

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Morfometría geométrica de alas en estudios poblacionales de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*, vectores de malaria en la costa del Ecuador.

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada
en Ciencias Biológicas**

CYNDEL ROSSANA ROMO GRANDA

Quito, 2018

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Cyndel Rossana Romo Granda ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Sofía Ocaña-Mayorga
Directora de la Disertación
Quito, 19 de julio de 2018

A mis padres,

Victor Hugo Romo y Nancy Granda

*Por su gran ejemplo, como seres humanos extraordinarios y
profesionales sobresalientes. Gracias por su más valioso regalo,
mi educación.*

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo fue financiada en su totalidad por el Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL). Mi más sincero agradecimiento al CISeAL y a su distinguido fundador y director, el Dr. Mario J. Grijalva, por promover el aprendizaje y desenvolvimiento profesional de sus integrantes en favor de la investigación científica de calidad y servicio a la comunidad.

A la Dra. Sofía Ocaña-Mayorga, directora y mentora del presente trabajo, a quien admiro y aprecio. Un agradecimiento enorme y muy especial por la formación remarcable que me ha brindado los últimos años, fundamental para mi crecimiento profesional.

Al Dr. Jean-Pierre Dujardin, también mentor de este trabajo. Un científico de renombre a quien he tenido el gusto de conocer, y cuya trayectoria de investigación y forma de enseñar son modelos que seguir.

A mis colegas del CISeAL, Anita Villacís y César Yumiseva, por sus aportes y amabilidad. Pero, sobre todo, a la Lic. Soledad Santillán por su asesoría y guía, imprescindibles para el enriquecimiento del estudio.

Un cordial agradecimiento a la Lic. Anita Peñafiel y a la Dra. Violeta Rafael (Laboratorio de Genética Evolutiva-PUCE), por brindarme su conocimiento, apoyo y amabilidad. Asimismo, agradezco al Dr. Oscar Pérez, director del Laboratorio de Biología del Desarrollo-PUCE, por facilitar equipos indispensables para el desarrollo del estudio.

Finalmente, deseo agradecer a algunos de los docentes y colegas que conocí y traté durante mis años de carrera en la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE: Andrés Romero, Myrian Rivera, Ma. Eugenia Ordoñez, Álvaro Pérez, Iliana Alcocer, entre otros. Porque, con su ejemplo e instrucción, fomentan a que los jóvenes persigan aún más convertirse en profesionales de excelencia.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	1
2.	<i>ABSTRACT</i>	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
3.1.	GENERALIDADES DE LA MALARIA	3
3.1.1.	AGENTE INFECCIOSO: PROTOZOOS DEL GÉNERO <i>Plasmodium</i>	3
3.1.2.	CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO Y TRANSMISIÓN.....	3
3.1.3.	ASPECTOS CLÍNICOS	4
3.1.4.	EPIDEMIOLOGÍA.....	4
3.1.4.1.	MALARIA EN ECUADOR.....	5
3.1.4.2.	ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA MALARIA.....	5
3.2.	INSECTO VECTOR: MOSQUITOS DEL GÉNERO <i>ANOPHELES</i>	6
3.2.1.	CICLO DE VIDA Y BIOLOGÍA DEL INSECTO VECTOR.....	6
3.2.2.	EVOLUCIÓN Y DIVERSIDAD	8
3.2.3.	MOSQUITOS ANOPHELES EN ECUADOR.....	9
3.2.3.1.	<i>Anopheles albimanus</i>	9
3.2.3.2.	<i>Anopheles calderoni</i>	10
3.3.	HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE POBLACIONES DE <i>ANOPHELES</i>	11
3.4.	MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA	11
3.4.1.	MORFOMETRÍA ALAR	12
3.5.	JUSTIFICACIÓN.....	13
3.6.	OBJETIVOS	14
3.6.1.	OBJETIVO GENERAL.....	14
3.6.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1.	ÁREA DE ESTUDIO	16
4.1.1.	PROVINCIA DE ESMERALDAS	16
4.1.2.	PROVINCIA DE EL ORO	16
4.2.	SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS	17
4.2.1.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	17
4.2.1.1.	SOLUCIÓN DE MONTAJE HOYER.....	17
4.2.1.2.	ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE MONTAJE DE ALAS 18	
4.2.1.3.	FOTOGRAFÍA DE LAS MUESTRAS	19
4.2.2.	DATOS MÉTRICOS.....	19
4.2.2.1.	MANEJO DEL SOFTWARE CLIC (VERSIÓN 98)	19
4.2.2.2.	DIGITALIZACIÓN DE PUNTOS DE REFERENCIA	20
4.2.2.3.	ANÁLISIS GENERALIZADO DE PROCRUSTES	20
4.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21

4.3.1.	CÁLCULO DEL ERROR DE MEDICIÓN	21
4.3.2.	ANÁLISIS DE TAMAÑO.....	21
4.3.3.	ANÁLISIS DE CONFORMACIÓN (FORMA).....	22
4.3.4.	ANÁLISIS DEL EFECTO ALOMÉTRICO	23
5.	RESULTADOS.....	24
5.1.	INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE ESCAMAS EN LA MORFOMETRÍA ALAR 24	
5.2.	ERROR DE MEDICIÓN	24
5.3.	ANÁLISIS DEL TAMAÑO	24
5.3.1.	CARACTERÍSTICAS DE TAMAÑO ALAR INTERESPECÍFICO Y ENTRE PROVINCIAS	24
5.3.2.	CARACTERÍSTICAS DE TAMAÑO ALAR INTRAESPECÍFICO	25
5.3.2.1.	ANÁLISIS DE TAMAÑO ALAR EN <i>Anopheles albimanus</i>	25
5.3.2.2.	ANÁLISIS DE TAMAÑO EN <i>Anopheles calderoni</i>	25
5.4.	ANÁLISIS DE LA CONFORMACIÓN (FORMA).....	26
5.4.1.	FORMA ALAR INTERESPECÍFICA Y ENTRE PROVINCIAS.....	26
5.4.2.	FORMA ALAR INTRAESPECÍFICA.....	27
5.4.2.1.	ANÁLISIS DE FORMA EN <i>Anopheles albimanus</i>	27
5.4.2.2.	ANÁLISIS DE FORMA EN <i>Anopheles calderoni</i>	28
5.5.	ANÁLISIS DEL EFECTO ALOMÉTRICO.....	28
6.	DISCUSIÓN	29
6.1.	INFLUENCIA DE PRESENCIA DE ESCAMAS EN LA TOMA DE DATOS PARA MORFOMETRÍA ALAR.....	29
6.2.	ERROR DE MEDICIÓN	30
6.3.	TAMAÑO ALAR.....	30
6.4.	CONFORMACIÓN ALAR	31
6.5.	EFECTO ALOMÉTRICO	35
6.6.	IMPORTANCIA DE ESTUDIOS DE POBLACIONES Y SU APLICACIÓN EN LA COMPRESIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA	35
6.7.	LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA COMO HERRAMIENTA PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES	37
7.	CONCLUSIONES	38
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
9.	FIGURAS	47
10.	TABLAS.....	59
11.	ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Ecuador con las localidades de colecta de cada provincia.....	47
Figura 2. Comparación de los tratamientos de montaje de las alas.....	48
Figura 3. Puntos de referencia (<i>landmarks</i>) usados en el estudio	48
Figura 4. Variación del tamaño alar de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i> a nivel de provincias.....	49
Figura 5. Variación intraespecífica del tamaño alar de <i>Anopheles albimanus</i> a nivel de localidades de muestreo.....	49
Figura 6. Variación intraespecífica del tamaño alar de <i>Anopheles calderoni</i> a nivel de localidades de muestreo.....	50
Figura 7. Comparación de la forma alar de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i> a nivel de especies y provincias.....	51
Figura 8. Análisis discriminante de la forma alar de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i> a nivel de provincias.....	52
Figura 9. Dendrograma UPGMA en base a las distancias de Mahalanobis (D^2) de la conformación alar de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i>	53
Figura 10. Comparación intraespecífica mediante superposición de Procrustes de la forma alar de <i>Anopheles albimanus</i> a nivel de localidades de muestreo.....	54
Figura 11. Análisis discriminante de la forma alar de <i>Anopheles albimanus</i> a nivel de localidades de muestreo.....	55
Figura 12. Comparación intraespecífica de la forma alar de <i>Anopheles calderoni</i> a nivel de localidades de muestreo.....	56
Figura 13. Análisis discriminante de la forma alar de <i>Anopheles calderoni</i> a nivel de localidades de muestreo.....	57
Figura 14. Análisis del efecto alométrico.	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos de colecta de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i>	59
Tabla 2. Repetibilidad de la digitalización de puntos de referencia.....	60
Tabla 3. Media (\bar{x}), desviación estándar (SD) y varianza (σ^2) del tamaño alar a nivel de provincias de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i>	60
Tabla 4. Valores de p corregidos con Bonferroni de las comparaciones múltiples de la media (\bar{x}) (parte inferior) y de la varianza (σ^2) (parte superior) del tamaño alar a nivel provincias de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i>	61
Tabla 5. Media (\bar{x}), desviación estándar (SD) y varianza (σ^2) del tamaño alar a nivel de localidades de muestreo de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i>	62
Tabla 6. Valores de p corregidos con Bonferroni de las comparaciones múltiples de la media (\bar{x}) (parte inferior) y de la varianza (σ^2) (parte superior) del tamaño alar a nivel de localidades de muestreo de <i>Anopheles albimanus</i>	63
Tabla 7. Valores de p corregidos con Bonferroni de las comparaciones múltiples de la media (\bar{x}) (parte inferior) y de la varianza (σ^2) (parte superior) del tamaño alar a nivel de localidades de muestreo de <i>Anopheles calderoni</i>	64
Tabla 8. Distancias de Mahalanobis (D^2) (parte inferior) y valores correspondientes de p corregidos con Bonferroni (parte superior) obtenidos de las variables de forma alar de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i> a nivel de especie y provincia	65
Tabla 9. Reclasificación validada y disparidad métrica a nivel de provincias de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i>	65
Tabla 10. Valores de p corregidos con Bonferroni de las comparaciones múltiples de la disparidad métrica de la forma alar a nivel de especie y provincia de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i>	66
Tabla 11. Distancias de Mahalanobis (D^2) (parte inferior) y valores correspondientes de p corregidos con Bonferroni (parte superior) obtenidos de las variables de forma alar de <i>Anopheles albimanus</i> y <i>Anopheles calderoni</i> considerando provincias y localidades de muestreo.	67

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Ciclo de transmisión del <i>Plasmodium</i>	68
Anexo 2. Ciclo de vida del mosquito <i>Anopheles</i>	69
Anexo 3. Filogenia molecular de todos los anofelinos	70
Anexo 4. Mapa predictivo del rango de distribución geográfica de <i>Anopheles albimanus</i> en América.	71
Anexo 5. Distribución geográfica conocida de <i>Anopheles calderoni</i>	72
Anexo 6. Representación del nombre de las venas y los tipos de <i>landmarks</i> digitalizados en un ala de <i>Anopheles</i>	73

1. RESUMEN

La malaria es una enfermedad causada por la invasión de varias especies de parásitos del género *Plasmodium* a los glóbulos rojos del hígado humano. Los mosquitos hembra del género *Anopheles* (Diptera: Culicidae) son responsables de la transmisión mediante la picadura de hospederos vertebrados. En Ecuador, la información disponible sobre estos vectores es limitada y no existen datos sobre las variaciones poblacionales del fenotipo de las especies a lo largo de su distribución geográfica. El objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad fenotípica del ala de *An. albimanus* y *An. calderoni* de las provincias fronterizas de Esmeraldas y El Oro mediante la morfometría geométrica. Se analizaron 198 alas, basándose en la digitalización de 13 puntos de referencia. Tanto en el tamaño del ala como en su forma se encontraron diferencias significativas entre las dos especies. Mientras que, para estas mismas características, no se encontraron diferencias entre los individuos de cada especie proveniente de las dos provincias. La variación de la forma no mostró diferencias significativas entre especies como tampoco entre provincias. A nivel de provincias, la asignación correcta basada en la forma del ala fue baja tanto en *An. albimanus* (69%) como en *An. calderoni* (66%), es decir, no se formaron grupos separados dentro de cada especie, ni entre localidades de las dos provincias. Estos resultados fueron confirmados con el análisis UPGMA, en el que, si bien se separaron las dos especies, las localidades dentro de cada especie se agruparon indistintamente de su origen geográfico. El efecto alométrico fue estadísticamente significativo al comparar las dos especies y entre las provincias de *An. albimanus*. Los resultados de este estudio muestran que no se forman grupos de individuos en estas especies, probablemente debido a un flujo entre poblaciones.

Palabras clave: alometría, *Anopheles*, forma alar, morfometría geométrica, tamaño alar

2. ABSTRACT

Malaria is a disease caused by the invasion of the red blood cells of the human liver by several species of *Plasmodium* parasites. Female mosquitoes of the genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae) are responsible for its transmission by stinging their vertebrate hosts. In Ecuador, the information available about these vectors is limited and there are no data on the population phenotypic variations of the species along their geographical distribution. The objective of this study was to determine the phenotypic variability of the wings of *An. albimanus* and *An. calderoni* of Esmeraldas and El Oro provinces by geometric morphometry. 198 wings were analyzed, based on the digitization of 13 landmarks. The wing shape and size showed significant differences between the two species. However, within each species, no significant differences were found between the individuals of the two provinces. The data of metric disparity in either species was statistically significant nor between provinces. At the provincial level, the correct allocation based on wing shape was low in both *An. albimanus* (69%) and *An. calderoni* (66%), that is, no separate groups were formed within each species, nor between individuals of the two provinces. These results were confirmed with the UPGMA analysis, in which, although both species were separated, localities within each species were grouped indistinctly of their geographical origin. The allometric effect was statistically significant when comparing the two species and between the provinces of *An. albimanus*. The results of this study show that no groups were formed within these species, probably due to population flow.

Keywords: allometry, *Anopheles*, geometric morphometry, wing shape, wing size

3. INTRODUCCIÓN

3.1. GENERALIDADES DE LA MALARIA

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por la infección de protozoos del género *Plasmodium* en las células rojas de la sangre. Es transmitida a través de la picadura de mosquitos hembras pertenecientes al género *Anopheles* (Familia Culicidae) (CDC, 2016a). A lo largo de la historia se han registrado epidemias importantes a nivel global. Muchas de ellas relacionadas con guerras (como la primera y segunda Guerra Mundial), con aglomeraciones masivas de gente (como la construcción del canal de Panamá); y fenómenos climáticos como el de El Niño (Kohn, 2008). Durante el siglo XX, esta enfermedad provocó la muerte de 250 millones de personas. Hoy en día, la malaria se encuentra eliminada de EE. UU., Canadá, Europa y Rusia (White et al., 2013), pero el 40% de la población mundial todavía es vulnerable y vive en zonas donde existe una transmisión activa de la enfermedad (Arrow, Panosian, & Gelband, 2004).

3.1.1. AGENTE INFECCIOSO: PROTOZOOS DEL GÉNERO *Plasmodium*

Los parásitos del género *Plasmodium* requieren de dos hospederos: un hospedero invertebrado (mosquito hembra del género *Anopheles*) y un hospedero vertebrado (reptil, pájaro o mamífero) (Roberts, Janovy, & Schmidt, 2005). La malaria humana es causada por cinco especies del género *Plasmodium* pero la mayoría de los casos corresponde a *P. falciparum* o *P. vivax* (White et al., 2013).

3.1.2. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO Y TRANSMISIÓN

El ciclo de vida en el hospedero vertebrado inicia cuando un mosquito infectado se alimenta de la sangre del hospedero, en el proceso inyecta saliva con esporozoitos. Una vez que los parásitos están en el torrente sanguíneo, estos infectan células del hígado, donde se replican y maduran para formar esquizontes (ciclo exoeritrocítico). La ruptura de los esquizontes provoca la liberación de merozoitos que infectan los glóbulos rojos de la sangre y se replican asexualmente (ciclo eritrocítico). Dentro de los glóbulos rojos se forman los

trofozoitos inmaduros (caracterizados por su estadio en forma de anillo) (CDC, 2016a) que son los responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Los trofozoitos maduran en una de dos formas: en esquizontes, cuyo rompimiento libera más merozoitos a la sangre o en gametocitos (microgametocitos y macrogametocitos), que representan los estadios eritrocíticos sexuales (Anexo 1) (CDC, 2016a).

En el mosquito *Anopheles*, el ciclo empieza cuando éste ha ingerido sangre con gametocitos. En el estómago de los mosquitos, los parásitos se multiplican en una fase conocida como ciclo esporogónico. Durante este ciclo, los microgametocitos (macho) penetran a los macrogametocitos (hembras) y generan cigotos. Estos cigotos crecen y se vuelven móviles y elongados (oocinetes), que son los que invaden el intestino medio donde se desarrollan en oocistos y se rompen liberando esporozoitos. Los últimos viajan hacia las glándulas salivares del mosquito y son inoculados cuando éste pica a otro ser humano, quien se convierte en un nuevo hospedero de la enfermedad (Anexo 1) (CDC, 2016a).

3.1.3. ASPECTOS CLÍNICOS

La infección con los parásitos de la malaria puede ser no complicada o grave (CDC, 2015a). La sintomatología principal consiste en una combinación de fiebre, escalofríos, sudor, náusea y vómito, dolores de cabeza y dolor corporal. Las manifestaciones de la malaria grave incluyen afecciones neurológicas, respiratorias, anemia, hiperparasitemia, hipoglicemia, entre otros (CDC, 2015a). A pesar de que aún no se ha logrado obtener una vacuna efectiva que prevenga la infección, la malaria es curable cuando el diagnóstico y tratamiento son adecuados y se hacen a tiempo (CDC, 2015b).

3.1.4. EPIDEMIOLOGÍA

La malaria se encuentra distribuida globalmente en áreas tropicales y subtropicales. En estas zonas la temperatura, humedad y precipitación permiten la sobrevivencia y reproducción de los vectores, además de favorecer el ciclo de desarrollo de los parásitos (CDC, 2017). De las 95 áreas endémicas para la malaria, declaradas hasta el 2016, la transmisión más alta existe en África Sub-Sahariana, Papúa Nueva Guinea (Oceanía) y Brasil (Sudamérica) (CDC, 2017). En la actualidad, se conocen 21 países endémicos para

malaria en las Américas y se estima que 20 millones de personas se encuentran en alto riesgo de infección por *P. vivax* y *P. falciparum* (WHO, 2016). En el 2017 se registró un total de 451 mil casos de malaria en esta región, de los cuales la mitad fueron en Brasil. Esto significó una reducción de 62% con respecto al año 2000, pero un aumento de 16% con respecto a lo observado en 2014, año en que se registró el menor número de casos de malaria en las últimas cuatro décadas.

3.1.4.1. MALARIA EN ECUADOR

En el 2014, se reportó la menor incidencia de malaria en la última década en Ecuador (241 casos). Sin embargo, en el año 2015, 2016 y 2017 se observó un aumento en el número de casos (686, 926 y 1279 casos, respectivamente) (WHO, 2016). En este último año, el reporte se realizó a partir de los datos de 13 provincias, de las cuales las más afectadas fueron: Morona Santiago (41%), Esmeraldas (20%), Pastaza (19%) y Orellana (15%); de estos, 62,5% fueron provocados por *P. vivax* y el 37,4% por *P. falciparum* (MSP, 2017). Si bien, Ecuador ha experimentado una reducción del 93% en los casos clínicos de malaria en los últimos 15 años y ahora apunta hacia una fase de eliminación (MSP, 2017), se ha demostrado que muchas infecciones son submicroscópicas y asintomáticas, lo que lleva a una subestimación del número de individuos infectados. En áreas con bajos niveles de transmisión, los casos asintomáticos podrían ser reservorios críticos en el mantenimiento de la transmisión (Sáenz et al., 2017).

3.1.4.2. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA MALARIA

Las estrategias más importantes son el uso de mosquiteros impregnados con insecticidas de larga duración (MTILDs) y el rociamiento intradomiciliar con insecticidas de efecto residual (IRS por sus singlas en inglés). Los mosquiteros tratados con insecticida reducen el contacto entre los mosquitos y los seres humanos, proporcionando una barrera física al dormir debajo de una red que además tiene un efecto insecticida. Mientras que, el rociamiento logra matar a los vectores que reposan en las paredes luego de picar a su hospedero. Esta técnica se basa en rociar una dosis efectiva de insecticida con una actividad

residual prolongada en paredes interiores y techos, generalmente una o dos veces al año (Mashauri, Manjurano, Safari Kinung'hi, Martine et al., 2017).

En Ecuador, las estrategias de control de vectores de malaria empezaron a aplicarse a inicios del siglo XX. Además, se participó en múltiples iniciativas regionales con el fin de lograr que la formación de profesionales y aplicación de estrategias se manejen de manera sostenibles (Naranjo et al., 2014).

Dichas intervenciones tuvieron como resultado una disminución en el número de casos reportados, lo que permitió a Ecuador ser el acreedor del premio “Campeón de la malaria” en el año 2009 y finalista, para el mismo galardón, en el 2012. Consecuentemente, entre el 2013 y 2014 el número de casos disminuyó de 544 a 368, en comparación con el 1.14 millones que se reportó en el año 2000 o los 572 mil en el 2008 (WHO, 2015; PAHO, 2013).

3.2. INSECTO VECTOR: MOSQUITOS DEL GÉNERO *Anopheles*

Los mosquitos son el grupo de mayor importancia médica y veterinaria. Se encuentran distribuidos en todo el mundo, excepto en la Antártica (Martinsen et al., 2016) y sobre los 3000 metros de altura sobre el nivel del mar (msnm) (Black y Kondratieff, 2004). La mayoría de los mosquitos se clasifican en tres grandes grupos: anofelinos, aedinos y culicinos (Black y Kondratieff, 2004). La malaria humana es transmitida únicamente por mosquitos de la subfamilia Anophelinae (Familia Culicidae) (White et al., 2014).

3.2.1. CICLO DE VIDA Y BIOLOGÍA DEL INSECTO VECTOR

El ciclo de vida de los anofelinos consta de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (Anexo 2). Las primeras tres etapas se desarrollan en vida acuática y duran entre 5 y 14 días, dependiendo de la especie y de la temperatura ambiente. El tiempo de vida de las hembras adultas es de dos semanas en la naturaleza (o hasta de un mes o más en cautiverio) (CDC, 2015c). Sus probabilidades de supervivencia también dependen de la humedad y de su capacidad para obtener una comida de sangre exitosamente, evitando ser notado por el huésped (CDC, 2015c).

Las hembras adultas ovopositan entre 50 a 200 huevos, los que están asociados al agua, son de color marrón o negro, tienen forma de barco, no resisten a la desecación y

poseen una especie de flotadores a los lados, lo que es una característica única y exclusiva del género (Service, 2008) (Anexo 2a). El sitio de ovoposición es determinante para la distribución de las diferentes especies, y estos hábitos varían ampliamente entre las diferentes especies (Black y Kondratieff, 2004).

Las larvas son organismos complejos cuya principal función es alimentarse de algas, bacterias y otros microorganismos de la superficie de la micro capa acuática donde pasan la mayor parte del tiempo (Service, 2008) (Anexo 2b). Se desarrollan a través de 4 etapas, o estadios, antes de transformarse en pupas (CDC, 2015c). Las larvas se encuentran en diversos hábitats, pero la mayoría de las especies prefieren el agua limpia y no contaminada. Sin embargo, se las ha encontrado también en humedales de agua dulce o salada, pantanos de manglares, campos de arroz, zanjas de hierba, bordes de arroyos y ríos y pequeños estanques temporales pues gran parte de las especies prefieren los hábitats con vegetación (Service, 2008). Algunas larvas se han adaptado a zonas con poca o nula vegetación como piscinas abiertas; y pocas de ellas se encuentran sólo en lugares de reproducción sombreados en los bosques, pues se reproducen en los agujeros de los árboles o en las axilas de algunas plantas (CDC, 2015c).

