Berti y Julio E. González

Anopheles aquasalis es un importante vector de malaria en Venezuela, Brasil, Trinidad e islas del Caribe. En Venezuela, esta especie es responsable de mantener un foco de transmisión de malaria por *Plasmodium vivax* en los estados Sucre y Delta Amacuro, sin embargo hacia el occidente no está implicada en la transmisión. Con la finalidad de comprobar la existencia de un gradiente en la competencia vectorial de esta especie, que va de mayor a menor desde Brasil hacia Venezuela, se emprendió un estudio de su susceptibilidad a *P. vivax* en cuatro localidades seleccionadas en el oriente y centro de su distribución geográfica en Venezuela; dos en el delta del río Orinoco, una en el estado Sucre y una en el estado Aragua. De cada una de estas localidades se infectaron experimentalmente mosquitos criados en el laboratorio (F1) sobre pacientes infectados con *P. vivax*. Los resultados obtenidos son indicativos de diferencias en la susceptibilidad a *P. vivax* entre las poblaciones de *An. aquasalis* estudiadas. Se reporta el fenómeno de melanización de oocistos y esporozitos.

Palabras clave: *Anopheles aquasalis*, *Plasmodium vivax*, susceptibilidad, infección experimental, melanización, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

Anopheles aquasalis Curry, 1932 es un importante vector de malaria en la región noreste de Suramérica que incluye Venezuela, Trinidad, Guyana, Suriname, Antillas menores y Brasil (Fleming, 1986). En Venezuela es considerado el principal vector de malaria por *Plasmodium vivax* en la región costera del extremo nororiental del país (Berti *et al*, 1993a), representando un problema de salud pública por la elevada morbilidad malarica registrada en esa zona. En 1988 se registraron 4.998 casos de malaria en el estado Sucre, en 1989 hubo 5.513, en 1990 el registro fue de 6.842 y en 1991 llegó a 8.231 casos (Berti *et al*, 1998). Por este motivo, en el año 1991 se inició un proyecto de investigación (Berti *et al*, 1993 a, b), que abarcó aspectos

taxonómicos, bionómicos, ecológicos y de competencia vectorial, destinados a conocer mejor la biología y ecología de esta especie e implementar un programa de manejo integrado de vectores en la región (Zimmerman & Berti, 1994).

Anopheles aquasalis está distribuido en toda la región costera de Venezuela desde el delta del río Orinoco en el oriente hasta el estado Zulia en el occidente. Sin embargo, sólo es incriminado como vector en la zona oriental del país, principalmente en el estado Sucre (Berti *et al*, 1993a; Cáceres, 1993; Zimmerman & Berti, 1994). Esta especie no tiene ninguna responsabilidad en la transmisión malarica del occidente del país. *Anopheles aquasalis* es reportado en la cuenca del Lago de Valencia por Cova-García (1964). En su distribución continental la especie sólo es vector en la porción occidental, desde Brasil hasta Venezuela, incluyendo Guyana e islas vecinas (Faran & Linthicum, 1981). Debido a la variación en el gradiente de su

Instituto de Altos Estudios de Salud Pública "Dr. Arnoldo Gabaldon".
Av. Bermúdez Sur, Maracay, 2101, estado Aragua, Venezuela.
Telefax: 0243 - 2419997.

competencia vectorial, se ha sugerido la existencia de un proceso de diferenciación en las poblaciones de esta especie ubicadas a lo largo de la costa continental, que ha derivado en dos tipos diferentes; al este y al oeste del río Orinoco, siendo las poblaciones del este excelentes vectoras a diferencia de las del oeste y donde el delta de este río representa una zona de transición (Steiner *et al*, 1981). Este aspecto ha sido estudiado por Moncada & Conn (1992) quienes encontraron identidad cromosómica entre poblaciones de Venezuela y Brasil. No obstante, Conn *et al.*, (1993) encontraron diferencias en el ADN de estas dos poblaciones e identidad entre las poblaciones de Venezuela y Trinidad. En el presente trabajo se quiere comprobar si existen diferencias en la susceptibilidad a *P. vivax* entre poblaciones de *An. aquasalis* del centro y oriente del país, que confirmen al menos parcialmente, la existencia del gradiente sugerido por Steiner *et al.*, (1981).

MATERIALES Y MÉTODOS

Area de estudio. Se seleccionaron cuatro localidades de estudio en la parte central y oriental de la distribución geográfica de la especie en Venezuela (Figura 1). En el delta del Orinoco se seleccionaron dos localidades ubicadas a ambos márgenes del mismo; Pedernales (PED, 9°57'N, 62°6'W) y La Línea (LIN, 8°19'N, 59°51'W) en la frontera con Guyana; en el estado Sucre la localidad de Santa Rosa (SUC, 10°42'N, 63°25'W) y en el estado Aragua a Caño Rico (ARA, 10°7'N, 67°36'W), en la ribera occidental del Lago de Valencia. El área de estudio se corresponde con la ecoregión Costera, según la clasificación ecoregional de los vectores de la malaria propuesta por Rubio-Palis & Zimmerman (1997), salvo la zona del Lago de Valencia que según estos autores corresponde a la ecoregión de Piedemonte.

Colecta y cría de *Anopheles aquasalis*. Se colectaron especímenes hembras de *An. aquasalis* sobre cebo humano o animal (WHO, 1975) en cada una de las localidades. Para la localidad de Pedernales se incluyeron las dos subpoblaciones de la especie existentes en el área, *An. aquasalis* s.s. y *An. aquasalis deltaorinoquensis* (Cova-García *et al*, 1977) como dos poblaciones diferentes (PED1 y PED2 respectivamente). La población Pedernales 2 anteriormente fue considerada como la especie *An. deltaorinoquensis* por Cova-García *et al*, (1977), pero posteriormente fue colocada en sinónimia con *An. aquasalis* (Faran, 1980). Todas las hembras seleccionadas fueron alimentadas con sangre humana proveniente de voluntarios y mantenidas en condiciones de insectario según la metodología descrita por Zerpa *et al*, (1997, 1998) para la obtención de la

primera generación filial.

