

26:25
27

EVIDENCIA GENÉTICA DE UN COMPLEJO DE ESPECIE EN ANOPHELES PSEUDOPUNCTIPENNIS PSEUDOPUNCTIPENNIS

José G. Estrada-Franco,¹ Michael C. Ma,^{1,2}
Gregory C. Lanzaro,³ Robert Gwadz,³
Carmen Galván-Sánchez,⁴ José Luis Céspedes,⁵
Roberto Vargas-Sagarnaga⁵ y Roberto Rodríguez⁵

Debido a inconsistencias en el patrón de la transmisión de la malaria en las zonas geográficas donde habita Anopheles pseudopunctipennis pseudopunctipennis, se investigó la posibilidad de que este vector representara un complejo de especie. Se hicieron estudios de hibridación, localización electroforética de enzimas y análisis restrictivo del ADN en mosquitos capturados en nueve localidades de México, Bolivia y el Perú. La esterilidad de las generaciones resultantes de cruzamientos entre hembras mexicanas y machos sudamericanos, dos localizaciones enzimáticas capaces de diferenciar ambas poblaciones y el valor de 0,13 de distancia genética comprobaron la presencia de un complejo de especie probablemente producido por especiación alopatrica. Se concluye que es necesario establecer la extensión geográfica de las especies recién descubiertas por su efecto potencial en el control de la malaria.

Actualmente se observa un recrudescimiento general de la malaria que afecta a la mayor parte del Tercer Mundo. En América Latina, esta situación se ha

visto favorecida por las condiciones resultantes de la crisis económica y los estilos de desarrollo que rigen en la mayoría de los países. El problema de salud pública planteado por la malaria se ha deteriorado, en particular desde comienzos de la década de los ochenta. El número de casos de malaria notificados a la Organización Panamericana de la Salud aumentó de 602 826 en 1980, al extremo nunca antes alcanzado de 1 045 808 en 1990 (1).

¹ Department of Entomology, University of Maryland, College Park, Maryland 20742.

² Center for Agricultural Biotechnology, Maryland Biotechnology Institute, University of Maryland, College Park, Maryland 20742. Toda la correspondencia debe dirigirse a esta dirección, a nombre del Dr. Michael C. Ma.

³ Laboratory of Malaria Research, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892.

⁴ Secretaría de Salud y Bienestar Social, Cuernavaca, Morelos, México 63000.

⁵ Ministerio de Previsión Social y Salud Pública, Dirección Nacional de Epidemiología, La Paz, Bolivia.

Entre los cinco principales vectores de la malaria endémica en las Américas se encuentra *Anopheles pseudopunctipennis pseudopunctipennis* (2), especie que tiene una distribución muy amplia y ocupa una gran variedad de nichos ecológicos. Además, dentro del ámbito de distribución geográfica de esta especie se han detectado ciertas inconsistencias en el patrón de transmisión de la malaria que llaman la atención (2-7).

Partiendo del supuesto de que la capacidad vectorial de *A. pseudopunctipennis pseudopunctipennis* difiere de acuerdo con las diferentes cepas geográficas, se llevó a cabo una investigación para establecer el posible nivel de divergencia genética entre las poblaciones del vector y determinar si esas posibles diferencias podrían representar un complejo de especie. Con estos fines, se realizaron capturas de campo de especímenes de *A. pseudopunctipennis pseudopunctipennis* durante un intervalo de 13 meses (julio de 1990 a agosto de 1991) en nueve áreas geográficas claramente diferenciadas de México, Bolivia y el Perú. Las recolecciones de mosquitos en México abarcaron sitios montañosos y costeros de los estados de Morelos, México y Guerrero; en Bolivia, los valles interandinos de las provincias de Andrés Ibáñez y Arque; y en el Perú, las zonas circundantes del área urbana de la ciudad de Lima.

Para evaluar la hipótesis de que existía un complejo de especie, se emplearon tres técnicas: 1) estudios de hibridación de cruzamientos; 2) análisis electroforético de localización de enzimas; y 3) análisis restrictivo del ADN. Estos estudios se aplicaron a especímenes recolectados en el campo y a especímenes criados en insectarios. En los estudios de hibridación se detectó esterilidad unidireccional en los machos y hembras producidos por los cruzamientos entre hembras mexicanas y machos sudamericanos.