La etapa pupal dura de dos a tres días (Anexo 2c) (Black y Kondratieff, 2004). El apareamiento ocurre cerca de las fuentes de agua donde se encuentran las larvas. Sin embargo, antes del apareamiento, la hembra debe haberse alimentado de sangre (Anexo 2d). La hembra descansa hasta que la sangre sea digerida y se desarrollen los huevos, lo que tarda entre dos y tres días dependiendo de la temperatura ambiental (Anexo 2e) (CDC, 2015c). La sangre provee de los nutrientes necesarios para el desarrollo de los huevos que serán fertilizados (Black y Kondratieff, 2004).

La hematofagia en artrópodos ha evolucionado, independientemente, al menos 21 veces (Black y Kondratieff, 2004). En *Anopheles* se ha visto comportamientos antropofílicos (que tienen preferencia por alimentarse de sangre humana) y zoofílicos (con preferencia de alimentarse de otros animales) (CDC, 2015c).

En cuanto a su actividad, la mayoría de los mosquitos *Anopheles* son crepusculares (activos al anochecer o al amanecer) o nocturnos (activos por la noche). Algunos se alimentan en interiores (endófagos) mientras que otros se alimentan al aire libre (exofágico). Después de la alimentación de sangre, algunos mosquitos prefieren descansar en el interior (endofílicos) mientras que otros prefieren descansar al aire libre (exofílicos) (CDC, 2015c). Estas características varían de acuerdo con la especie, y son aspectos importantes que se debe conocer para establecer estrategias de prevención en la transmisión de malaria. (CDC,

2015c).

3.2.2. EVOLUCIÓN Y DIVERSIDAD

De acuerdo con un estudio reciente, la filogenia molecular de los anofelinos muestra que llevan aproximadamente 100 millones de años de evolución desde su divergencia (Anexo 3) (Neafsey et al., 2015) y la mayoría de las especies comprenden complejos de especies hermanas (Harbach, 2013). Además, se observa que el género *Anopheles* exhibe un perfil evolutivo genómico dinámico que contribuye a su flexible capacidad para aprovechar nuevos nichos ecológicos, incluyendo la adaptación a los seres humanos como huéspedes primarios. En el caso de las especies vectores de la malaria, esta plasticidad genética determina la capacidad vectorial dentro del género (Neafsey et al., 2015).

En la actualidad, el género *Anopheles* incluye alrededor de 500 especies entre las cuales, al menos 20 taxones representan complejos de especies, que comprenden alrededor de 115 miembros de especies hermanas. Los complejos de especies incluyen vectores y no vectores (Choochote y Saeung, 2013). Asimismo, estas se dividen en siete subgéneros: *Anopheles* (cosmopolitas, 182 especies), *Baimaia* (Orientales, una especie), *Cellia* (del Viejo Mundo, 220 especies), *Kerteszia* (Neotropicales, 12 especies), *Lophopodomyia* (Neotropicales, seis especies), *Nyssorhynchus* (Neotropicales, 39 especies) y *Stethomyia* (Neotropicales, cinco especies). Cuatro de ellos (*Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* y *Nyssorhynchus*) comprenden a las especies transmisoras de mayor importancia (Anexo 3) (Harbach, 2013), y tan solo aproximadamente 60 de las especies conocidas son consideradas vectores eficientes (Neafsey et al., 2015).

En América del Sur las especies de anofelinos epidemiológicamente importantes se encuentran distribuidas en tres grandes regiones. *An. darlingi* es el vector primario en la región amazónica; *An. cruzii* y *An. strodei* son vectores dominantes en la región del Bosque Atlántico (Wilke et al., 2016); y *An. albitarsis*, *An. nuneztovari*, *An. pseudopunctipennis*, y *An. albimanus* predominan en la región costa Pacífica (Laporta et al., 2015). Las diferentes especies difieren según su capacidad vectorial, preferencia de tipos de sangre y, también en sus funciones vectoriales primarias o secundarias, dependiendo de las especies con las que comparten el hábitat (Pinault, 2011).

3.2.3. MOSQUITOS *Anopheles* EN ECUADOR

Se han reportado 36 especies de anofelinos en Ecuador (Pinault y Hunter, 2012a), pero colecciones recientes han identificado 11 especies en zonas de transmisión activa. Entre ellas, cinco vectores costeros: *Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. triannulatus*, *An. punctimacula*, *An. calderoni* y, seis vectores amazónicos: *An. oswaldoi*, *An. rangeli*, *An. darlingi*, *An. benarrochi*, *An. konderi*, *An. nuñeztovari* (Pinault y Hunter, 2011; Peralta, 2014; Viera, 2014).

Además, estudios relacionados con la biología del vector en Ecuador demuestran que varias especies de *Anopheles* han ampliado su distribución geográfica (Pinault y Hunter, 2011). A pesar de que la malaria está controlada, el aumento de brotes podría darse bajo condiciones adecuadas, como causas climáticas (oscilaciones de la corriente de El Niño) o no climáticas (descontinuación de las campañas de fumigación, variabilidad en la disponibilidad de tratamientos, migración) (Gagnon et al., 2002). Así como la presencia de casos asintomáticos, con parasitemias submicroscópicas, que podrían ser reservorios críticos en el mantenimiento de la transmisión (Sáenz et al., 2017).

Históricamente, en 1950, la mayor incidencia de malaria en la región costa del Ecuador era en la zona norte. Allí los vectores más comunes eran *An. albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, y *An. punctimacula* (Pinault y Hunter, 2012b). La primera gran epidemia de malaria en zonas altas se informó en 1958 debido al inicio de la construcción de carreteras que unían Quito con la costa, lo que generó un gran desplazamiento de habitantes y amplias franjas de bosque fueron convertidas en plantaciones (Pinault y Hunter, 2012b). Esto favoreció la generación de hábitats para la reproducción de mosquitos *Anopheles* (Pinault y Hunter, 2012b).

Se especula que los vectores de la malaria en Ecuador podrían ampliar su distribución geográfica en regiones montañosas, debido a efectos del cambio climático, la resistencia a insecticidas, los cambios en la metodología de control de vectores y las alteraciones en el uso del suelo por el ser humano (Pinault y Hunter, 2012b).

El presente estudio se centrará en dos especies: *An. albimanus* y *An. calderoni*. Las principales características de estas especies se detallan a continuación.

3.2.3.1. *Anopheles albimanus*

Anopheles albimanus Wiedemann es una especie del subgénero *Nyssorhynchus* (Faran, 1980). Se encuentra distribuida desde la región Neártica (norte de México y a lo largo del Río Grande en Texas) hasta Perú (Anexo 4) (Harbach, 2013; Sinka et al., 2010). Registros indican que, en 17 de los 20 países de la región caribeña, es el vector principal de la malaria (WRBU, 2015).

Esta especie habita en zonas menores a los 500 (msnm). No obstante, un estudio para conocer su distribución en Ecuador reportó 5 *hot spots* (sitios con alta densidad de larvas) importantes a mayores altitudes (zonas bajas de Imbabura, Pichincha y Sto. Domingo de los Tsáchilas) (Pinault y Hunter, 2011). Esta especie se caracteriza por presentar un comportamiento antropofílico predominante, es decir que prefiere y se ha adaptado a alimentarse de sangre humana, aunque podría aprovechar comidas de otras fuentes animales (zoofilia) (Naranjo-Díaz, Altamiranda, Luckhart, Conn, y Correa, 2014). Su actividad es mayor después del atardecer, con su pico más alto entre las 18h00 y 21h00 (Naranjo-Díaz, Altamiranda, Luckhart, Conn, y Correa, 2014). Otras observaciones indican que *An. albimanus* muestra un comportamiento exófago significativo y un comportamiento exófilo de reposo (Sinka et al., 2010), es decir prefieren alimentarse y reposar (después de la alimentación de sangre) en áreas abiertas (CDC, 2015).

Esta especie ha sido asociada con sitios de mayor salinidad y expuestos al sol (Pinault, 2011) por lo que se la encuentra con abundancia en zonas de manglar o cerca de canales de drenaje de humedales, pues estos les representan sitios apropiados de reproducción (Naranjo-Díaz, Altamiranda, Luckhart, Conn, y Correa, 2014). Además, ha sido asociada con hábitats permanentes y con sustratos arenosos, estos últimos son más comunes en hábitats de tierras altas (Pinault y Hunter, 2012a).

3.2.3.2. *Anopheles calderoni*

Anopheles calderoni Wilkerson es una especie del subgénero *Anopheles* (Arregui et al., 2015). Su distribución geográfica está limitada al noroccidente de América del Sur desde Venezuela hasta Perú (Anexo 5), aunque se sugiere que esta podría ser más extensa (González et al., 2010). Existen pocos reportes de esta especie y su relevancia epidemiológica es poco conocida. Ha sido registrada como un vector de importancia local en el occidente peruano, donde es el segundo en abundancia a nivel intradomiciliar.

Colecciones de museo han revelado que habita en zonas entre los 500 y 1113 msnm (González et al., 2010).

Se caracteriza por presentar un comportamiento antropofílico, pero no es específico, es decir, que no se alimentan exclusivamente de sangre de humanos, sino que también de otros animales (zoofílico) (Naranjo-Díaz, Altamiranda, Luckhart, Conn, y Correa, 2014). Se conoce que esta especie es activa después del atardecer, con su pico más alto de actividad entre las 21h00 y 00h00. Otras observaciones indican que *An. calderoni* ha sido detectada en gran abundancia durante época lluviosa sobre todo en zonas de cultivo de palma (*Elaeis guineensis*, cultivada para obtención de aceite), pues estos representan sitios apropiados de reproducción (Naranjo-Díaz, Altamiranda, Luckhart, Conn, y Correa, 2014).

3.3. HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE POBLACIONES DE *Anopheles*

El género *Anopheles* ha sido ampliamente estudiado debido a su importancia médica. Las herramientas clásicas para el estudio de sistemática y taxonomía se basan en el uso de caracteres morfológicos. Sin embargo, el desarrollo de técnicas moleculares permitió una mayor ampliación de los estudios, por ejemplo, a nivel taxonómico se logró determinar la presencia especies crípticas que morfológicamente son indiferenciables, pero que epidemiológicamente tienen roles diferentes. Además, se lograron responder preguntas relacionadas con estructura poblacional, reconstrucción de filogenias, comparación de genomas (Norris, 2002; Krzywinsky y Besansky, 2003).

A pesar de que la biología molecular abre las posibilidades de investigación, también tiene ciertas limitantes como los costos asociados (equipos, reactivos), almacenamiento especial de las muestras, personal con entrenamiento específico. Esto, junto con una disminución en el interés de realizar estudios morfológicos, ha hecho que gran parte de las colecciones de referencia queden subutilizadas (Garros y Dujardin, 2013). No obstante, el desarrollo de la bioinformática ha abierto el campo para realizar la cuantificación y visualización de diferencias en los caracteres morfológicos, lo que actualmente se conoce como morfometría geométrica (Garros y Dujardin, 2013).

3.4. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

La morfometría (medida *-metron-* de la forma *-morphe-*) geométrica (MG) aborda el estudio morfológico de las estructuras biológicas en dos o tres dimensiones espaciales (Lorenz et al., 2017). Los enfoques morfométricos tradicionales suelen aplicar técnicas

estadísticas a una amplia gama de mediciones, como las distancias y las proporciones de distancia, ángulos, áreas y volúmenes (Mitteroecker y Gunz, 2009). Mientras que, la MG aplica la estadística multivariada, el uso de datos multidimensionales permite capturar la geometría de un organismo o estructura, y permite describir la forma del objeto en términos de la relación espacial entre los puntos anatómicos de referencia (conocidos como *landmarks* o hitos) (Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004a; Dujardin, 2008; Toro et al., 2010). Existen tres clases: los *landmarks*, *semilandmarks* y *landmarks* de contorno. Para el presente estudio solo se utilizó *landmarks*. Estos a su vez están clasificados en tres categorías: los de Tipo I son fácilmente reconocibles, los de Tipo II son difíciles de diferenciar entre individuos, y lo de Tipo III, son puntos extremos, cuya posición se relacionan con otros *landmarks* (Anexo 6) (Bookstein, 1991).

En esta herramienta, el tamaño y la forma derivan de una configuración de puntos de referencia de una sección no articulada del insecto (Garros y Dujardin, 2013). La MG está basada en coordenadas cartesianas, es capaz de conservar la geometría de la configuración de los puntos de referencia a lo largo del análisis y permite representar los resultados estadísticos como formas reales (Mitteroecker y Gunz, 2009).

La MG se la considera, por tanto, una herramienta poderosa para evaluar correlaciones entre formas y variables ambientales o genéticas pues se basa en puntos de referencia identificables que son, por lo general, aunque no necesariamente, corresponsales evolutivos (Lorenz et al., 2017). Entre las mayores ventajas de esta metodología está el bajo costo, el no requerir personal altamente especializado, la rapidez de la aplicación de la técnica y la ausencia de impedimentos para analizar el mismo individuo con otras técnicas (por ejemplo: técnicas moleculares) (Garros y Dujardin, 2013).

En mosquitos, los análisis morfométricos se realizan, generalmente, en alas debido a que estas estructuras son bidimensionales y relativamente rígidas, lo que facilita la repetición en la toma de los puntos de referencia. Este análisis permite conocer si hay una correspondencia anatómica entre poblaciones y especies (Garros y Dujardin, 2013).

3.4.1. MORFOMETRÍA ALAR

La MG de la arquitectura alar de los mosquitos es una técnica multifuncional. Se la utiliza para identificar especies hermanas y especies crípticas, principalmente en algunas especies cuya identificación mediante otras técnicas ha resultado problemática (Wilke et al.,

2016). De igual forma, es útil para estudiar la diferenciación dentro y entre especies, reconocer dimorfismo sexual y separar cepas de laboratorio (Lorenz et al., 2017).

El ala es ampliamente utilizada para las comparaciones morfométricas debido a su estructura bidimensional, a que no sufre deformación al ser montada entre dos placas y, a que contienen puntos de referencia anatómicos naturales (intercepción entre venas) (Anexo 6), que son ideales para marcar puntos de referencia o *landmarks* (Lorenz et al., 2017).

Con relación a *An. albimanus*, existen algunos estudios realizados con morfometría de alas. Gómez et al. (2013) estudiaron poblaciones de varias eco-regiones en Colombia comparando la geometría del ala con microsatélites y variables ambientales (elevación, humedad relativa y precipitación). Este estudio reporta que el tamaño del ala podría estar influenciado por la elevación y la humedad relativa, mientras que la forma del ala estaba afectada por esas dos variables y también por la lluvia, la latitud, la temperatura y las eco-regiones. Tanto los rasgos de las alas como los datos de microsatélites mostraron que *An. albimanus* forma una sola población panmíctica, a pesar de la heterogeneidad ambiental (Gómez et al., 2013).

En relación con *An. calderoni*, existen dos estudios realizados con morfometría de alas. El primero, utilizó la morfometría tradicional en la que se comparó dos poblaciones de diferentes gradientes altitudinales que mostraron diferencias tanto en tamaño como en forma, posiblemente causado por características micro ambientales de cada localidad más que a diferencias genéticas (Rodríguez-Zabala et al., 2016). El segundo estudio, utiliza la morfometría geométrica y compara *An. calderoni* con otras especies del mismo subgénero y de otros subgéneros. Este estudio mostró que el tamaño del ala fue variable tanto a nivel intraespecífico como interespecífico puesto que cada subgénero presentó una tendencia de tamaño de ala particular, posiblemente relacionada con la historia evolutiva de estos linajes. Además, la forma del ala permitió la discriminación de especies (Gómez y Correa, 2017).

3.5. JUSTIFICACIÓN

La generación de conocimiento de las especies de vectores locales es esencial para dar seguimiento a la situación epidemiológica en zonas endémicas para la malaria. Dado el papel crítico del control de vectores y la magnitud de las inversiones, es primordial una comprensión clara de la biología de la enfermedad y la ecología de la transmisión local para reducir la transmisión (Mnzava et al., 2014).

Los insectos de importancia médica están continuamente sometidos a diversas presiones de selección, ya sea por cambios ambientales o por la aplicación de medidas de control (exposición a insecticidas), lo que puede generar variación fenotípica, que a su vez es la fuente de muchas preguntas taxonómicas y epidemiológicas (Dujardin, 2008). Sin embargo, el cuerpo del insecto *per se* evidencia que la plasticidad fenotípica tiene una importancia evolutiva (Pigliucci, 2005).

Conocer la variación geográfica a nivel de la morfología de las poblaciones de una especie puede mejorar las estrategias de control antes de las mismas y puede respaldar la vigilancia entomológica después de las campañas de rociamiento (Dujardin, 2008). Dentro de los estudios para determinar la variabilidad fenotípica de los vectores, una de las herramientas utilizadas es el análisis de la morfometría geométrica de las alas (Vidal y Suesdek, 2012).

En el presente trabajo se plantea estudiar a dos especies de la costa del Pacífico del Ecuador de las cuales se posee escasa información: 1) *An. albimanus*, vector importante de la malaria humana en los sitios costeros de México, Centroamérica y parte de Sudamérica (Molina-Cruz y Barillas-Mury, 2016) y, 2) *An. calderoni*, especie reportada desde Venezuela hasta Perú, declarada de importancia médica al sur de Colombia y en el norte de Perú (Orjuela et al., 2015; Naranjo-Díaz, Altamiranda, Luckhart, Conn, y Correa, 2014).

En Ecuador, el conocimiento sobre la biología de *Anopheles* es limitado. En los últimos años, varias publicaciones han aportado con información sobre la ampliación de su distribución geográfica, el efecto del uso del suelo y la taxonomía (Pinault y Hunter 2011, 2012a, 2012b; Arregui et al., 2015). Sin embargo, no se han realizado estudios que nos permitan determinar si las poblaciones de *Anopheles* presentan variaciones morfológicas a lo largo de su rango de distribución, las que pueden relacionarse con el cambio climático, control vectorial, migración de poblaciones de vectores, etc. Dentro de este contexto, el presente estudio es el primero en analizar la morfometría alar de anofelinos del país y propone determinar la variabilidad fenotípica de los vectores *An. albimanus* y *An. calderoni*, que se encuentran en las provincias fronterizas Esmeraldas y El Oro, mediante morfometría geométrica alar.

3.6. OBJETIVOS

3.6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad fenotípica de *Anopheles albimanus* y *An. calderoni* en las provincias fronterizas de Esmeraldas y El Oro mediante el análisis de la morfometría geométrica de alas de especímenes previamente colectados y albergados en el CISEAL.

3.6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.6.2.1.** Determinar la variabilidad de tamaño alar inter e intraespecífica en individuos de las dos provincias.
- 3.6.2.2.** Determinar la variabilidad de la conformación (forma) alar inter e intraespecífica en individuos de las dos provincias.
- 3.6.2.3.** Determinar cómo la variación de la forma está influenciada por la variación del tamaño alar dentro de cada especie con respecto a su distribución geográfica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

Este trabajo se realizó con muestras provenientes de dos provincias previamente colectadas y almacenadas en el CISeAL. En Esmeraldas (ESM) las localidades de muestreo fueron: Unión de Atacames (ATA), Las Golondrinas (GOL), Limones (LIM), Muisne (MUI) y San Lorenzo (SAN). En El Oro (ORO) las localidades de muestreo fueron: Barbones (BAR), Los Ángeles (LA), Huaquillas (HUA) (Figura 1).

4.1.1. PROVINCIA DE ESMERALDAS

Esmeraldas (ESM) es una provincia costera septentrional del Ecuador localizada en la frontera con Colombia. Está compuesta, en su gran mayoría, por bosque siempreverde del Chocó, bosque seco tropical y manglar con clima húmedo a hiperhúmedo (MAE, 2013). La estación lluviosa se extiende de diciembre a mayo con un promedio de 1000 mm de precipitación. Mientras que, la estación seca, influenciada por la corriente cálida ecuatorial, es corta y ocurre alrededor del mes de noviembre. La provincia reporta una temperatura promedio de 26°C a lo largo del año (Jorgensen y León-Yáñez, 1999; Hernández, 2005).

Esta provincia se encuentra dentro de las zonas de riesgo epidemiológico para la malaria en el Ecuador, donde alrededor de 534 mil personas son vulnerables a la transmisión de esta enfermedad (MSP, 2018). En lo que lleva del año 2018, se han reportado 34 de 535 casos de malaria a nivel nacional, de los cuales el 100% fueron reportados para San Lorenzo (MSP, 2018). La ubicación geográfica de las localidades y el número de muestras analizadas en este estudio se encuentran detallados en la Tabla 1.

4.1.2. PROVINCIA DE EL ORO

El Oro (ORO) es una provincia costera meridional del Ecuador localizada en la frontera con Perú. Está compuesta, en gran parte, por bosque deciduo y semideciduo de tierras bajas y manglar con clima subhúmedo y seco (MAE, 2013). La estación lluviosa se extiende de diciembre a mayo con un promedio de 300 mm de precipitación. La estación seca está influenciada por la corriente de Humboldt que hace que sea larga, desde mayo a

diciembre. Esta provincia reporta una temperatura promedio de 24.9°C a lo largo del año (Jorgensen y León-Yáñez, 1999; Hernández, F., 2005).

El Oro se encuentra también dentro de las zonas de riesgo epidemiológico para la malaria dentro del Ecuador, donde alrededor de 600 mil personas son vulnerables a la transmisión (MSP, 2018). Sin embargo, la prevalencia de esta enfermedad ha disminuido considerablemente durante la última década en esta provincia. En lo que lleva del año 2018, no se ha reportado casos de malaria (MSP, 2018). La ubicación geográfica de las localidades y el número de muestras analizadas en este estudio se encuentran detallados en la Tabla 1.

4.2. SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS

Este trabajo se realizó con colecciones almacenadas en seco en el Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) las cuales fueron colectadas en el año 2012. Se seleccionó muestras cuya identificación taxonómica fue realizada con claves morfológicas y, luego confirmada por técnicas moleculares. Se analizó 102 individuos de *An. albimanus* colectados en Esmeraldas y 49 en El Oro, mientras que de *An. calderoni* se analizó 19 individuos de Esmeraldas y 28 individuos de El Oro, respectivamente (Tabla 1). Para el análisis, se trabajó únicamente con las alas izquierda de los mosquitos hembras adultos.

4.2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Debido al modo de almacenamiento, los tejidos de las muestras eran frágiles y poco elásticos. Para evitar la ruptura de su estructura y para facilitar la disección de sus alas, se procedió a realizar un proceso de suavización. Para ello, se colocaron los individuos en tubos individuales, sobre una gradilla de espuma flex, dentro de una cámara hermética con arena blanca durante 4 horas. Posteriormente, se extrajo el ala izquierda desde la base en el tórax. Este proceso se realizó con pinzas entomológicas de puntas afiladas y placas portaobjetos de vidrio con el código correspondiente a la identificación del individuo.

4.2.1.1. SOLUCIÓN DE MONTAJE HOYER

La solución Hoyer es un medio que ha sido ampliamente utilizado por entomólogos,

acarólogos e incluso por botánicos y micólogos. Este medio se caracteriza por limpiar el tejido blando y mejorar la visibilidad de los objetos debido a su alto índice de refracción. Además, su durabilidad es reconocida pues diversos ejemplares se han conservado durante más de veinte años en el Museo Nacional de los Estados Unidos sin deterioro (Anderson, 1954). El medio se preparó siguiendo el protocolo descrito en de Cold Spring Harbor Protocols (2011) calculando las cantidades para el volumen de muestra deseado. En vaso de precipitación con 25 ml de agua destilada se agregó 15g de goma arábiga y se calentó a 60°C, con agitación constante, durante 1 hora. Posteriormente, se agregó 100g de hidrato de cloral. Una vez que se disolvió por completo, se agregó 10g de glicerol. Finalmente, se almacenó la solución a temperatura ambiente en un recipiente herméticamente cerrado.

