

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

---

**GENÉTICA DE POBLACIONES DEL COMPLEJO *Culex pipiens*  
(DIPTERA: *CULICIDAE*) EN LA CIUDAD DE MÉXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**P R E S E N T A E L**

**M. en C. ÁLVARO DÍAZ BADILLO**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO**

**DRA. MINERVA CAMACHO NUEZ**

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

### ASESORES DE TESIS:

Dr. Barry Beaty. (Colorado State University)

Dr. William Black IV. (Colorado State University)

Dr. Gary Clark. (United States Department of Agriculture)

Dr. Ildefonso Fernández Salas. (Universidad Autónoma de Nuevo León)

### LECTORES DE TESIS:

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga.

Dr. José de Jesús Olivares Trejo.

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM y en Laboratorio Uno del Departamento de Genética y Biología Molecular que incluye el Insectario del CINVESTAV-IPN, bajo la Dirección de las Doctoras María de Lourdes Muñoz Moreno y Minerva Camacho Nuez.

Parte de los insumos, viáticos y reactivos ocupados en este trabajo fueron auspiciados por la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno. La colecta e identificación de los mosquitos contó con el apoyo y la asesoría del Maestro Entomólogo Médico Jorge Pascual Martínez Muñoz.

Dedico este trabajo en toda su integridad a la Gran Constelación de Dios y de mis Padres...

... al pasado ... FAMILIA DIAZ BADILLO.

(Abuelas, Abuelos, Tias, Tios, Primas, Primos, Sobrinas, Sobrinos)

... al presente ... ALFONSINA

ARTURO

AUGUSTO

ADRIANA

ALEJANDRO

AURORA

ALFONSO

ANGEL

ANDRES

ALONDRA.

... al futuro ... MARÍA CONCEPCIÓN.

Mi admiración y amor eternos

... a la Sra. María Concepción Morales.

... al Sr. Alfonso Díaz y la Sra. Guadalupe Badillo.

... a Rocío, Adolfo, Rosario, Arturo, Alejandro,

Antonio, Ruth y Roxana.

... al Colibrí Sublime.

... a mi Chiqui Chiqui.

... Familias: Morales Gómez, Zarazua Muñoz, Padilla Viveros, Torres

Sánchez, Bañuelos Barrón, Escoto Hernández, García Nava.

Ustedes fueron, son y serán el motor que me mueve a ser mejor cada día; gracias por su gran apoyo incondicional y emocional, por estar conmigo en las buenas y en las malas; me educan, me aconsejan, me imparten valores para conducirme correctamente y me ofrecen el sabio consejo en el momento oportuno. ¡Dios los bendiga a todos!

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de todo corazón a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por todo el apoyo académico y económico que me brindó.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron al logro de este trabajo.

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno. Quien desinteresadamente dirigió esta tesis y que me enseñó a nadar contra corriente con disciplina y responsabilidad. Claridad de espíritu, valor y entrega desinteresada es lo que aprendí de ella. Mi admiración y respeto por siempre.

M. en C. Jorge Pascual Martínez Muñoz. Por haber despertado en mí el interés por los vectores de enfermedades. Por mostrarme la belleza de los insectos. Por todas sus enseñanzas y su gran paciencia. Te admiro mucho.

Dra. Minerva Camacho Nuez. Por dirigir esta tesis; por su apoyo y mano firme, por haber estado pendiente siempre del desarrollo de los estudiantes del Posgrado en Ciencias Genómicas.

Dra. Esther Orozco Orozco. Por haber confiado en mis capacidades. Por toda su entrega a la creación y dirección del Posgrado en Ciencias Genómicas.

A mis Asesores:

Dr. Barry Beaty. Por todo su conocimiento y su apoyo. Junto con Carol me hicieron sentir parte de la familia.

Dr. William Black IV. Gracias por sus enseñanzas.

Dr. Gary Clark. Por todo el apoyo brindado en el AMCA a los mexicanos, por el "Protocolo" y por todos sus consejos.

Dr. Ildefonso Fernández Salas. Gran amigo, el mejor Entomólogo Médico que conozco. Gracias por su tiempo y su espacio.

Drs. Elisa Irene Azuara Liceaga y José de Jesús Olivares Trejo, por su integridad como personas y sus enormes conocimientos.

A mis Compañeros de Generación:

M. en C. Miguel Palomino Ángeles, Dr. Gerardo Pérez Ramírez, Biol. Gerardo Rodríguez Muñoz, M. en C. Eduardo Flores Soto, Dra. Esther Herrera Aguirre y Dra. Mavil López Casamichana. Por su camarería y sus consejos. Todos ellos con un haz de luz muy especial.

## ÍNDICE

Índice de tablas	4
Índice de Figuras	5
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Antecedentes generales del tema	11
Clasificación taxonómica del genero <i>Culex</i>	11
El complejo <i>Culex pipiens</i>	13
Distribución de <i>Culex quinquefasciatus</i>	15
El complejo <i>Culex pipiens</i> en las áreas de introgresión de genes	15
Estado del arte	16
Diferenciación de los miembros del complejo <i>pipiens</i> por la morfología	16
Genética de poblaciones	19
Mutantes morfológicas	19
Inversiones cromosomales	19
Isoenzimas	19
Satélites	19
Marcadores de ADN	19
Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs)	20
Arbitrarily amplified DNA (RAPD-PCR)	20
Secuenciación nucleotídica	20
Single strand conformation polymorphisms (SSCP)	20
Flujo genético	23
Antecedentes particulares del proyecto	26
Marcadores moleculares en los mosquitos	26
El ADN mitocondrial	27
El ADN ribosomal	29
Espaciadores, intrones y unidades de repetición (microsatélites)	29
Diferenciación molecular por el intrón Ace 2	30
Importancia del continuar el estudio del tema	31
Importancia del estudio en Salud Pública	31
Alimentación Sanguínea de vectores de enfermedades	32

Preocupaciones sobre los vectores de enfermedades en los centros urbanos	34
Arbovirus	34
Encefalitis equina venezolana (EEV)	34
Encefalitis de San Luis (SLE)	35
Fiebre del Virus del Nilo Occidental (WNV)	36
Las filarías	37
Dirofilariasis del gusano del corazón canino	37
Filarías Americana de Bancroft (elefantiasis)	38
Justificación.	39
Hipótesis	40
Objetivos	40
Objetivo general	40
Objetivos particulares	40
Estrategia experimental	41
Metodología	42
Muestreo	42
Área de estudio	44
Colección de Mosquitos e Identificación de Individuos	45
Pruebas morfométricas	48
<i>Morfología del ala Femenina</i>	48
<i>Morfología de la genitalia masculina</i>	49
Aislamiento de ADN a partir de artrópodos individuales	50
Diseño de primers para amplificar regiones específicas en el mADN	50
Establecimiento y corrimiento de las reacciones de PCR para el análisis SSCP	52
Montaje, carga y corrimiento de geles verticales para SSCP	52
Tinción con plata de los geles SSCP	53
El gen de la Acetilcolinesterasa (Ace)	53
Secuenciación de los productos de PCR.	55
Construcción y análisis de secuencias para los estudios de filogenia	55
Resultados	56
Especies de mosquitos recolectados	56
Índice Sifonal en el Cuarto Instar de las Larvas	56
Identificación de los miembros del complejo <i>Culex pipiens</i> en la Ciudad de México por análisis morfológico de las alas de las hembras adultas	63

Identificación de los miembros del complejo <i>Culex pipiens</i> en la Ciudad de México por análisis morfológico de la genitalia masculina	67
Análisis molecular	71
El Gen mitocondrial ND4	71
El gen Nuclear Ace 2	77
Contribución de las lluvias estacionales en la genética de los mosquitos	84
Discusión	85
Conclusiones	89
Referencias bibliográficas	90
Anexos	104
Publicaciones generadas a partir del estudio	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características del ADN mitocondrial	29
Tabla 2. Primers para la amplificación del ADN mitocondrial en mosquitos	51
Tabla 3. Localización geográfica de los cementerios analizados y porcentaje de mosquitos adultos machos obtenidos	57
Tabla 4. Localización geográfica de los cementerios analizados para determinar el valor del Índice Sifonal en larvas de cuarto estadio	60
Tabla 5. Localización geográfica de los cementerios analizados para determinar el valor del Índice de ala en hembras adultas seleccionadas al azar en la Ciudad de México y los sitios usados como controles positivos	66
Tabla 6. Localización geográfica de los cementerios analizados para determinar el valor del Índice DV/D en machos adultos seleccionados al azar en 16 cementerios de la Ciudad de México y 2 sitios usados como controles positivos	68
Tabla 7. Condiciones climáticas de algunos sitios de colecta localizados en los cementerios analizados a fin de determinar la posición morfológica y molecular en machos adultos seleccionados al azar	70
Tabla 8. Distribución haplotípica del gen mitocondrial ND4 en la Ciudad de México	76
Tabla 9. Distribución de los miembros del complejo <i>Culex pipiens</i> e individuos híbridos identificados por la aplicación del marcador molecular Ace 2	79
Tabla 10. Distribución haplotípica del gen nuclear Ace 2 en la Ciudad de México	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de las etapas de la vida del mosquito <i>Cx. quinquefasciatus</i>	12
Figura 2. Clasificación taxonómica de los adultos del complejo <i>Cx. pipiens</i> y <i>Cx. tarsalis</i>	13
Figura 3. Distribución de <i>Cx. (Cx.) pipiens</i> y <i>Cx. (Cx.) quinquefasciatus</i> en el continente americano	14
Figura 4. Estructura de los órganos genitales masculinos de mosquitos adultos de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	17
Figura 5. Estructura de las alas de las hembras adultas	18
Figura 6. Efectos de la deriva génica	24
Figura 7. Efecto de la selección natural	25
Figura 8. ADN mitocondrial de los artrópodos	28
Figura 9. Hábitos alimenticios en el mosquito <i>Culex</i>	33
Figura 10. Proceso de colecta y selección de individuos muestreados	43
Figura 11. Mapa físico de la zona metropolitana de la Ciudad de México	45
Figura 12. Paisajes de los hábitats de los mosquitos en los sitios de recolección	47
Figura 13. Análisis morfométrico del ala de los mosquitos Hembras adultos	48
Figura 14. Aspecto general del falosoma de <i>Cx. quinquefasciatus</i> y la ubicación de los puntos para medir la relación DV/D (radio de distancia entre los brazos dorsal y ventral del edeago)	49
Figura 15. Fragmento Ace 2 de la familia de genes de la acetilcolinesterasa	53
Figura 16. Alineación de secuencias del gen Ace 2	54
Figura 17. Localización geográfica de los sitios de muestreo en cementerios de la Ciudad de México	59
Figura 18. Clave entomológica para la diferenciación de los miembros del complejo <i>Cx. pipiens</i> en la Ciudad de México	61
Figura 19. Ubicación de los sitios de muestreo de mosquitos del complejo <i>Cx. pipiens</i> y las especies detectadas en los cementerios durante el año 2004	62
Figura 20. Valores promedio del Índice Sifonal determinado para 18 sitios colectados representativos de las 16 delegaciones del Distrito Federal más los dos sitios control para las especies estudiadas	63
Figura 21. Guía para el análisis morfométrico de las alas de los mosquitos hembras adultos	65
Figura 22. Análisis morfológico del ala de un mosquito <i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i> , donde se indica la ubicación de los principales puntos de análisis y la ubicación de la celda radial <sub>2</sub> (R <sub>2</sub> ) y la vena radial <sub>2+3</sub> (R <sub>2+3</sub> )	66
Figura 23. Gráfica que muestra los valores promedio del Índice de Ala determinado para 40 hembras adultas, seleccionadas al azar en las 16 delegaciones del Distrito Federal más los dos sitios control para las especies estudiadas	67
Figura 24. Morfotipos de la genitalia masculina de los mosquitos adultos del complejo estudiado	68

Figura 25. Valores promedio del Índice DV/D determinado para 18 sitios colectados representativos de las 16 delegaciones del Distrito Federal más los dos sitios control para las especies estudiadas	69
Figura 26. Extracción de ADN total de mosquitos del complejo <i>Cx. pipiens</i>	72
Figura 27. Amplificación del gen mitocondrial ND 4 en mosquitos del complejo <i>Cx. pipiens</i>	73
Figura 28. SSCP (Polimorfismos de conformación de cadena sencilla) de productos de amplificación del marcador molecular ND4	74
Figura 29. Representación filogenética de los haplotipos encontrados con el gen mitocondrial ND4 en muestras de la Ciudad de México	75
Figura 30. Representación gráfica de las frecuencias haplotípicas para el gen mitocondrial ND4 en la Ciudad de México	76
Figura 31. Amplificación del gen nuclear Ace 2 en mosquitos del complejo <i>Cx. pipiens</i>	78
Figura 32. Amplificación por PCR del gen nuclear Ace 2 a partir de muestras de seis diferentes cementerios durante el temporal de lluvias en 2005	78
Figura 33. Amplificación por PCR del gen Ace 2 a partir de muestras de dos diferentes cementerios en 2005	79
Figura 34. Distribución de mosquitos del complejo <i>Culex pipiens</i> en Ciudad de México	80
Figura 35. Representación gráfica de las frecuencias haplotípicas para el gen nuclear Ace 2 en la Ciudad de México	82
Figura 36. Representación filogenética de los haplotipos encontrados con el gen nuclear Ace 2 en muestras de la Ciudad de México	83