Infección experimental de mosquitos. Se infectaron hembras de *An. aquasalis* pertenecientes a la primera generación filial (F1) obtenidas en laboratorio, de aproximadamente 72 horas de emergidas, provenientes de parentales colectadas en cada una de las localidades de estudio. Estas, fueron puestas a picar en ayuna sobre pacientes adultos infectados con *P. vivax*, en el estado Sucre, de acuerdo al protocolo para experimentos con humanos (WHO, 1975). Se seleccionaron pacientes que no hubiesen recibido tratamiento antimalárico a quienes se les diagnosticó previamente la parasitemia en gota gruesa. Los mosquitos fueron puestos a picar sobre el paciente febril en vasos de cartón, en la cara interna de la pierna por debajo de la rodilla hasta su completa repleción (WHO, 1975; Davis, 1994). Se determinó la gametocitemia/ μ l de sangre en gota gruesa al momento de la ingestión, según la ecuación: parasitemia = No. de gametocitos x 8.000/100 leucocitos. Los mosquitos no repletos eran retirados del vaso y eliminados del estudio. Los mosquitos alimentados fueron mantenidos en un insectario a una temperatura media de 28°C y una humedad relativa superior al 80% por un lapso mínimo de 10 días hasta completar el ciclo esporogónico. Como dieta de mantenimiento se les suministró miel de abeja al 10%.

Determinación de la infección en el mosquito. La infección en el mosquito fue determinada por el método clásico de disección de estómago y glándulas salivales en solución salina (WHO, 1975). Para la búsqueda de ooquistes se disecaron mosquitos a partir del cuarto día de la comida infectante. Durante los días 7, 8 y 9 se disecaron estómagos y glándulas salivales para la búsqueda simultánea de ooquistes y esporozoitos; a partir del día 10 se disecaron sólo glándulas salivales hasta el día 14, siempre y cuando la sobrevivencia del mosquito lo permitiera. Los estómagos fueron examinados en fresco bajo microscopio compuesto (400X) en solución fisiológica saturada con azul de metileno para el conteo de los ooquistes. Siempre se examinó cuidadosamente el estómago de cada mosquito, observando en detalle cada plano del objeto a fin de contar con mayor exactitud el número de ooquistes presentes. Las glándulas salivales fueron maceradas en una gota de solución fisiológica haciéndose un extendido circular de aproximadamente 10 mm de diámetro, el cual fue fijado durante 10 minutos con metanol y coloreado con Giemsa. El conteo de esporozoitos se hizo bajo un microscopio compuesto (1.000X), siempre se contaron 100 o más campos.

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistica® versión 4.0. (Copyright