4.2.1.2. ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE MONTAJE DE ALAS

Los anofelinos están caracterizados por poseer abundantes escamas coloridas en sus alas (González y Carrejo, 2009). Varios autores recomiendan la remoción de estas, ya que los puntos oscuros y las escamas pueden sesgar la exactitud con que se digitalizan los puntos de referencia. Por tanto, una visualización nítida de las venas y de sus intersecciones mejora la captura de su geometría, y reduce el margen de error para los análisis morfométricos (Lorenz y Suesdek, 2013; Roggero & Passerin d'Entrèves, 2005; Motoki, Suesdek, Bergo, & Sallum, 2012).

Antes de iniciar este estudio, se realizó un ensayo para evaluar el efecto de la presencia/ausencia de escamas sobre la visualización de las venas en alas de *An. albimanus*, es decir se midió la capacidad de comparar la variación fenotípica alar para determinar la mejor técnica de preparación de las alas (Figura 2). Para este ensayo, las “alas con escamas” de 30 individuos fueron fotografiadas y digitalizadas. Posteriormente, estas mismas alas fueron sometidas a remoción mecánica. La remoción de escamas se realizó mediante la extracción mecánica con un pincel húmedo fino y agujas de microdissección. El proceso se realizó sobre una placa Petri bajo un estereoscopio, lo cual requiere una manipulación sutil de los instrumentos para evitar la ruptura de las alas que puede romperse con facilidad. Las alas tratadas se transfirieron a nuevos portaobjetos y se añadió una gota de solución Hoyer. Posteriormente, la muestra fue cubierta con un cubreobjetos (evitando la formación de

burbujas de aire). Esto se dejó secar a temperatura ambiente por aproximadamente 6 días. Las “alas sin escamas” fueron fotografiadas y digitalizadas. Para determinar el error de medición dentro cada tratamiento y entre tratamientos se realizó la digitalización de cada ala se realizó cuatro veces (dos veces para cada preparación “con escamas” y “sin escamas”). La estimación del error fue medida con el valor de repetibilidad para el tamaño (Arnqvist y Martinson, 1998); y con la varianza de Procrustes para la forma alar (Klingenberg y McIntyre, 1998). Los análisis estadísticos evaluaron la precisión (repetibilidad) y exactitud (al eliminar el error de medición) del método de preparación del material de estudio.

4.2.1.3. FOTOGRAFÍA DE LAS MUESTRAS

Cada ala se fotografió utilizando el software Infinity Analyze (versión 6.5.1) conectado a la cámara Carl Zeiss Stemi SV6 (Zeiss, Alemania) acoplada a un estereoscopio. En cada foto se realizó un ajuste de la escala. Las fotos que presentaron alas completas y con una clara definición de la nervadura fueron seleccionadas para el análisis.

4.2.2. DATOS MÉTRICOS

4.2.2.1. MANEJO DEL SOFTWARE CLIC (VERSIÓN 98)

The CLIC Package es un software libre bajo licencia GPL, disponible en <http://xyom-clic.eu/>. Las siglas “CLIC” corresponden al inglés *Collecting Landmarks for Identification and Characterization*. Este programa ha sido ampliamente utilizado para el análisis tanto de morfometría tradicional y geométrica en el área de la entomología médica. Está compuesto por ocho módulos, pero para el presente estudio solo se utilizó los seis que se describen a continuación:

COO (Colecta de coordenadas): módulo diseñado para digitalizar *landmarks*, *semilandmarks* y *pseudolandmarks*, permite una digitalización manual, rápida y precisa.

MOG (Morfometría Geométrica): módulo diseñado para procesar un estudio basado en *landmarks* y *semilandmarks*; permite visualizar los diferentes pasos de una superposición de Procrustes: traslación, escalamiento, y rotación.

TET (Tabla Espacios Tabulaciones): módulo diseñado para editar, convertir o calcular datos y posee las funciones “*concatenate by rows*” para unir archivos de datos por

filas; y la función “*scale*” para corregir la escala de las imágenes.

VAR (Variable): módulo diseñado para analizar la variación de tamaño y su significación, permite calcular el error de medición.

PAD (Permutaciones, Análisis Discriminante): módulo diseñado para realizar la permutación aleatoria de individuos entre grupos para probar la significancia de cada distancia de Mahalanobis en pares. Reclasifica individuos, con y sin validación cruzada, y se pueden introducir datos complementarios.

COV (Covarianza): módulo diseñado para realizar varias operaciones multivariadas básicas o especializadas como el análisis de componentes principales (PCA), deformaciones parciales (PW), modelo alométrico de diferentes curvas comunes (MANCOVA), disparidad métrica (MD), entre otros (Kitthawee y Dujardin, 2016).

4.2.2.2. DIGITALIZACIÓN DE PUNTOS DE REFERENCIA

Se digitalizaron 13 puntos de referencia (*landmarks*) en cada ala utilizando el módulo COO v98. Estos puntos se encuentran localizados en los sitios de unión de las nervaduras de las alas (intersección entre venas) y en la intersección entre las venas y el borde del ala, lo que se ilustra en la Figura 3.

4.2.2.3. ANÁLISIS GENERALIZADO DE PROCRUSTES

El Análisis Generalizado de Procrustes (GPA por sus siglas en inglés) es una superposición que minimiza la diferencia entre los puntos de referencia equivalentes de dos o más figuras a comparar (Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004e). Consiste en tres pasos: (i) el centroide de cada configuración de puntos se traslada al origen, (ii) se escalan las configuraciones según el tamaño centroide (CS) y (iii) se rotan las configuraciones (Adams, Rohlf y Slice, 2004; Dujardin y Slice, 2007). Como resultado, se generan coordenadas residuales que son proyectadas en el plano Euclidiano (espacio tangencial lineal) (Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004e). Esto permite visualizar la diferencia entre configuraciones y realizar los análisis multivariados por la separación de las variables de tamaño y forma (Bookstein, 1990; Dujardin y Slice, 2007; Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004e). Este proceso se realizó en el módulo MOG v98.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron a partir de los datos generados como coordenadas después de la digitalización de los puntos de referencia. Antes de analizar los datos, estos fueron concatenados (unidos ordenadamente en un solo archivo) y escalados (correcciones de escala) en el módulo TET.

4.3.1. CÁLCULO DEL ERROR DE MEDICIÓN

Previo al análisis de las muestras, en el módulo VAR, se realizó el cálculo del error de medición en base a un análisis de repetibilidad con 60 alas (30 alas por especie), donde se evaluó la precisión con la cual una persona es capaz de marcar los puntos en el mismo lugar, repetidas veces. Para esto, se eligió las muestras al azar sin repetición. Dichas muestras se digitalizaron dos veces para comparar la información de sus coordenadas. El cálculo de la repetibilidad fue hecho mediante un ANOVA en el módulo VAR v98 lo que permite evaluar la precisión con la cual se pueden digitalizar los diferentes puntos de referencia, cálculo de la repetibilidad.

4.3.2. ANÁLISIS DE TAMAÑO

El tamaño alar fue comparado entre especies, provincias y localidades de cada provincia. Esto se realizó en el módulo VAR y consistieron en calcular los valores de la media ($\bar{\chi}$), la desviación estándar (SD) y la varianza (σ^2) del tamaño centroide para las especies, provincias y comunidades. El tamaño centroide o *centroid size* (CS, por sus siglas en inglés), es una medida de la escala geométrica. Corresponde a la raíz cuadrada de las distancias cuadradas sumadas de cada punto de referencia, desde el centroide de la configuración del punto de referencia (Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004b).

La significación estadística se determinó mediante la prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni. Esta corrección es un ajuste del valor de p , que se emplea cuando se realizan comparaciones múltiples (Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004c). La corrección de Bonferroni se realizó en el paquete “*stats*” del software RStudio v.1.0.153 (disponible gratuitamente en <https://www.rstudio.com>).

Para las comparaciones a nivel de localidad de muestreo, se excluyó al individuo de

An. calderoni colectado en Las Golondrinas ya que el análisis no acepta grupos tan pequeños.

4.3.3. ANÁLISIS DE CONFORMACIÓN (FORMA)

Al igual que en los análisis de tamaño, la forma alar fue comparada entre especies, provincias y localidades de cada provincia. Dichos análisis se realizaron en el módulo PAD. Con los datos de forma se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA). Este análisis aplica una técnica de proyección y rotación de datos que resume la mayor parte de la variabilidad en los datos y permite observar patrones y clústeres en pantallas para obtener una idea de las variables influyentes y asociadas que dan lugar a estas pantallas (Rohlf y Marcus, 1993).

Posteriormente, los componentes más representativos del PCA fueron sometidos a un análisis discriminante (DA). Este análisis permite examinar la estructura de un grupo de datos y diferenciar entre grupos (Klingenberg, 2013). Asimismo, encuentra transformaciones lineales de los datos que maximizan la variación entre los grupos en relación con la variación agrupada dentro del grupo. La variación entre los grupos se expresa en relación con la matriz de covarianzas dentro del grupo (Lorenz et al., 2017).

Se calcularon las distancias de Mahalanobis (D^2) y su significación estadística mediante una prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida por Bonferroni, lo que evita la sobreestimación del valor de p (Wilke, 2016). Las D^2 son las distancias generalizadas que consideran la varianza, la correlación de variables dentro de los grupos definidos *a priori* y las distancias de medición entre puntos (Lorenz et al., 2017).

Posteriormente, cada individuo fue reclasificado utilizando la prueba de reclasificación validada (CCC) en el módulo PAD. En MG, la reclasificación validada es también conocida como *cross-validated reclassification* o *Cross Checked Classification* (CCC, por sus siglas en inglés). Se trata de la herramienta donde al tomar una muestra, un espécimen se deja de lado y todos los otros (N-1) se usan para estimar las D^2 . La muestra omitida se trata como desconocida y se predice su pertenencia a un grupo. El procedimiento permite evaluar el rendimiento del modelo y se repite para todas las muestras, dejando secuencialmente cada una de ellas fuera del análisis y estimando las distancias de las otras para luego predecir la pertenencia al grupo de la muestra omitida (Strauss, 2001).

Además, las D^2 fueron utilizadas para construir un árbol UPGMA, análisis que

consideró las provincias y las localidades de muestreo de cada especie. El diagrama de UPGMA o *unweighted pair group method with arithmetic mean* es un análisis de conglomerados simple, y emplea la agrupación secuencial para construir un cladograma enraizado (Choudhuri, 2014). El UPGMA fue construido usando el paquete “ape” del software RStudio v.1.0.153 (Paradis et al. 2004).

Se calculó la disparidad métrica para estimar la varianza de la forma y así poder examinar el rango de variación fenotípica. Se trata de una medida de la variedad de formas en una muestra (Jirakanjanakit, 2007).

4.3.4. ANÁLISIS DEL EFECTO ALOMÉTRICO

El efecto de la variación de tamaño alar sobre la variación de su forma fue evaluado entre las especies y entre las provincias. Se utilizó el módulo COV donde se aplica una regresión lineal multivariante de la primera función discriminante (CV1) (variable de forma) frente a la variación de tamaño (Jirakanjanakit, 2007). Las variables de forma fueron representadas en el eje Y o variable dependiente; y de tamaño, en el eje X o variable independiente. La significancia estadística se estimó mediante la prueba de *t* de *Student* para muestras independientes.

5. RESULTADOS

5.1. INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE ESCAMAS EN LA MORFOMETRÍA ALAR

La digitalización de puntos de referencia, al retirar las escamas, mejoró la repetibilidad en la determinación del tamaño de 81% a 99%, mientras que, para la forma este cambio no fue tan marcado (de 86% a 87%). Por tanto, la mayor repetibilidad tanto para el tamaño como para la forma se obtuvo al quitar las escamas. Al comparar entre tratamientos, se observa que la repetibilidad fue menor (75% para el tamaño y 67% para la conformación) y que aumentó el error de medición (Tabla 2). Consecuentemente, todas las alas fueron tratadas de la misma manera para los análisis, con la remoción mecánica de escamas.

5.2. ERROR DE MEDICIÓN

El análisis de repetibilidad de la digitalización de los puntos de referencia de las alas mostró un porcentaje de error de medición de 0.06% para el tamaño y 3.86% para la conformación en *An. albimanus*. Mientras que para *An. calderoni* fue de 0.17% y 4.43%, para tamaño y conformación, respectivamente. Estos porcentajes de error están dentro del rango esperado para el análisis de alas.

5.3. ANÁLISIS DEL TAMAÑO

5.3.1. CARACTERÍSTICAS DE TAMAÑO ALAR INTERESPECÍFICO Y ENTRE PROVINCIAS

El análisis del tamaño alar entre ambas especies mostró que *An. calderoni* (3.92 ± 0.171 mm) presenta alas significativamente más grandes que *An. albimanus* (3.19 ± 0.206 mm) ($p < 0.01$) (Figura 4, Tabla 3, Tabla 4). La mayor varianza (σ^2) se encontró en *An. albimanus* (0.0423 mm), aunque dicha medida no fue significativamente diferente a la de *An. calderoni* (0.296 mm, $p = 0.085$) (Tabla 3, Tabla 4).

Dentro de cada especie, al comparar el tamaño alar de los individuos entre las provincias no se encontró diferencias significativas (Tabla 3, Tabla 4). En *An. albimanus* se observó que los individuos de El Oro tienden a presentar mayor tamaño alar y varianza que los individuos de Esmeraldas (Figura 4, Tabla 3), sin embargo, estos valores no fueron

estadísticamente significativos ($p > 0.05$). En *An. calderoni*, la diferencia en tamaño y varianza entre provincias fue menos marcada y no presentó diferencias ($p > 0.05$) (Tabla 3, Tabla 4).

5.3.2. CARACTERÍSTICAS DE TAMAÑO ALAR INTRAESPECÍFICO

5.3.2.1. ANÁLISIS DE TAMAÑO ALAR EN *Anopheles albimanus*

En ESM, la localidad con los individuos de tamaño alar más pequeño fue MUI (3.11 ± 0.175 mm), mientras que los de mayor tamaño alar fueron de SAN (3.23 ± 0.110 mm). En ORO, los más pequeños fueron de HUA (3.12 ± 0.236 mm), mientras que los individuos de LA presentaron alas de mayor tamaño (3.38 ± 0.198 mm) (Figura 5, Tabla 5). Se observó diferencias estadísticamente significativas entre LA (individuos de tamaño alar más grande) y MUI ($p = 0.00$) y HUA ($p = 0.03$) (individuos de tamaño alar más pequeño) (Tabla 5, Tabla 6).

Respecto a la varianza, en ESM, SAN presentó la menor varianza (0.0122 mm) entre sus individuos y LIM la mayor varianza (0.0527 mm) (Tabla 5); mientras que, en ORO, LA presentó la menor varianza (0.0392 mm) y HUA presentó la mayor varianza (0.0558 mm). La diferencia entre dichas medidas no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (Tabla 5, Tabla 6).

5.3.2.2. ANÁLISIS DE TAMAÑO EN *Anopheles calderoni*

En ESM, la localidad con los individuos de tamaño alar más pequeño fue SAN (3.88 ± 0.149 mm), mientras que los de mayor tamaño alar fueron de ATA (4.06 ± 0.192 mm). Al comparar estos grupos se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.05$). En ORO, los más pequeños fueron BAR y HUA (3.90 ± 0.246 mm y 3.90 ± 0.161 mm respectivamente) y los más grandes fueron de LA (3.38 ± 0.198 mm) (Figura 6, Tabla 5, Tabla 7). Sin embargo, estas comparaciones no indicaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Tabla 5, Tabla 7).

Respecto a la varianza, en ESM, SAN presentó la menor varianza (0.0221 mm) entre sus individuos y ATA la mayor varianza (0.0370 mm); mientras que, en ORO, LA presentó

la menor varianza (0.0135 mm) y BAR presentó la mayor varianza (0.0605 mm). La diferencia entre dichas medidas no fue significativa ($p > 0.05$) (Tabla 5, Tabla 7).

5.4. ANÁLISIS DE LA CONFORMACIÓN (FORMA)

5.4.1. FORMA ALAR INTERESPECÍFICA Y ENTRE PROVINCIAS

El análisis de forma alar entre ambas especies, mediante la superposición de Procrustes, mostró diferencias visibles especialmente en los puntos 2, 3, 6, 12, 13, es decir en las intersecciones de las venas Medial, Cubital y Radial (Figura 7a). Mientras que la comparación de la forma alar entre los individuos de ESM y ORO en *An. albimanus* (Figura 7b) y en *An. calderoni* (Figura 7c) no expuso diferencias visibles. La superposición de Procrustes de los objetos promedio de las dos provincias coincidió casi perfectamente en todos los puntos en ambas especies.

Se observó que al comparar las distancias de Mahalanobis entre *An. albimanus* y *An. calderoni* estas eran superiores a 9, lo cual demostró diferencias significativas ($p < 0.001$) (Tabla 8), ratificando las diferencias entre especies del análisis de superposición de Procrustes. Por otro lado, al comparar entre provincias se observó que las distancias de Mahalanobis entre ESM y ORO de *An. albimanus* y *An. calderoni* fueron de 1.49 y 1.94, respectivamente. Únicamente se reportó diferencias significativas en *An. albimanus* ($p < 0.001$) (Tabla 8).

Debido a que las distancias de Mahalanobis no son una medida determinante de diferenciación, se complementó con el análisis discriminante (DA). En este análisis se determinó que el factor canónico primero (CV1) explica el 96% de la variación total y diferencia principalmente las especies; mientras que el CV2 contribuyó tan solo en un 2% a la separación entre provincias de ambas especies. Es decir, la discriminación es muy clara entre *An. albimanus* y *An. calderoni* pues los polígonos no se solapan, en tanto que no se observa una discriminación entre poblaciones geográficas, pues sus polígonos muestran un alto grado de solapamiento (Figura 8).

El análisis de conglomerados UPGMA fue construido en base a las distancias de Mahalanobis. Para este dendrograma se consideraron las especies, provincias y, además, las localidades de muestreo. Los resultados indican que se forman dos grupos bien diferenciados, cada uno correspondió a las dos especies en estudio (Figura 9). Sin embargo, dentro de dichos conglomerados, sus localidades se agrupan indistintamente de su origen

geográfico, es decir en ninguna especie se distingue una estructuración relacionada con la provincia o la localidad en donde fueron colectados los individuos.

La reclasificación validada de la conformación alar entre *An. albimanus* y *An. calderoni* fue del 100%, es decir, la forma alar de ambas especies es claramente diferente. Para *An. albimanus* se reclasificó correctamente el 70% de los individuos de ESM y el 67% de los individuos de ORO (Tabla 9). Mientras que para *An. calderoni* la reclasificación fue de 68% y 64%, respectivamente. Esto quiere decir que, en ambos casos, aproximadamente el 30% de individuos restantes en cada grupo no pudieron ser asignados, ni como individuos de ESM ni de ORO, ya que comparten características de forma alar muy similares. En la Figura 10, este resultado se representa por el área de intersección entre los polígonos.

La variación de la forma alar fue calculada con la disparidad métrica (Tabla 9). El valor más alto fue para *An. albimanus* (MD= 0.00046) indicando que sus individuos poseen alas cuya variedad de forma se distribuye en un rango más amplio. Sin embargo, dicho valor no fue significativamente diferente al calculado para *An. calderoni*. Es decir, no se observó diferencias significativas en la disparidad métrica entre especies. Adicionalmente, no se encontró diferencias significativas al comparar las poblaciones de ESM y ORO dentro de *An. albimanus* y *An. calderoni* (Tabla 9, Tabla 10).

5.4.2. FORMA ALAR INTRAESPECÍFICA

5.4.2.1. ANÁLISIS DE FORMA EN *Anopheles albimanus*

El análisis de conformación mediante la superposición de Procrustes muestra diferencias visibles entre las localidades de muestreo dentro de ESM pues se observa la superposición imperfecta en los puntos 1, 2, 13 (Figura 10a); mientras que en ORO las diferencias fueron imperceptibles (Figura 10b), es decir, la superposición de Procrustes de los objetos promedio de cada grupo coincide.

Las distancias de Mahalanobis demostraron que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre localidades de muestreo (Tabla 11). La menor distancia (0.27) se observó entre las comunidades de LA (ORO) y BAR (ORO), mientras que la mayor distancia (1.63) se encontró entre SAN (ESM) y MUI (ESM) (Tabla 11) pero dichas medidas no fueron estadísticamente significativas.

En el DA, el CV1 contribuyó en un 41% a la variación total y el CV2 en 31% (Figura 11). En ninguno de ejes se observa un agrupamiento claro entre localidades dentro de la misma provincia e incluso entre provincias (Figura 11). Sin embargo, los datos de la media muestran un ligero agrupamiento de las localidades de ESM y de ORO, con excepción de GOL (ESM) cuyo polígono en la figura, se ubicó más cercano a las localidades del ORO que a las de ESM (Figura 11).

5.4.2.2. ANÁLISIS DE FORMA EN *Anopheles calderoni*

En *An. calderoni* se observó que, al comparar la forma del ala en un esquema, se reconocieron ligeras incongruencias en la superposición de Procrustes de los objetos promedio de cada localidad de muestreo (Figura 12). Los puntos de divergencia que se reconocen a simple vista en ESM son: 1, 2, 13 (Figura 12a), y en ORO: 1, 5, 6, 12 (Figura 12b).

Las distancias de Mahalanobis demostraron que estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre las localidades de muestreo (Tabla 11). La menor distancia (0.22) se observó entre las comunidades de SAN (ESM) y BAR (ORO), mientras que la mayor distancia (1.43) se encontró entre ATA (ESM) y LA (ORO) (Tabla 11).

En el DA se observó que el CV1 contribuyó en un 61% a la variación total y el CV2 en un 34% (Figura 13). Sin embargo, no se reconoce ninguna tendencia de agrupación conforme a su origen geográfico ya que hay solapamiento de los polígonos y el centroide se distribuye indistintamente en el diagrama (Figura 13).

5.5. ANÁLISIS DEL EFECTO ALOMÉTRICO

El análisis mostró un efecto altamente significativo (65%, $p= 0.000$) de la variación del tamaño del ala sobre la variación su forma. Es decir, que durante el reconocimiento entre *An. albimanus* y *An. calderoni*, la variación del tamaño alar influyó significativamente sobre la forma en la discriminación de los individuos. En cuanto a la comparación entre provincias, se encontró significación estadística para la alometría de *An. albimanus* (3%, $p= 0.009$), pero no para *An. calderoni* (1%, $p= 0.253$) (Figura 14).

6. DISCUSIÓN

El género *Anopheles* es probablemente uno de los géneros mejores estudiados entre los grupos de insectos de importancia médica (Garros y Dujardin, 2013). Los dípteros, en general, representan un organismo modelo para estudiar los cambios fenotípicos inducidos por el medio ambiente (Alves, 2016). Se conoce que varias especies presentan variaciones en los rasgos morfológicos (tamaño y forma alar) que están relacionados con la aptitud física del individuo. Dichas variaciones se correlacionan con las presiones selectivas locales, principalmente la selección térmica (Alves, 2016). Sin embargo, esto podría estar sesgado hacia grupos de importancia médica y veterinaria (Alves, 2016). En estudios de morfometría geométrica, la forma corresponde a las coordenadas X y Y de los puntos de referencia y es la posición relativa de los puntos anatómicos del ala. Por otro lado, el estimador de tamaño corresponde a una sola variable (Garros y Dujardin, 2013). La forma del ala se ha utilizado como un indicador de la discriminación entre grupos y permite detectar diferencias interespecíficas, como la estructura de la población en algunas especies (Garros y Dujardin, 2013). En cambio, el tamaño del ala es importante para realizar la discriminación entre especies, ya que el tamaño es una característica importante para la clasificación taxonómica (Garros y Dujardin, 2013).