## RESUMEN

Los mosquitos del género *Culex spp* son considerados como los vectores más importantes en la transmisión del Virus del Oeste del Nilo (VON) y otras enfermedades de importancia en el mundo, detectadas en al menos 34 especies de mosquitos en los Estados Unidos. En América del Norte, *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex tarsalis* son vectores competentes para el Virus del Oeste del Nilo, que se considera es enzoótica en los Estados Unidos y también se ha detectado en equinos y aves en muchos estados de de la Republica Mexicana y en seres humanos en el estado de Nuevo León, México. Existe la posibilidad de que el Virus del Oeste del Nilo sea introducido en la Ciudad de México por varios medios, incluyendo los mosquitos infectados en los aviones, las aves migratorias, el transporte terrestre y por los seres humanos infectados. Poco se sabe de la distribución geográfica de los mosquitos del complejo *Culex pipiens* y sus formas híbridas en la Ciudad de México. *Culex pipiens pipiens* se alimentan preferentemente de huéspedes aviares, en *Culex pipiens quinquefasciatus* se ha considerado, históricamente, que tiende a preferir huéspedes mamíferos, y los híbridos de estas dos especies en teoría podrían servir como vectores de puente para transmitir el Virus del Oeste del Nilo de los hospederos aviares hacia los humanos y otros mamíferos. A fin de abordar el potencial de introducción del Virus del Oeste del Nilo en la Ciudad de México, hemos determinado la identidad y la distribución espacial de los mosquitos del complejo *Culex pipiens* y sus híbridos. Se colectaron larvas de mosquitos en 103 sitios a lo largo de la Ciudad de México durante el período 2004-2005, las cuales fueron identificadas como de los géneros *Culex*, *Ochlerotatus* y *Culiseta* a través del análisis morfológico, utilizando claves entomológicas. Dentro del género *Culex*, los especímenes fueron identificados como *Culex tarsalis* o como miembros del complejo *Culex pipiens* (*Cx. pipiens pipiens* o *Cx. pipiens quinquefasciatus*). Los miembros del complejo *Culex pipiens* fueron separados inicialmente en su estadio inmaduro determinando las medidas del sifón; posteriormente se realizó la medición de las alas de las hembras adultas y finalmente se considero la medición de la proporción de los brazos dorsal y ventral (DV/D) de los genitales masculinos. Para corroborar estas determinaciones se considero el uso de cebadores moleculares, mitocondriales (ND4) y nucleares (Ace 2). *Culex pipiens quinquefasciatus* fue la forma más abundante en el estudio. Importantes vectores del Virus del Oeste del Nilo fueron estudiados en el presente trabajo, incluyendo las especies *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* y *Cx. tarsalis*, estos se encuentran presentes en la Ciudad de México y representan un potencial de una epidemia por esta enfermedad. Híbridos de *Cx. p. pipiens* y *Cx. p. quinquefasciatus* también fueron colectados e identificados. La presencia y abundancia de estos vectores competentes de Virus del Oeste del Nilo es una causa de preocupación a nivel de salud pública. Este es el primer estudio realizado al respecto en esta zona geográfica. Comprender la distribución de estos vectores puede ayudar a mejorar las actividades de vigilancia viral y los esfuerzos de control de mosquitos en la Ciudad de México.

## ABSTRACT

*Culex* spp. mosquitoes are considered to be the most important vectors of West Nile virus (WNV) and other sicknesses, detected in at least 34 species of mosquitoes in the United States. In North America, *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens quinquefasciatus*, and *Culex tarsalis* are all competent vectors of WNV, which is considered to be enzootic in the United States and has also been detected in equines and birds in many states of Mexico and in humans in Nuevo Leon. There is potential for WNV to be introduced into Mexico City by various means including infected mosquitoes on airplanes, migrating birds, ground transportation and infected humans. Little is known of the geographic distribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes and hybrids in Mexico City. *Culex pipiens pipiens* preferentially feed on avian hosts; *Culex pipiens quinquefasciatus* have historically been considered to prefer mammalian hosts; and hybrids of these two species could theoretically serve as bridge vectors to transmit WNV from avian hosts to humans and other mammalian hosts. In order to address the potential of WNV being introduced into Mexico City, we have determined the identity and spatial distribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes and their hybrids. Mosquito larvae collected from 103 sites throughout Mexico City during 2004-2005 were identified as *Culex*, *Culiseta* or *Ochlerotatus* by morphological analysis. Within the genus *Culex*, specimens were further identified as *Culex tarsalis* or as belonging to the *Culex pipiens* complex. Members of the *Culex pipiens* complex were separated initially using the Siphonal index on the fourth instars of larva, later we determined the Wing Index in female specimens, finally we made an analysis measuring the ratio of the dorsal and ventral arms (DV/D ratio) of the male genitalia and also by using diagnostic primers designed for the mitochondrial gene ND4 and for nuclear gene *Ace.2*. *Culex pipiens quinquefasciatus* was the most abundant form collected. Important WNV vectors species, *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* and *Cx. tarsalis*, are all present in Mexico City. Hybrids of *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* were also collected and identified. The presence and abundance of these WNV competent vectors is a cause of concern. This is the first report about the *Culex pipiens* complex in Mexico City. Understanding the distribution of these vectors can help to improve viral surveillance activities and mosquito control efforts in Mexico City.

## **INTRODUCCIÓN**

Las variaciones en el medio ambiente, y particularmente el clima, poseen un influjo innegable en la aparición, distribución y evolución de las enfermedades infecciosas, y destacadamente en aquéllas transmitidas por vectores. En este contexto actualmente se discuten los cambios que se han observado en los últimos años en relación con ciertas arbovirosis (enfermedades virales transmitidas por picaduras de artrópodos), y el posible papel que ha jugado el cambio climático en estas variaciones. Para el desarrollo de esta tesis hemos seleccionado como modelo una de las arbovirosis de mayor importancia en el mundo animal: la fiebre/encefalitis por virus del Oeste del Nilo. Particularmente se trata de una infección que ha dado un salto cualitativo importante en los últimos 10 años, considerándose una enfermedad emergente en diversas partes del mundo. La fiebre/encefalitis por VON afecta a animales silvestres (aves), especies domésticas (equinos) y al hombre, por lo que, además de sus repercusiones económicas, su carácter zoonótico (cualquier enfermedad que puede transmitirse de animales a seres humanos) le confiere gran importancia desde el punto de vista de la salud pública. El virus del Oeste del Nilo se ha expandido en los últimos 10 años sobre amplias zonas del mundo, particularmente en América, donde apareció por primera vez en 1999 extendiéndose desde entonces por el continente americano de forma incesante, produciendo una severa epidemia de consecuencias desastrosas para la salud pública, la fauna silvestre y la ganadería. En Europa este virus es conocido desde hace años, pero es a partir de finales de los años 90 del siglo pasado cuando su incidencia ha aumentado sensiblemente. (Roehrig et. al., 2002) La primera pregunta que nos surgió fue: ¿Qué relación guardan los fenómenos de cambio climático, los vectores de enfermedades infecciosas y el incremento actual que tienen estas enfermedades en México y en el mundo?

Se designa como arbovirus a un conjunto de virus pertenecientes a diferentes familias cuyo ciclo natural incluye como hospedero intermediario a un artrópodo (animales invertebrados que tienen un exoesqueleto articulado de quitina). Entre los arbovirus más importantes en el campo de la investigación se encuentran aquellos que pueden infectar al humano ocasionando cuadros clínicos de fiebre, meningitis y/o encefalitis. Destacan como los más importantes los virus del Oeste del Nilo (VON) y el virus de la Encefalitis de St. Louis (VES, de la familia *Flaviviridae*) y el virus La Crosse (VLC, *Bunyaviridae*). Estos virus se transmiten por mosquitos y, su ciclo de mantenimiento y reservorio en la naturaleza aun es complejo, ya que intervienen no sólo los mosquitos como vectores, sino también otros factores del medio ambiente, como por ejemplo una gran variedad de aves (migratorias principalmente), y en algunos casos mamíferos, que funcionan como reservorios amplificadores del virus. El Virus del Oeste del Nilo (VON) puede producir diversos cuadros clínicos, como síndrome febril, meningitis y/o encefalitis y parálisis flácida aguda y se ha asociado a largo plazo con problemas de memoria, dolor en extremidades y articulaciones y fatiga. (Carson et. al., 2006). En consecuencia, es considerado como un problema emergente de salud pública humana en todo el mundo. El VON se mantiene en la naturaleza en poblaciones animales (aves principalmente) en las cuales es transmitido por diferentes especies de mosquitos (del género *Culex* principalmente). Aun cuando la mayoría de las infecciones son asintomáticas (Sevjar et. al., 2003), se sabe que el 20 % de los individuos infectados desarrollan síndrome febril y menos

del 1 % desarrollan la enfermedad a nivel neurológico (Nash et. al., 2001). Se conoce que este virus se aisló inicialmente en Uganda (Smithburn et. al., 1940) y es un virus envuelto con genoma de RNA de cadena sencilla que pertenece a la familia *Flaviviridae* (Petersen y Marfin, 2002). El virus del Oeste del Nilo se ha asociado a epidemias en África, Asia, Europa y recientemente en Norteamérica, donde el primer brote ocurrió en la ciudad de Nueva York en 1999, provocando defunciones en humanos y animales, siendo la primera vez que se detectó este virus en el hemisferio occidental (Nash et. al., 2001). A partir de este brote, la distribución geográfica del virus se ha ampliado a todos los estados continentales de Estados Unidos (CDC, 2007), considerándose que las aves migratorias son los hospederos introductorios del virus a nuevas áreas del continente americano, infectando a mosquitos ornitofílicos y transmitiéndose desde éstos a otras especies, incluyendo al humano. (Rappole et. al., 2000).

La epidemiología del VON en México difiere de la presentada en otros países en donde ha tenido un impacto menor en las poblaciones de aves silvestres y otros vertebrados. En nuestro país se ha aislado al virus en mosquitos y se han confirmado siete casos de enfermedad en humanos (Ramos y Falcon-Lezama, 2005), aunado a que se han detectado anticuerpos contra el VON en aves y animales domésticos en diferentes regiones del país como Chiapas, Yucatán y Coahuila (Ulloa et. al., 2003, Blitvich et. al., 2003, Farfan-Ale et. al., 2004). El complicado diagnóstico diferencial de estas infecciones, aunado a que no se tienen disponibles las pruebas de diagnóstico rutinario excepto para fines de investigación, sugiere la posibilidad de que exista un sub-registro de casos no reportados, o bien que haya reacción cruzada con otros *flavivirus*. En relación a la incidencia de otros virus transmitidos por mosquitos, el Virus de la Encefalitis de St. Louis y el Virus La Crosse son virus que pueden producir también diversos cuadros clínicos en humanos, incluyendo síndrome febril, meningitis y/o meningoencefalitis, aun cuando no producen enfermedad o síntoma en otras especies de vertebrados, como perros y gatos por ejemplo. Aun cuando la incidencia de la enfermedad en humanos es aparentemente baja, constituyen aún un problema importante de salud pública, ya que pueden resultar fatales o dejar secuelas neurológicas importantes en el individuo infectado. Esto conlleva un fuerte impacto en la calidad de vida no sólo de los pacientes, sino también de las personas en su entorno, incluso a nivel económico y laboral.

En nuestro país las pruebas de diagnóstico para estos virus no se encuentran disponibles de manera rutinaria debido a la falta de planeación y de presupuesto. La afinidad alimenticia de los vectores de estas enfermedades es un factor importante en el ciclo de transmisión de estos virus, debido a que las epidemias se han relacionado con cambios estacionales que presentan los vectores en cuanto a su preferencia hacia las fuentes de alimentación. Así, el impacto económico y social de las enfermedades causadas por estos virus justifica la importancia de la vigilancia y control de los **mosquitos vectores**, así como la identificación del rango de los hospederos y la presencia de infección por estos virus. Esto permitirá a corto y mediano plazo establecer el riesgo potencial de una epidemia para los humanos como para aquellos animales que presenten la enfermedad.

## Antecedentes generales del tema

### *Clasificación taxonómica del genero Culex*

El género *Culex*, está constituido por mosquitos hematófagos de la familia Culicidae; como ya se menciono, muchas de sus especies actúan como vectores de importantes enfermedades, como el VON, la filariasis, las encefalitis virales (japonesa, equina venezolana y San Luis) y la malaria aviar. Existen una gran variedad de especies de *Culex*. A grandes rasgos estos mosquitos son de tamaño medio, con cuerpo alargado y castaño, con escamas oscuras y claras. Antenas filiformes en hembras y plumosas en machos. Patas oscuras. Abdomen marrón oscuro con manchas claras en la zona dorsal y claro con manchas oscuras en la ventral, el mosquito adulto puede medir de 4 a 10 mm. Su ciclo consta de 4 estadios separados por mudas. La duración del estadio larvario está muy influida por la temperatura, llegando a durar de 5 a 7 días en verano y mucho más a temperaturas bajas. (Ver Figura 1). La hembra pone sus huevos pegados formando grupos de 50 a 200 llamados navículas, estos constituyen un racimo, sobre la superficie del agua. Los sitios de incubación pueden ser cualquier lugar donde se acumule agua como, por ejemplo, botes, neumáticos de coche, depósitos de agua de lluvia o charcos. Las larvas se desarrollan en aguas con temperaturas superiores a los 15° C, aunque pueden soportar temperaturas inferiores; prefieren las aguas sucias; las hembras adultas pican a mamíferos o aves para obtener sangre y aportar proteínas a los huevos, llegando a recorrer kilómetros para ello y luego pasan el invierno ya fecundadas en bodegas o lugares húmedos similares.