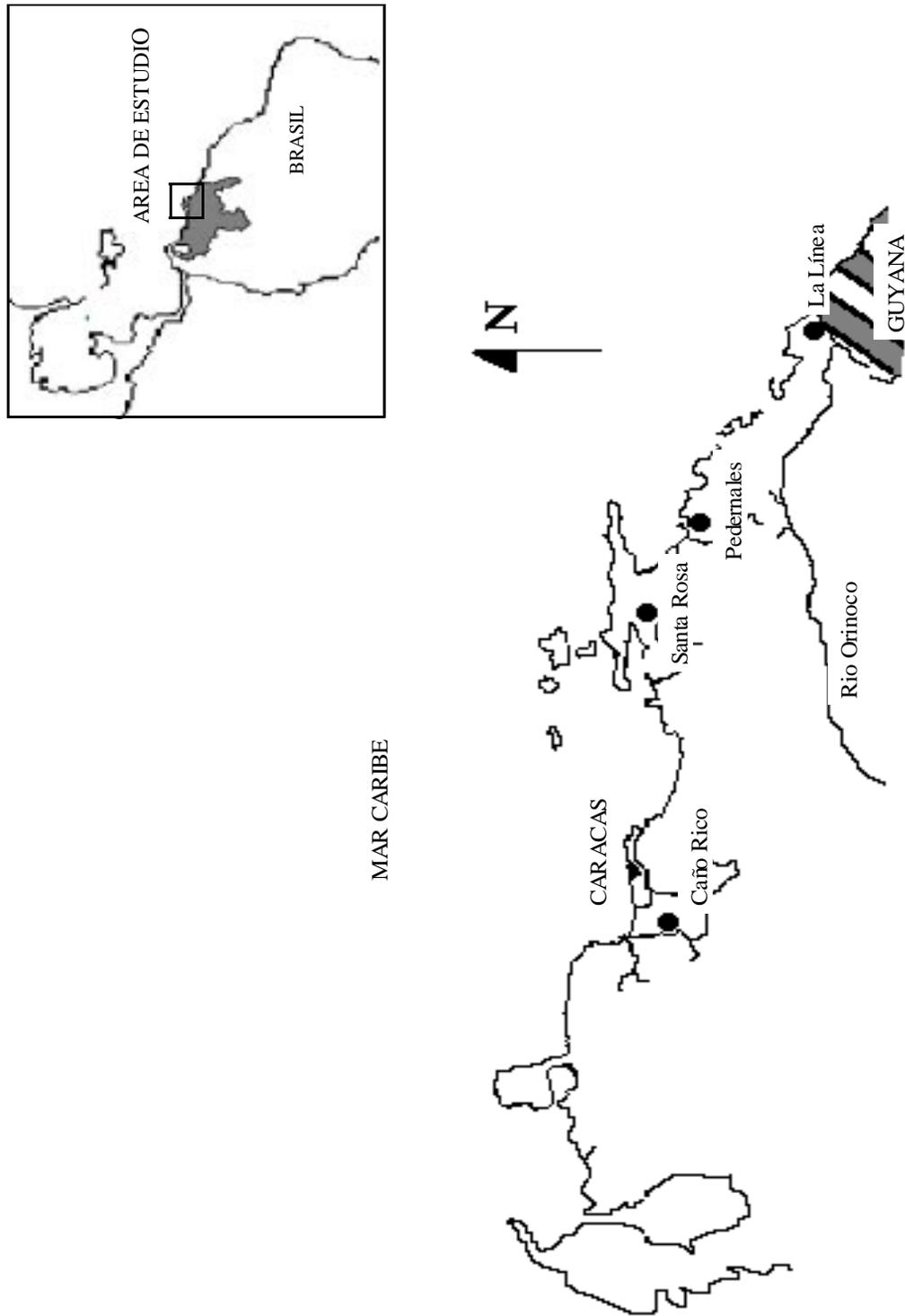


Fig.1.- Localización de las poblaciones de *Anopheles aquasalis* estudiadas en los estados Delta Amacuro, Sucre y Aragua.

@ Statsoft. Inc. 1993). Los datos no estuvieron distribuidos normalmente para ninguna de las variables. En el caso de la variable ooquistes melanizados se realizó la transformación angular de los datos. Para establecer asociaciones entre el número de parásitos ingurgitados y el número de ooquistes producidos se definieron para ambas variables tres rangos: bajo, medio y alto (Parasitemia baja = gametocitos $\leq 720/\mu\text{l}$, media = gametocitos $\leq 1.680/\mu\text{l}$, alta = gametocitos $> 1.680/\mu\text{l}$; números de ooquistes/estómago: bajo = ooquistes ≤ 14 , medio = $14 < \text{ooquistes} \leq 28$, alto = ooquistes > 28).

RESULTADOS

Ooquistes: Todas las poblaciones experimentales estudiadas se infectaron con *P. vivax*, en mayor o menor grado y desarrollaron el parásito hasta la fase de ooquiste. El número de ooquistes producidos en el estómago del mosquito resultó estar asociado negativamente al número de gametocitos ingurgitados. Se encontraron diferencias altamente significativas entre grupos (ANOVA de Kruskal-Wallis, $p < 0,001$) en cuanto al número de ooquistes producidos, cuando se separó el número de gametocitos ingurgitados por el mosquito en tres rangos: alto, medio y bajo, lo que indica que probabilísticamente al aumentar la cantidad de gametocitos ingurgitados

aumenta la probabilidad de que se produzcan menos ooquistes. Por otro lado, al eliminar la población de La Línea, el análisis de frecuencias entre poblaciones demostró que el número de ooquistes producidos no es independiente de la gametocitemia ingurgitada ($\chi^2 = 90,3001$, $p < 0,01$), i.e. el número de ooquistes producidos es mayor cuando la gametocitemia es baja. Paralelamente, un análisis de correlación cruzada demostró que el 100% de los casos con rango alto de ooquistes y más del 80% con rango medio ocurre cuando el rango de gametocitos ingurgitados es bajo, siendo el porcentaje de mosquitos positivos muy bajo cuando el rango de gametocitos es alto (Figura 2).

Los valores para la media de ooquistes formados para cada una de las poblaciones estudiadas son resumidos en la Tabla 1. Estos resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones en cuanto al número promedio de ooquistes desarrollados (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). La media de ooquistes producidos en la población de La Línea es considerablemente mayor que las correspondientes a las restantes poblaciones (Tabla 1). La media general para todas las poblaciones de *An. aquasalis* fue de 10,8 ooquistes por mosquito (Tabla 2). Por otro lado, la mediana de ooquistes formados por la población de La