La esterilidad se confirmó mediante la disección de gónadas. Los testículos de híbridos de la generación F_1 presentaron diferentes grados de anormalidad que variaron desde la presencia de una pequeña cantidad de espermatozoides parcialmente formados hasta la aspermia. Los testículos de estos híbridos fueron de tamaño más pequeño que los normales y los canales deferentes se caracterizaron por ser más cortos y anchos que los de los controles. La esterilidad de las hembras de la generación F_1 se dedujo por la presencia de una asinapsis excesiva en los cromosomas politénicos de las células ováricas germinales y por el colapso de la generación F_2 de híbridos, en los cuales se manifestó atrofia del aparato reproductivo de los machos.

El análisis electroforético proporcionó pruebas adicionales de que se trataba de un complejo de especie, al revelar una diferencia fijada en dos localizaciones enzimáticas, *Gcd* (E.C. 1.1.1.72) y *Pgm* (E.C. 2.7.5.1). Esta diferencia sugiere que no existe flujo genético entre las poblaciones de mosquitos mexicanos y los sudamericanos. Las dos enzimas discriminaron visiblemente entre individuos de las poblaciones sudamericanas y mexicanas. Estos estudios se complementaron con un análisis de distancia genética (D o distancias de Nei), el cual dio como resultado un valor de 0,13 de distancia, que permite distinguir dos conglomerados: uno sudamericano representado por tres poblaciones de Bolivia y el Perú, y otro mexicano, representado por seis poblaciones. Los valores D se corresponden con las cifras que separan claramente especies crípticas de anofelinos consideradas representativas de fenómenos de especiación alopátrica.

Por último, se empleó una tecnología basada en el uso de sondas de ADN de los ribosomas de *A. gambiae s.s.*, que permitió descubrir en las cepas mexicanas la presencia de un fragmento de ADN ribosomal ausente en las sudamericanas. La sonda heteróloga fue capaz de diferenciar machos mexicanos de *A. pseu-*

dopunctipennis pseudopunctipennis de los machos sudamericanos. La especie mexicana de *A. pseudopunctipennis* (especie A) fue identificada por la presencia de un fragmento de 3,4 kilobases después de una digestión con la enzima restrictiva EcoRI. Este fragmento estaba ausente en las especies sudamericanas.

Estos resultados, obtenidos por medio de un enfoque multifacético, demuestran la presencia de un complejo de especie en *A. pseudopunctipennis pseudopunctipennis*. Las dos formas identificadas a través de estos estudios se han denominado provisionalmente *A. pseudopunctipennis* especie A (forma encontrada en la meseta central y vertiente del Pacífico de México) y *A. pseudopunctipennis* especie B (forma identificada en la región andina del Perú y Bolivia).

La investigación descrita en este informe presenta las primeras pruebas de que *A. pseudopunctipennis pseudopunctipennis* constituye un complejo de especie cuya forma de especiación es alopátrica. Se cree que este mecanismo de especiación está relacionado con barreras geográficas que aislaron las poblaciones de México y Sudamérica. Esto, a su vez, puede haber favorecido diferentes momentos de adaptación de las dos poblaciones y prevenido el flujo genético entre ellas (8).

Estos datos proporcionan nueva información que podría ayudar a resolver interrogantes no resueltas sobre los patrones epidemiológicos de la transmisión malarica en la América neotropical. Además, implican aspectos prácticos que necesariamente tienen que ser considerados por su efecto potencial en el control vectorial de *Anopheles pseudopunctipennis* en las Américas. Para entender la

epidemiología de la malaria y efectuar un control eficaz de este vector, es imperativo establecer la distribución geográfica de las dos especies recientemente descubiertas y de algunas otras que pudieran descubrirse en estudios futuros. Tal información es de importancia decisiva para conocer la extensión geográfica de las diferentes especies del complejo, lo que podría afectar su contribución relativa a los brotes de malaria así como su posible respuesta a los métodos de control.