*Culex* es el mosquito más común en el ambiente humano. Se cría tanto en recipientes artificiales como en lagos, arroyos, pantanos, etc., siempre en las zonas de menor movimiento del agua y preferentemente sombreadas. Se han colectado de manera sorprendente en aguas con materia orgánica y detritus. Para la clasificación taxonómica de los adultos se toma en cuenta la presencia de una antena casi del tamaño de la proboscis; el segundo segmento de la antena es corto en ambos sexos; la antena de los machos casi siempre es plumosa; los mosquitos son de color uniforme; los palpos de la hembra son de no más de un cuarto de la longitud de la trompa, muy cortos; si los palpos del macho son largos, siempre son delgados, con las dos últimas articulaciones vueltas hacia arriba; los ojos son contiguos o tocándose por encima de la antena; álula (estructura en el ala que contiene de entre 3 a 5 pelos) muestra franja de pelos; con pelos en la primera vena del ala; la vena anal llega mas allá de la bifurcación de la vena cubital; la segunda célula submarginal es del tamaño del peciolo o mayor que él; la membrana del ala muestra microtiquia (micropelos); las escamas del ala generalmente son de color oscuro; escudillo trilobado; las uñas de la hembra son simples; postnoto (segmento esclerosado) sin pelos; con las escamas del escudete siempre estrechas, y los mosquitos son de tamaño regular, como ya se indico. (Ver figura 2). (Clements, 1992-1999., Vinogradova, 2000). La clasificación taxonómica detallada del complejo se describe a continuación:

Reino Animalia (Animales)  
Fila Arthropoda (artrópodos)  
Clase Insecta (Insectos)  
Orden Diptera (moscas)  
Taxón –indefinido- ("Nematocera" (No Braquicera))  
Infraorden Culicomorfa  
Familia Culicidae (mosquitos)  
Género *Culex*  
Especie *quinquefasciatus* (Mosquito sureño de las casas)  
Especie *pipiens* (Mosquito norteño de las casas)  
Especie *tarsalis* (Mosquito común de las casas)

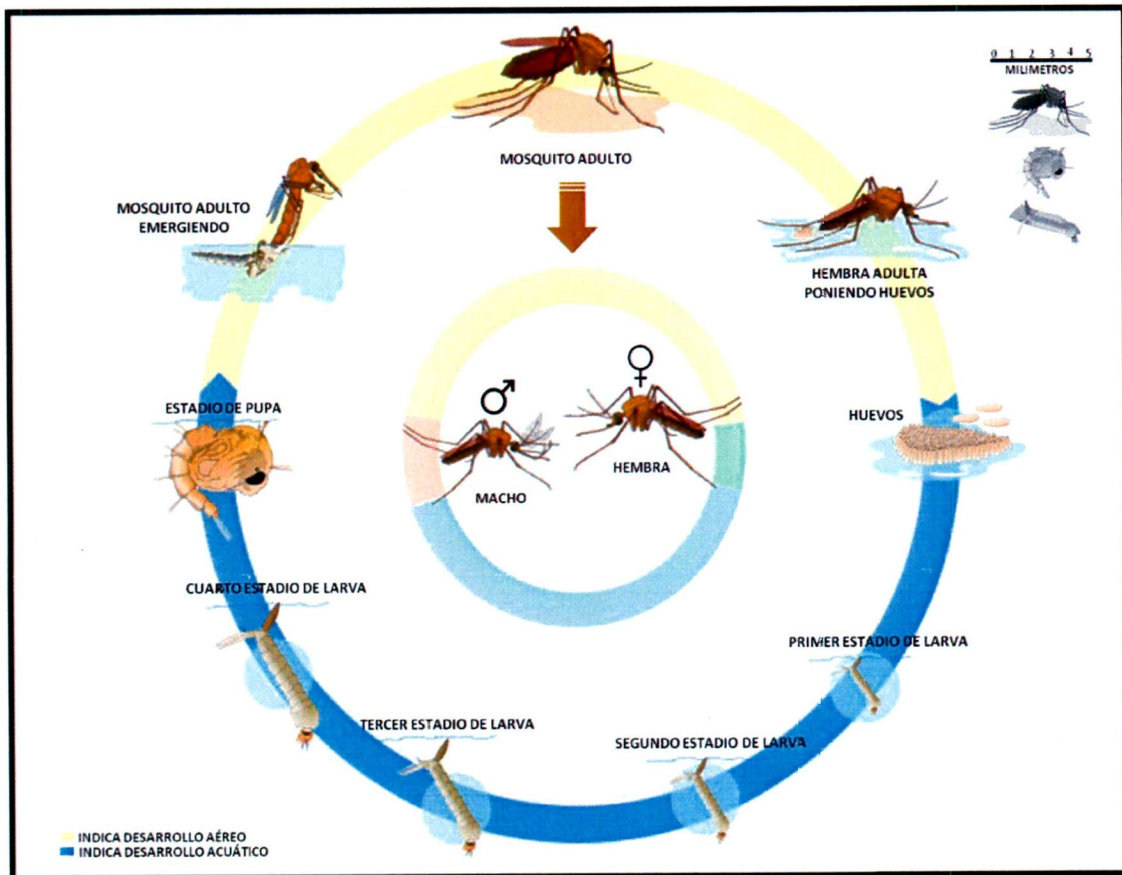


Figura 1. Imágenes de las etapas de la vida del mosquito *Cx. quinquefasciatus*. El desarrollo inicia con la oviposición de la hembra adulta, 4 estadios larvales, pupa, y culmina con la emergencia de un mosquito adulto que se alimenta del néctar de las flores y los frutos. Adicionalmente las hembras ingieren sangre para poder procrear a los huevecillos.

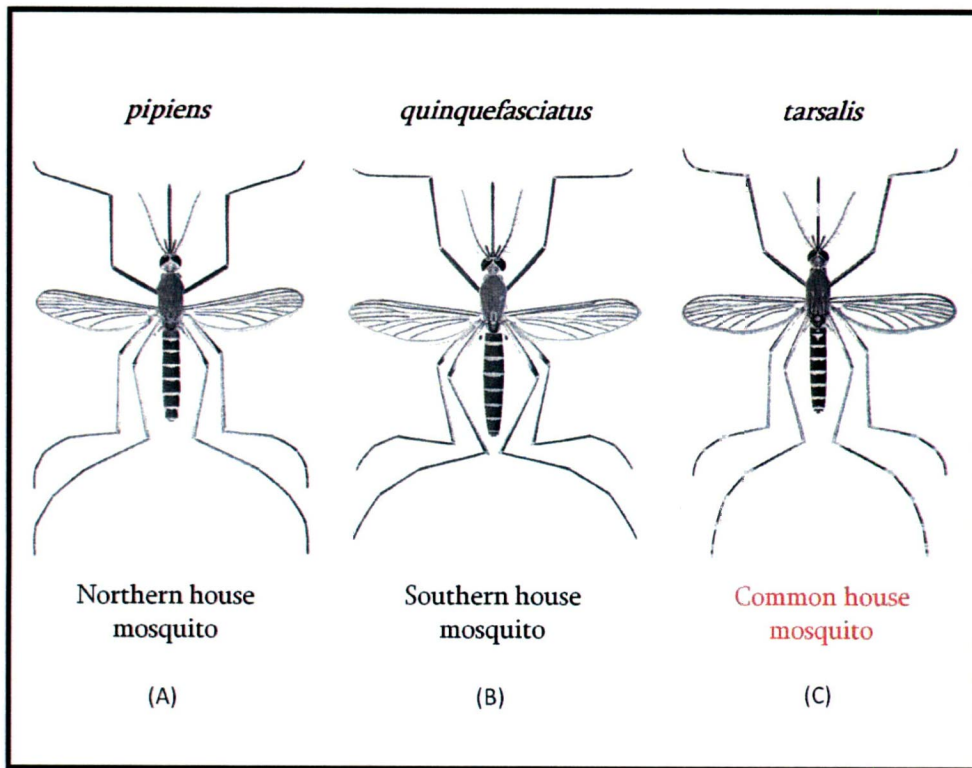


Figura 2. Clasificación taxonómica de los adultos del complejo *Cx. pipiens* y *Cx. tarsalis*. A) *Cx. pipiens*, B) *Cx. quinquefasciatus*, C) *Cx. tarsalis*.

### El complejo *Culex pipiens*

Los miembros del complejo *Culex pipiens* comprenden a las especies *Cx. pipiens pipiens* Linnaeus 1758, *Cx. pipiens f. molestus* Forskal 1785, *Cx. pipiens quinquefasciatus* Say 1823, *Cx. pipiens pallens* Coquillett 1898 y *Cx. australicus* Dobrotworsky & Drummond 1953, (Smith y Fonseca, 2004). El *Cx. p. f. molestus* se considera una variante de *Cx. p. pipiens*, que se encuentra en las zonas templadas, junto con este último. Estas dos formas tienen diferencias fisiológicas, conductuales y epidemiológicas y en las zonas de simpatria (concordancia geográfica en la presencia de individuos, poblaciones o especies distintas), se someten a procesos de introgresión de genes (movimiento de genes de una especie a otra a consecuencia de un proceso de hibridación interespecífica seguido de retrocruzamiento). (Bahnck y Fonseca, 2006). El *Cx. australicus* ha restringido su distribución en Australia y *Cx. p. pallens* se ha producido en una zona de hibridación con *Cx. pipiens*, en países cercanos a Corea del Norte (Smith y Fonseca, 2004). La especie *Cx. torrentium* Martini 1925 y *Cx. pervigilans* Von Bergroth 1889 son morfológicamente muy similares a los miembros del complejo *Cx. pipiens*, pero no pertenecen a este subgrupo. *Culex torrentium* está presente en simpatria con *Cx. pipiens* en toda Europa y en algunas partes de Asia (Service, 1968). *Culex pervigilans* ha sido reportado en Nueva Zelanda y las islas vecinas como una especie de distribución cerrada y que se desarrollan en paralelo con *Cx. quinquefasciatus* (Belkin, 1962). *Culex pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* poseen una distribución geográfica en zonas

templadas tropicales y ecuatoriales, respectivamente. Y desde luego esto en función de la distribución y dispersión que acompaña a la actividades y la convivencia humana. De acuerdo con Fonseca y col. (2004), en las zonas urbanas de norteamérica están presentes las especies *Cx. pipiens* por encima de los 39° N, *Cx. quinquefasciatus* por debajo de los 36° N y los híbridos de estos entre 35° y 38° N. (Ver figura 3). La literatura reporta la existencia de zonas de hibridación entre estas dos especies en América del Norte, Argentina y Madagascar (Urbanelli et. al. 1997; Humeres et. al. 1998).

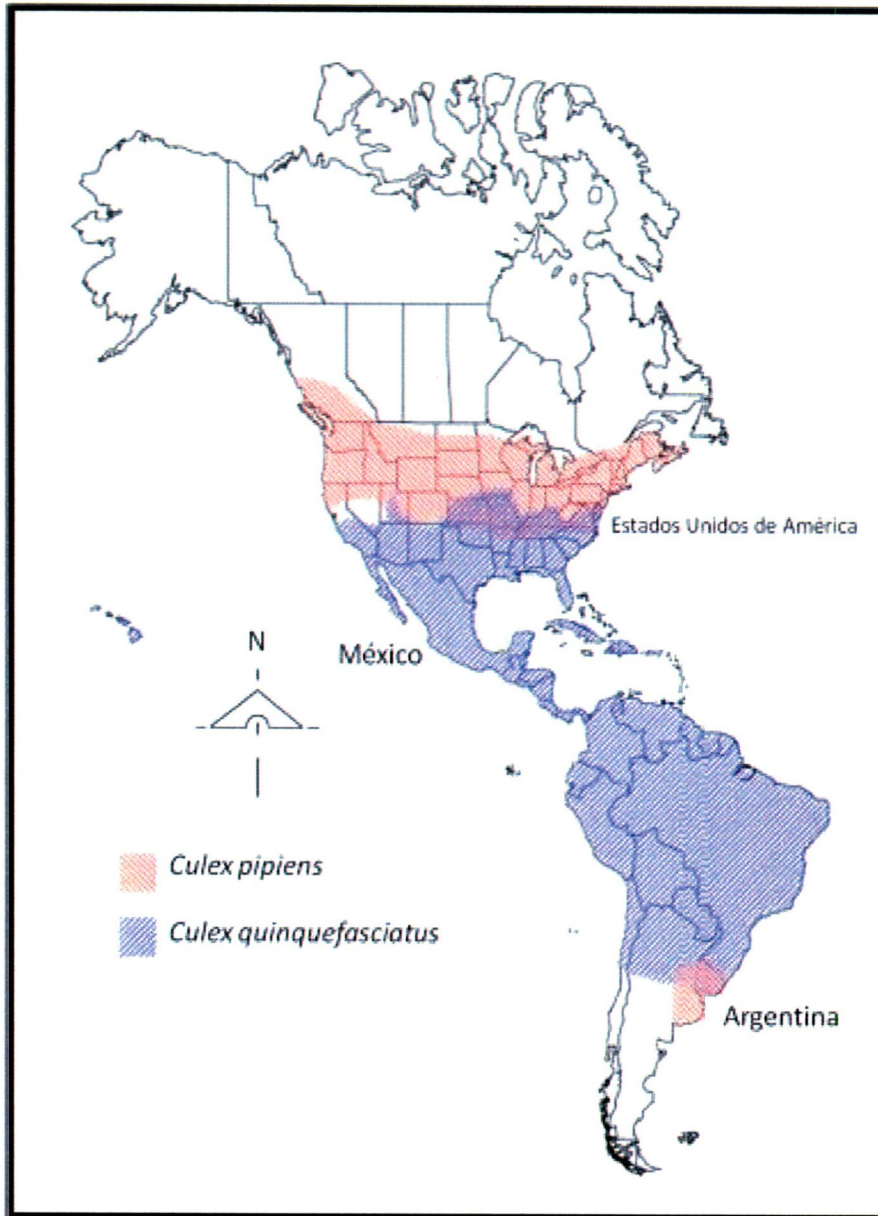


Figura 3. Distribución de *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* en el continente americano. (Adaptada de Barr, 1957., Darsie Jr. y Ward, 2005., y Smith y Fonseca, 2004).

### *Distribución de Culex quinquefasciatus*

Este mosquito es conocido como el mosquito tropical o mosquito sureño (Southern House Mosquito). *Cx. quinquefasciatus* tiene una distribución expansiva en zonas urbanizadas entre las franjas ecuatoriales y tropicales de todo el mundo (Barr, 1957; Belkin, 1962), Incluyendo a México (Martini, 1935., Martínez, 1952., y Vargas, 1956). Se ha documentado que los distintos estadios de esta especie tienen mayor rendimiento en entornos con una exposición limitada al cambio climático brusco, ya que muestran una alta resistencia al frío (Leather et. al. 1995; Mori et. al. 2007). (Ver figuras 1 y 3).