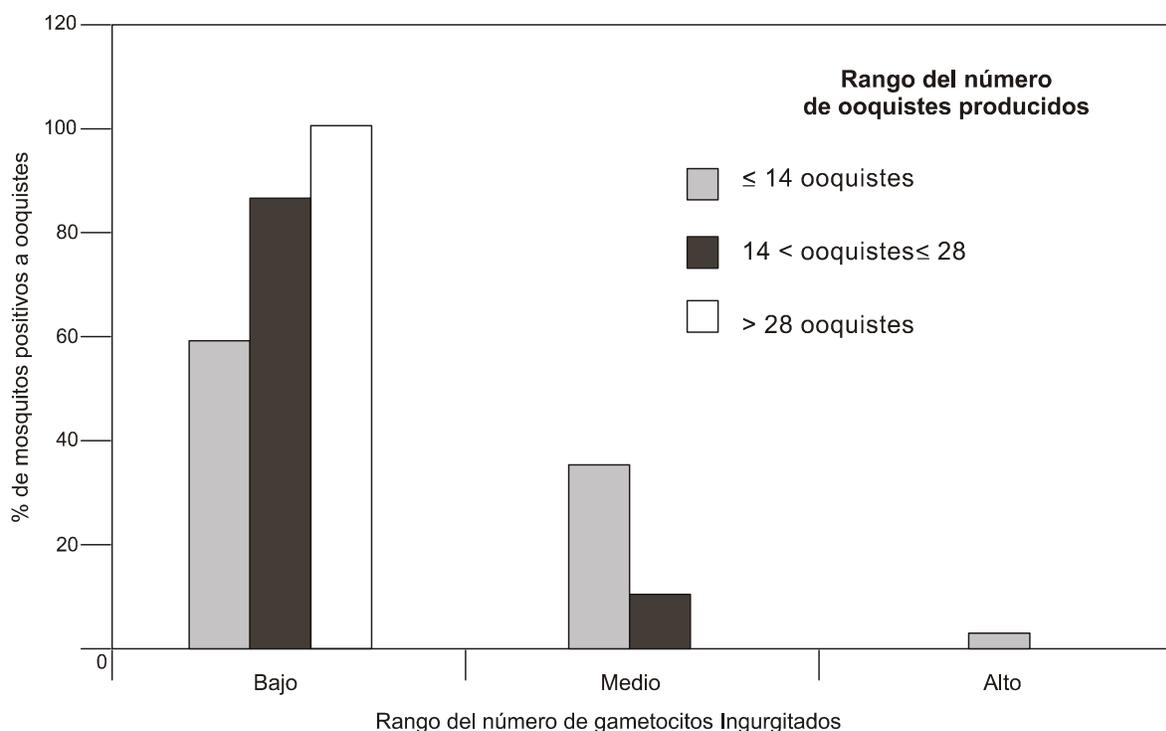


Fig. 2.- Frecuencia de números de ooquistes producido por mosquito para todas las poblaciones de *Anopheles aquasalis*, excepto La Línea.

Línea es estadísticamente superior a las demás poblaciones (Tabla 3), entre las cuales no se encontraron diferencias significativas (Prueba U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Ooquistes melanizados: Todas las poblaciones de

mosquitos estudiadas presentaron el fenómeno de melanización de ooquistes. La proporción media general de ooquistes melanizados para todas las poblaciones juntas fue de 0,40 en una muestra de 136 mosquitos disecados (Tabla 2). El valor más elevado (0,35) para una población correspondió a Pedernales 1 y el más bajo

Tabla 1.- Tasa de infección y media del número de parásitos de *Plasmodium vivax* desarrollados por mosquitos y por población de *Anopheles aquasalis* estudiada

Población	Ooquistes			No. Mosquitos Positivos ¹	Ooquistes Melanizados		No. Mosquitos Disecados ²	Esporoitos	
	No. Mosquitos Disecados	Tasa Infección Ooquistes	Media Ooquistes (Rango)		Tasa Ooquistes Melanizados	Proporción Media de Melanizados		Tasa Infección Esporoito	Media Esporoitos (Rango)
LIN	39	0,82	58,74 (269)	32	0,47	0,12b	10	0,70	17,50 (102)
PED1	57	0,61	1,74 (12)	35	0,71	0,35a	30	0,73	53,83 (374)
PED2	53	0,57	1,90 (17)	30	0,60	0,32a	15	1,00	97,44 (309)
SUC	57	0,47	2,02 (37)	27	0,41	0,18b	18	0,94	59,21 (598)
ARA	63	0,44	4,38 (42)	28	0,61	0,23b	21	0,57	22,83 (260)

(LIN) =La Línea. (PED1)= Pedernales 1 (*An. aquasalis* s.s.), (PED2)= Pedernales 2 (*An. deltaorinoquensis*), (SUC)= Sucre. (ARA)= Aragua. Valores seguidos de letras iguales no son significativamente diferentes entre sí al nivel de 5% ($P < 0,05$) (Prueba de Mínimo Rango Significativo)

¹Mosquitos positivos a ooquistes

²Disecación de glándulas salivales

Tabla 2.- Tasa de infección, media y mediana del número de parásitos de *Plasmodium vivax* desarrollados por mosquito en cada fase del ciclo esporogónico de *Anopheles aquasalis*

Variable	Tamaño de Muestra ¹	Tasa de Infección ²	Media \pm SD	Mediana
A	263	0,56	10,80 \pm 31,76	1,00
B	136	0,57	0,40 \pm 0,43	0,17
C	107	0,77	48,54 \pm 105,25	2,00

A= Ooquistes

B= Proporción de ooquistes melanizados.

C= Esporozoítos en glándulas salivales

¹Número total de mosquitos disecados para todas las poblaciones

²Porcentaje de mosquitos positivos.

(0,12) se presentó en la población de La Línea (Tabla 1).

El análisis estadístico (ANOVA de Kruskal-Wallis), mostró diferencias altamente significativas entre las poblaciones en estudio ($p < 0,01$). Pedernales 1 y Pedernales 2, resultaron estadísticamente similares entre sí en cuanto a la proporción media de ooquistes melanizados y significativamente diferentes a las demás poblaciones (Aragua, Sucre y La Línea); entre las cuales no se presentaron diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Mínimo Rango Significativo, $p < 0,05$) (Tabla 1).

Esporozoitos en glándulas salivales: Todas las poblaciones estudiadas desarrollaron esporozoitos hasta la fase infectiva, detectados en glándulas salivales. El promedio general para todas las poblaciones fue de 48,5 esporozoitos por glándula (Tabla 2). El valor promedio más elevado fue 97,4 esporozoitos para la población de Pedernales 2 y el más bajo fue de 17,5 y correspondió a la población de La Línea (Tabla 1). Se encontraron diferencias significativas entre las cinco poblaciones de mosquitos en cuanto al número de esporozoitos detectados en las glándulas salivales (ANOVA de Kruskal-Wallis, $p = 0,0019$). La prueba U de Mann-Whitney aplicada por pares de poblaciones detectó diferencias significativas entre las mismas ($p < 0,05$); de tal manera que la mediana de esporozoitos para la población Pedernales 2 fue superior a la de las otras poblaciones, salvo Pedernales 1 que fue estadísticamente similar. Esta última (PED1) tampoco presentó diferencias significativas con relación a las poblaciones

de Sucre y La Línea, pero fue superior a la población de Aragua. También se encontró similitud entre Pedernales 1, Sucre y La Línea e igualmente entre La Línea y Aragua (Tabla 3).