REFERENCIAS

1. Organización Panamericana de la Salud. Situación de los programas de malaria en las Américas, XXXIX informe. Washington, DC: OPS; 1991. (Documento DC35/INF/2, 16 agosto 1991.)
2. Fleming G. Biology and ecology of malaria vectors in the Americas. Washington, DC: Pan American Health Organization; 1986. (Documento PNSP/86-72.)
3. Vargas L, Casis G, Earle WC. *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald: a vector of malaria in Mexico. *Am J Trop Med.* 1941;21:779-788.
4. Gabaldón A. Malaria incidence in the West Indies and South America. En: Boyd F, ed. *Malariaology*, Vol 1. Philadelphia, Pennsylvania: WB Saunders; 1949:764-787.
5. Baker RH, Kitzmiller JB, Chowdaiah BN. The salivary gland chromosomes of *Anopheles pseudopunctipennis pseudopunctipennis*. *Bull WHO.* 1965;33:837-841.
6. Warren M, Collins W, Jeffery G, Richardson B. *Anopheles pseudopunctipennis*: laboratory maintenance and malaria susceptibility of a strain from El Salvador. 1980; *Am J Trop Med Hyg.* 29(4):503-506.
7. Molez JF, Desenfant P, Pajot F, Jacques JR, Duverseau Y, Saint-Jean Y. Le paludisme en Haïti: 2, Présence d'*Anopheles (A) pseudopunctipennis* Theobald 1901. Première mise en évidence sur l'île d'Hispaniola. *Cah ORSTOM, Ser Ent Med Parasitol.* 1987;25(2):75-81.
8. Mayr, E. *Animal species and evolution*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1963.

SUMMARY

GENETIC EVIDENCE OF A SPECIES COMPLEX IN *ANOPHELES* *PSEUDOPUNCTIPENNIS* *PSEUDOPUNCTIPENNIS*

In light of inconsistencies in the pattern of malaria transmission within geographical areas inhabited by *Anopheles pseudopunctipennis pseudopunctipennis*, a study was carried out to investigate the possibility that this vector constitutes a species complex. Hybrid crossing studies, electrophoretic analysis of enzyme loci, and DNA restriction analysis were conducted

on mosquitoes captured at nine sites in Mexico, Bolivia, and Peru. The sterility of generations resulting from cross-mating of Mexican female mosquitoes and South American male mosquitoes; the results of electrophoretic analysis, which showed differences at two loci; and a genetic distance value of 0.13 confirmed the existence of a species complex, probably produced by allopatric speciation. It is concluded that the geographic distribution of this newly discovered species complex should be defined, in view of its potential effect on malaria control.

La medicina de los aborígenes venezolanos

"Los piaches no tenían ni podían tener instrucción científica. En los primeros tiempos de la humanidad los médicos no se ocuparon sino en proporcionar alivio al enfermo. Así se formaron las tradiciones primitivas. En materia de drogas administraban hierbas, crudas o cocidas y polvos de ciertas cortezas. Empleaban emplastos de varias resinas y fumigaciones aromáticas. Usaban en fricciones y masajes el unto de varios cuadrúpedos, aves y peces. Curaban las heridas con infusiones de ciertas hojas y ponían al enfermo a dieta. La dieta era esencial en la disentería, lo cual censura el Padre Gilli, sosteniendo que en tal estado es mejor alimentar al enfermo. Conocían los sudoríficos, los vomitivos y purgantes y también el uso de la sangría. Llegamos por fin a una verdadera tradición médica que por sí sola bastaría a hacernos considerar a nuestros piaches con más indulgencia que sus denigrantes historiadores. El empleo del agua fría fue general entre los de Venezuela y las Antillas. Cada día se sumergían los indios repetidas veces, pero no sólo tomaban baños de aseo, sino que aplicaban éstos a la terapéutica. La mayoría de las tribus cargaban al enfermo, lo sumergían en el río, y terminado el baño lo volvían a depositar en su hamaca. Poseyeron, pues, los médicos venezolanos precolombianos una medicina tradicional y a pesar de la reputación de bárbaros con que se les abruma, empleaban metódicamente, hace más de cuatro siglos, uno de los agentes más eficaces de la terapéutica moderna".

Fuente: H. Rivero Saldivia, *Gaceta Médica de Caracas*, 35:53 (febrero 29) 1928.

(Esta nota se publicó por primera vez en el *Boletín* de octubre, 1928.)