En Ecuador, el presente trabajo representa un estudio pionero de la morfometría geométrica alar en el género *Anopheles*. Nuestros resultados aportan con nueva información de dos especies de relevancia epidemiológica para el país. Además, constatan la eficiencia de la técnica para distinguir especies perfectamente y reconocer su variación fenotípica a nivel de la geometría alar.

6.1. INFLUENCIA DE PRESENCIA DE ESCAMAS EN LA TOMA DE DATOS PARA MORFOMETRÍA ALAR

En el proceso de preparación de las alas de los mosquitos se constató que las escamas en las alas impiden la visualización completa de las venas. La limpieza alar parcial (remoción de escamas) permitió la visualización clara de venas y contornos y mejoró la precisión y exactitud al marcar los puntos de referencia. Los análisis estadísticos demostraron que la remoción tiene un impacto positivo en la repetibilidad tanto del tamaño como de la forma, aunque en esta última, el impacto fue menos representativo. Debido a ello, se recomienda la

remoción de las escamas como un paso previo al montaje en los estudios con alas de *Anopheles*.

6.2. ERROR DE MEDICIÓN

Los resultados de este análisis mostraron un bajo porcentaje de error en la digitalización de los puntos de referencia. Estos errores podrían estar asociados a factores intrínsecos como claridad de la venación, mayor presencia de escamas, o patrones de coloración oscuros en zonas de marca de puntos de referencia. Estudios previos han demostrado que algunas especies tienen alas con manchas oscuras o muchas escamas que pueden dificultar ver los puntos de referencia (Lorenz et al., 2017). Sin embargo, estos errores también son comunes debido a los daños causados por las pinzas, el pincel o durante el protocolo de montaje. Otros estudios que han aplicado la misma técnica también han experimentado un alto porcentaje de pérdida de muestras, ya que la eliminación de las escamas con el cepillo significa un tratamiento más agresivo (Lorenz y Suesdek, 2013). En este estudio hubo una disminución en el número de muestras consideradas para el análisis; sin embargo, las pruebas de medición demuestran un bajo porcentaje de error y, por lo tanto, garantizan una buena repetibilidad en los puntos de referencia, tal como se ha demostrado en estudios previos en los que la eliminación mecánica de las escamas fue eficaz para mejorar la visualización de los puntos de referencia (Lorenz y Suesdek, 2013).

6.3. TAMAÑO ALAR

Los resultados encontrados en el presente estudio indicaron que *An. albimanus* presenta alas significativamente más pequeñas que *An. calderoni*. La diferencia de tamaño entre ambas especies concuerda con un estudio previo que discrimina especies de *Anopheles* neotropicales basado en caracteres morfométricos y moleculares. Los resultados de este estudio indicaron que las especies del subgénero *Anopheles* (al que pertenece *An. calderoni*) eran más grandes que las de los subgéneros *Nyssorhynchus* (al que pertenece *An. albimanus*) (Gómez y Correa, 2017).

Las especies del subgénero *Nyssorhynchus* (*An. albimanus*) son consideradas como los vectores más importantes para la transmisión de malaria en el neotrópico (Calle et al., 2002). El análisis del tamaño alar de esta especie no mostró diferencias significativas entre los individuos del ESM y ORO. Estos resultados concuerdan con reportes previos que

indican que *An. albimanus* es morfológicamente muy constante a lo largo de su rango de distribución (Faran, 1980). Además, en estudios recientes en Colombia no se encontraron diferencias entre individuos de diferentes eco-regiones; aunque se reportó que el tamaño del ala estaría influenciado por la elevación y la humedad relativa (Gómez et al., 2013). En el caso de los individuos analizados en este estudio, no se encontraron diferencias a pesar de que hay una variación de altura entre las localidades de ESM (8-220 msnm) y ORO (4-9 msnm), y aunque la humedad relativa en ambas zonas es similar (80%) (INAMHI, 2015).

Anopheles calderoni es una especie con distribución restringida a Colombia, Ecuador y Perú, de lo que se tiene conocimiento. En Ecuador, hay pocos registros de esta especie (González et al., 2010); sin embargo, en Perú es considerado un vector de importancia local en el occidente y en Colombia es un vector potencial (Rodríguez-Zabala et al., 2016). Un estudio previo de la morfometría de esta especie mostró diferencias significativas entre individuos de alta montaña, en comparación con individuos de la costa pacífica (Rodríguez-Zabala et al., 2016). En el presente estudio no se vieron diferencias significativas de tamaño entre los individuos de ESM y ORO, lo que es consistente con el reporte previo, ya que todos los individuos analizados fueron colectados en zonas bajas (4-220 msnm).

A nivel intraespecífico, no se observaron diferencias significativas entre de los individuos de ESM y ORO para *An. calderoni*. Sin embargo, al comparar los individuos de cada localidad se encontró que en *An. albimanus* los individuos de LA (ORO) presentan alas significativamente más grandes con respecto a HUA (ORO) (a pesar de que son localidades geográficamente cercanas: ± 70 km), y a MUI (ESM) (± 600 km). Dado que el tamaño alar está relacionado con las adaptaciones ambientales, ecológicamente, una de las posibles razones por las que se observa estas diferencias pudiese estar relacionado con la competencia por la explotación de diversos nichos. Se conoce que *An. albimanus* es una especie predominantemente antropofílica; por el contrario, *An. calderoni* posee un comportamiento antropofílico, pero no es específico, es decir que no se alimentan exclusivamente de sangre de humanos, sino que también de otros vertebrados (Naranjo-Díaz, Altamiranda, Luckhart, Conn, y Correa, 2014). El tamaño de muestra de este estudio podría influenciar estos resultados y se requeriría incrementar el n para determinar si esta tendencia se mantiene.

6.4. CONFORMACIÓN ALAR

Los resultados encontrados con el presente estudio indicaron que la forma alar de *An. albimanus* presenta diferencias significativas con respecto a *An. calderoni*. Estos resultados

son corroborados con los análisis de las distancias de Mahalanobis, DA y UPGMA. Esto es un resultado esperado ya que ambas especies están taxonómicamente bien diferenciadas y se encuentran filogenéticamente alejadas; incluso se las clasifica en subgéneros distintos (*Anopheles* y *Nyssorhynchus* respectivamente) (Arregui et al., 2015; González et al., 2010). El uso de la morfometría alar para distinguir especies puede ser una herramienta muy útil para una identificación inicial de especies, cuando la cantidad de muestras es alta y se trabaja en zonas en las que hay varias especies (incluso especies cercanamente relacionadas).

Para *An. albimanus* no se encontró diferencias significativas de conformación alar relacionado con las provincias. Si bien, la superposición de Procustes muestra algunos puntos que no se superponen perfectamente entre sí, se debe considerar que estos esquemas permiten comparar configuraciones, no obstante, no proporcionan un valor que determine su significación estadística. Adicionalmente, las distancias de Mahalanobis detectaron divergencias a nivel estadístico entre las provincias, sin embargo, estas no son una medida determinante de diferenciación y necesitan ser complementadas con análisis estadísticamente más robustos. Al apoyarse en otros análisis no se observa que se mantenga dicha separación por lo que se considera que no hay diferencias. En el UPGMA la agrupación de las localidades no se relacionó con su provincia de origen. Un dato atípico corresponde a la información del DA en la que el tamaño centroide de los individuos de GOL (ESM) aparece agrupado con los individuos de El Oro. Sin embargo, hay que considerar que en este análisis el CV1 únicamente explica el 41% de la separación de las poblaciones (Figura 11), por lo que no se considera una diferencia significativa. Estos resultados son congruentes con estudios previos que realizaron el análisis de conformación de alas de *An. albimanus* en Colombia (Gómez et al., 2013) en la que se reporta una baja estructuración poblacional y no se observa una diferenciación en la población que esté definida por el origen geográfico, y, por tanto, se considera a *An. albimanus* como una población panmítica (Gómez et al., 2013). No obstante, se recomienda profundizar el análisis de datos para esta especie, posiblemente ampliando el rango geográfico con localidades de colecta a lo largo de la región costa.

Para *An. calderoni* se observa la misma tendencia con los datos de la distancia de Mahalanobis. El análisis de DA nos indica que el CV1 explica el 61% de la separación con relación a origen geográfico. Además, el centroide de los polígonos de cada grupo se encuentra cercanos entre sí, por lo que no se puede inferir una separación relacionada con el origen geográfico, y efectivamente, confirma la ausencia de estructuración en esta población. Estos resultados concuerdan con un estudio previo en *An. calderoni* en el que se reporta una

baja diferenciación en las características morfométricas, lo que indica un constante flujo entre poblaciones (Rodríguez-Zabala et al., 2016).

En el análisis del esquema de la forma del ala, representada por la superposición de Procrustes de los objetos promedio de la configuración de puntos de referencia digitalizados, se evidenció solapamiento imperfecto en algunos de los puntos, para las provincias de ambas especies. Sin embargo, este tipo de esquemas no proporcionan un valor que determine su significación estadística, sino que permiten hacer una primera observación para examinar el aporte de los puntos tomados. Se debe considerar que los puntos que presentan solapamiento no proporcionan mucha información pues son constantes ya que cuando las configuraciones de puntos de referencia se superponen, los grados de libertad se pierden, es decir, la información que no es relevante para la comparación de las formas (ubicación, escala y rotación) se elimina de las coordenadas (Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004a). De este modo, es importante tomar en cuenta que algunos puntos de referencia son propensos a error en una sola dimensión, por ejemplo, podría ser fácil encontrar su posición a lo largo del eje anteroposterior, pero es más difícil determinar su ubicación a lo largo del eje dorsoventral (Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004a). En la actualidad, varios investigadores están buscando un método para detectar puntos de referencia automáticamente e identificar muy rápido especies de culícidos basándose en patrones de venas de las alas; tales métodos ya existen para otros grupos de organismos (Lorenz et al., 2017). Para capturar más información de la forma, se recomienda que en futuros estudios se haga pruebas con otra configuración de puntos como la del contorno externo del ala, ya que existe evidencia de que los cambios que se observan en el eje anteroposterior del compartimento distal de las alas de los mosquitos influyen en la elevación aerodinámica del ala durante el vuelo (Hidalgo et al., 2015) y eso podría tener implicaciones en la eficiencia del mosquito para conseguir alimento.

En general, los individuos de *An. albimanus* fueron mejor reclasificados que los individuos de *An. calderoni* (69% y 66%, respectivamente). Este es un resultado esperado ya que los análisis de conformación no muestran la formación de agrupamientos en ambas especies, por lo que se espera que la reclasificación no pueda asignarse según la localidad de colección. Además, la interpretación de este resultado debe hacerse tomando en cuenta el número de muestra de cada grupo. Esto puede generar un sesgo, ya que las comparaciones entre grupos cuando la diferencia del n es grande, limita la información real de la especie o especies en estudio que se puede extraer de las muestras (Cardini y Elton, 2007). Según, Cardini y Elton (2007) el tamaño medio, la desviación estándar del tamaño y la varianza de la forma son bastante precisos incluso en muestras relativamente pequeñas. Por el contrario,

las formas y ángulos medios entre trayectorias alométricas estáticas se ven fuertemente afectados por el error de muestreo.

En cuanto a la disparidad métrica, de acuerdo nuestros datos, la variación de forma no es significativa entre provincias en ninguna de las especies, es decir que la forma alar muestra uniformidad en el rango geográfico de distribución. Varios autores proponen que la disparidad morfológica está bajo la posible influencia del hábitat del mosquito, incluso se ha utilizado la variación de forma como un indicador de riqueza de especies (Dujardin, Thongsripong & Henry, 2012). Estudios realizados en otras especies como *Aedes aegypti* describe la relación de las propiedades métricas de las alas con variables climáticas en donde la conformación del ala depende principalmente de las condiciones geográficas y climáticas del hábitat del mosquito, mientras que el tamaño de la hembra cambia principalmente como respuesta a las condiciones ambientales percibidas durante el desarrollo pre-imaginal (Morales-Vargas, Ya-Umphun, Phumala-Morales, Komalamisra, & Dujardin, 2010). Sin embargo, las medidas de disparidad generalmente no consideran la importancia biológica de las variables contribuyentes. Por ejemplo, el que grandes cambios morfológicos puedan tener pocas consecuencias biológicas; o el que algunos pequeños cambios que afectan solo unos pocos detalles morfológicos puedan tener profundas consecuencias para la función (Zelditch, Swiderski, Sheets y Fink, 2004d). Aunque en nuestro estudio no se hayan considerado variables ambientales, es interesante conocer otros factores por las cuales se ha observado variación fenotípica alar. De igual manera, se recomienda incrementar los estudios morfométricos correlacionando las variaciones métricas con las distintas variables ambientales de las localidades de muestro, además de complementar el estudio con análisis genéticos usando marcadores moleculares como los microsatélites. La variabilidad intraespecífica de los mosquitos es un fenómeno que ha sido examinado durante mucho tiempo, el que se ha visto potenciado por su complementación con técnicas moleculares. Los análisis moleculares han sido valiosos para identificar el aislamiento de poblaciones de vectores en base a las adaptaciones fenotípicas y genotípicas frente a ambientes específicos y a las diferencias biogeográficas que podrían conducir a la especiación futura de los mismos (Gómez et al., 2013; Lorenz et al., 2017).

En general, nuestros resultados podrían indicar que posiblemente no existan barreras entre los individuos de dichas especies y que exista flujo persistente entre las poblaciones (Gómez et al., 2013; Lorenz et al., 2017). Es decir, en cada especie, los individuos de ESM y ORO muestran características muy similares en su tamaño y conformación alar. Es importante señalar que estudios en otras especies de *Anopheles* en Latinoamérica y Europa

tampoco han detectado una variación geográfica a nivel de la morfología alar poblacional en sus muestras (Vicente et al., 2011; Altamiranda-Saavedra et al., 2017); mientras que, en otras especies (*An. funestus* en África) se ha mostrado que las poblaciones de mosquitos se encuentran bajo selección natural y que determinantes ambientales afectan a las poblaciones silvestres (Ayala et al., 2011).

6.5. EFECTO ALOMÉTRICO

Los resultados encontrados indicaron que el tamaño alar influye en un 65% al momento de discriminar entre *An. albimanus* y *An. calderoni* con relación a su forma, por tanto, la variación de tamaño a nivel de especies es un factor importante en la diferenciación. Este resultado concuerda con lo esperado, debido a que ambas especies son morfológicamente diferenciables y son evolutivamente distintas. Además, la variación interespecífica del tamaño y de la forma alar podría reflejar la evolución adaptativa que estas especies experimentaron para poder vivir en el mismo lugar (Klingenberg y Spence, 1997; Soto-Vivas et al., 2011). Esto concuerda con lo observado en un estudio sobre la discriminación de especies de *Anopheles* neotropicales, donde se detectó un efecto alométrico significativo del tamaño alar sobre la forma alar entre las especies del *Nyssorhynchus* (*An. albimanus*) y el subgénero *Anopheles* (*An. calderoni*) (Gómez y Correa, 2017).

El efecto alométrico fue bajo tanto para *An. albimanus* (3%) como para *An. calderoni* (1%), pero solo en la primera especie dicho valor fue significativo. Esto indicaría que la variación del tamaño alar pudiese influir en la variación de la forma alar al momento de discriminar los individuos de ESM y de ORO. Se debe tomar en cuenta que el número de muestra es mayor tanto de *An. albimanus* con respecto a *An. calderoni* como de ESM con respecto a ORO (*An. alb.*). Esto permite tener un rango de visión más amplio acerca de las características morfométricas que definen tanto a la provincia como a la especie.

6.6. IMPORTANCIA DE ESTUDIOS DE POBLACIONES Y SU APLICACIÓN EN LA COMPRENSIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA

A nivel epidemiológico y del control vectorial, el estudio poblacional de vectores tiene implicaciones importantes. Los mosquitos se dispersan, encuentran parejas, ponen huevos y buscan huéspedes en vuelo. Se conoce también que, entre otras de sus funciones, las alas de los mosquitos les sirven para escapar después de tomar una comida de sangre.

Para aquello, el mosquito debe ejercer fuerzas lo suficientemente altas como para despegar llevando una carga aproximadamente igual a su peso corporal. Al mismo tiempo, debe evitar ser detectado por su huésped al minimizar las señales táctiles ejercidas sobre la piel de este (Bomphrey et al., 2017). Teniendo en cuenta la importancia de las alas en el comportamiento y la fisiología de los mosquitos, las diferencias también podrían proporcionar información útil sobre distribución. Con nuestro estudio, se da paso al inicio de la generación de conocimiento en dichos aspectos, con respecto a especies de Ecuador.

La extensión geográfica es un rasgo importante del vector, especialmente para hacer predicciones sobre su relevancia epidemiológica o los costos de un programa de control. Si una especie se encuentra estructurada en poblaciones en un rago de distribución geográfica, existe la posibilidad que las medidas de control no tengan el mismo efecto o que se promueva la creación y expansión de resistencias a insecticidas (Dujardin, 2008). Por ello, se debe recalcar que las provincias estudiadas en este trabajo proporcionan información interesante por su ubicación clave para la prevalencia de la malaria en el país. La provincia de Esmeraldas y el departamento limítrofe de Nariño, en Colombia, son provincias costeras y tropicales. Las regiones están conectadas por la carretera Panamericana, lo que resulta en una importante migración transfronteriza, especialmente desde Colombia hacia Ecuador. Los bosques de Esmeraldas representan la extensión más al sur de las selvas tropicales en la costa del Pacífico de América del Sur. Son uno de los 10 lugares en el mundo con un número particularmente grande de especies endémicas en peligro de extinción y tasas particularmente altas de deforestación. Solo las porciones del norte de la provincia, cerca de la frontera con Colombia, permanecen forestadas (Rudel, 2000). La deforestación al igual que el cambio climático tienen un papel importante en las dinámicas de la malaria estacional e interanual (Krisher et al., 2016). En los últimos años, se pensaba que el motivo de los brotes en esta provincia se debía a casos importados de Colombia, no obstante, se ha demostrado que muchas infecciones son submicroscópicas y asintomáticas, lo que lleva a una subestimación del número de individuos infectados. En áreas con bajos niveles de transmisión, los casos asintomáticos podrían ser reservorios críticos en el mantenimiento de la transmisión (Sáenz et al., 2017). Según estudios recientes, se ha observado que en áreas endémicas una proporción substancial de las poblaciones humanas, tanto con alta o baja transmisión estacional, es portadora de parasitemias asintomáticas. Estas persisten en los seres humanos en niveles que optimizan la probabilidad de generar densidades de gametocitos transmisibles sin causar enfermedad, pero con potencial infeccioso (Imwong et al., 2015).

La provincia de El Oro y la región limítrofe de Tumbes, en el Perú, son provincias agrícolas costeras y tropicales. Las regiones están conectadas por la carretera Panamericana, lo que resulta en una importante migración transfronteriza, especialmente desde Perú hacia Ecuador. La transmisión en la provincia de El Oro se ha concentrado históricamente en las tierras bajas costeras tropicales, en los cantones de Arenillas y Santa Rosa. La región fronteriza de la costa norte del Perú es la segunda región más importante para la transmisión de la malaria de dicho país, después de la región amazónica. La malaria en esta región se transmite principalmente por los mosquitos *An. albimanus* y *An. pseudopunctipennis*. (Krisher et al., 2016). Curiosamente, en los últimos años los reportes de malaria para esta provincia son muy bajos, y en lo que lleva del 2018, son nulos (MSP, 2018).

Comprender la estructura poblacional de una especie es útil ya que puede revelar cuándo los regímenes de migración cambiaron en las poblaciones naturales, lo que apunta a factores ambientales potenciales tales como los cambios climáticos o a fuerzas microevolutivas tales como mutación, selección natural, deriva genética y flujo genético (Guillot y Orlando, 2013). En el caso de los vectores de la malaria, la estructura de la población tiene importantes consecuencias biomédicas cuando varios grupos subpoblacionales se adaptan localmente a condiciones ambientales particulares, lo que puede ser de enorme importancia en estudios acerca de la asociación estadística entre variantes genéticas y rasgos fenotípicos de vectores (Guillot y Orlando, 2013). El presente estudio representa un paso inicial para el avance de esta línea de investigación.

6.7. LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA COMO HERRAMIENTA PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

La MG alar fue elegida para el presente trabajo porque ha demostrado poseer una serie de ventajas. Una de ellas es que los caracteres de las alas responden rápidamente a los eventos microevolutivos (Wilke, 2016). Según Crozatier et al. (2004), la diversidad de los patrones de la vena del ala ilustra cómo pueden evolucionar dramáticamente, o ser inversamente estáticos, dentro del mismo rango de tiempos evolutivos. Se conoce también que la MG puede discriminar entre especies hermanas y simpátricas que son casi imposibles de identificar con claves dicotómicas (Lorenz et al., 2017). El uso de la MG para la detección de variabilidad en poblaciones ha sido utilizado exitosamente en estudios similares, a pesar de que en nuestro trabajo no se observó diferencias significativas. No obstante, la identificación de especies fue acertada y se recomienda utilizarla para futuros estudios.

7. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en el presente estudio demostraron que los individuos tanto de *An. albimanus* como de *An. calderoni* de las provincias del Esmeraldas y El Oro no se encuentran aislados y son morfológicamente indiferenciables. Es decir, no se observó que ninguna de estas dos especies manifieste una estructuración poblacional en base a la morfología alar. En contraste, los análisis a nivel interespecífico demostraron que las características de forma y tamaño alar son distintivas de cada especie, como se esperaba.

Mediante el presente estudio se logró aportar al conocimiento de dos vectores de la malaria en el Ecuador, poco estudiados en el país. La continuación de estudios poblacionales de los principales vectores de la malaria en la región Costa, así como en la región amazónica son necesarios dado que una mayor comprensión de la biología de los vectores es crucial para la aplicación de estrategias de control vectorial efectivo y para el progreso continuo en la eliminación de la malaria.

La complementación de este tipo de estudios con herramientas moleculares es de gran valor ya que aportarían a la caracterización genética de los insectos; a explorar las adaptaciones fenotípicas y genotípicas de los mosquitos a entornos específicos, cambio climático y diferencias biogeográficas que podrían conducir a una especiación futura.

La morfometría geométrica permitió identificar la variabilidad fenotípica entre especies, aunque no se detectó variabilidad entre las provincias de cada especie. Al mismo tiempo, esta técnica proporcionó información sobre diferencias taxonómicas por lo que se recomienda su uso en estudios de especies cercanas como un apoyo para la identificación taxonómica.