Por otro lado, se encontró una correlación positiva significativa entre el número de ooquistes desarrollados y el número de esporozoitos en las glándulas ($r_s = 0,3408$, $p < 0,01$), al analizar ambas variables para todas las poblaciones simultáneamente. Adicionalmente se observó melanización de esporozoitos en el hemocele en una frecuencia muy baja.

Tasas de infección: Las tasas de infección para cada una de las poblaciones experimentales estudiadas están representadas por sus respectivas tasa ooquistica, tasa esporozoítica y tasa de melanización; es decir, la proporción de mosquitos que desarrollaron ooquistes del total de mosquitos alimentados, la proporción de mosquitos positivos a esporozoitos del total de positivos a ooquistes y la proporción de mosquitos que presentaron melanización del total de positivos a ooquistes (Tabla 1).

La tasa ooquistica más elevada (0,82), se observó en los mosquitos de La Línea y la más baja (0,44) en los mosquitos de Aragua. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a este índice entre las cinco poblaciones ($\chi^2 = 17,3441$; $p < 0,01$). La tasa esporozoítica más elevada (1,00) se observó en Pedernales 2 y la más baja (0,57) en los

Tabla 3.- Valores de la mediana del número de parásitos desarrollados por mosquitos en cada fase del ciclo esporogónico de *Plasmodium vivax*, en cada población de *Anopheles aquasalis*

Población	Ooquistes		Ooquistes Melanizados		Esporozoitos	
	n	Mediana	n	Mediana	n	Mediana
LIN	35	30,00a	28	0,01	12	1,00bc
ARA	58	0,00b	22	0,03	30	0,00c
SUC	57	0,00b	25	0,00	19	2,00b
PED2	40	0,00b	16	0,00	16	30,00a
PED1	34	0,00b	15	0,25	30	7,50ab

(LIN) = La Línea, (PED1) = Pedernales 1 (*An. aquasalis* s.s.), (PED2) = Pedernales 2 (*An. deltaarinoquensis*), (SUC) = Sucre. (ARA) Aragua. Valores seguidos de letras iguales son significativamente diferentes entre sí al nivel de 5% ($P < 0,05$), (Prueba U de Mann-Whitney).

mosquitos de Aragua. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las poblaciones en cuanto a este índice ($\chi^2 = 2,784$). La tasa de melanización de ooquistes estuvo entre 0,41 y 0,71, correspondiendo el valor más elevado a Pedernales 1 y el más bajo a Sucre. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones en cuanto a este índice ($\chi^2 = 7,500$).

DISCUSIÓN

La susceptibilidad del mosquito al género *Plasmodium* está determinada por la posibilidad del parásito en alcanzar exitosamente cada una de las etapas de su ciclo evolutivo dentro del vector, para lo cual debe superar una serie de barreras antagónicas que constituyen estadios críticos en su desarrollo (Warburg & Miller, 1991), y que hacen que diferentes especies de mosquitos o grupos de ellos, exhiban infectividad diferencial a los plasmidios. Por tal razón, la susceptibilidad del mosquito al plasmidio se evidencia en su capacidad para desarrollar ooquistes viables, su capacidad para melanizar parásitos, su capacidad para desarrollar esporozoitos hasta la fase infectiva y en las tasas de infección, en las cuales confluyen las variables anteriores. Estas razones fundamentan la escogencia en este trabajo, de estas variables para cuantificar la susceptibilidad de *An. aquasalis* a la infección con *P. vivax*. El resultado obtenido, es decir, su nivel de susceptibilidad, es extraído de su conjugación más que de lo observado en una sola de estas variables.

En un estudio de susceptibilidad del mosquito al plasmidio existen dos factores que pueden causar sesgo en los resultados obtenidos: primero, un factor cualitativo constituido por la variabilidad genética del plasmidio y segundo, un factor cuantitativo constituido por la densidad de la infección ingurgitada por el mosquito, la parasitemia.

Con relación al primer factor Gupta & Day (1994) aseveran que la malaria en un área endémica está compuesta por una mezcla de varias cepas independientemente transmisibles. Gabaldon *et al*, (1971) dice que las diferentes cepas de *Plasmodium* que existen en Venezuela se distinguen entre sí, además de la virulencia, patogenicidad y susceptibilidad a las drogas, por la infectividad a los anofelinos. En ese sentido, nuestros mosquitos fueron alimentados sobre pacientes de una sola área malárica del foco oriental de Venezuela, Santa Rosa en el estado Sucre. En esta misma área, Cáceres (1993) no pudo determinar la presencia de cepas diferentes de *P. vivax*; ya que en su estudio el 80% de las muestras mostraron positividad sólo a la

variante Pv-210 del mismo parásito. En cuanto al segundo factor, la cantidad de parásitos ingurgitados, podría pensarse que es determinante en la densidad de la infección desarrollada por el mosquito, es decir, correspondería una mayor cantidad de gametocitos ingurgitados a una mayor producción de ooquistes. No obstante, Vaughan *et al*, (1994) en un estudio en el cual compararon el desarrollo esporogónico de *P. falciparum* en varias especies de *Anopheles*, no encontraron correlación entre los macrogametocitos ingurgitados y la densidad de ooquinetos para ninguna de las especies utilizadas. Boudin *et al*, (1993) no encontraron diferencias significativas en la media de ooquistes producidos por grupos de *An. gambiae* alimentados sobre pacientes con gametocitos o sin gametocitos de *P. falciparum* y *P. malariae*. En el presente estudio, en el cual se utilizaron pacientes con parasitemias diferentes, se encontró una correlación negativa entre el número de gametocitos ingurgitados y el número de ooquistes desarrollados por los mosquitos; por lo que las diferencias observadas entre las poblaciones de la especie, en cuanto a la densidad de la infección desarrollada, pueden ser atribuidas a factores intrínsecos del mosquito. En este sentido, se observaron marcadas diferencias en la población La Línea con respecto a las otras poblaciones. Tanto la tasa de infección ooquistica como la media de ooquistes desarrollados fueron significativamente mayores en esta población, lo que indica que, por lo menos hasta esta fase, los mosquitos de La Línea son más susceptibles a *P. vivax* que las otras cuatro poblaciones.