En México, no se había informado sobre la presencia de otro miembro del complejo pipiens. Sin embargo, hay estudios aislados que indican la presencia de *Cx. pipiens pipiens* en el país. (CENAVECE, 2005).

### *El complejo Culex pipiens en las áreas de introgresión de genes*

En ecología y en biología, se habla de introgresión cuando se presenta el fenómeno de movilidad de genes de una especie a otra a consecuencia de un proceso de hibridación interespecífica que generalmente esta seguido por el retrocruzamiento de las mismas. El aislamiento reproductivo es uno de los criterios más importantes para determinar el estado taxonómico de los seres vivos. Naturalmente, los estudios sobre la hibridación son de vital importancia en las estimaciones del grado de proximidad genética en el complejo *Cx. pipiens*. La capacidad de entrecruzamiento dentro del complejo *Cx. pipiens* se ha estudiado en detalle desde la década de los 50's. Se utilizaron 18 cepas de laboratorio de *Cx. pipiens* de diferente origen geográfico de América del Norte, Europa, África, India y Malasia. Como resultado, los tres principales tipos de capacidad de cruzamiento fueron establecidos: compatibilidad bidireccional (fertilidad), incompatibilidad bidireccional (esterilidad), y incompatibilidad unidireccional. Algunos cruces fueron totalmente infructuosos (sólo los huevecillos sin fecundar fueron establecidos en la cruce); en otros cruces, la embriogénesis fue completada, pero sólo en unas pocas larvas; y el resto de cruces resultaron normales con progenies fértiles. Algunos experimentos especiales mostraron que el tipo de cruce es determinado por factores extracromosómicos, por lo que a este fenómeno se le denominó como incompatibilidad citoplasmática. (Vinogradova, 2000).

Dobrotworsky (1967) ha revisado el proceso de hibridación entre los miembros del complejo *Culex pipiens*; observo algunas de las dificultades que surgen en la interpretación de las cruces de laboratorio con miembros del complejo *Cx. p. pipiens*, en la mayoría de los casos las cepas utilizadas no poseían todas las características biológicas atribuidas a la típica colonia de *Cx. p. pipiens*, como son: anautogenia (en la mayoría de los mosquitos y en muchos dípteros hematófagos, es la capacidad de la hembra de cumplir varios ciclos gonadotróficos y en cada uno de ellos madurar y oviponer luego de una ingesta sanguínea), eurigamia (requerimiento que tienen los mosquitos para entrecruzarse en espacios grandes, como la selva o el bosque, ya que la enjambrazón de machos es una necesidad), heterodinamia (desarrollo con hibernación del adulto) y ornitofilia (preferencia de las hembras por el consumo de sangre de aves).

En general, los organismos híbridos interespecíficos son comúnmente estériles (Burke y Arnold, 2001). Una explicación es que los pares de cromosomas, que consisten en un cromosoma de cada especie no son segregados regularmente en la meiosis, y para desarrollar una nueva especie biológica la esterilidad se debe superar. Un mecanismo favorable en los insectos es la poliploidia (Hoy, 2003). En este caso, si el número de cromosomas se duplican, cada par en la meiosis contiene dos cromosomas de cada especie, por lo que la segregación es restaurada de forma regular y más rápidamente (Ridley, 2006). Otro mecanismo para el éxito evolutivo de una población híbrida es la introgresión, donde los individuos híbridos retrocruzan con los padres. Si los híbridos y las cruces de los padres, ocurren durante cierto número de generaciones, la población híbrida tiende a constituir una mezcla compleja de genes de los padres. Esto convierte a la población, evolutiva y reproductivamente hablando, capaz para el desarrollo de nuevas especies (Ridley, 2006). Por lo tanto, las regiones de intergradación son áreas de hibridación con alta presión selectiva. El ejemplo clásico es América del Norte, donde la banda híbrida se extiende desde los 35° hasta los 38 ° de latitud norte (Fonseca et. al. 2004); en América del Sur, probablemente ocurren los procesos de hibridación a lo largo de la banda latitudinal subtropical-templado, pero hay pocos estudios al respecto. Las regiones de América del Sur cercanas de esta franja abarcan el extremo sur de Brasil, Uruguay y Argentina. Almirón y col. (1995) reportaron la presencia de *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* e híbridos entre los 32° y los 38 ° de latitud Sur, siendo esta última graduación la más próxima a Buenos Aires, Argentina. En los estudios realizados por Almirón y col. (1995) se detalla la diferenciación de los miembros del complejo *Cx. pipiens* y fue hecha por morfología de los genitales de los adultos machos, con la observación de las medidas de los radios de DV/D de los brazos dorsales y ventrales del edeago (órgano masculino que se utiliza para depositar el esperma y no como un órgano copulativo) y no del falosoma (el mesosoma o falosoma es una estructura quitinosa en forma de tubo que rodea al pene o edeago, está situada ventralmente al proctíger, sostenida por estructuras de soporte, placas basales y parámetros).

## Estado del arte

### *Diferenciación de los miembros del complejo pipiens por la morfología*

Taxonómicamente las especies de estos mosquitos son difíciles de separar de forma fiable, concretamente las hembras o estadios larvarios. Los machos pueden ser separados por estructuras de los genitales masculinos. En el caso de *Cx. quinquefasciatus* los brazos dorsales se extienden en forma paralela que terminan en un punto reducido. Los brazos ventrales se ensanchan y están claramente separados de la parte terminal de los brazos dorsales en su intersección. Esta distancia es conocida como la medición DV. En *Cx. pipiens* los brazos dorsales también se ensanchan lateralmente a una punta roma donde hay una superposición de las puntas de los brazos ventrales, así que no hay prácticamente ninguna medida de DV. Los híbridos muestran una condición intermedia (Figura 4 B). Uno de los parámetros más utilizados para el diagnóstico morfométrico de los adultos machos del complejo *Culex* es por la morfología interna

de la relación entre estas distancias D y DV que separan los brazos dorsales y ventrales del edeago, no del falosoma de la genitalia masculina, como se muestra en la figura 4 F-G. Las mediciones de radio de DV/D de los brazos dorsales del falosoma en los genitales de los adultos machos, de los miembros del complejo *Cx. pipiens* ya han sido revisadas previamente junto con técnicas moleculares para la identificación de las especies (Sanogo et. al. 2008). Los resultados muestran que las diferencias morfológicas en los órganos genitales masculinos están más relacionadas con el origen geográfico de la población y las variaciones estacionales y de temperatura, que por la determinación genética de los taxones dentro de los subgrupos. Estos datos son aún más importantes en el análisis de una población híbrida.

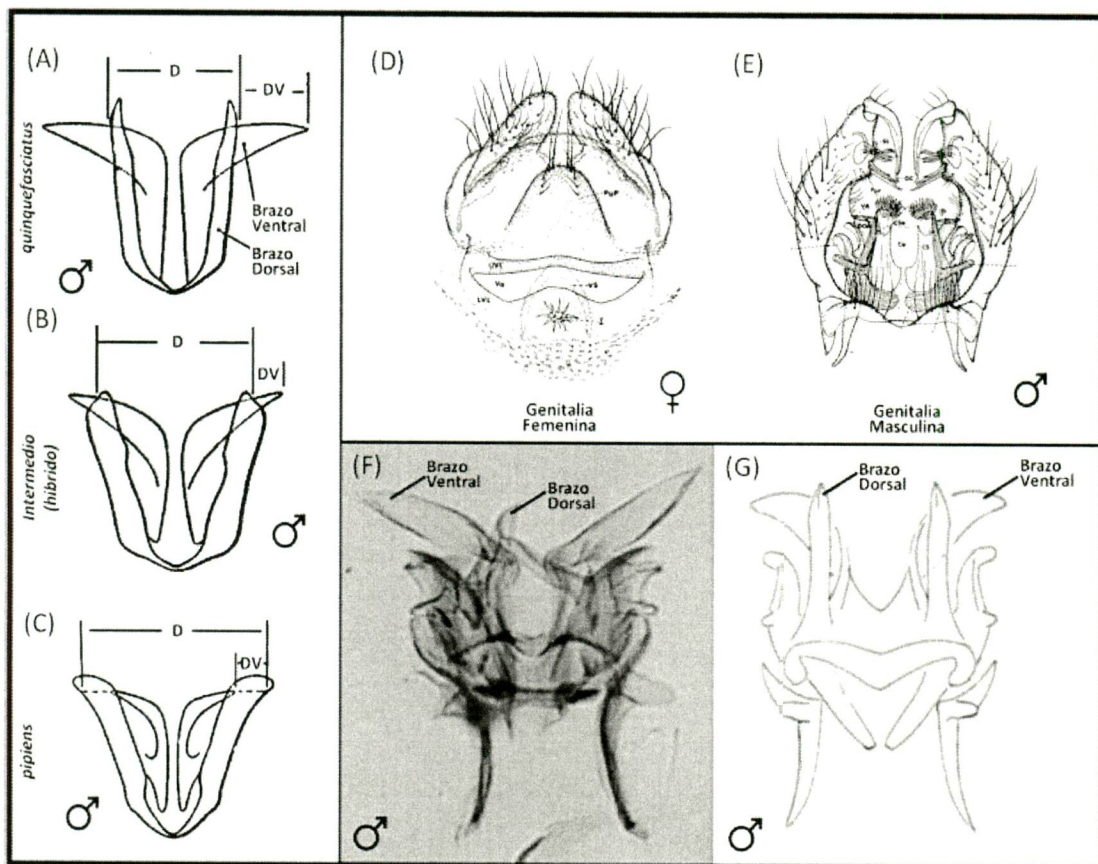


Figura 4. Estructura de los órganos genitales masculinos de mosquitos adultos de *Cx. quinquefasciatus*. A-C, medidas tomadas de los brazos dorsal y ventral de los genitales masculinos para las especies *quinquefasciatus*, híbridos y *pipiens* del complejo *Cx. pipiens*. D y E muestran la genitalia femenina y masculina respectivamente. F corresponde al montaje del edeago (parte externa más esclerosada y retráctil del falo, en cuya extremidad se abre el gonoporo), y G a la representación gráfica del mismo.

La separación de las larvas generalmente no es confiable, aunque el sifón de *Cx. quinquefasciatus* suele estar más inflado basalmente que *Cx. pipiens*, este tiende a ser más delgado y menos afilado en el ápice. En la hembra hay caracteres abdominales y en el ala que son útiles en la identificación de especies. El carácter del ala consiste en la relación entre la longitud de la región celular  $R_2$  dividida por la longitud de su pecíolo. Para *quinquefasciatus*  $R_{2+3}$  es generalmente más largo y la región celular  $R_2$  es más corta que en *pipiens*. Linam y Nielsen (1962) estudiaron esta relación. (Ver figura 5). Se examinaron 95 hembras de *pipiens*, de las cuales 9 eran de fuera de los Estados Unidos y 58 especímenes de *quinquefasciatus*, de los cuales 12 provenían de fuera de los Estados Unidos. Sus resultados indicaron que el 81% de los especímenes *quinquefasciatus* tenían una relación del ala entre 2.6 y 3.6, con un 90% por debajo de 3.6. Para *pipiens* casi el 95% tenían relaciones de ala por encima de 3.6. Linam y Nielsen (1962) también examinaron las bandas abdominales de todos estos especímenes en los tergitos abdominales (parte superior de los segmentos) de los segmentos III y IV. 91 de 95 muestras de *pipiens* tenían bandas basales ininterrumpidas que se extendían hasta el borde lateral. En contraste, 56 de 58 muestras de *quinquefasciatus* tenían las bandas laterales rotas o se estrechaban hacia los tergitos III y IV.

La elaboración de claves taxonómicas realizadas por Forattini, y publicadas en 2002, describen diferencias morfométricas en los puntos del ala de las hembras adultas, con la participación dicotómica de la vena subcostal (Sc), costal (C) y radial 2+3 ( $R_{2+3}$ ) entre las subespecies *pipiens* y *quinquefasciatus* (Ver figura 5).

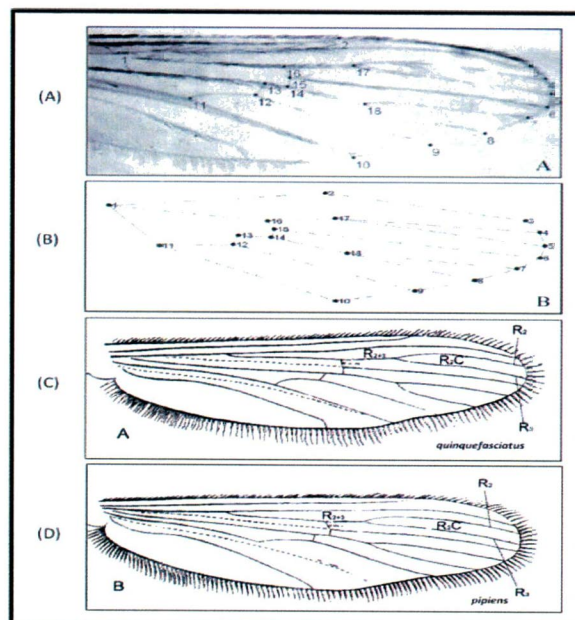


Figura 5. Estructura de las alas de las hembras adultas. Las medidas de las venas alares  $R_2$  y  $R_{2+3}$  presentan diferencias significativas. A y B, muestran los puntos principales de análisis al realizar una evaluación morfológica de las alas. C, representa el análisis de las venas alares en *Cx. quinquefasciatus*, en D, de *Cx. pipiens*. Los individuos híbridos tienen medidas intermedias.  $R_{2+3}$ , vena radial del pecíolo,  $R_2$ , vena radial 2;  $R_3$  vena radial 3;  $R_2C$ , celda radial 2.