Cabe recalcar, que la morfometría es una técnica rápida y de coste relativamente bajo, especialmente en comparación con la caracterización genética. Además, puede realizarse en el campo sin equipo avanzado y permite recuperar información de individuos de colecciones. En vista de las diferencias importantes entre las propiedades métricas derivadas de alas con y sin escamas, se recomienda comparar alas tratadas, siempre de la misma manera.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D. C., Rohlf, F. J., y Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution.” *Ital. J. Zool*, 71(1), 5–16.
- Altamiranda-Saavedra, M., Conn, J. E., & Correa, M. M. (2017). Genetic structure and phenotypic variation of *Anopheles darlingi* in northwest Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 56, 143-151. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.011>
- Anderson, L. E. (1954). Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryophytes. *The bryologist*, 57(3), 242-244.
- Arnqvist, G., y Mårtensson, T. (1998). Measurement error in geometric morphometrics: Empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 44(1–2), 73–96. <https://doi.org/citeulike-article-id:7907450>
- Arregui, G., Enriquez, S., Benítez-Ortiz, W., y Navarro, J.-C. (2015). Molecular Taxonomy of *Anopheles* from Ecuador, using mitochondrial DNA (Cytochrome c Oxidase I) and Maximum Parsimony optimization. *Malariología Y Salud Ambiental*, 2(2), 128–136. Recuperado de <http://www.scielo.org/ve/pdf/bmsa/v55n2/art02.pdf>
- Arrow, K. J., Panosian, C., y Gelband, H. (2004). *Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance*. (Committee on the Economics of Antimalarial Drugs, Ed.). Washington DC: The National Academies Press.
- Black, W. y Kondratieff, B. (2004). Evolution of Arthropod Disease Vectors. En Marquardt, W. (Ed.) *Biology of Disease Vectors: Second edition*. (p. 9). Burlington: Elsevier Academic Press.
- Bomphrey, R. J., Nakata, T., Phillips, N., y Walker, S. M. (2017). Smart wing rotation and trailing-edge vortices enable high frequency mosquito flight. *Nature*, 544(7648), 92–95. <https://doi.org/10.1038/nature21727>
- Bookstein F.L. (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, New York, 435 pp.
- Calle L., D. A., Quiñones, M. L., Erazo, H. F., y Jaramillo O., N. (2002). Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from Southern and Northwest Colombia. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(8), 1191–1195. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000800021>
- Cardini, A. y Elton, S. 2007. Sample size and sampling error in geometric morphometric studies of size and shape. *Zoomorphology* 126(2):121-134.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015a). Malaria: Disease. Recuperado de <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015b) Malaria Diagnosis and

- Treatment in the United States. Recuperado de https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/index.html
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015c). Anopheles mosquitoes. Recuperado de <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2016a). Malaria: Biology. Recuperado de <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2017) Where Malaria Occurs. Recuperado de <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>
- Choochote, W. y Saeung, A. (2015). Systematic Techniques for the Recognition of *Anopheles* Species Complex. En Manguin, S. (Ed.) *Anopheles mosquitoes – New insights into malaria vectors*. (p. 59). Croacia: InTech.
- Choudhuri, S. (2014). Phylogenetic Analysis. In *Bioinformatics for Beginners* (pp. 209–218). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410471-6.00009-8>
- Cold Spring Harbor Laboratory Press (2011). *Hoyer`s médium*. Obtenido de [doi:10.1101/pdb.rec12429](https://doi.org/10.1101/pdb.rec12429) Cold Spring Harb Protoc ©
- Crozatier, M., Glise, B., y Vincent, A. (2004). Patterns in evolution: Veins of the *Drosophila* wing. *Trends in Genetics*, 20(10), 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.07.013>
- Dujardin, J., y Slice, D. E. (2007). Contributions of Morphometrics to Medical Entomology. In *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*. <https://doi.org/10.1002/0470114207>
- Dujardin, J. P. (2008). Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.011>
- Dujardin, J.-P., Thongsripong, P., y Amy B., H. (2012). The Mosquito Fauna: From Metric Disparity to Species Diversity. In *Morphometrics*. Recuperado de <http://www.intechopen.com/books/morphometrics%0A/the-mosquito-fauna-from-metric-disparity-to-specie%0As-%0Adiversity>
- Faran, M. E. (1980). A revision of the *Albimanus* Section of the subgenus Nyssorhynchus of Anopheles. *Contributions of the American Entomological Institute*, 15(7), 1–213.
- Gagnon, A. S., Smoyer-Tomic, K. E., y Bush, A. B. (2002). The El Niño Southern oscillation and malaria epidemics in South America. *Int J Biometeorol*, 46, 81–89.
- Garros, Claire y Dujardin, Jean-Pierre. (2013). *Genetic and Phenetic Approaches to Anopheles Systematics*. En Manguin, S. (Ed). *Anopheles mosquitoes – new insights into malaria vectors*. (81-82). Croacia: In Tech.
- Gómez, G., Jaramillo, L., y Correa, M. M. (2013). Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the Albitarsis Complex from Colombia. *Molecular Ecology Resources*, 13, 1082–1092. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12126>

- Gómez, G. F., y Correa, M. M. (2017). Discrimination of Neotropical *Anopheles* species based on molecular and wing geometric morphometric traits. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.028>
- González, R., y Carrejo, N. S. (2009). *Introducción al estudio taxonómico de Anopheles de Colombia* (Segunda Ed). Cali: Programa Editorial Universidad del Valle.
- González, R., Carrejo, N., Wilkerson, R. C., Alarcon, J., Alarcon-Ormasa, J., Ruiz, F., ... Linton, Y. M. (2010). Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(8), 1001–1009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800009>
- Guillot, G. y Orlando, L. 2013. Population Structure. Technical Information Center of Denmark. Recuperado de http://orbit.dtu.dk/ws/files/61051172/PopStruct_OUP_Gilles_Guillot3.pdf
- Harbach, R. (2013). The Phylogeny and Classification of Anopheles. En Manguin, S. (Ed). *Anopheles mosquitoes – new insights into malaria vectors*. (110-112). Croacia: In Tech.
- Hernandez, F. (2005). Análisis de la variabilidad climática de la costa ecuatoriana. *Acta Oceanogr. Pac*, 2006, 13.
- Hidalgo, K., Dujardin, J.P., Mouline, K., Dabiré, R.K., Renault, D., Simard, F., 2015. Seasonal variation in wing size and shape between geographic populations of the malaria vector, *Anopheles coluzzii* in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop*. 143, 79–88.
- Imwong, M., Nguyen, T. N., Tripura, R., Peto, T. J., Lee, S. J., Lwin, K. M., ... Nosten, F. (2015). The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: Findings from cross-sectional surveys in Thailand-Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malaria Journal*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0906-x>
- INAMHI. (2015). Anuario Meteorológico Nro. 52-2012. Recuperado de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/wp-content/uploads/anuarios/meteorologicos/Am%202012.pdf>.
- Jirakanjanakit, N., Leemingsawat, S., Thongrungrat, S., Apiwathnasorn, C., Singhanityom, S., Bellec, C., y Dujardin, J. P. (2007). Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Tropical Medicine and International Health*, 12(11), 1354–1360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01919.x>
- Jørgensen, P. M., & León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador* (Vol. 75). St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.
- Kitthawee, S., y Dujardin, J. P. (2016). The Diachasmimorpha longicaudata complex in Thailand discriminated by its wing venation: Reference-based morphometric identification. *Zoomorphology*. <https://doi.org/10.1007/s00435-016-0307-x>

- Klingenberg, C. P. (2013). Visualizations in geometric morphometrics: How to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix*. <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-7691>
- Klingenberg, C. P., y McIntyre, G. S. (1998). Geometric Morphometrics of Developmental Instability: Analyzing Patterns of Fluctuating Asymmetry with Procrustes Methods. *Evolution*, 52(5), 1363. <https://doi.org/10.2307/2411306>
- Klingenberg, C. P., y Spence, J. R. (1997). On the role of body size for life-history evolution. *Ecological Entomology*, 22, 55–68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.1997.00031.x>
- Kohn, G. C. (2008). *Encyclopedia of Plague and Pestilence: From Ancient times to the Present*. (G. C. Kohn, Ed.), *Choice Reviews Online* (Third Edit). New York: Infobase Publishing. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.33-1256>
- Krisher, L. K., Krisher, J., Ambuludi, M., Arichabala, A., Beltrán-Ayala, E., Navarrete, P., ... Stewart-Ibarra, A. M. (2016). Successful malaria elimination in the Ecuador–Peru border region: epidemiology and lessons learned. *Malaria Journal*, 15(1), 573. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1630-x>
- Krzywinski, J., y Besansky, N. J. (2003). Molecular Systematics of Anopheles: From Subgenera to Subpopulations. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 111–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112647>
- Laporta, G. Z., Linton, Y.-M., Wilkerson, R. C., Bergo, E. S., Nagaki, S. S., Sant’Ana, D. C., & Sallum, M. A. M. (2015). Malaria vectors in South America: current and future scenarios. *Parasites & Vectors*, 8(1), 426. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1038-4>
- Lorenz, C., y Suesdek, L. (2013). Short report: Evaluation of chemical preparation on insect wing shape for geometric morphometrics. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0359>
- Lorenz, C., Almeida, F., Almeida-Lopes, F., Louise, C., Pereira, S. N., Petersen, V., ... Suesdek, L. (2017). Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 205–215. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.029>
- Marquardt, W. C., Black IV, W. C., y Hemingway, J. (2004). *Biology of Disease Vectors* (Second Edi). China: Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Martinsen, E. S., McInerney, N., Brightman, H., Ferebee, K., Walsh, T., McShea, W. J., ... Fleischer, R. C. (2016). Hidden in plain sight: Cryptic and endemic malaria parasites in North American white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Science Advances*, 2(2), 1–7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501486>
- Mashauri, F. M., Manjurano, A., Kinung’hi, S., Martine, J., Lyimo, E., Kishamawe, C., ... Magesa, S. (2017). Indoor residual spraying with micro-encapsulated pirimiphos-methyl (Actellic(R) 300CS) against malaria vectors in the Lake Victoria basin, Tanzania. *PloS One*, 12(5), e0176982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176982>

- MAE (Ministerio del Ambiente del Ecuador). 2013. Sistema de Clasificación de los Ecosistemas del Ecuador Continental. Subsecretaría de Patrimonio Natural. Quito.
- MSP (Ministerio de Salud Pública). (2017). Enfermedades Transmitidas Por Vectores Informe Malaria, 1–4. Recuperado de http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/vvMalaria-SE-45_2017.pdf
- MSP (Ministerio de Salud Pública). (2018) *Informe Malaria. Semana Epidemiológica (SE)01-13, 2017*. Dirección Nacional de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por vectores. Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- Mitteroecker, P., y Gunz, P. (2009). Advances in Geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*, 36(2), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s11692-009-9055-x>
- Minzava, A. P., Macdonald, M. B., Knox, T. B., Temu, E. A., y Shiff, C. J. (2014). Malaria vector control at a crossroads: Public health entomology and the drive to elimination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru101>
- Molina-Cruz, A., y Barillas-Mury, C. (2016). Mosquito vectors of ape malarías: Another piece of the puzzle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(19), 5153–5154. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604913113>
- Morales-Vargas, R. E., Ya-Umphun, P., Phumala-Morales, N., Komalamisra, N., & Dujardin, J.-P. (2010). Climate associated size and shape changes in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(4), 580-585. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.01.004>
- Motoki, M. T., Suesdek, L., Bergo, E. S., y Sallum, M. A. M. (2012). Wing geometry of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) in five major Brazilian ecoregions. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), 1246–1252. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.002>
- Naranjo-Díaz, N., Altamiranda, M., Luckhart, S., Conn, J. E., y Correa, M. M. (2014). Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific region. *PloS One*, 9(8), e103769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103769>
- Naranjo, D. P., Qualls, W. A., Jurado, H., Perez, J. C., Xue, R.-D., Gómez, E., ... Stewart-Ibarra, A. M. (2014). Vector control programs in Saint Johns County, Florida and Guayas, Ecuador: successes and barriers to integrated vector management. *BMC Public Health*, 14(1), 674. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-674>
- Neafsey, D. E., Waterhouse, R. M., Abai, M. R., Aganezov, S. S., Alekseyev, M. A., Allen, J. E., ... Besansky, N. J. (2015). Highly evolvable malaria vectors: The genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. *Science*, 347(6217), 1–20. <https://doi.org/10.1126/science.1258522>
- Norris, D. E. (2002). Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 32, pp. 1607–1615). [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00189-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00189-3)

- Orjuela, L. I., Ahumada, M. L., Avila, I., Herrera, S., Beier, J. C., y Quiñones, M. L. (2015). Human biting activity, spatial-temporal distribution and malaria vector role of *Anopheles calderoni* in the southwest of Colombia. *Malaria Journal*. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0764-6>
- PAHO (Pan American Health Organization). (2013). https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9130%3A2013-malaria-champions-americas-2013-finalists&catid=1983%3Amalaria-champions-award&Itemid=40365&lang=en
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. (2004) APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*; 20(2):289–90.
- Peralta G. (2014). *Identificación molecular de especies de anofelinos, vectores de malaria, en las provincias de Orellana, El Oro y Sucumbíos mediante la técnica de PCR-RFLP-ITS2*. (Disertación de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends in Ecology and Evolution*, 20(9), 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.001>
- Pinault, L. (2011). *Aspects of spatial and habitat ecology of multiple Anopheles species (Diptera: Culicidae): malaria vectors in the highlands and foothills of Ecuador*. (Tesis doctoral). Brock University. EE. UU.
- Pinault, L., y Hunter, F. (2011). New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. *Malaria Journal*, 10(1), 236. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-236>
- Pinault, L., y Hunter, F. (2012a). Characterization of larval habitats of *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Anopheles punctimacula*, and *Anopheles oswaldoi* s.l. populations in lowland and highland Ecuador. *Journal of Vector Ecology*, 37(1), 124–136. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2012.00209.x>
- Pinault, L., y Hunter, F. (2012b). Malaria in highlands of Ecuador since 1900. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4), 615–622. <https://doi.org/10.3201/eid1804.111267>
- Pratt, H. D., Barnes, R. C., y Littig, K. S. (1982). Mosquitoes of Public Health Importance and Their Control. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service: Communicable Disease Center. Recuperado el 16 de abril de 2018, de https://www.cdc.gov/nceh/ehs/docs/pictorial_keys/mosquitoes.pdf
- Roberts, L., Janovy, J., y Schmidt, P. (2005). *Foundations Of Parasitology. Society* (Seventh Ed). McGraw-Hill Science/Engineering/Math. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90219-T](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90219-T)
- Rodríguez-Zabala, J., González, R., Correa, M. M., y Gómez, G. F. (2016). Morphometric analysis of two populations of *Anopheles (Anopheles) calderoni* (Diptera: Culicidae) from southwestern Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 966–971. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.005>

- Roggero, A., & Passerin d'Entrèves, P. (2005). Geometric morphometric analysis of wings variation between two populations of the *Scythris obscurella* species-group: geographic or interspecific differences? (Lepidoptera: Scythrididae). *SHILAP Revista de Lepidopterología*, 33(130), 101-112.
- Rohlf, F., y Marcus, L. F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J)
- Rudel, T. K. (2000). Organizing for Sustainable Development: Conservation Organizations and the Struggle to Protect Tropical Rain Forests in Esmeraldas, Ecuador. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 29(2), 78–82. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-29.2.78>
- Sáenz, F. E., Arévalo-Cortés, A., Valenzuela, G., Vallejo, A. F., Castellanos, A., Poveda-Loayza, A. C., ... Herrera, S. (2017). Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the northern coast of Ecuador: high prevalence of asymptomatic infections. *Malaria Journal*, 16(300), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1947-0>
- Service, M. (2008). *Medical Entomology for Students* (Fourth Ed). United Kingdom: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511811012>
- Sinka, M. E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., ... Hay, S. I. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & vectors*, 3(72), 1-26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-72>
- Soto-Vivas, A., Liria, J., y De Luna, E. (2011). Morfometría Geométrica Y Filogenia En Rhodniini (Hemiptera, Reduviidae) De Venezuela. *Acta Zool. Mex. Acta Zool. Mex. Acta Zoológica Mexicana*, 27(271), 2101–87. [https://doi.org/10.1554/0014-3820\(2002\)056](https://doi.org/10.1554/0014-3820(2002)056)
- Strauss, R. (2010). Discriminating Groups of Organisms. En Elewa, A. (Ed). *Morphometrics for Nonmorphometricians*. (73-77). Berlin: Springer.
- Toro Ibacache, M. V., Manriquez Soto, G., y Suazo Galdames, I. (2010). Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4), 977–990. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022010000400001>
- UNAM (Universidad Nacional Autóctona de México). (2017) Paludismo o malaria. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/paludismo.html>
- Vicente JL, Sousa CA, Alten B, Caglar SS, Falcuta E, Latorre JM, Toty C, Barre H, Demirci B, Di Luca M, Toma L, Alves R, Salgueiro P, Silva TL, Bargues MD, Mas-Coma S, Boccolini D, Romi R, Nicolescu G, do Rosario VE, Ozer N, Fontenille D, Pinto J. Genetic and phenotypic variation of the malaria vector *Anopheles atroparvus* in southern Europe. *Malar J*. 2011; 10:5. [PubMed:21223582]
- Vidal, P. O., y Suesdek, L. (2012). Comparison of wing geometry data and genetic data for assessing the population structure of *Aedes aegypti*. *Infection, Genetics and*

Evolution, 12(3), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.013>

- Viera L. (2014). *Identificación de especies de Anopheles, vectores de malaria, mediante secuenciación del gen Citocromo C Oxidasa I (COI)*. (Disertación de pregrado). Escuela Superior Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., y Dondorp, A. M. (2013). Malaria. *The Lancet*, 383(9918), 723–735. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0)
- WHO (World Health Organization). (2015). World malaria report 2014. *Geneva: WHO*.
- WHO (World Health Organization). (2016). Geneva: WMR (World Malaria Report) 2016. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wilke, A. B. B., Christe, R. de O., Multini, L. C., Vidal, P. O., Wilk-da-Silva, R., de Carvalho, G. C., y Marrelli, M. T. (2016). Morphometric Wing Characters as a Tool for Mosquito Identification. *PLOS ONE*, 11(8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161643>
- WRBU (The Walter Reed Biosystematics Unit). (2015). *Anopheles (Nys.) albimanus*. Recuperado de http://www.wrbu.org/mqID/mq_medspc/AD/ANalb_hab.html
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, D., y Fink, W. (2004a). Landmarks. In *Geometric Morphometrics for Biologists: A primer*. (pp. 23-25). California: Elsevier Academic Press.
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, D., y Fink, W. (2004b). Introduction. In *Geometric Morphometrics for Biologists: A primer*. (pp. 1–10). California: Elsevier Academic Press.
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, D., y Fink, W. (2004c). Simple size and shape variables: Bookstein shape coordinates. In *Geometric Morphometrics for Biologists: A primer*. (pp. 57–59). California: Elsevier Academic Press.
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, D., y Fink, W. (2004d). Disparity and variation. In *Geometric Morphometrics for Biologists: A primer*. (pp. 295–298). California: Elsevier Academic Press.
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets, D., y Fink, W. (2004e). Superimposition methods. In *Geometric Morphometrics for Biologists: A primer*. (pp. 295–298). California: Elsevier Academic Press.

9. FIGURAS

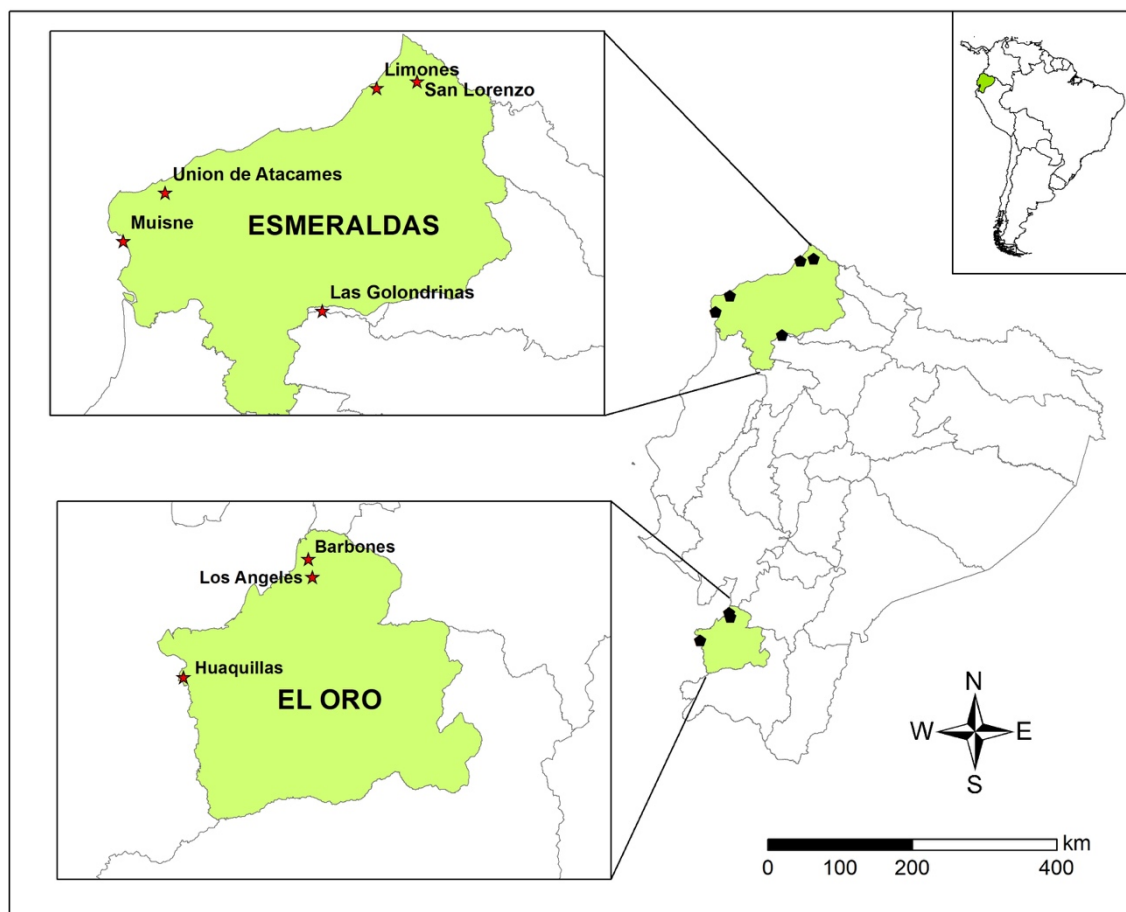


Figura 1. Mapa del Ecuador con las localidades de colecta de cada provincia. En la provincia de Esmeraldas (ESM), las localidades analizadas corresponden a Unión de Atacames (ATA), Golondrinas (GOL), Limones (LIM), Muisne (MUI) y San Lorenzo (SAN). En la provincia de El Oro (ORO), las localidades analizadas corresponden a Barbones (BAR), Huaquillas (HUA) y Los Ángeles (LA).

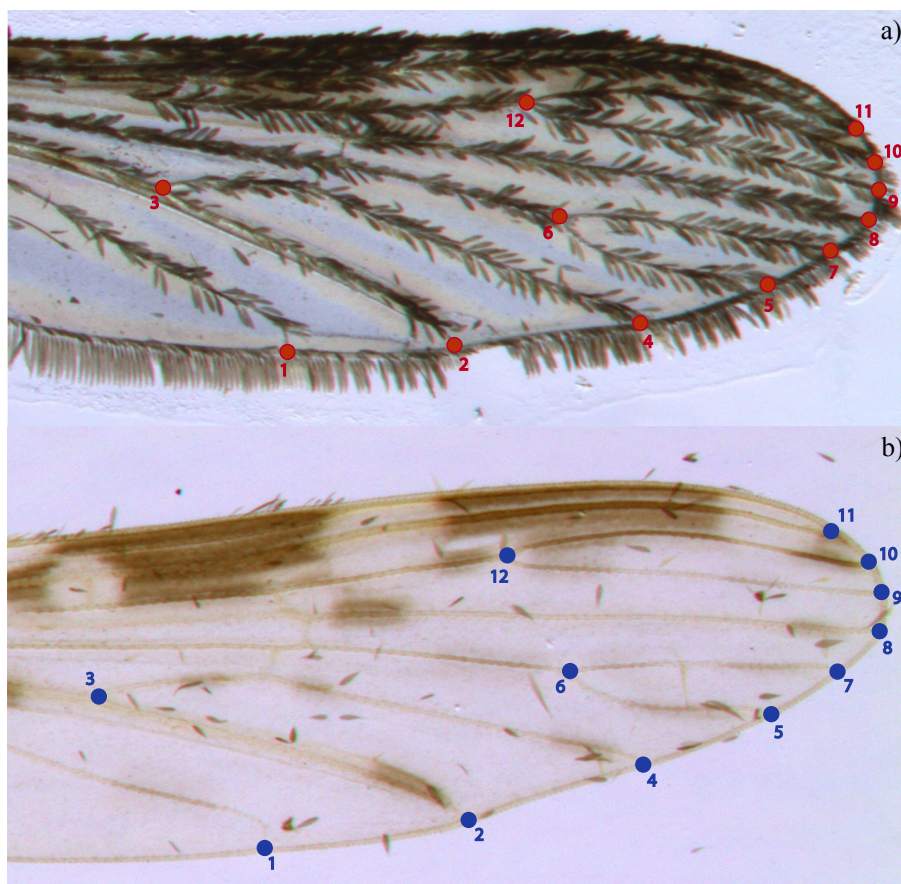


Figura 2. Comparación de los tratamientos de montaje de las alas. Ala sometida al proceso remoción mecánica de escamas mediante un pincel para comparar la variación fenotípica entre a) alas “con escamas” y b) alas “sin escamas”.