El rango observado para el número de ooquistes producidos en *An. aquasalis* estuvo entre 1 y 269 ooquistes, con una media de 10,8 en 224 mosquitos disecados, lo que es indicativo de una gran variabilidad intrapoblacional. Los resultados obtenidos en cuanto a la densidad ooquistica, están dentro del rango de resultados reportados por otros autores para *P. vivax* en otras especies del género *Anopheles*. Warren *et al*, (1979) obtuvieron medias que van de 43 a 479 ooquistes por mosquito *An. albimanus*. Chan *et al*, (1994) reportaron medias ubicadas entre 62 y 553 ooquistes. Klein *et al*, (1991) encontraron medias que van de 1 a 57 ooquistes por mosquito en varias especies de este género. Camage-Mendis *et al*, (1993) reportaron un rango entre 1 y 400 ooquistes para *P. vivax* y *P. falciparum* en *An. tessellatus*, con una densidad media de 10 ooquistes por mosquito.

Con respecto a la tasa ooquistica, los valores observados fueron bastante elevados, a diferencia de los resultados obtenidos por Cáceres (1993) para poblaciones de *An. aquasalis* de Sucre y Aragua, quien realizó la infección experimental con un diseño similar

y reporta una tasa de infección ooquistica de apenas 20%. Las tasas de infección ooquistica a *P. vivax* obtenidas en este trabajo son elevadas si las comparamos con las reportadas por otros autores. Se han reportado tasas de infección experimental de 25% para *An. albimanus* en Colombia (Salas *et al*, 1994) y de 53% en México (Chan *et al*, 1994). Asimismo, en Brasil se han encontrado tasas de infección ooquistica de 52% para *An. albimanus*, 38% para *An. mediopunctatus*, 53% para *An. oswaldoi*, 54% para *An. braziliensis* y 22% para *An. benarrochi*; solamente *An. darlingi* y *An. deaneorum* han mostrado tasas superiores a las señaladas en el presente trabajo, con valores de 97% y 82% respectivamente (Klein *et al*, 1991).

Uno de los aspectos más conspicuos para revelar el grado de susceptibilidad de un mosquito a una especie del género *Plasmodium* es el fenómeno de la refractariedad, que se manifiesta como una respuesta del vector a la invasión del parásito. (Warburg & Miller, 1991). Análisis genéticos han demostrado que en la regulación de la refractariedad o susceptibilidad están involucrados genes ligados a locus de esterasa (Crews-Oyen *et al*, 1993). Otros autores han sugerido la posibilidad de que la regulación de este fenómeno pueda ser multigénica y que un grupo de genes menores adicionales puedan estar involucrados (Thathy *et al*, 1994).

En este estudio se ha observado y cuantificado la melanización de ooquistes como una variable determinante de la susceptibilidad a *P. vivax* entre las poblaciones de *An. aquasalis* estudiadas; una descripción detallada del fenómeno se hace en una publicación previa (Moreno & Berti, 2000). Todas las poblaciones experimentales comparadas exhibieron algún grado de refractariedad, manifestada en la encapsulación melanótica de los ooquistes. Las diferencias entre poblaciones fueron más evidentes en cuanto a la proporción media de ooquistes melanizados que en relación a las tasas de melanización. En este sentido, la más baja proporción media de ooquistes melanizados correspondió a la población La Línea, lo cual sumado a una tasa y una densidad ooquisticas más elevadas, además de la baja tasa de melanización, sugieren su mayor susceptibilidad a *P. vivax*. De la misma forma, la baja densidad y baja tasa de melanización presentadas por la población de Sucre, indican una baja refractariedad a *Plasmodium*, resultado que explicaría el papel vectorial de esta población en el foco de malaria del oriente del país (Berti *et al*, 1993b; Zimmerman & Berti, 1994).

Con relación a las otras tres poblaciones, las

dos de Pedernales y la de Aragua, no se observaron mayores diferencias entre ellas. De éstas, las poblaciones de Pedernales (PED1 y PED2), exhibieron valores de melanización muy similares, al igual que los obtenidos para la densidad y la tasa de infección ooquistica, de donde se deduce que no existen diferencias en la susceptibilidad o en la refractariedad entre estas subpoblaciones de *An. aquasalis*. Estos resultados avalan los estudios taxonómicos realizados anteriormente, en los cuales no se han encontrado diferencias morfológicas consistentes entre estas dos poblaciones de la especie (Faran, 1980), por lo cual *An. deltaorinoquensis* ha sido colocada en sinonimia con *An. aquasalis*.

La población de Aragua exhibe una tasa de melanización comparativamente alta y una proporción media de melanización intermedia entre las cinco poblaciones. Cuando se compara la tasa de melanización con su tasa de infección ooquistica, la más baja entre las cinco poblaciones, se puede deducir que esta población es la de menor susceptibilidad a *P. vivax*. No obstante, la media de ooquistes producidos fue la segunda más elevada después de la de La Línea, aunque considerablemente inferior a ésta; esto indica que en esta población se infectan comparativamente pocos mosquitos, pero a una elevada densidad de ooquistes; lo que sugiere una gran variabilidad intrapoblacional en la susceptibilidad (Chan *et al*, 1994).