Estudios de Humeres y col. (1998) y de Linam y Nielsen (1962) encontraron diferencias significativas en las mediciones de radio de las venas alares  $R_2$  y  $R_{2+3}$  entre estas dos especies, determinando que los individuos híbridos mostraron medidas intermedias. Debido a que estos datos aún no habían sido revisados entre los taxones del subgrupo (en biología, un taxón es un grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados), a nivel molecular; sus datos no mostraron diferencias entre las poblaciones neotropicales y los grupos separados geográficamente.

### *Genética de poblaciones*

La genética de poblaciones es el estudio de la variación genética dentro de las poblaciones naturales y los factores que influyen en esta variación. El entender la variación genética dentro de las poblaciones del mosquito vector del complejo *Culex pipiens* proporciona una base importante para entender su papel en la epidemiología de la enfermedad del Virus del Oeste del Nilo. La genética de poblaciones es un área crítica para el estudio en la biología del artrópodo vector, como lo demostró uno de los primeros estudios realizados con el complejo *Culex pipiens* (Cheng et. al., 1982)

Inicialmente solo mutantes morfológicas estaban disponibles para el análisis, sin embargo, con las técnicas moleculares disponibles actualmente se puede abordar el análisis genético poblacional empleando distintas metodologías:

- A. Mutantes morfológicas. Ya que la estructura de un organismo está controlada por sus genes, los cuales se rigen bajo los procesos de la herencia, los marcadores recesivos no pueden verse en la generación siguiente de individuos heterocigotos.
- B. Inversiones cromosomales. Son cambios cromosómicos en los que un segmento se ha rotado  $180^\circ$  en relación con las regiones que lo flanquean y vuelto a insertar.
- C. Isoenzimas. Mediante su análisis por técnicas electroforéticas se pueden identificar las distintas isoformas presentes en cada individuo que es un indicador de la variación nucleotídica. Sin embargo dos isoenzimas con la misma migración pueden no ser producto de alelos equivalentes por lo que se subestima la variación genética.
- D. Satélites. En los artrópodos el ADN parece ser bastante homogéneo. Normalmente una unidad de repetición muy corta caracteriza más del 90% del satélite, lo cual hace que la determinación de la secuencia sea bastante sencilla. Una particularidad de esta metodología es la existencia de una pronunciada asimetría en la orientación de sus pares de bases en sus dos hebras lo que hace que sus densidades de flotación sean muy diferentes y puedan separarse fácilmente para su secuenciación.
- E. Marcadores de ADN. Los marcadores de ADN constituyen la nueva generación de marcadores moleculares y han solucionado el problema de la carencia de marcadores que tenían las isoenzimas, pues son capaces de generar una cantidad virtualmente infinita de marcadores. Existen varias técnicas para identificar marcadores de ADN, las que se pueden agrupar en tres

categorías: las de hibridación tipo Southern, las de reacción de polimerización en cadena (PCR) y las que combinan PCR o sus productos de ADN con la hibridación tipo Southern. Entre estas destacan:

a. Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). Esta técnica se basa en que una mutación puntual que afecta a un lugar de restricción se identifica por las diferencias existentes entre los fragmentos de restricción. Los polimorfismos de los sitios de restricción se heredan según las leyes de Mendel. En todas las posibles combinaciones apareadas existen cuatro alelos para un marcador de restricción, que se transmiten de forma independiente en cada generación. En este caso se puede estudiar la coheredabilidad de un fenotipo si el marcador RFLP se encuentra próximo en el cromosoma al gen responsable del fenotipo.

b. Arbitrarily Amplified DNA (RAPD-PCR). En esta técnica se emplea un primer de 10 pb (pares de bases) cuya secuencia es arbitraria con un mínimo contenido de GC de 60% para amplificar muchas regiones en el genoma simultáneamente. La amplificación geométrica solo ocurre en aquellas regiones en las cuales al final del extremo 3' de la cara del primer alineado el uno al otro sobre la cadena complementaria no está separada más de 3 kb una de la otra. Estas condiciones sugieren que los sitios de alineamiento pueden ser inversiones repetidas. Los polimorfismos en estas regiones amplificadas se manifiestan típicamente como la presencia o ausencia de una banda entre individuos. La mayoría de las bandas amplificadas se heredan en forma Mendeliana como alelos dominantes. Esto significa que un individuo que manifiesta la banda puede poseer dos copias (homocigoto dominante) o una sola copia (heterocigoto dominante) del alelo amplificado. El individuo homocigoto recesivo no presenta la banda.

F. Secuenciación nucleotídica. La secuencia que se obtiene de un fragmento de ADN. El entendimiento a fondo de la estructura, función y mutación de un fragmento de ADN depende en primera instancia de conocer la estructura primaria de sus nucleótidos; es decir, la secuencia de nucleótidos. Básicamente existen dos métodos para la secuenciación del ADN, uno químico y otro enzimático, desarrollados en la década de los 70 por Maxam&Gilbert y Sanger y colaboradores (Lehninger et. al., 1993). Conocer la secuencia de un segmento de ADN que ya sea clonado u obtenido directamente de un producto de PCR, representa una gran ventaja para su caracterización ya que, a través de la secuencia es posible determinar las diferentes regiones que conforman un gen, deducir la secuencia de aminoácidos para la síntesis de una proteína y la formación de sus estructuras secundarias (Cerezo y Madrid, 1995). Actualmente ya existen procedimientos para secuenciar prácticamente cualquier genoma sin importar su tamaño (Referencias). Resulta de suma importancia mencionar la técnica de SSCP, conformación de polimorfismos de cadena sencilla.

a. Single Strand Conformation Polymorphisms (SSCP). Permite la identificación de ambos alelos. Se analizan variaciones hasta de una sola base en secuencias amplificadas basándose en que la movilidad electroforética de una sola cadena de ADN en un gel no desnaturante que depende tanto de su tamaño como de su forma. Un número de formas estables o conformaciones son formadas cuando el apareamiento de bases secundarias ocurre

entre los nucleótidos en una cadena sencilla de ADN. La longitud, sitio y número de pares de bases dentro de la cadena determinan la estructura secundaria o terciaria de la conformación. Mutaciones puntuales afectan las interacciones dentro de la cadena y pueden por lo tanto cambiar la forma de la molécula y alterar su movilidad durante la electroforesis. Con esta técnica se puede detectar el 99% de las mutaciones puntuales en una molécula de ADN de 100-300 pb de longitud y el 89% de mutaciones puntuales en una molécula de ADN de 300-450 pb de longitud. Solo se requiere contar con alguna información acerca de la secuencia de los segmentos que flanquean la región que se quiere amplificar para el diseño de los primers (Hayashi, 1991).

En genética de poblaciones los cálculos matemáticos de los diferentes parámetros a analizar varían dependiendo del tipo de marcador que se tome como base para el análisis, sin embargo todos ellos consideran como principio fundamental la Ley de Hardy-Weinberg, la cual fue formulada en 1908 de forma independiente por el matemático G.H. Hardy en Inglaterra y por el médico Wilhelm Weinberg en Alemania. Esta ley establece los factores responsables de la estructura genética de las poblaciones y postula que en poblaciones con apareamiento al azar y en ausencia de selección, migración y mutación, el proceso de la herencia no cambia ni las frecuencias alélicas ni las frecuencias genotípicas de un locus dado, por lo tanto, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. La distribución de los alelos en un locus está considerada bajo condiciones ideales que mencionamos en seguida:

1. Las generaciones no se traslapan.
2. El apareamiento es al azar.
3. El tamaño de la población es grande.
4. La migración es mínima.
5. La selección natural no afecta.

Cuando se utilizan marcadores mitocondriales para el análisis genético poblacional algunos de los parámetros importantes que se determinan son las frecuencias haplotípicas, la variabilidad genética, la tasa de migración, el flujo genético, el tamaño efectivo de la población y la distancia genética. La determinación de las frecuencias haplotípicas es el primer paso fundamental para calcular los siguientes parámetros, la frecuencia haplotípica (A) que se calcula sabiendo el número de individuos que son portadores del haplotipo A y dividiéndolo entre el número total de individuos de nuestra muestra analizada. En todo momento la suma de las diferentes frecuencias haplotípicas dadas nos debe de arrojar el valor de 1 que considera el total de individuos de la población.

$$f(A) = \frac{\text{No. de individuos del haplotipo en la población}}{\text{No. de individuos en la población total}}$$

La mutación es la fuente básica de toda variabilidad genética, sin embargo ocurre con una frecuencia muy baja, es un proceso muy lento que por sí mismo cambia la constitución genética de las poblaciones con una tasa muy baja. Si la mutación fuera el único proceso que explicara el cambio genético, la evolución tendría lugar con una tasa muy baja. Desde luego también es sabido

que la tasa de mutación en regiones no codificantes, sobre todo en secuencias altamente repetitivas con estructuras simples de reposición, es grande y por lo tanto en este caso no puede ser ignorada cuando se realizan estudios poblacionales analizando estas regiones. El conocimiento de la variabilidad genética de la región que se analiza no implica el que se pueda anticipar si el número de haplotipos que se presentan es alto o bajo, tal y como lo demuestran los resultados obtenidos en algunos estudios previos en los que la diversidad nucleotídica es de 3 a 6 veces mayor (de Merida et. al., 1995. de Merida et. al., 1999), sin embargo el número de haplotipos encontrados es 6.4 veces menor. Esto se explica porque los efectos de selección afectan de manera independiente a cada sitio particular lo cual hace que dentro del número total de posibilidades de que se presente la variación en un sentido u otro, en realidad solo algunos cambios específicos serán encontrados en los individuos de la población. La magnitud de la variación heredable es importante ya que es ella la que determina el potencial para el cambio evolutivo y la adaptación de las especies, algunas fuerzas evolutivas aumentan la variación y otras la disminuyen. Más aún, la manera en que nuevas especies surgen puede depender de la cantidad de variación genética mantenida dentro de las poblaciones. Anteriormente se consideraban dos hipótesis para explicar la variación genética observada en las poblaciones naturales, el modelo clásico aseguraba que la mayoría de las poblaciones naturales presenta poca variación genética, en contraste con el modelo balanceador que proponía que hay mucha variación genética presente en las poblaciones naturales.

Con el desarrollo de las técnicas moleculares se demostró que las poblaciones naturales efectivamente tienen mucha variación genética. La variación genética es una condición necesaria para la evolución ya que ésta consiste precisamente en cambios en la constitución genética de las poblaciones. La evolución puede verse como un proceso en dos etapas, por un lado la mutación y la recombinación que generan variaciones genéticas hereditarias y por otro lado la deriva genética y la selección natural que transmiten de forma diferencial esta variación genética de generación en generación. Cuando dos poblaciones que difieren en sus frecuencias haplotípicas intercambian individuos migrantes, las frecuencias haplotípicas de cada población pueden cambiar dependiendo de la proporción de individuos que migran. La proporción de migrantes relativos a la población total es referida como tasa de migración ( $m$ ). En el caso de los mosquitos el número estimado de individuos que migran entre las subpoblaciones solo a pocos cientos de metros a partir de una población a otra es muy pequeño comparado con muchos cientos de individuos presentes en la población, sin embargo el número estimado de migrantes no se debe solamente a la simple dispersión por vuelo, sino también el transporte urbano y comercial humano que contribuyen de manera importante a que estos patrones de migración naturales se vean afectados, de manera que poblaciones que pudieran pensarse que están aisladas una de la otra por distancia o barreras geográficas, no lo estén en realidad ya que entre ellas hay intercambio de individuos cuando hablamos de poblaciones de mosquitos ya sea en la fase de huevo, de larva, de pupa o en su etapa adulta.

### *Flujo genético*

Se denomina flujo genético al intercambio de individuos que se entrecruzan entre las poblaciones y que contribuyen con genes para la descendencia. El flujo genético causa que las poblaciones lleguen a ser genéticamente similares. Una misma población posee una estructura jerárquica ya que se puede considerar a los mosquitos de una llanta en una vulcanizadora como una unidad base de muestreo. Sin embargo puede haber muchas llantas en distintas vulcanizadoras dentro de la misma ciudad, muchas ciudades dentro de un estado, muchos estados dentro de un país, lo cual impone la necesidad de establecer la tasa de migración dentro de estos límites. Algo importante de considerar es el efecto Wahlund que dice que si dos poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg con diferentes frecuencias haplotípicas son agrupadas juntas, la población agrupada tendrá una frecuencia haplotípica igual al promedio de las dos poblaciones. El efecto de agrupamiento de la población debe considerarse como una complicación potencial para el análisis genético, ya que la subdivisión no reconocida puede ocurrir en muestras de, virtualmente, todas las poblaciones naturales. Si consideramos el tamaño de las poblaciones, el parámetro importante no es el número total de individuos en la población, sino el tamaño efectivo de la población, que es el número de progenitores que produce la siguiente generación, esto es así porque los genes muestreados para producir la siguiente generación son de los individuos que llegan a ser progenitores, no del resto de la población.

A pesar de que las poblaciones naturales fluctúan grandemente en tamaño, es posible conocer las frecuencias haplotípicas dadas en la siguiente generación siempre y cuando conozcamos el número de progenitores que participan en producir la siguiente generación y sus frecuencias haplotípicas. Los cambios que se presentan en las frecuencias haplotípicas de generación en generación se conocen como deriva génica, lo cual es un proceso de puro azar. En este caso el tamaño de la muestra es un factor importante a considerar, entre más pequeña sea la muestra mayores serán los efectos. En una población natural implica que entre más pequeño sea el número de individuos capaces de reproducirse en una población mayores serán los cambios probables de sus frecuencias haplotípicas debidos a la deriva génica (Ver figura 6), es decir, un alelo puede llegar a desaparecer de la población en pocas generaciones por efectos del puro azar si son pocos los individuos que lo portan, ya que si estos individuos no llegan a reproducirse entonces los alelos que son exclusivos de ellos ya no podrán estar representados en la siguiente generación. Como esto es un proceso azaroso, puede llegar a ocurrir que un haplotipo se fije en la población aunque su frecuencia haplotípica sea baja, es decir, aunque el número de individuos que lo portan sea pequeño, desde luego, la probabilidad de que esto ocurra es mucho más baja. De esta forma los haplotipos pueden llegar a fijarse o a desaparecer de la población a través de las generaciones por deriva génica independientemente de sus frecuencias haplotípicas.