Figura 3. Puntos de referencia (*landmarks*) usados en el estudio. Los puntos morados indican la localización de los 13 puntos de referencia que se marcaron sobre cada ala para el análisis de morfometría alar.

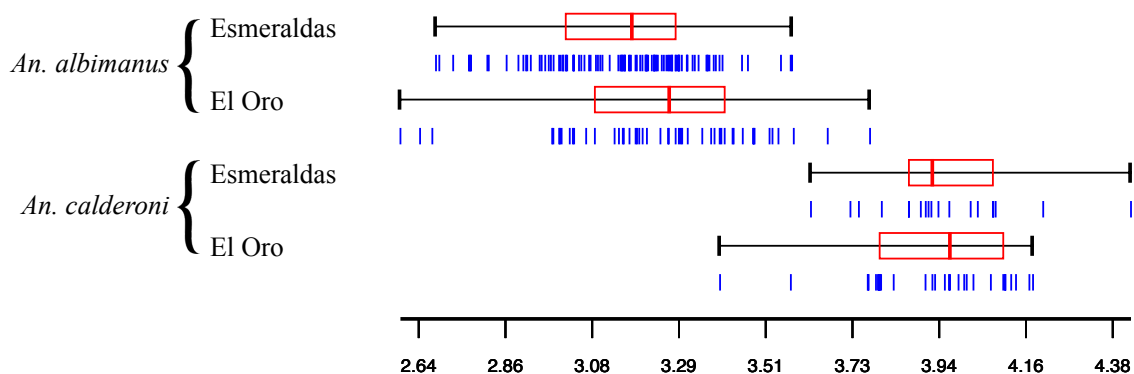


Figura 4. Variación del tamaño alar de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni* a nivel de provincias. Las líneas verticales azules representan los individuos. La línea roja que divide la caja representa la mediana y los extremos los cuartiles 25% y 75%. Los valores máximos y mínimos son indicados con las líneas verticales negras. El tamaño alar está expresado en milímetros.

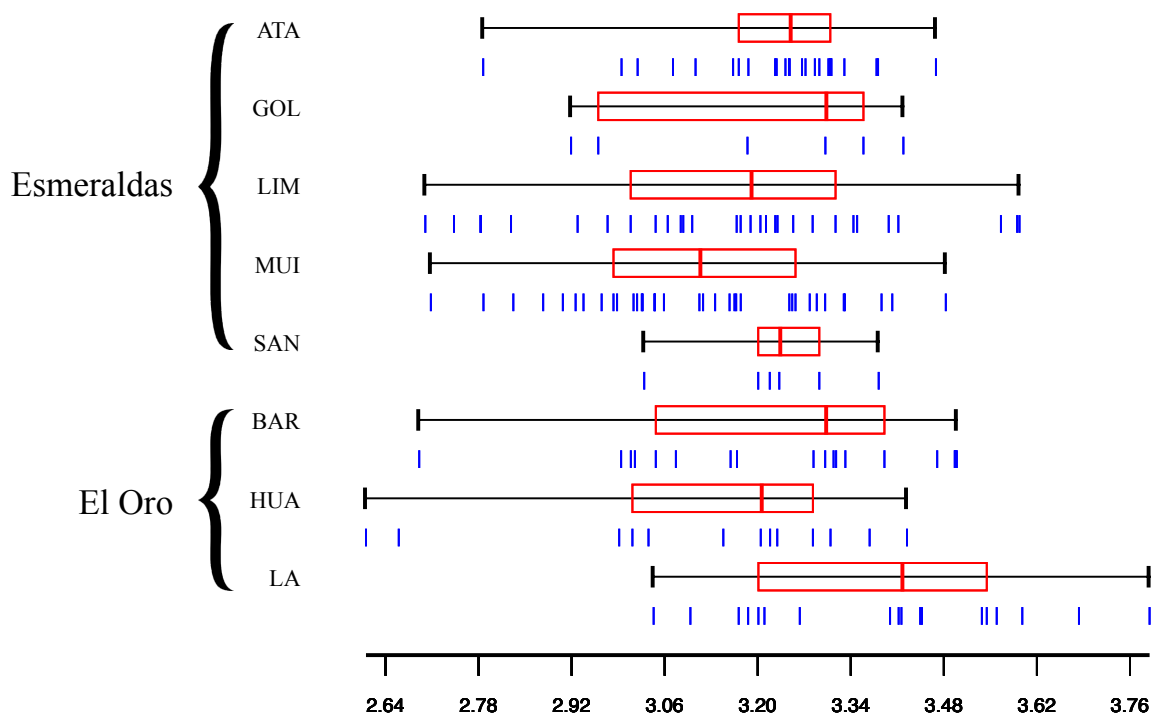


Figura 5. Variación intraespecífica del tamaño alar de *Anopheles albimanus* a nivel de localidades de muestreo. Las localidades de muestreo en la provincia de Esmeraldas son Unión de Atacames (ATA), Golondrina (GOL), Limones (LIM), Muisne (MUI) y San Lorenzo (SAN); las localidades de El Oro son Barbones (BAR), Huaquillas (HUA) y Los Ángeles (LA). El tamaño alar está expresado en milímetros.

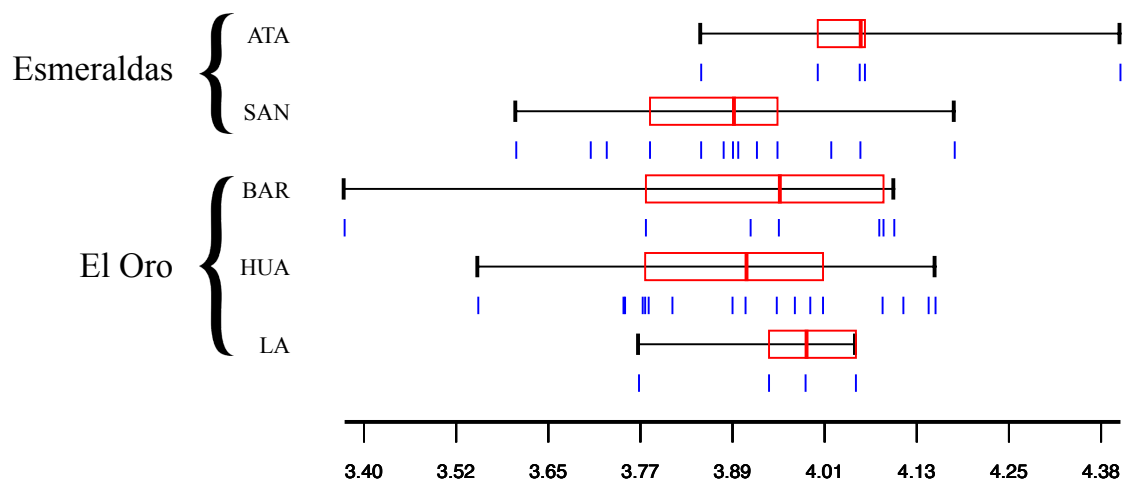


Figura 6. Variación intraespecífica del tamaño alar de *Anopheles calderoni* a nivel de localidades de muestreo. Las localidades de muestreo en la provincia de Esmeraldas son Unión de Atacames (ATA) y San Lorenzo (SAN); las localidades de El Oro son Barbones (BAR), Huaquillas (HUA) y Los Ángeles (LA). El tamaño alar está expresado en milímetros. Las líneas verticales azules representan los individuos. La línea roja que divide la caja representa la mediana y los extremos los cuartiles 25% y 75%. Los valores máximos y mínimos son indicados con las líneas verticales negras. El tamaño alar está expresado en milímetros.

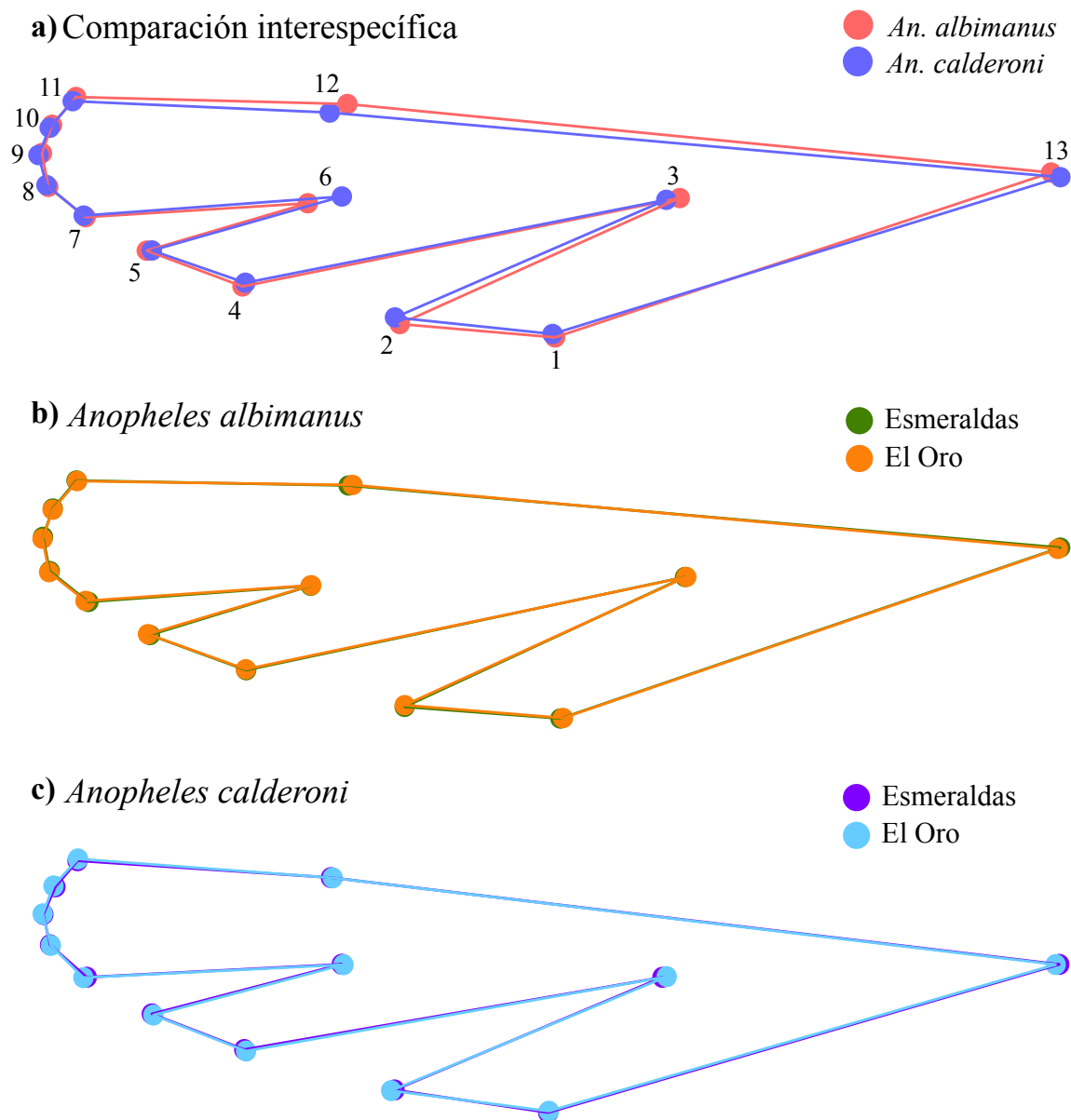


Figura 7. Comparación de la forma alar de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni* a nivel de especies y provincias. Comparación de la forma alar a) entre especies y entre provincias donde fueron colectados los individuos de b) *An. albimanus* y c) *An. calderoni*.

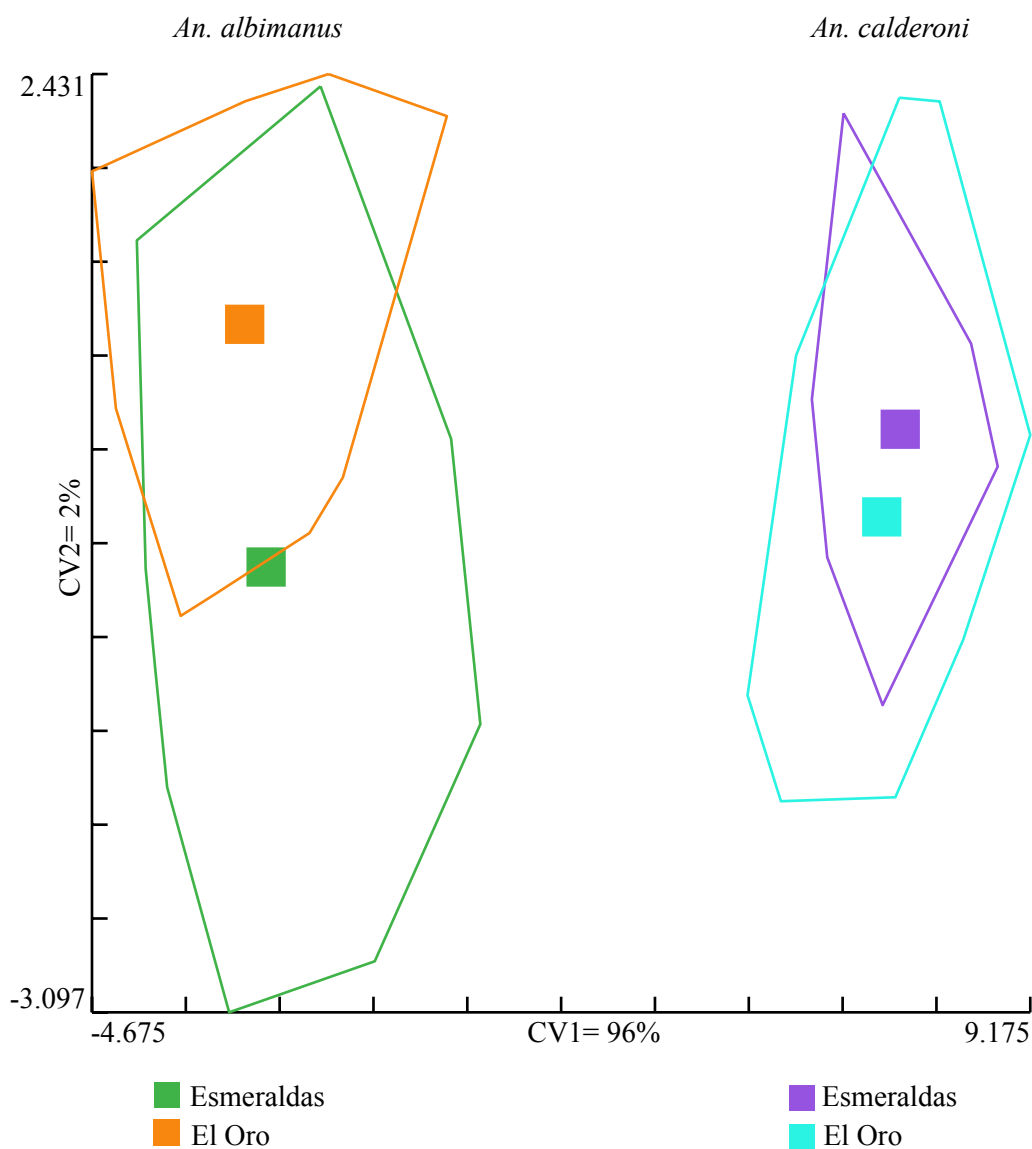


Figura 8. Análisis discriminante de la forma alar de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni* a nivel de provincias. Los porcentajes ilustrados en cada eje representan la contribución de cada factor canónico (CV1 y CV2) a la variación total de cada grupo. El cuadrado dentro de cada polígono indica el centroide de la distribución de cada grupo.

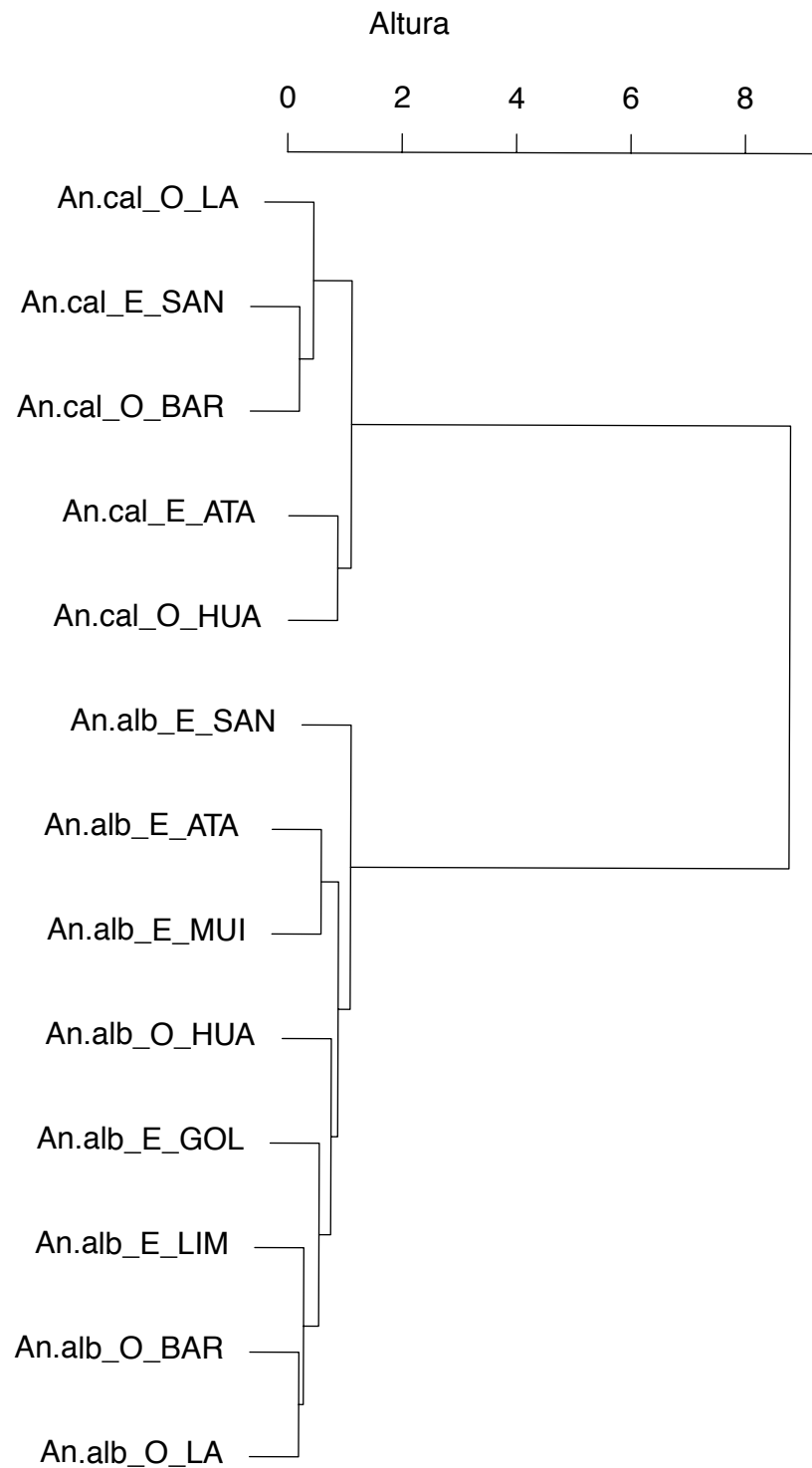


Figura 9. Dendrograma UPGMA en base a las distancias de Mahalanobis (D^2) de la conformación alar de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*. Se incluyen las especies de estudio *Anopheles albimanus* (An. alb) y *Anopheles calderoni* (An. cal), las provincias donde fueron colectados los individuos Esmeraldas (E) y El Oro (O) y, las localidades de muestreo: Unión de Atacames (ATA), Golondrinas (GOL), Limones (LIM), Muisne (MUI) y San Lorenzo (SAN); las localidades de El Oro son Barbones (BAR), Huaquillas (HUA) y Los Ángeles (LA).

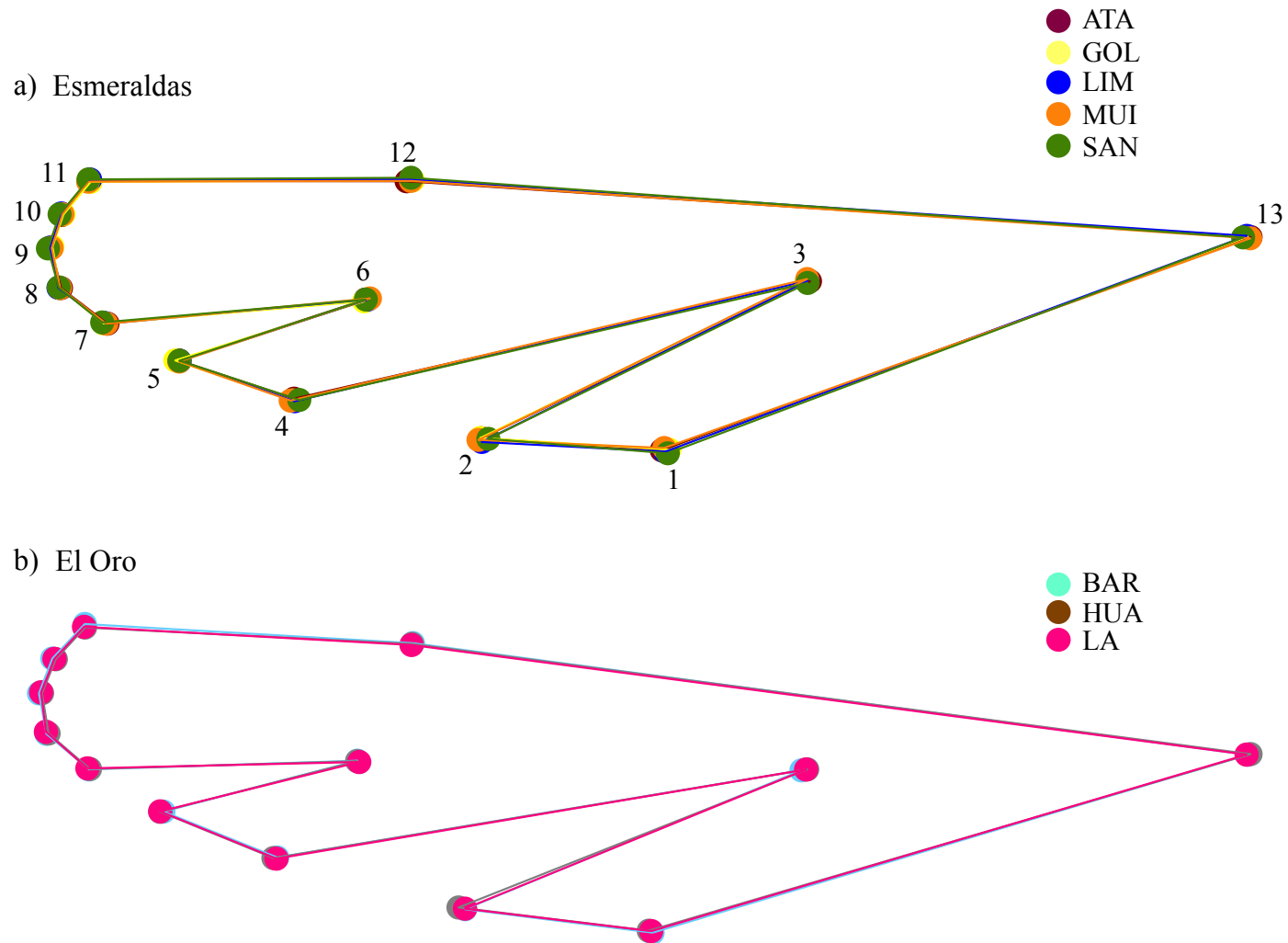


Figura 10. Comparación intraespecífica mediante superposición de Procrustes de la forma alar de *Anopheles albimanus* a nivel de localidades de muestreo. Los esquemas muestran la forma alar de los individuos colectados en a) Esmeraldas y b) El Oro en las distintas localidades de muestreo.