En el número de esporozoitos detectados en glándulas también hubo diferencias entre las poblaciones. No obstante, los resultados pueden estar sesgados por un tamaño de muestra muy pequeño o por las limitaciones de la técnica utilizada para cuantificar el número de esporozoitos (contaje visual). Por lo tanto, los resultados obtenidos para la densidad esporozoítica, si bien dan algunos indicios son poco consistentes. Las cinco poblaciones de mosquitos desarrollaron esporozoitos hasta la fase infectiva, y la tasa de infección esporozoítica fue bastante alta en todas, oscilando entre 57% y 100%. Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren notablemente de los obtenidos por Cáceres (1993), quien reporta para *An. aquasalis* de Venezuela una tasa de infección a *P. vivax* de 5,5% (14 mosquitos positivos de 254 examinados).

Los resultados indican que esta especie es susceptible a *P. vivax*, y que puede ser vectora a lo largo de su distribución geográfica. La baja carga esporozoítica no debe ser impedimento en su papel vectorial, pues el número de esporozoitos inoculados en una picada infectante es considerablemente inferior a cien (Camage-Mendis *et al*, 1993). A pesar de la

ausencia de malaria en la zona central del país y de no haber sido involucrada como vector en el pasado (Gabaldon, 1949), los resultados demuestran que también en esta área, *An. aquasalis* es un vector potencial, capaz de infectarse a tasas elevadas y el posible responsable de los brotes esporádicos que se han registrado al norte del estado Carabobo.

Si bien la presencia de ooquistes no constituye una prueba definitiva de la infectividad de un mosquito (Camage-Mendis *et al*, 1993), en la mayoría de los estudios se utilizan las tasas de infección y la densidad ooquistica para establecer comparaciones de susceptibilidad entre especies o grupos de mosquitos (Vaughan *et al*, 1994). Los resultados de este trabajo en cuanto a la tasa de infección ooquistica, la media de ooquistes producidos, la tasa de melanización y la proporción media de ooquistes melanizados constituyen suficiente evidencia de la existencia de mayor grado de susceptibilidad en la población de La Línea con respecto a las demás poblaciones. No ocurre lo mismo con su capacidad vectorial, la cual depende de otros factores biológicos y epidemiológicos (Rubio-Palis, 1994). Por tal motivo, se considera que los resultados obtenidos no constituyen suficiente evidencia para comprobar la existencia de un gradiente en la susceptibilidad de esta especie, tal como lo propone Steiner *et al*, (1981). Para comprobar esta hipótesis, será necesario extender este estudio hacia el occidente del país, a través de todo el rango de distribución geográfica de la especie en Venezuela y de ser posible también al Brasil.

SUMMARY

Anopheles aquasalis is an important vector of malaria in Venezuela, Brazil, Trinidad and the Caribbean islands. In Venezuela, this species is responsible of maintaining a focus of malaria produced by *Plasmodium vivax* in Sucre and Delta Amacuro states. However toward the west this species is not implicated in the transmission. In order to determine the existence of a gradient in the vectorial competence of this species, that goes from major to minor from Brazil toward Venezuela, a study of its susceptibility to *P. vivax* was undertaken in four places of the east and centre of its geographical distribution in Venezuela: two in the delta of the Orinoco river, one in Sucre states and one in Aragua state in the centre of the country. From each one of these places laboratory-reared mosquitoes (F1) were fed on *P. vivax* infected patients. The results obtained are indicative of differences in the susceptibility to *P. vivax* among populations of *An. aquasalis* studied. Additionally, this study report for the first time in the country the phenomena of oocyst and sporozoite melanization in the vector populations.

KEY WORDS: *Anopheles aquasalis*, *Plasmodium vivax*, susceptibility, experimental infection, melanization, Venezuela.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental a través del Proyecto Control de Enfermedades Endémicas (PCEE) y por la Fundación para el desarrollo de la Ciencia y la Tecnología del estado Aragua (FUNDACITE) a través del convenio PG-SA-0001. También fue financiado parcialmente por el Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) mediante el Megaproyecto Social Malaria, Sub-proyecto: RP-IV-130032-11. Nuestro más sincero agradecimiento al personal de Malariología de los estados Sucre y Delta Amacuro.

REFERENCIAS

- Berti, J., Zimmerman, R. & Amarista J. (1993 a). Adult abundance, biting behavior and parity of *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 in two malarious areas of Sucre state, Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **88**: 363-369.
- Berti, J., Zimmerman, R. & Amarista J. (1993b). Spatial and temporal distribution of anopheline larvae in two malarious areas in Sucre state, Venezuela. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **88**: 353-362.
- Berti, J., González, J., Vanegas, C., Guzmán, H. & Amarista J. (1998). Fluctuaciones estacionales de la densidad larvaria de *Anopheles pseudopunctipennis* en dos ríos de Santa Fé, estado Sucre, Venezuela. Bol. Entomol. Venez., **13**: 1-15.
- Boudin, C., Olivier, M., Molez, J., Chiron, J. & Ambroise-Thomas, P. (1993). High human malarial infectivity to laboratory-bred *Anopheles gambiae* in village in Burkina Faso. Am. J. Trop. Med. Hyg., **48**: 700-706.
- Cáceres, R. (1993). Responsabilidad vectorial de *Anopheles aquasalis* Curry, 1932 en la transmisión de *Plasmodium vivax* (grassi y feletti, 1890) en el estado Sucre, Venezuela. [Tesis doctoral]. Universidad Central de Venezuela. 162 p.
- Camage-Mendis, A., Rajakauruna, J., Weerasinghe, S., Mendis, C., Carter, R. & Mendis, K. N. (1993). Infectivity of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* to *Anopheles tesellatus*; relationships between oocyst and sporozoite development. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **87**: 3-6.
- Chan, A., Rodríguez, M., Torres, J., Rodríguez, M. & Cuauhtemoc, V. (1994). Susceptibility of three laboratory strain of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in southern Mexico. J. Med. Entomol., **31**: 400-403.
- Conn, J., Cockburn, A. & Mitchell, S. E. (1993). Population differentiation of the malaria vector *Anopheles aquasalis* using mitochondrial DNA. J. Heredity, **84**: 248-253.
- Cova-García, P. (1964). Sobre el *Anopheles (Nyssorhynchus) emilianus* Komp, 1941 en Venezuela. Rev. Ven. San. Asis. Soc., **24**: 199-217.