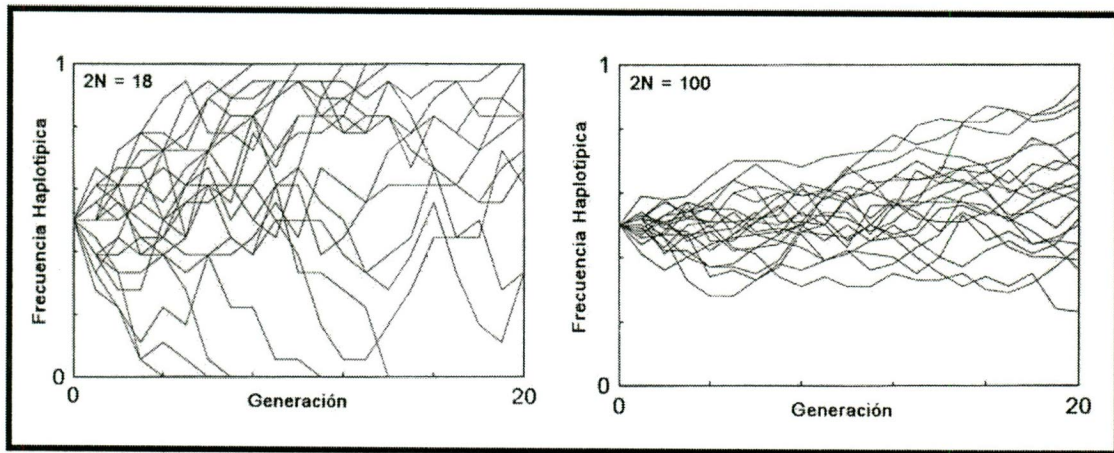


Figura 6. Efectos de la deriva génica. Se muestra un resultado generado por un ordenador que simula los efectos de la deriva génica. El tamaño de población fue 18 y 100. En cada caso, se iniciaron 20 poblaciones con frecuencias de 0.5 que sufrieron deriva genética a lo largo de 20 generaciones. En cada generación, la deriva modifica la frecuencia alélica anterior en base a las reglas probabilísticas vistas previamente. Podemos observar que los cambios de  $p$  son mucho más fuertes con  $N=18$  que con  $N=100$ , indicando que la deriva es más importante cuanto menor sea el tamaño de los reproductores.

Las fuerzas de selección pueden llegar a tener un impacto determinante sobre la estructura de la población, un alelo puede también llegar a fijarse o a desaparecer de la población a través de las generaciones independientemente de que su frecuencia haplotípica sea alta o baja si es que se encuentra sujeto a selección (Ver figura 7). La selección natural puede ser definida como la reproducción diferencial de variantes genéticas alternativas, determinada por el hecho de que algunas variantes aumentan la probabilidad de supervivencia y reproducción de sus portadores en relación con los portadores de otras variantes, puede deberse a supervivencia diferencial o fertilidad diferencial o a ambas.

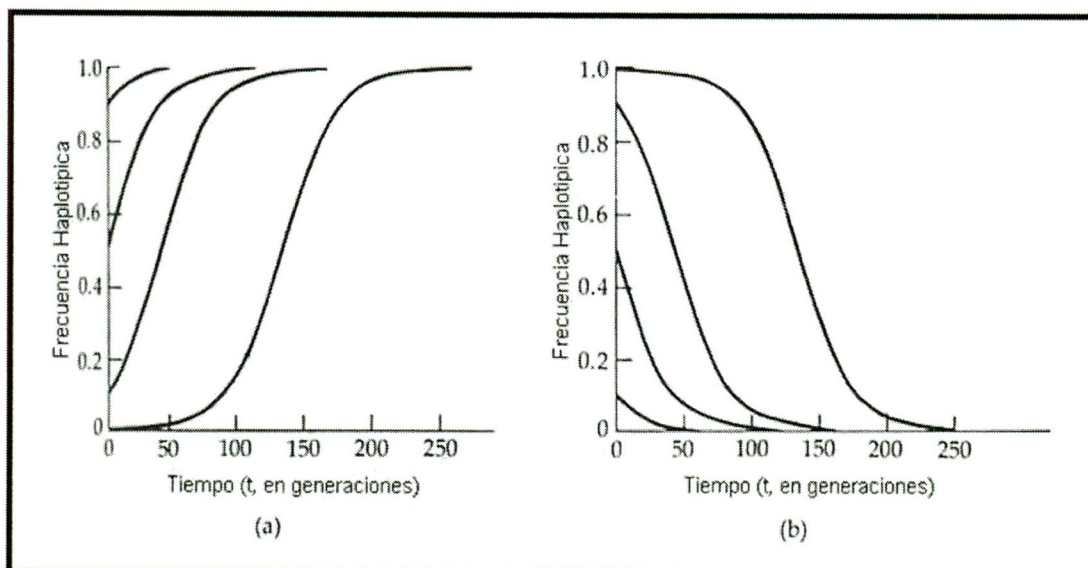


Figura 7. Efecto de la selección natural. Se muestra el efecto de la selección natural sobre las frecuencias haplotípicas a través del paso de las generaciones en una población.

La dirección y la tasa de cambio en las frecuencias haplotípicas debidas a la mutación o a la migración se pueden predecir, respecto a la deriva genética, el conocimiento de parámetros como el tamaño efectivo de la población y frecuencias haplotípicas hace posible calcular la magnitud esperada de los cambios en la frecuencia haplotípica, pero no la dirección del cambio, ya que esta es aleatoria. La mutación, la migración y la deriva (tasa de mutación, tasa de migración y la varianza de las frecuencias haplotípicas, respectivamente) no están orientadas con respecto a la adaptación. Estos procesos cambian las frecuencias de los genes independientemente de si aumenta o disminuye la adaptación de los organismos a su ambiente. Estos procesos son aleatorios con respecto a la adaptación, por sí mismos destruirían la organización y adaptación de los seres vivos. La selección natural (vista como eficacia biológica) promueve la adaptación y mantiene a raya los efectos desorganizadores de los otros procesos. De esta forma la selección natural explica por sí sola la naturaleza adaptativa y altamente organizada de los seres vivos así como la diversidad, porque promueve la adaptación a diferentes formas de vida.

La eficacia biológica es una medida de la eficacia reproductora de un genotipo. La selección natural opera por reproducción diferencial, así la eficacia biológica se expresa a menudo como una medida relativa, no absoluta de eficiencia reproductora. Por conveniencia matemática se le asigna el valor de eficacia biológica 1 al genotipo con la eficacia reproductora más alta. Puede calcularse la eficacia biológica cuando se conoce el número de progeñe producido por cada genotipo. Primero se calcula el número medio de progeñe producida por individuo por cada genotipo en la siguiente generación y se divide entre el número del mejor genotipo. Si conocemos las eficacias biológicas genotípicas podemos predecir la tasa de cambio en las frecuencias. La eficacia biológica suele representarse con la letra  $w$ . Una medida relacionada con el coeficiente de selección ( $s$ ) se define como  $s = 1 - w$ . El coeficiente de selección mide la reducción de la eficacia biológica de un genotipo. La eficacia biológica relativa predice el curso de la selección, por ejemplo, como

cambiarán las frecuencias de los genes, pero no que le ocurrirá a la población (si aumentará o disminuirá). Los aspectos de la vida de un individuo que pueden afectar su éxito reproductor contribuyen a la selección natural y en consecuencia a la eficacia de los genotipos. Estos diversos aspectos, supervivencia, tasa de desarrollo, éxito en el apareamiento, fertilidad, etc., se llaman componentes de la eficacia biológica. La supervivencia (viabilidad) y la fertilidad son los más importantes. Las diferencias en cuanto a la eficacia biológica pueden deberse a uno o a varios de estos componentes. Desde el punto de vista de la selección natural, lo que cuenta es la eficacia biológica total o neta y no los componentes implicados. El último resultado de la selección natural puede ser la eliminación de uno u otro alelo (aunque la mutación puede conservar los alelos deletéreos a bajas frecuencias). Las frecuencias haplotípicas pueden ser usadas para estimar la variabilidad genética total entre las poblaciones. A partir de ellas se puede obtener el valor de la distancia genética (D) que es el grado de diferenciación genómica entre especies o subpoblaciones entre las diferentes localidades. Este parámetro se basa en el número de sustituciones en un gen por locus que han ocurrido entre las poblaciones después de su divergencia. Cuando se están analizando varias poblaciones diferentes las relaciones genéticas se ven a través de un diagrama en forma de dendograma. Un método para convertir la distancia genética o valores de similitud genética dentro del dendograma es a través del método de agrupamiento promedio no ponderado (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) que identifica las asociaciones presentes entre las localidades desde el punto de vista genético. El árbol se construye por la primera unión de las dos poblaciones con la distancia más pequeña, enseguida se construye una nueva matriz usando ahora la población previamente agrupada como una unidad, con esta distancia la siguiente unidad es el promedio de toda la población dentro de la unidad.

### **Antecedentes particulares de su proyecto**

#### *Marcadores moleculares en los mosquitos*

El uso de marcadores moleculares basados en el ADN es solo el comienzo de un largo estudio para ser aplicados en la genética de poblaciones vectoras. Muchas de las nuevas técnicas empleadas tienen la ventaja, comparadas con la electroforesis isoenzimática, de comenzar a ser capaces de calcular la variación genética a nivel nucleotídico. La variación en la movilidad isoenzimática es un indicador de la variación nucleotídica; sin embargo, dos isoenzimas con la misma migración pueden no ser producto de alelos equivalentes, por lo tanto, la electroforesis isoenzimática sobreestima la variación genética. Ensayos de variación a nivel de ADN, a través de sitios de restricción polimórfica o secuenciación directa, proporciona una medida más exacta de la variación. Además, los marcadores isoenzimáticos son limitados en números mientras que la variación nucleotídica puede ser muestreada a través del genoma con tal que se usen sondas apropiadas, primers (iniciadores) o clonas disponibles.

Las secuencias de bases del ADN de mosquitos han sido estudiadas para obtener donativos para la caracterización de las especies y sus poblaciones. Sin embargo, estudios *in silico*, con sólo datos de la secuencia principal, pueden contribuir en la determinación de estimaciones de los niveles de

diversidad. Para reducir los posibles errores en las estimaciones, un recurso es el uso de datos de las secuencias secundarias. Esto se debe a que la tasa de variación observada en las secuencias primarias para un genotipo no pueden ser las mismas fenotípicamente. La transferencia de información de los genes para producir un gen presenta algunas peculiaridades. En el genoma mitocondrial, la información para el ARN es casi convertida de forma inmediata en una cadena de aminoácidos (polipéptidos), y en los genes nucleares la transferencia de la información esta espacialmente separada, llevando la transcripción de núcleo y la traducción en el citoplasma (Griffiths et. al. 2008. Tabachnick y Powell, 1983). Como resultado, los estudios con estructuras secundarias se hacen generalmente sobre la base de la predicción de la estructura de una proteína para los marcadores mitocondriales (a excepción de los genes para el rRNAm) y la inferencia de la estructura del ARN sobre los espaciadores de genes para la transcripción del ARN.

#### *El ADN mitocondrial*

El ADN mitocondrial (ADNmt) (Figura 8) se ha utilizado como una herramienta importante en el análisis genético de las poblaciones de insectos. La organización de este es relativamente simple, consiste en una doble cadena circular que contiene 37 genes, de los cuales 2 codifican ARN ribosomal, 22 codifican ARN de transferencia y 13 que codifican para proteínas (Hoy, 2003). Además de estos genes, el ADN mitocondrial tiene una región no codificante, que es responsable de controlar la replicación y la transcripción del genoma de las mitocondrias. Esta región, llamada zona de control, región hipervariable o D-loop es muy rica en adenina y timina, y es conocida como una región rica en A + T (Upholt y Dawid, 1977). El genoma mitocondrial, salvo raras excepciones, se hereda exclusivamente por vía materna y no recombina. La herencia materna del ADN mitocondrial permite que esta molécula sea utilizada como un importante marcador molecular con el fin de trazar la historia evolutiva y filogenética de las poblaciones existentes. Otra característica importante del ADN mitocondrial es su alta tasa de evolución, ya que se desarrolla 10 veces más rápido que el ADN nuclear (Tabla 1). Esto se explica por la reducida presencia de mecanismos de reparación de esta molécula, facilitando la acumulación de mutaciones (Gray, 1989). Por esta razón las variaciones intraespecíficas son más fáciles de detectar.

Aunque no hay una homogeneidad cualitativa de las moléculas de ADN mitocondrial en un mismo individuo, hay una diferencia entre la tasa de acumulación de mutaciones en los genes o regiones del genoma. Los genes que codifican las subunidades de la nicotinamida adenina dinucleótido - NADH deshidrogenasa (nd1-6), citocromo c oxidasa (COX1-3 o CO I-III) y el tRNA son los que acumulan más rápidamente la sustitución de bases. Sin embargo, los genes codificadores para las unidades ribosomales rRNA (12S y 16S) y el citocromo b (Cyt b) se encuentran entre los genes más conservados del genoma mitocondrial (Gray, 1989; Hoy, 2003). Las regiones de control o D-loop son las más variables, y pueden acumularse mutaciones del tipo de sustitución de bases o de inserción/delección (Upholt y Dawid, 1977), que puede cambiar el tamaño de la molécula. Estas variaciones en la evolución de las regiones del ADN mitocondrial permite el estudio de los diferentes niveles taxonómicos, por diversos marcadores mitocondriales. Por otra parte, el ADNmt está presente en grandes cantidades en todas las células (Entre 1000 y 10000 moléculas de ADN por célula), lo que le da un menor riesgo de degradación en relación con el ADN nuclear. El ADN

mitocondrial es muy importante cuando se realizan estudios de muestras biológicas antiguas, cuyo ADN nuclear se encuentra degradado (Burger et. al. 2003). La detección de polimorfismos en general, vía SNPs (Single Nucleotide Polymorphism/Polimorfismo de Nucleótido Simple) y la distribución de los diferentes linajes mitocondriales contribuyen al proceso del conocimiento del flujo de genes y la deriva génica (fuerza evolutiva que actúa junto con la selección natural cambiando las características de las especies en el tiempo). Al igual que en la investigación de las barreras biológicas de las poblaciones de mosquitos causadas por organismos endosimbiontes como *Wolbachia pipientis* (Turelli y Hoffmann, 1999), una rickettsia involucrada en la incompatibilidad citoplasmática reproductiva (Guillemaud et. al. 1997; Rasgon y Scott, 2003).