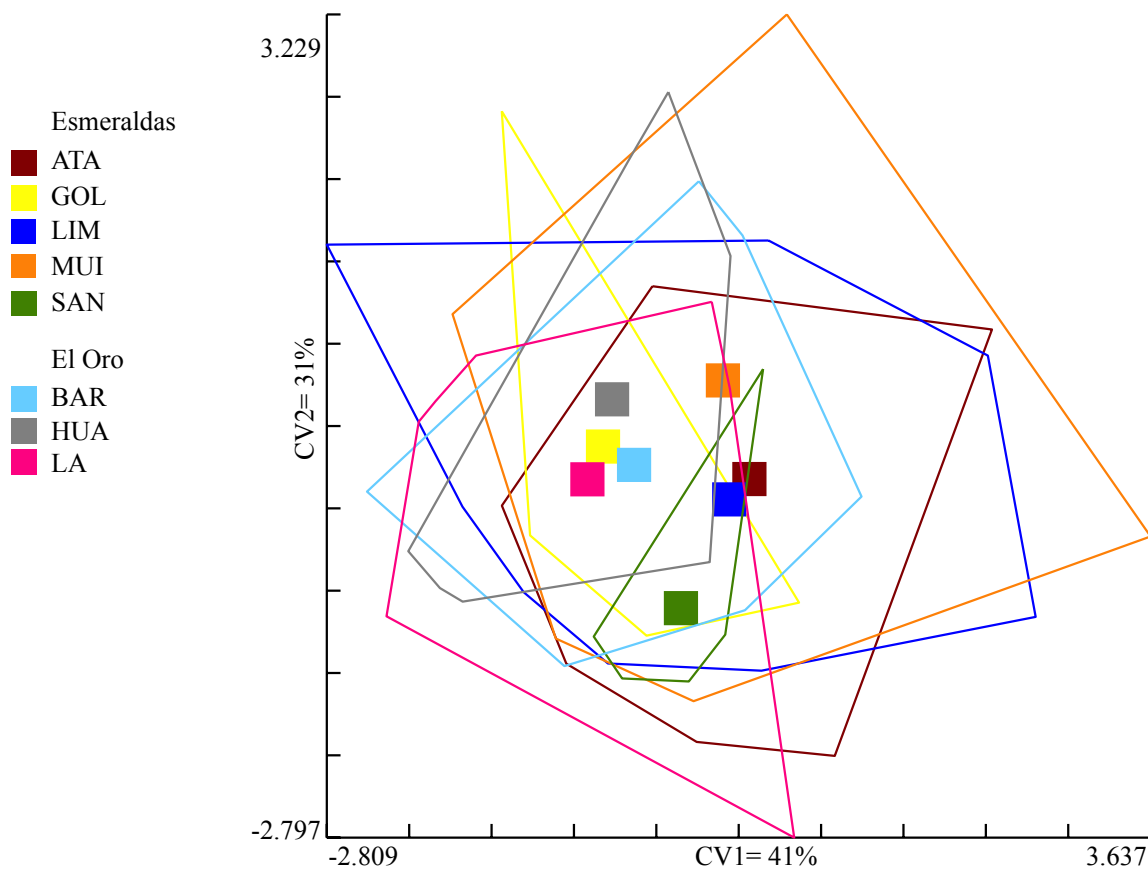
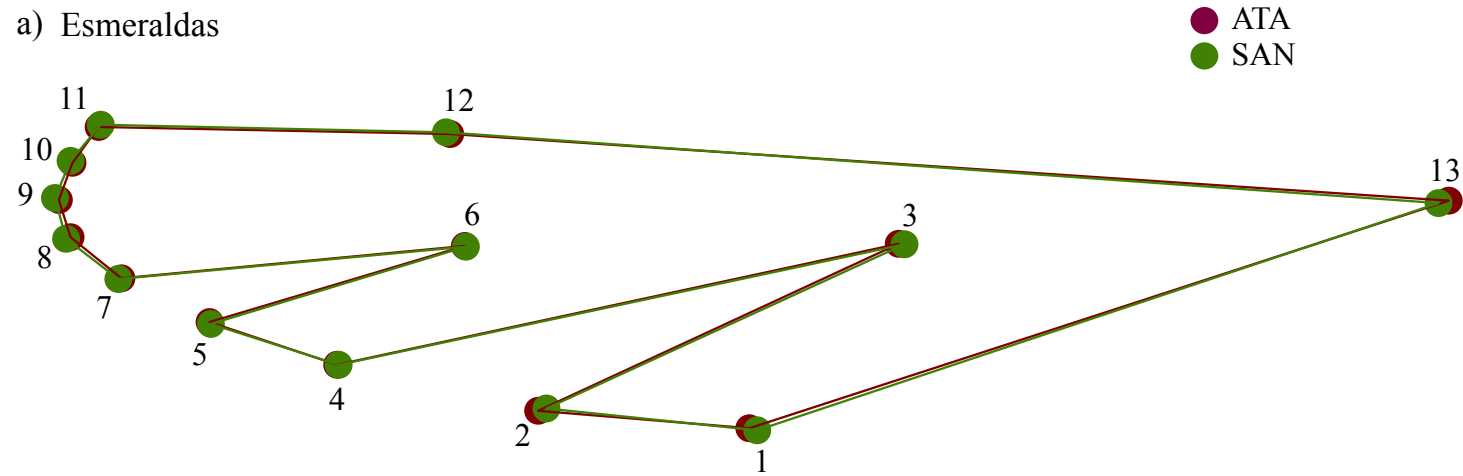


Figura 11. Análisis discriminante de la forma alar de *Anopheles albimanus* a nivel de localidades de muestreo. Los porcentajes ilustrados en cada eje representan la contribución de cada factor canónico (CV1 y CV2) a la variación total de cada grupo. El cuadrado dentro de cada polígono indica el centroide de la distribución de cada grupo.

a) Esmeraldas



b) El Oro

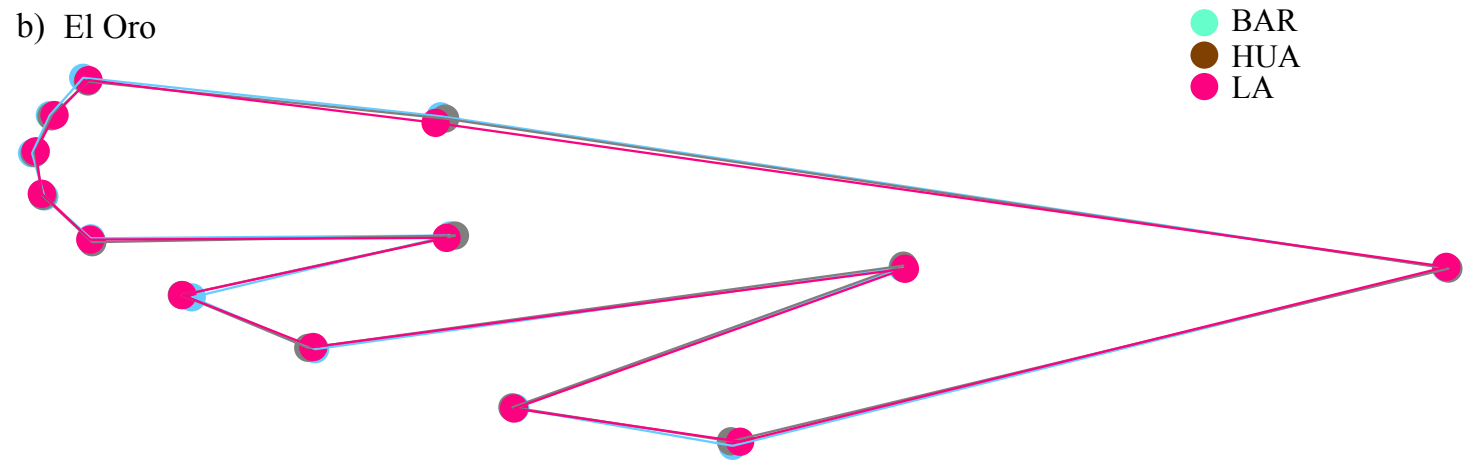


Figura 12. Comparación intraespecífica de la forma alar de *Anopheles calderoni* a nivel de localidades de muestreo. Los esquemas muestran la forma alar de los individuos colectados en (a) Esmeraldas y (b) El Oro en las distintas localidades de muestreo.

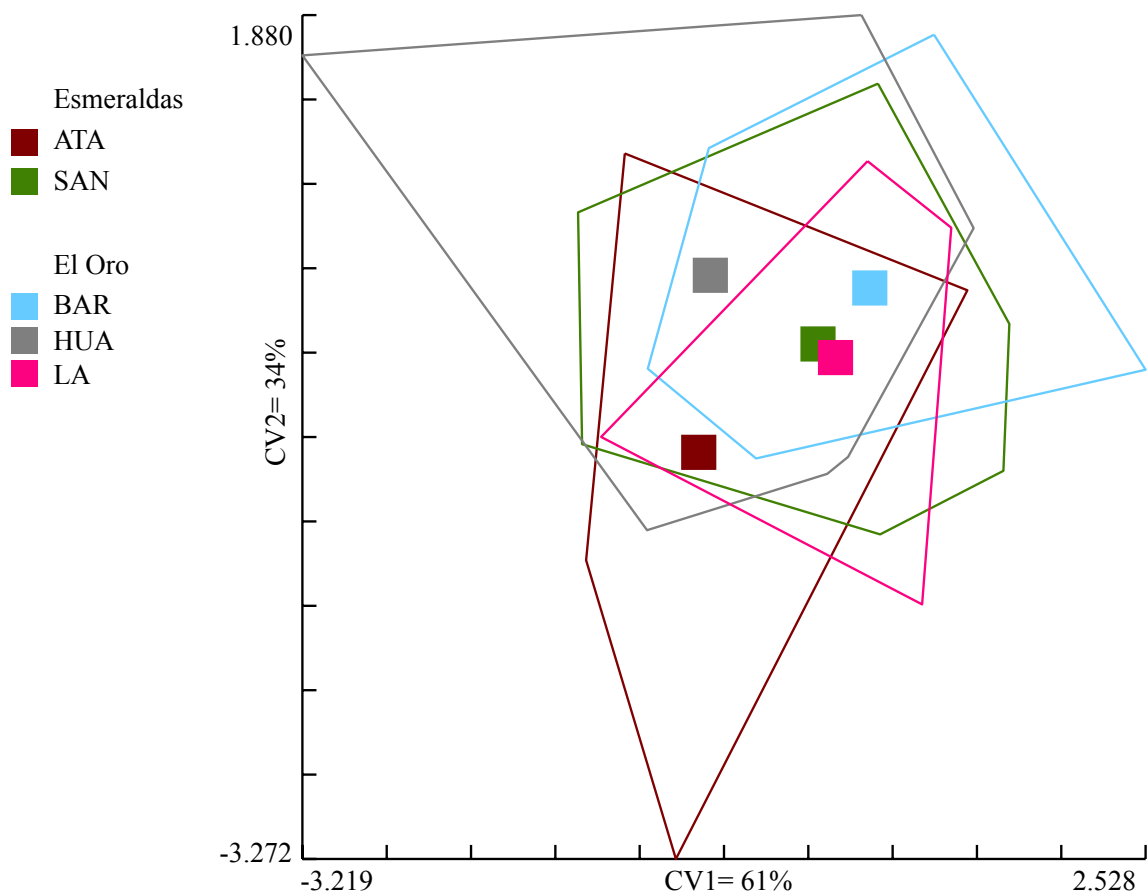


Figura 13. Análisis discriminante de la forma alar de *Anopheles calderoni* a nivel de localidades de muestreo. Los porcentajes ilustrados en cada eje representan la contribución de cada factor canónico (CV1 y CV2) a la variación total de cada grupo. El cuadrado dentro de cada polígono indica el centroide de la distribución de cada grupo.

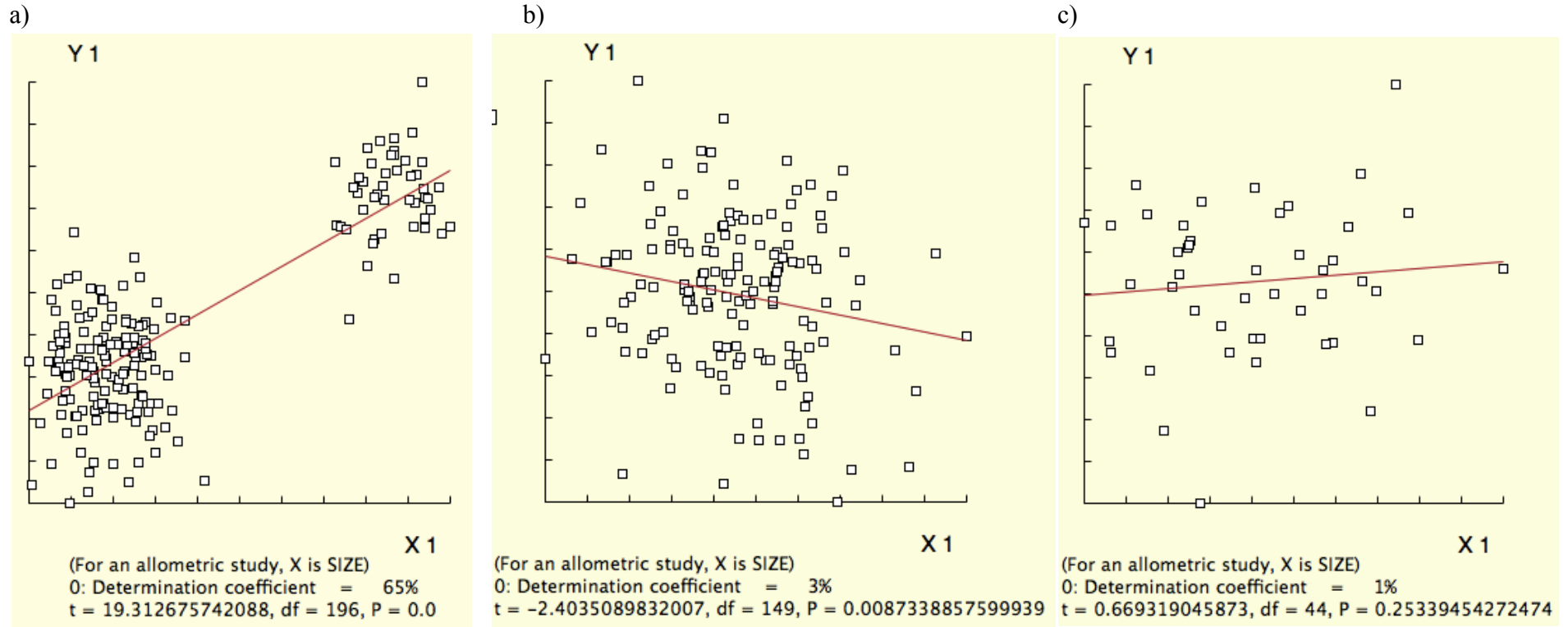


Figura 14. Análisis del efecto alométrico. Las graficas muestran la tendencia del efecto alometrico a) interespecifico, b) dentro *Anopheles albimanus* y c) dentro *Anopheles calderoni*.

10. TABLAS

Tabla 1. Datos de colecta de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*

Especie	Provincia	Localidad de muestreo	Latitud	Longitud	Altura (msnm)	Tamaño de muestra
<i>An. albimanus</i>	Esmeraldas	Unión de Atacames (ATA)	0.81469	-79.86330	4-200	25
		Las Golondrinas (GOL)	0.32376	-79.21107	180-220	6
		Limonas (LIM)	1.24987	-78.98610	1-15	30
		Muisne (MUI)	0.61290	-80.03853	8-32	35
		San Lorenzo (SAN)	1.27721	-78.81889	10-25	6
						102
	El Oro	Barbones (BAR)	-3.13528	-79.86870	4	18
		Huaquillas (HUA)	-3.47744	-80.23079	9	13
		Los Ángeles (LA)	-3.18729	-79.85742	6	18
						49
<i>An. calderoni</i>	Esmeraldas	Unión de Atacames (ATA)	0.81469	-79.86330	4-200	5
		Las Golondrinas (GOL)	0.32376	-79.21107	180-220	1
		San Lorenzo (SAN)	1.27721	-78.81889	10-25	13
						19
	El Oro	Barbones (BAR)	-3.13528	-79.86870	4	7
		Huaquillas (HUA)	-3.47744	-80.23079	9	17
		Los Ángeles (LA)	-3.18729	-79.85742	6	4
						28
	TOTAL					

Tabla 2. Repetibilidad de la digitalización de puntos de referencia. Comparación de la influencia de la presencia de escamas dentro de tratamientos indica la precisión; mientras que entre tratamientos indica la exactitud

Tratamiento	Tamaño		Forma	
	Repetibilidad	Error de Medición (%)	Repetibilidad	Error de Medición (%)
"con escamas"	0.81	19	0.86	14
"sin escamas"	0.99	1	0.87	13
Entre tratamientos	0.75	25	0.67	33

% Error de Medición= (1-Repetibilidad) *100

Tabla 3. Media (\bar{x}), desviación estándar (SD) y varianza (σ^2) del tamaño alar a nivel de provincias de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*

Especie	Provincia	$\bar{x} \pm SD$ (mm)	σ^2 (mm)
<i>An. albimanus</i>	Esmeraldas	3.17 \pm 0.185 ^a	0.0343 ^a
	El Oro	3.25 \pm 0.233 ^a	0.0544 ^a
	Total	3.19 \pm 0.206	0.0423
<i>An. calderoni</i>	Esmeraldas	3.93 \pm 0.173 ^b	0.0298 ^a
	El Oro	3.91 \pm 0.174 ^b	0.0304 ^a
	Total	3.92 \pm 0.171	0.0296

Valores con el superíndice *a* son significativamente diferentes a los que tienen otra letra (*b*); valores que comparten la misma letra/s no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4. Valores de p corregidos con Bonferroni de las comparaciones múltiples de la media (\bar{x}) (parte inferior) y de la varianza (σ^2) (parte superior) del tamaño alar a nivel provincias de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*

	1	2	3	4
1. <i>An. albimanus</i> - Esmeraldas	-	0.26	1.00	1.00
2. <i>An. albimanus</i> - El Oro	0.05	-	0.55	0.44
3. <i>An. calderoni</i> - Esmeraldas	0.00	0.00	-	1.00
4. <i>An. calderoni</i> - El Oro	0.00	0.00	1.00	-

Valores significativos se señalan con negrillas.

Tabla 5. Media (\bar{x}), desviación estándar (SD) y varianza (σ^2) del tamaño alar a nivel de localidades de muestreo de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*

Provincia	Localidad de muestreo	<i>An. albimanus</i>		<i>An. calderoni</i>	
		$\bar{x} \pm SD$ (mm)	σ^2 (mm)	$\bar{x} \pm SD$ (mm)	σ^2 (mm)
Esmeraldas	Unión de Atacames (ATA)	3.22 \pm 0.135 ^{a,b}	0.0183 ^a	4.06 \pm 0.192 ^a	0.0370 ^a
	Las Golondrinas (GOL)	3.19 \pm 0.198 ^{a,b}	0.0391 ^a	-	-
	Limonas (LIM)	3.16 \pm 0.230 ^{a,b}	0.0527 ^a	-	-
	Muisne (MUI)	3.11 \pm 0.175 ^a	0.0305 ^a	-	-
	San Lorenzo (SAN)	3.23 \pm 0.110 ^{a,b}	0.0122 ^a	3.88 \pm 0.149 ^b	0.0221 ^a
El Oro	Barbones (BAR)	3.23 \pm 0.210 ^{a,b}	0.0439 ^a	3.90 \pm 0.246 ^{ab}	0.0605 ^a
	Huaquillas (HUA)	3.12 \pm 0.236 ^a	0.0558 ^a	3.90 \pm 0.161 ^{ab}	0.0259 ^a
	Los Ángeles (LA)	3.38 \pm 0.198 ^b	0.0392 ^a	3.93 \pm 0.116 ^{ab}	0.0135 ^a

Valores con el superíndice *a* son significativamente diferentes a los que tienen otra letra (*b*); valores que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6. Valores de p corregidos con Bonferroni de las comparaciones múltiples de la media (\bar{x}) (parte inferior) y de la varianza (σ^2) (parte superior) del tamaño alar a nivel de localidades de muestreo de *Anopheles albimanus*

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>An. albimanus</i> - ESM - ATA	-	1.00	0.28	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2. <i>An. albimanus</i> - ESM - GOL	1.00	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
3. <i>An. albimanus</i> - ESM - LIM	1.00	1.00	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4. <i>An. albimanus</i> - ESM - MUI	0.20	1.00	1.00	-	1.00	1.00	1.00	1.00
5. <i>An. albimanus</i> - ESM - SAN	1.00	1.00	1.00	1.00	-	1.00	1.00	1.00
6. <i>An. albimanus</i> - ORO - BAR	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-	1.00	1.00
7. <i>An. albimanus</i> - ORO - HUA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	-	1.00
8. <i>An. albimanus</i> - ORO - LA	0.22	1.00	0.11	0.00	1.00	1.00	0.03	-

Valores significativos se señalan con negrillas.

Tabla 7. Valores de p corregidos con Bonferroni de las comparaciones múltiples de la media (\bar{x}) (parte inferior) y de la varianza (σ^2) (parte superior) del tamaño alar a nivel de localidades de muestreo de *Anopheles calderoni*

	1	2	3	4	5
1. <i>An. calderoni</i> - ESM - ATA	-	1.00	1.00	1.00	1.00
2. <i>An. calderoni</i> - ESM - SAN	0.05	-	1.00	1.00	1.00
3. <i>An. calderoni</i> - ORO - BAR	1.00	1.00	-	1.00	1.00
4. <i>An. calderoni</i> - ORO - HUA	0.73	1.00	1.00	-	1.00
5. <i>An. calderoni</i> - ORO - LA	1.00	1.00	1.00	1.00	-

Valores significativos se señalan con negrillas.

Tabla 8. Distancias de Mahalanobis (D^2) (parte inferior) y valores correspondientes de p corregidos con Bonferroni (parte superior) obtenidos de las variables de forma alar de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni* a nivel de especie y provincia

	1	2	3	4
1. <i>An. albimanus</i> - Esmeraldas	-	0.00	0.00	0.00
2. <i>An. albimanus</i> - El Oro	1.49	-	0.00	0.00
3. <i>An. calderoni</i> - Esmeraldas	9.33	9.70	-	0.07
4. <i>An. calderoni</i> - El Oro	9.04	9.44	1.94	-

Valores significativos se señalan con negrillas.