- Cova-García, P., Pulido, F. & Amarista J. (1977). *Anopheles (Nyssorhynchus) deltaorinoquensis* n. Sp. (Diptera: Culicidae) de Venezuela. Bol. Dir. Malariol. San. Amb., **17**: 150-161.
- Crews-Oyen, A., Kumar, V. & Collins, F. (1993). Association of two esterase genes, a chromosomal inversion, and susceptibility to *Plasmodium cynomolgi* in the African malaria vector *Anopheles gambiae*. Am. J. Trop. Med. Hyg., **49**: 341-347.
- Davis, J. R. (1994). Laboratory methods for the malaria challenge of volunteers. Vaccine, **12**: 321-327.
- Faran, M.E. (1980). Mosquito studies (Diptera, Culicidae) xxxiv. A revision of the *albimanus* section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. Cont. Am. Inst., **15**: 1-215.
- Faran, M. E. & Linthicum, K. (1981). A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics. **13**: 1-81.
- Fleming, G. (1986). Biología y ecología de los vectores de malaria en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. Washington d.c., 51 p.
- Gabaldon, A. (1949). The nation wide campaign against malaria in Venezuela. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **43**:113-164.
- Gabaldon, A., Mendicoa, T. & Castellani, O. (1971). La resistencia de los parásitos maláricos a las drogas en Venezuela. Bol. Dir. Malariol. San. Amb., **11**: 22-46.
- Gupta, S. & Day, K. (1994). A strain theory of malaria transmission. Parasitology today. **10**: 476-481.
- Klein, T., Lima, J., Tada, M. & Miller, R. (1991). Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes in Rondonia, Brazil to infection by *Plasmodium vivax*. Am. J. Trop. Med. Hyg., **45**: 463-470.
- Moncada A, Conn J. (1992). A polytene chromosome study of four populations of *Anopheles aquasalis* from Venezuela. Genome **35**: 327-331.
- Moreno J.E. & Berti J.A. (2000). Melanización de ooquistes y esporozoitos de *Plasmodium vivax* en poblaciones de *Anopheles aquasalis* Curry (Diptera: Culicidae) de Venezuela infectadas experimentalmente. Bol. Entomol. Venez., **15**: 17-27.
- Rubio-Palis, Y. (1994). Variation of the vectorial capacity of some anophelines in western Venezuela. Am. J. Trop. Med. Hyg., **50**: 420-424.
- Rubio-Palis, Y. & Zimmerman, R. H. (1997). Ecoregional classification of malaria vector in the neotropics. J. Med. Entomol., **34**: 499-510.
- Salas, M., Romero, J., Solarte, Y., Olano, V., Herrera, M. & Herrera, S. (1994). Development of sporogonic cycle of *Plasmodium vivax* in experimentally infected *Anopheles albimanus* mosquitoes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **89**:115-119.
- Steiner, W., Kitzmiller, J. & Osterbur, D.L. (1981). On the genetic identity and evolution of the malaria vector *Anopheles aquasalis* Curry and *Anopheles emilianus* Komp. **In**: Cytogenetics of vector: Proceeding of a symposium of the XVI International Congress of Entomology. Elsevier Biomedical press. p.75-84.
- Thaty, V., Severson, D. & Christensen, B. M. (1994). Reinterpretation of the genetics of susceptibility of *Aedes aegypti* to *Plasmodium gallinaceum*. J. Parasitol., **80**: 705-712.
- Vaughan, J., Noden, B. & Beier J.C. (1994). Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. Am. J. Trop. Med. Hyg., **51**: 233-243.
- Warburg, A. & Miller, L.H. (1991). Critical stages in the development of *Plasmodium* in mosquitoes. Parasitology today. **7**: 179-181.
- Warren, M., Collins, W., Richardson, B. & Skinner J.C. (1979). Naturally occurring pupal phenotypes of *Anopheles albimanus* and their susceptibility to *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. Mosquito News. **39**: 472-477.
- World Health Organization. (1975). Manual on practical entomology in malaria. Part ii. Methods and techniques. Geneva. 160 p.
- Zerpa, N., Moreno, J., González, J. & Noya, O. (1998). Colonization and laboratory maintenance of *Anopheles albimanus* Wiedemann in Venezuela. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, **40**: 173-176.
- Zerpa, N., Noya, O., Moreno, J., Wide, A., Pabon, R. & González, J. (1997). Infección de especies de *Anopheles* con gametocitos provenientes de cultivos para la evaluación de vacunas antimaláricas y drogas antiesporozoítos. Bol. Dir. Malariol. San. Amb., **37**: 49-54.
- Zimmerman, R. & Berti, J. A. (1994). The importance of integral control of malaria for the preservation of wetlands in latin america. **In**: Global wetlands: Old World and New. Edited by W.S. Witson. Elsevier Science. Ohio State USniversity. p. 797-803.