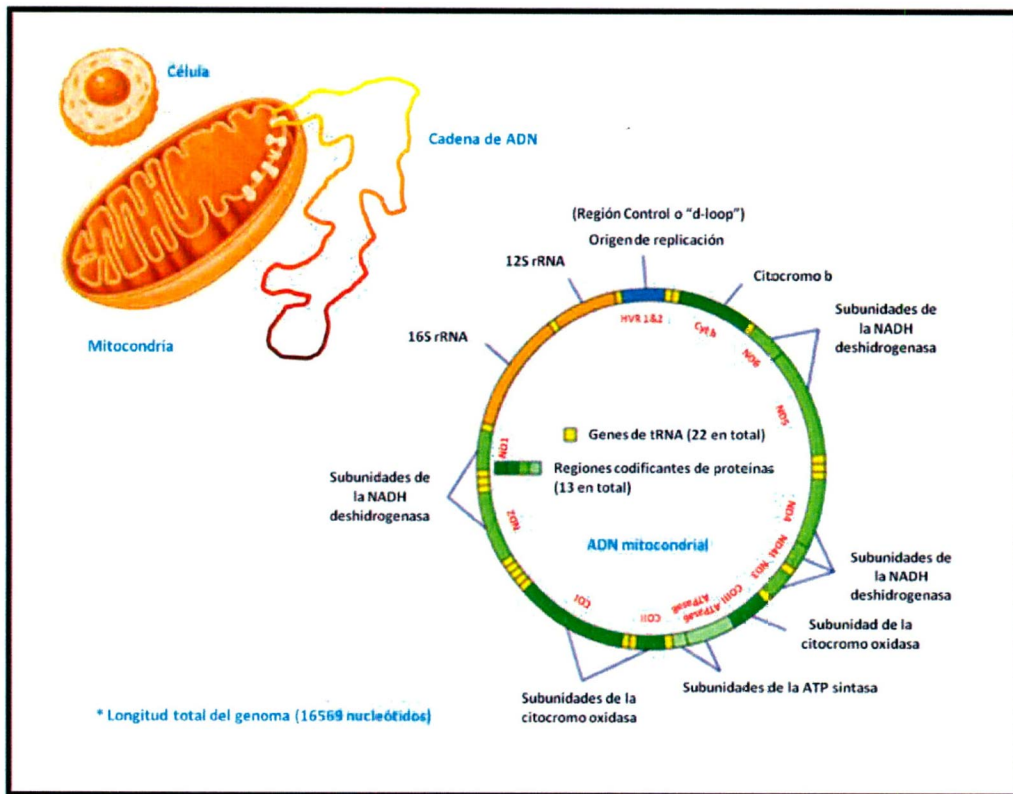


Figura 8. ADN mitocondrial de los artrópodos.

Tabla 1. Características del ADN mitocondrial.

Características	ADN mitocondrial	ADN nuclear
Tamaño	~ 16 569 pb	~ 3.2 billones pb
Copias por célula	> 1000	2
Estructura	Circular	Lineal
Herencia	Materna	Biparental
Complemento cromosómico	Haploide	Diploide
Recombinación/ Reparación	No	Sí
Tasa de mutación	5-10 veces ADN nuclear	Baja

### *El ADN ribosomal*

En eucariotas, el ADN ribosomal se organiza en una familia multigénica organizada en unidades repetidas en tándem dentro de la región nuclear. Cada unidad de repetición contiene los genes para los ARNs 18S, 5.8S y 28S, intercalados por regiones más variables de espaciadores no codificantes. En la mayoría de los animales, hay de 100 a 500 copias del gen del ADNr en el genoma nuclear. Cada unidad de transcripción se compone de una región promotora líder (ETS – External Transcribed Spacer/Espaciador Externo Transcrito) una región codificante de ARNr 18S, un espaciador interno no codificante (ITS-1), una región codificante de ARNr 5.8S, otro espaciador interno no codificante (ITS-2), una región para ARNr 28S y, finalmente, un segmento intergénico espaciador no transcrito, IGS -intergenic spacer- (Hillis y Dixon, 1991; Polanco et. al. 1998). La transcripción del rRNA está formada por nucleótidos y tiene una estructura helicoidal resultante de plegado de una sola cadena del polímero sobre sí mismo, en áreas donde las conexiones son posibles mediante enlaces de hidrógeno, debido a las pequeñas extensiones presentes en su estructura complementaria (Conn y Stumpf, 1980). Una vez que el rRNA tiene una estructura doble helicoidal del ADN, estable y extremadamente rígida, puede existir en diferentes conformaciones. Estas conformaciones representan un fenotipo, pudiendo haber diferentes índices de la diversidad que se encuentran en las estructuras primarias de la ADNr (Bhargavi et. al. 2005). En los insectos son usados normalmente los genes nucleares ribosomales 18S, 5.8S y 28S, así como los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 para diversos estudios poblacionales (Wesson et. al. 1992., Hasan et. al. 2009.) A partir del momento en que las secuencias del genoma nuclear puede ser accedidas de manera eficiente, comienzan a proporcionar un suministro sin fin de marcadores para estudios genéticos y evolutivos. La gran ventaja de trabajar con secuencias *loci* conocidas es que presentan un mayor potencial para la verificación de su diferencia o variación respecto a otras especies y por lo tanto ser beneficiados por la sinergia entre los estudios de evolución y la sistemática molecular.

### *Espaciadores, intrones y unidades de repetición (microsatélites)*

El análisis de las secuencias en las regiones de los intrones se debe hacer con precaución, porque los sitios con mutaciones de bases son menos informativos para los estudios de evolución y biológicos, ya que las estructuras secundarias no pueden ser evaluadas, por que los intrones se

eliminan durante la transcripción, en un proceso llamado “*splicing*” o empalme (Griffiths et. al. 2008.), y donde se produce la remoción de intrones y la unión de exones en el ARNm antes de dejar el núcleo. Así como, las pruebas de comparación inter pares con otros taxones muestran altos niveles de variabilidad (Smith y Fonseca, 2004), también se muestran los caracteres menos conservados en esta región. Por otra parte, los intrones tienen una función estructural conocida, muy particular en la molécula del ADN, ya que son diploides y pasan por la recombinación genética. En este caso, un cierto genotipo tiende a ser más frecuente en las cepas más puras, con diferencias en los híbridos en áreas de la introgresión de genes. Como resultado, estos fragmentos se utilizan en combinación con otros marcadores para evaluar la estructura genética de las poblaciones de mosquitos y tratando de diferenciar las especies y subespecies consideradas *cripticas* (especies gemelas que son extremadamente similares en apariencia -morfología, fisiología y comportamiento- pero que se hallan reproductivamente aisladas entre sí) dentro de los subgrupos taxonómicos. Un ejemplo de ello son los estudios con la región del segundo intrón del locus de la acetilcolinesterasa (Ace 2) (Bourguet et. al. 1998., Aspen y Savage, 2003).

Otra característica importante presente en las secuencias del genoma son las llamadas Repeticiones de secuencia simple (SSR, Single sequence repeats), también llamados microsatélites (Watson et. al. 2009.), estos marcadores se están convirtiendo en los marcadores moleculares más importantes en los animales y las plantas. Los SSR se extienden de 1 a 6 unidades de nucleótidos repetidas en tándem (conjunto de dos elementos que se complementan) y propagación al azar en los genomas eucariotas. Los SSR son muy polimórficos, debido a la alta tasa de mutación que afectan el número de unidades de repetición. Los microsatélites pueden ser mono, di o trinucleótidos, con repeticiones de 1 a 50 veces o más. Estos segmentos representan errores en el entrecruzamiento de los genes durante el entrecruzamiento cromosómico (o *crossing over* en inglés) en la meiosis (este es un proceso por el cual dos cromosomas se aparean e intercambian secciones de su ADN) (Levinson y Gutman, 1987). Los marcadores microsatélites son valiosos, no sólo porque son frecuentemente polimórficos, sino porque hay decenas de miles de ellos a lo largo del genoma. Estos marcadores pueden ser dimensionados mediante la determinación de sus longitudes, por reacción de PCR, seguido de la normalización de las bandas de electroforesis. Las repeticiones de las bases aumentan el tamaño de las secuencias, así como la variabilidad de las especies, lo que crea posibilidades adaptativas para la introducción de los organismos en nuevos entornos ambientales. Cuando las repeticiones son evolutivamente negativas, son eliminadas por la presión de selección natural. Como resultado, son más frecuentes las acumulaciones de intrones y espaciadores intra-génicos, la presión es más baja, selectivamente, en estas regiones del genoma (Arensburger et. al. 2010).

#### *Diferenciación molecular por el intrón Ace 2*

Los estudios sobre la secuencia de bases del gen que codifica para la acetilcolinesterasa-1 (Ace 1), uno de los genes asociados con la resistencia a insecticidas en las especies *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*, indican similitud genética a nivel mundial. Este es un gen nuclear y conservado, sin embargo, entre los grupos taxonómicos existen polimorfismos entre las regiones de los intrones. Una explicación es que esta región genética presenta variación desde tiempos antiguos,

con un ancestro común, que evoluciono más tarde en dos direcciones (Bourguet et. al., 1998). Los genes Ace 1 y Ace 2 están presentes en la mayoría de los insectos y probablemente derivados de un evento de duplicación muy remoto. En el mosquito *Anopheles gambiae*, los genes Ace 1 y Ace 2 alcanzan 53% de similitud en la composición de aminoácidos y una filogenia global indica que se separaron antes de la diferenciación de los insectos (Labbé et. al., 2007a). El gen Ace 1 codifica para la enzima acetilcolinesterasa-1 (AChE1), que participa en los mecanismos de resistencia a los insecticidas. Sin embargo, sólo en el complejo *Cx. pipiens*, la AChE1 esta realmente asociada con el mecanismo de resistencia, con una amplificación y distribución en todo el mundo (Lenormand y Raymond, 2000). Esto porque dicha enzima está dirigida contra organofosforados y carbamatos, dos importantes pesticidas utilizados en todo el mundo para el control de mosquitos en los programas de salud pública en los centros urbanos (Labbé et. al., 2007b). El gen Ace 2 codifica para una enzima bioquímicamente distinta, la AChE2, que no está asociado con la resistencia a insecticidas, y que su función todavía no está bien definida (Malcolm et. al., 1998). Con el tiempo, la región no codificante del segundo intrón del gen Ace 2 ha experimentado eventos evolutivos diferenciados claramente entre los miembros del complejo *Cx. pipiens*, haciendo posible el análisis molecular por visualización de los polimorfismos en las secuencias de bases y las pruebas estandarizadas de visualización de bandas producidas por electroforesis.

Otros estudios han reportado diferencias interespecíficas entre *pipiens* y *quinquefasciatus* en la estructura de los genes nucleares relacionados con la resistencia a los insecticidas (Raymond et. al., 1991. Severini et. al., 1996). Lenormand y Raymond en 2000 pusieron de relieve los casos de adaptación local en las poblaciones del complejo *Cx. pipiens* para los niveles de expresión de esterasas en dos loci asociados con resistencia a insecticidas. Los autores presentan los cambios encontrados en el patrón clinal (clina se utiliza en genética de poblaciones para designar el cambio gradual de rasgos fenotípicos de una misma especie por influjos y condiciones medioambientales) durante el desarrollo larval entre los periodos de invierno y verano. Los miembros del subgrupo *pipiens* tienen similitudes tanto morfológicas como genéticas. Como resultado, las pequeñas diferencias en estas especies son muy difíciles de detectar. Además, estos mosquitos tienen una serie de diferencias fisiológicas y de comportamiento, tornándolos de mayor o menor importancia en la cadena de transmisión de arbovirus y filarídeos (gusanos del corazón), lo que justifica la búsqueda nuevos marcadores morfológicos y moleculares para diferenciar correctamente a estas especies y caracterizarlas, particularmente en la Ciudad de México que es el objeto de este estudio.

### **Importancia para continuar con el estudio planteado**

#### *Importancia del estudio en Salud Pública*

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) son aquellas enfermedades que recientemente han expandido su rango geográfico; han pasado de una especie hospedadora a otra; han incrementado su impacto o severidad; han padecido un cambio en la patogénesis; o son causadas por patógenos recientemente descubiertos. Algunas de estas enfermedades producen baja

mortalidad, pero representan una amenaza particular debido a sus altos índices de mortalidad y a la falta de una vacuna o terapia efectiva (por ejemplo: el Virus del Ebola, el Virus de la Fiebre hemorrágica o Dengue, el Virus Nipah o el Virus del Oeste del Nilo), es por esto que se ha convertido en uno de los objetivos de la salud pública en los últimos 30 años (Lederberg et. al., 1992. Binder et. al., 1999). De las 1407 especies de microorganismos patógenos en humanos al menos el 61% son de carácter zoonótico (Daszak et. al., 2000), con 177 especies consideradas como emergentes o reemergentes, en las cuales la fauna silvestre ha incrementado su valor como fuente importante de transmisión (Daszak et. al., 2000). Se considera que de estas 1407 especies patógenas, 37% son virus o priones; 10% son bacterias; 7% son hongos; 25% son protozoos y 3% son helmintos (Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005). Uno de las mayores formas de transmisión de las EIE es el contacto cercano entre el humano y la fauna silvestre, principalmente causado por la intervención, introducción y modificación de los hábitats naturales. Como las poblaciones humanas continúan creciendo, se requiere de más espacio y recursos, resultando esto en un mayor número de intervenciones dentro del mundo silvestre (Daszak et. al., 2000).