Tabla 9. Reclasificación validada y disparidad métrica a nivel de provincias de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*

Especie	Provincia	Reclasificación validada	Disparidad métrica
<i>An. albimanus</i>	Esmeraldas	70% (71/102)	0.00046 ^a
	El Oro	67% (33/49)	0.00045 ^a
	Subtotal	69% (106/151)	0.00046
<i>An. calderoni</i>	Esmeraldas	68% (13/19)	0.00037 ^a
	El Oro	64% (18/28)	0.00039 ^a
	Subtotal	66% (33/47)	0.00038
TOTAL		68% (135/198)	0.00076

Valores con el mismo superíndice (*a*) son significativamente iguales; valores que comparten la misma letra/s no presentan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 10. Valores de p corregidos con Bonferroni de las comparaciones múltiples de la disparidad métrica de la forma alar a nivel de especie y provincia de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*.

	1	2	3	4
1. <i>An. albimanus</i> - Esmeraldas	-			
2. <i>An. albimanus</i> - El Oro	0.41	-		
3. <i>An. calderoni</i> - Esmeraldas	0.07	0.09	-	
4. <i>An. calderoni</i> - El Oro	0.06	0.10	0.44	-

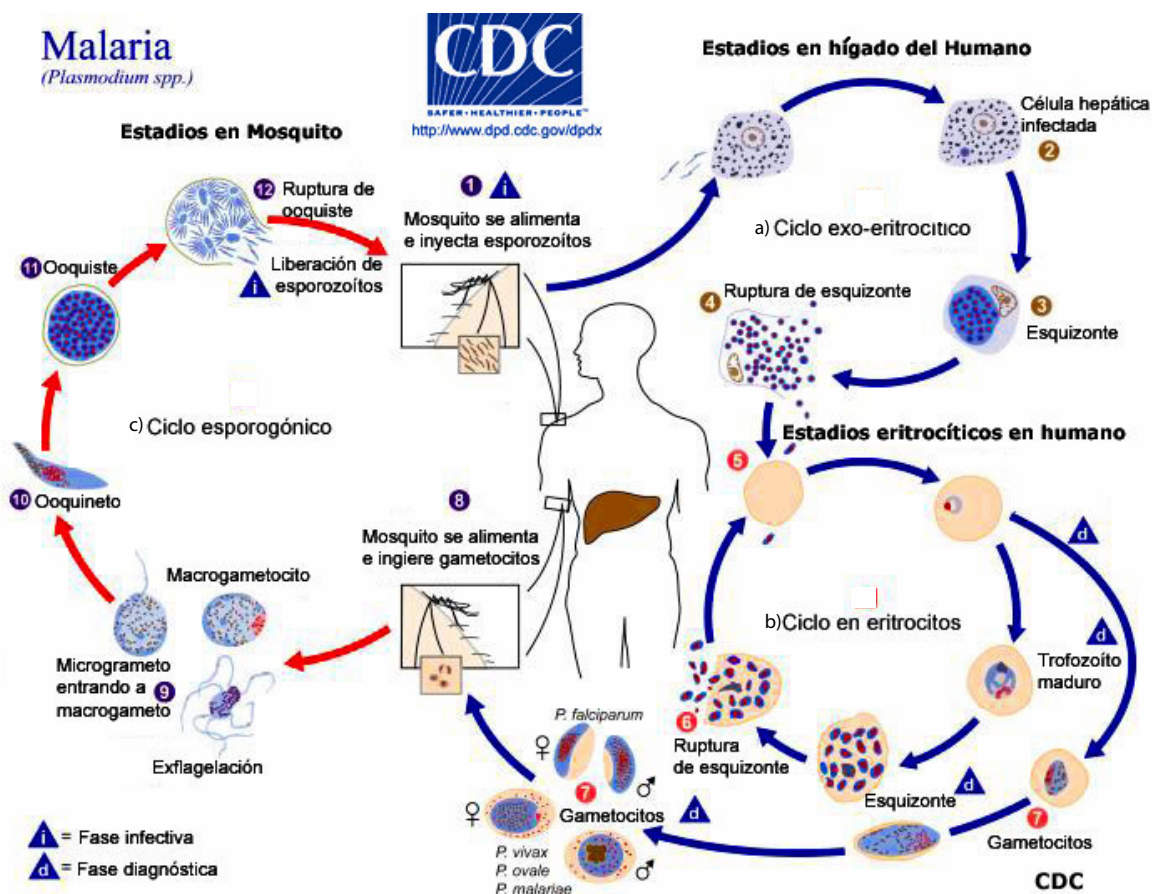
Valores significativos se señalan con negrillas.

Tabla 11. Distancias de Mahalanobis (D^2) (parte inferior) y valores correspondientes de p corregidos con Bonferroni (parte superior) obtenidos de las variables de forma alar de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni* considerando provincias y localidades de muestreo.

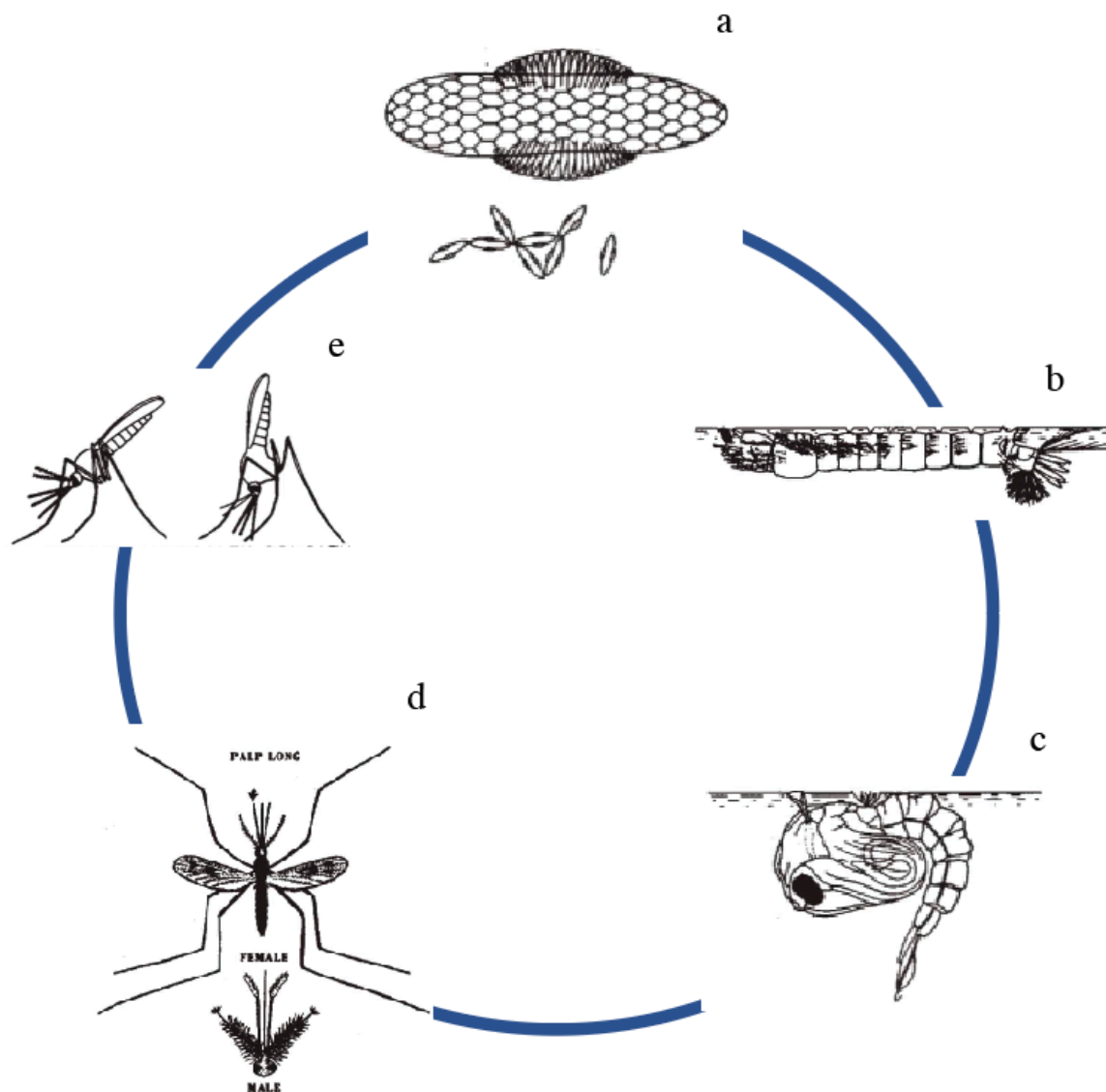
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>An. alb</i> - ESM - ATA	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2. <i>An. alb</i> - ESM - GOL	0.91	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3. <i>An. alb</i> - ESM - LIM	0.69	0.55	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4. <i>An. alb</i> - ESM - MUI	0.63	1.2	0.83	-	0.62	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5. <i>An. alb</i> - ESM - SAN	1.43	0.97	0.83	1.63	-	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6. <i>An. alb</i> - ORO - BAR	1.01	0.63	0.31	1.05	0.67	-	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7. <i>An. alb</i> - ORO - HUA	0.86	0.72	0.82	0.86	1.55	0.96	-	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8. <i>An. alb</i> - ORO - LA	1.00	0.66	0.39	0.93	0.93	0.27	0.77	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9. <i>An. cal</i> - ESM - ATA	8.94	9.71	9.22	8.53	9.69	9.34	9.31	9.27	-	1.00	1.00	1.00	1.00
10. <i>An. cal</i> - ESM - SAN	8.54	9.27	8.75	8.13	9.14	8.85	8.94	8.81	1.18	-	1.00	1.00	1.00
11. <i>An. cal</i> - ORO - BAR	8.44	9.17	8.65	8.04	9.02	8.74	8.85	8.70	1.40	0.22	-	1.00	1.00
12. <i>An. cal</i> - ORO - HUA	8.64	9.36	8.86	8.20	9.29	8.96	8.99	8.89	0.90	0.78	0.92	-	1.00
13. <i>An. cal</i> - ORO - LA	8.10	8.84	8.33	7.71	8.71	8.43	8.53	8.39	1.43	0.49	0.43	1.09	-

Valores significativos se señalan con negrillas.

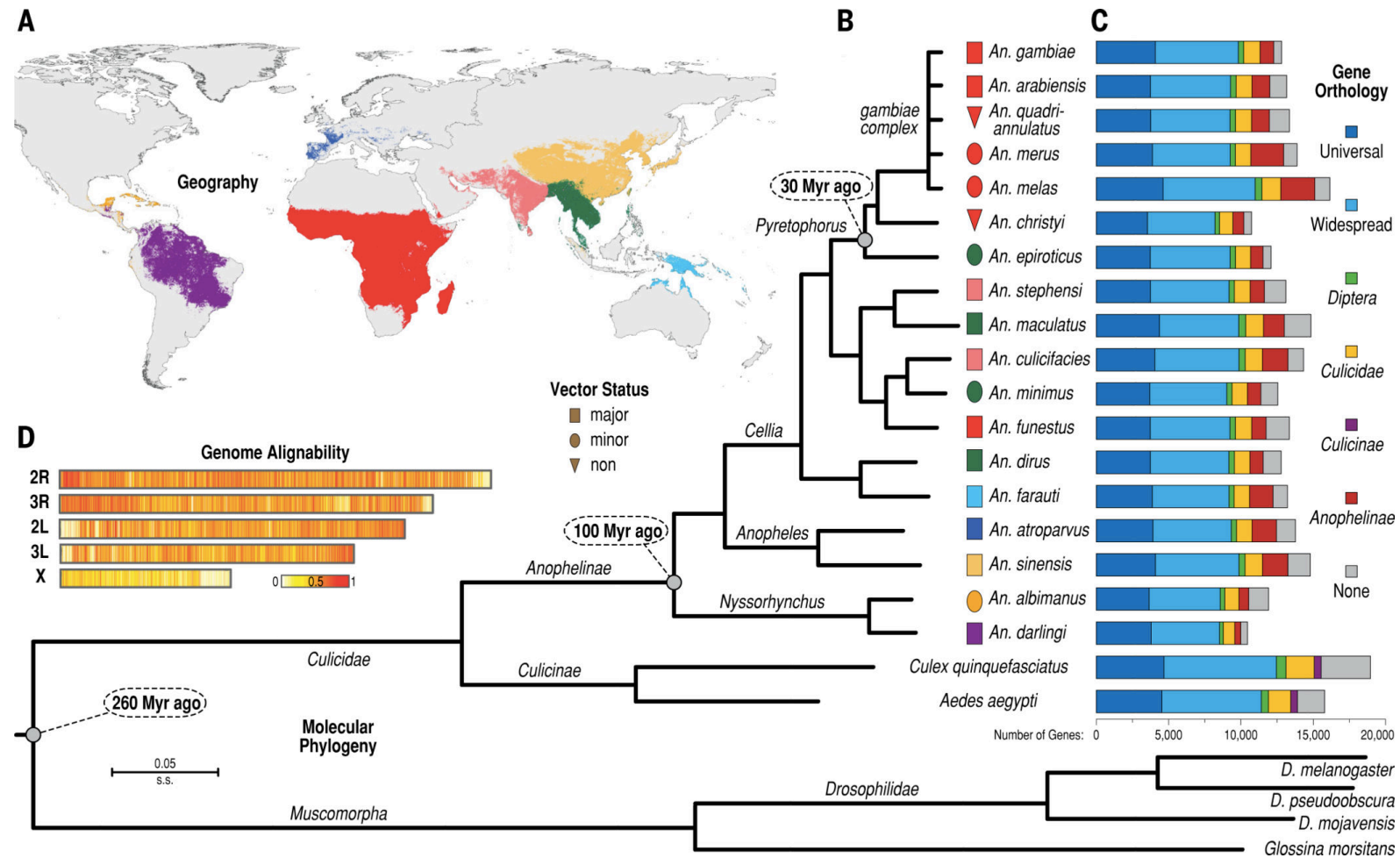
11. ANEXOS



Anexo 1. Ciclo de transmisión del *Plasmodium*. El ciclo inicia cuando a) los esporozoítos móviles inoculados en la dermis viajan al hígado donde cada esporozoito invade un hepatocito y luego se multiplica. Después de aproximadamente una semana, los esquizontes hepáticos estallan, liberando en el torrente sanguíneo miles de merozoítos que invaden los glóbulos rojos y comienzan el ciclo asexual. b) La enfermedad comienza cuando el número total de parásitos asexuales en la circulación del humano alcanza aproximadamente 100 millones. Dentro de los glóbulos rojos se forman los trofozoítos inmaduros que son los responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Al madurar, estos se desarrollan en esquizontes, cuyo rompimiento libera más merozoítos a la sangre, o en formas sexuales (gametocitos). c) Los gametocitos son absorbidos por un mosquito anofelino y se reproducen sexualmente, formando un oocineto y luego un oocisto en el intestino del mosquito. El oocisto estalla y libera esporozoítos, que migran a las glándulas salivales para esperar la inoculación en el próximo suministro de sangre que tome el mosquito (White, 2014; CDC, 2016a; UNAM, 2017).



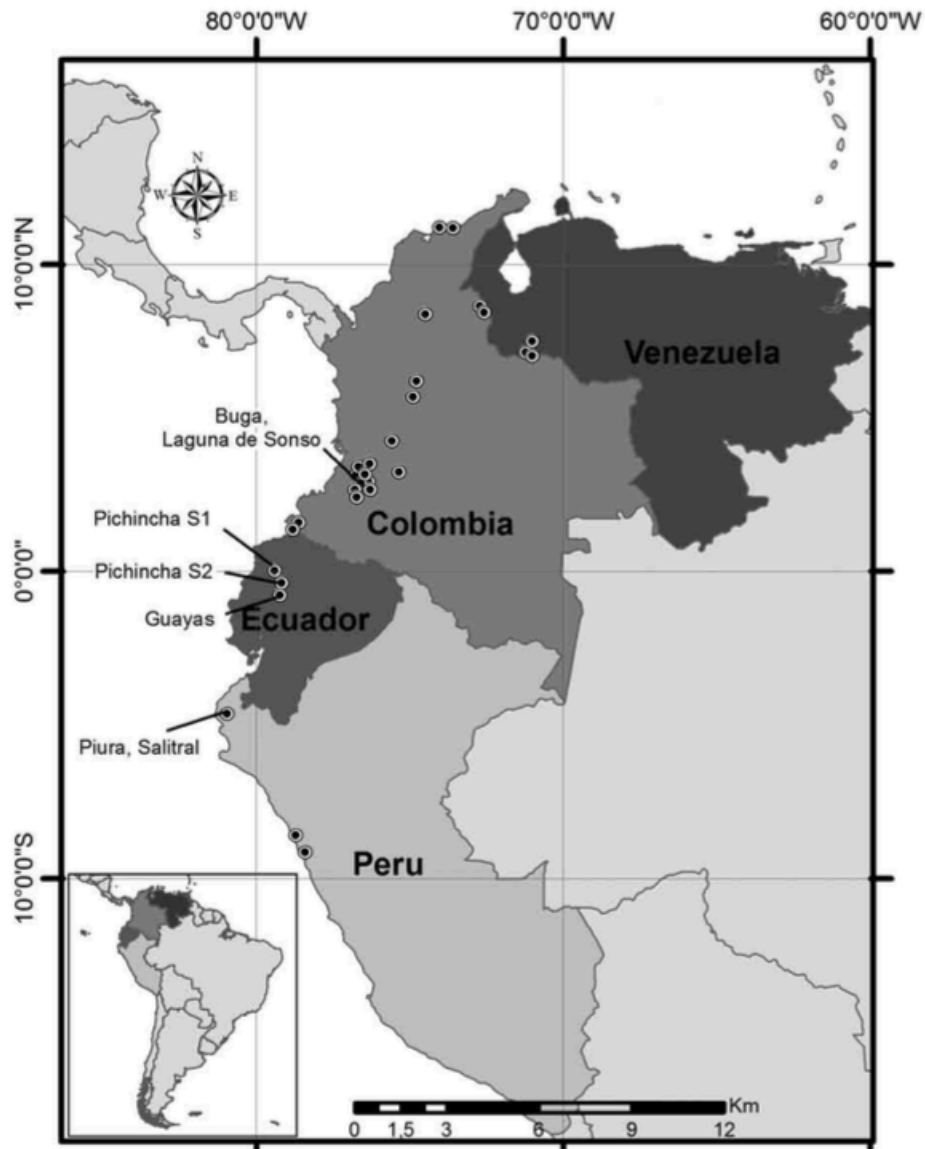
Anexo 2. Ciclo de vida del mosquito *Anopheles*. El ciclo de vida de los mosquitos del género *Anopheles* consiste en cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto. Las primeras tres etapas son acuáticas. En países tropicales, a) los huevos eclosionan dentro de tres días. Los huevos de *Anopheles* tienen forma de barco y poseen una especie de flotadores a los lados, una característica única y exclusiva del género (Service, 2008). b) La etapa larval dura alrededor de siete días. Las larvas de *Anopheles* respiran a través de espirales ubicadas en el octavo segmento abdominal por lo cual se posicionan para que su cuerpo se mantenga paralelo a la superficie del agua (CDC, 2015c). c) El estadio pupal en *Anopheles* dura entre 2 a 3 días. Los mosquitos machos habitualmente emergen antes que las hembras (Black y Kondratieff, 2004). d) El adulto emergente vivirá entre dos semanas y un mes. La cuarta etapa es cuando el mosquito hembra *Anopheles* actúa como vector de la malaria. En *Anopheles* los palpos son tan largos como la probóscide, y poseen bloques discretos de escamas negras y blancas en las alas. e) En *Anopheles*, tanto el macho como la hembra descansan con sus abdomenes sobresaliendo en el aire. (Black y Kondratieff, 2004) (Figura modificada de CDC, 2015).



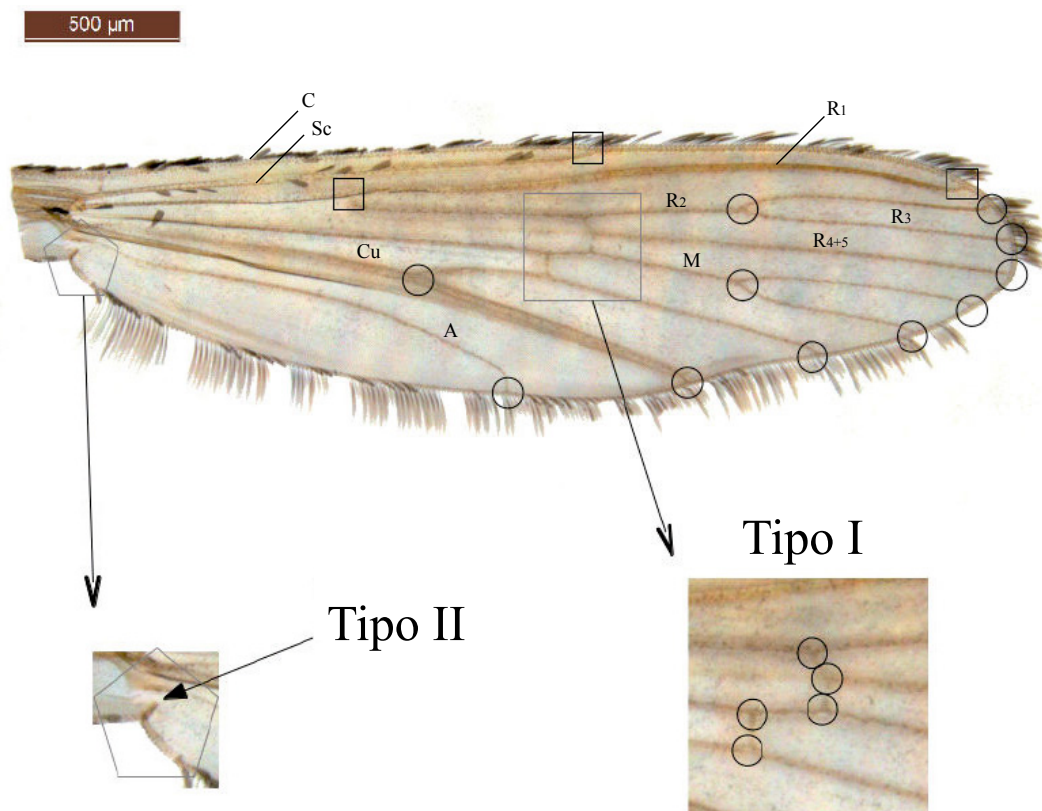
Anexo 3. Filogenia molecular de todos los anofelinos. El clado *Anophelinae* lleva ~100 millones de años de evolución desde su divergencia. Los grupos de mayor relevancia en la transmisión de la malaria son: *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* y *Nyssorhynchus* (Neafsey, 2015).



Anexo 4. Mapa predictivo del rango de distribución geográfica de *Anopheles albimanus* en América. De acuerdo con las predicciones de Sinka et al. (2010) esta especie se encuentra distribuida desde el sur de México hasta el norte de Perú.



Anexo 5. Distribución geográfica conocida de *Anopheles calderoni*. Según la revisión de González et al. (2010), esta especie se encuentra distribuida desde el norte de Venezuela hasta el norte de Perú.



Anexo 6. Representación del nombre de las venas y los tipos de *landmarks* digitalizados en un ala de *Anopheles*. Las alas poseen ocho venas longitudinales: la vena Costa (C), Subcosta (Sc), las Radiales (R1, R2+3, R4+5), la Medial (M), la Cubital (Cu), y la Anal (A) (González y Carrejo, 2009). Existen tres clases de puntos de referencia: los *landmarks*, *semilandmarks* y *pseudolandmarks* (Bookstein, 1991). Los *landmarks* se diferencian en tres categorías: Tipo I son los centros de los círculos o cuadrados; los círculos indican puntos de referencia fácilmente reconocibles, los cuadrados pueden ser difíciles de localizar de un individuo a otro y no se usan con frecuencia. Tipo II son la parte superior de la curva que hace la transición entre el alula y el margen posterior del ala. Tipo III son puntos extremos, cuya posición se relacionan con otros landmarks (Harbach, 2013).