En los tiempos modernos, el crecimiento exponencial del comercio y el aumento de los viajes, han transformado la epidemiología de las EIE, dando lugar a la presentación local de eventos globales de gran importancia (Taylor et. al., 2001). El comercio internacional de vida silvestre es ahora descomunal, con cientos de millones de animales silvestres y sus productos comercializados globalmente cada año (Karesh et. al., 2005). Aunque el problema de las enfermedades emergentes infecciosas continuará creciendo, estas no son solo un problema para la salud humana, pues representan una de las mayores amenazas de las especies (Daszak et. al., 2000-2004; Cunningham et. al., 2003). Sólo hasta hace muy poco han sido realmente apreciadas las interrelaciones del complejo entre las enfermedades infecciosas de la fauna silvestre, los animales domésticos y el hombre (Daszak et. al., 2000), en parte, debido a que las enfermedades emergentes no están asociadas con un hospedero animal específico, pueden vivir en las más disímiles especies animales y además poseen una flexibilidad biológica que les permite aprovechar las oportunidades epidemiológicas que se presenten (Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005).

#### *Alimentación sanguínea de vectores de enfermedades*

La hematofagia es el hábito de alimentación de aquellos seres vivos que se nutren con sangre. Representa una forma de ectoparasitismo. Entre los casos más notables de hematófagos están los mosquitos, las garrapatas, las pulgas y los piojos, de los que sólo las hembras son hematófagas. En la hematofagia, los productos sanguíneos son convertidos en constituyentes de reserva de los componentes en el huevo, donde los hidratos de carbono y los lípidos son importantes fuentes de energía para la etapa de reproducción. Machos y hembras se alimentan de sustancias azucaradas como néctar y exudados de frutos, pero las últimas a su vez necesitan, en la mayoría de las especies, ingerir sangre (hematofagia), para poder desarrollar los huevos. La importancia sanitaria de los mosquitos se debe, precisamente, a este hábito alimenticio. La sucesión de acontecimientos que ocurren en una hembra desde que ingiere sangre hasta que ovipone, se denomina ciclo gonadotrófico. Las hembras de los insectos, particularmente de los mosquitos, que se alimentan de sangre y de azúcar (Ver figura 9) ponen más huevos que las hembras que solo consumen

azúcar (néctar de flores y de frutos) debido a que la producción de huevos incurre en altos costos de energía para las hembras adultas (Clements, 1999).

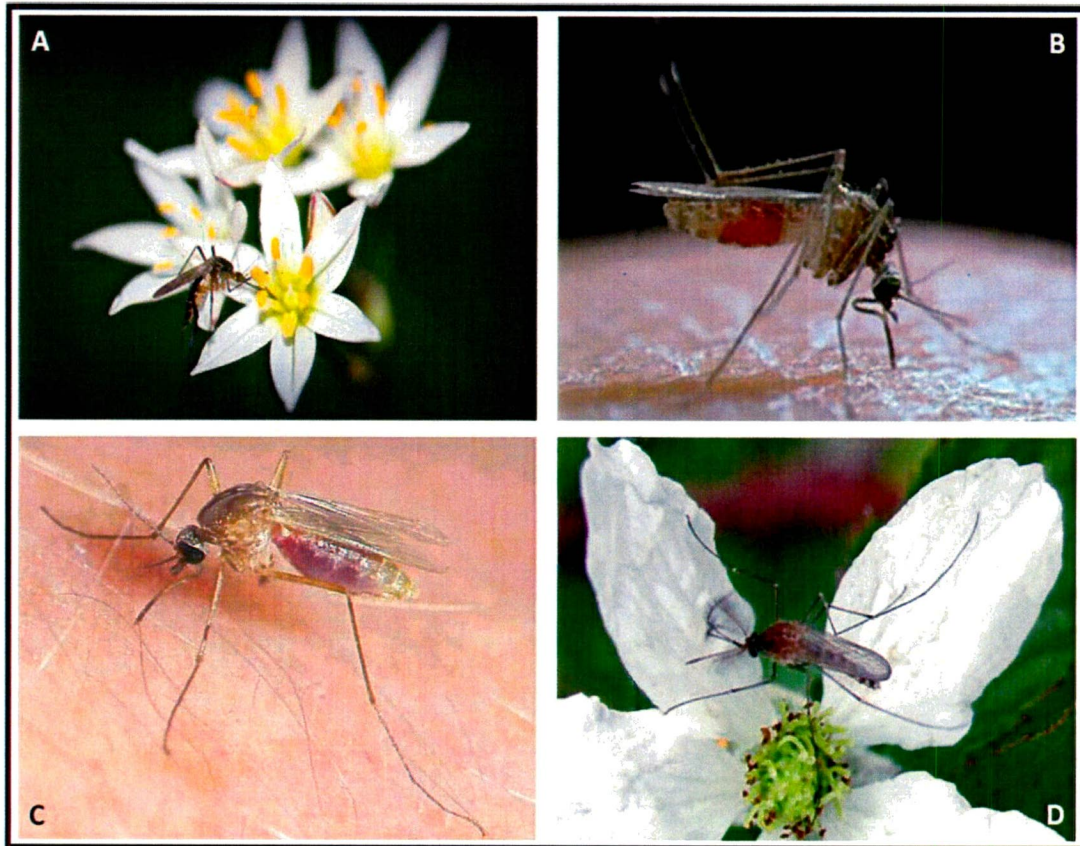


Figura 9. Hábitos alimenticios en el mosquito *Culex*. A) Mosquito adulto hembra *Culex* sp. ingiriendo néctar de las flores. B) Hembra de *Culex tarsalis* ingiriendo sangre posterior a la ingesta de azúcar. C) Hembra de *Culex quinquefasciatus* después de la ingestión de sangre. D) Mosquito adulto macho *Culex* sp. ingiriendo néctar de las flores.

De acuerdo a una revisión hecha por Zinser y colaboradores en 2004, las hembras de *Cx. quinquefasciatus* son consideradas como "oportunistas" cuando se trata de la conducta de alimentación sanguínea. Esto se debe a que en los asentamientos humanos donde se pueden encontrar aves, roedores, perros y gatos, se ha encontrado una frecuencia pequeña de hembras con sangre de estos animales, aunque la ingestión de la sangre humana es siempre mayor. Un aspecto importante de resaltar es que la variación genética parece ser un factor relevante en el comportamiento de alimentación sanguínea. En las zonas de clima templado, frío, las hembras de *Cx. quinquefasciatus* se encontraron tanto con sangre de aves como de seres humanos, que puede ser debido al origen híbrido, en las áreas de introgresión genética, con especies *Cx. pipiens*. Este mosquito tiene una tendencia demostrada a consumir sangre de aves de corral en su ingesta diaria (Fonseca et. al., 2004).

### *Preocupaciones sobre los vectores de enfermedades en los centros urbanos*

Una preocupación fundamental, asociada a la urbanización, es su alto potencial de vulnerabilidad al cambio climático debido a menores abastecimientos de agua o mayor incidencia de enfermedades, de acuerdo con la localización geográfica de los asentamientos humanos más importantes. El abastecimiento de agua será menor y mucho más caro si se mantienen los mismos niveles de consumo, ya que probablemente disminuya la precipitación y aumente el nivel de evaporación. El cambio del clima también tendría repercusiones en la salud humana: existirá mayor "stress" debido a un clima más caluroso; una mayor humedad y la temperatura estimularía la expansión de ciertas enfermedades infecciosas y aquellas transmitidas por vector, principalmente. Una primera condición es que la vulnerabilidad es baja cuando las densidades de población son bajas; una alta densidad incrementa la vulnerabilidad al aumentar el número de víctimas por unidad territorial; al aumentar el número de víctimas, se incrementa el costo social del cambio climático. Por lo tanto, una alta vulnerabilidad estará asociada a un mayor tamaño de asentamientos humanos, en los cuales se localiza un gran número de establecimientos industriales, viviendas y vehículos automotores (Scott et. al., 1996)

Las hembras adultas de *Cx. quinquefasciatus* tienen una actividad de alimentación sanguínea en la oscuridad del crepúsculo (intervalo de claridad que comienza a vislumbrarse desde el inicio del amanecer hasta la salida del sol y desde que este se esconde hasta que cae la noche) y la noche. Es sabido que esta especie cuenta con mecanismos de adaptación en el órgano de la visión, que le permite ver "en la oscuridad" las reflectancias de la longitud de onda ultravioleta (Beck, 1968). Por lo tanto, *Cx. quinquefasciatus* come normalmente cuando la gente descansa o duerme, lo que provoca incomodidad y molestia en las comunidades donde la frecuencia de la población de los mosquitos es alta o incluso en áreas donde es moderada (Taïpe-Lagos y Natal, 2003; Natal et. al., 1991).

### *Arbovirus*

Las arbovirosis están constituidas por un grupo de enfermedades transmitidas al hombre a través de artrópodos, en general mosquitos. El grupo de arbovirus no es un grupo taxonómico homogéneo, pertenecen a distintas clases y comparten el mecanismo de transmisión a través de artrópodos. Son infecciones generalmente rurales, en las estaciones húmedas y calurosas cuando proliferan los mosquitos y pueden producir una amplia variedad de cuadros clínicos, algunos subclínicos que pasan desapercibidos, otras veces producen cuadros de fiebre, mialgias, cefaleas que no precisan atención médica específica. En otras ocasiones producen encefalitis o fiebre hemorrágica (como el dengue, que goza de la distribución mundial más amplia).

### *Encefalitis equina venezolana (EEV)*

El virus EEV se mantiene en un ciclo roedor - mosquito - roedor. Durante los brotes importantes que afectan a los humanos, la enfermedad se transmite en un ciclo que involucra mosquitos como vectores y a los caballos y otros equinos como huéspedes. Por esta razón, los brotes naturales están normalmente precedidos de epizootias equinas. Los humanos también pueden desarrollar

suficiente viremia para servir como huéspedes en los ciclos humano - mosquito - humano. Las cepas epidémicas y no epidémicas se pueden distinguir antigénicamente. El agente es un miembro del género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae*. El virión mide cerca de 70 nm de diámetro y su material genético consiste de una cadena de ARN positivo de una hélice encerrado en una cápside icosaédrica, rodeada por una membrana lipídica de dos capas en cuya superficie se encuentran incluidas las glicoproteínas. Los subtipos IAB e IC son patógenos para los equinos y son responsables de los principales brotes en humanos. Las otras variantes normalmente no causan encefalitis en équidos y, aunque algunas veces se encuentran en humanos, no se han aislado de los principales brotes. De acuerdo con Forattini (1965), algunos autores sostienen la hipótesis de que *Cx. quinquefasciatus* fue parte del ciclo de transmisión de la encefalitis equina venezolana (EEV) durante los años 60 en Colombia. Según el autor, esta especie fue encontrada naturalmente infectada con el virus de la EEV en Panamá. Otras especies de géneros *Culex*, *Aedes* y *Mansonia* se consideran vectores de la infección por este arbovirus. Como ya se menciona la EEV es una infección que afecta a los caballos, y es transmisible a los seres humanos, en los que proporciona un marco de desorden cefálico. Las investigaciones recientes sugieren un papel importante de roedores, murciélagos y aves en el ciclo enzoótico natural de este virus. Este factor contribuye a los estudios sobre la tendencia de alimentación de los culícidos que participan en la transmisión de la enfermedad.

#### *Encefalitis de San Luis (SLE)*

La Encefalitis de San Luis (ESL o SLE por sus siglas en inglés) es una enfermedad transmitida por mosquitos que fue reconocida por primera vez en 1933 (en St. Louis, Missouri, Estados Unidos). El virus de la ESL es un virus de genoma ARN, perteneciente al género *Flavivirus*; forma parte del complejo de los virus de las encefalitis del Valle de Murray, del oeste del Nilo y de la encefalitis japonesa. El agente está distribuido desde Argentina hasta Canadá. La enfermedad no se conoce fuera del continente americano. En las décadas siguientes a su reconocimiento se han producido epidemias de forma esporádica e impredecible. Durante las epidemias un gran número de personas han enfermado seriamente, produciéndose muertes en algunos casos. Las mayores epidemias se han producido en los Estados Unidos aunque también se han presentado en Canadá y México. En otras partes de América se registran pocos casos aislados de enfermedad en humanos. El número de casos clínicos desde 1953 fuera de los Estados Unidos, Canadá y México no suma más de 25 (la mayoría de ellos sin sintomatología nerviosa). El virus de la ESL como otros flavivirus se mantiene en un ciclo enzoótico que involucra mosquitos ornitofílicos y aves susceptibles. Este virus se convierte en una amenaza para los seres humanos cuando los mosquitos alimentados de forma oportunista, se infectan con el agente y amplían su espectro de ingestión sanguínea a la población humana (Richards et. al., 2009). Los vectores primarios del virus SLE en los Estados Unidos de América, donde hay registros de esta enfermedad, han sido identificados como *Cx. tarsalis*, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. nigripalpus*. En pruebas de laboratorio, *Cx. quinquefasciatus* muestra mayor susceptibilidad y competencia vectorial para albergar a los virus de la Encefalitis de San Luis (Reisen et. al., 2010). De acuerdo con lo publicado por Flores y colaboradores (2010), el virus de la ESL se registra en las zonas templadas del

Argentina y *Cx. pipiens* es considerado el principal vector. En el laboratorio, *Cx. quinquefasciatus* presenta infectividad y transmisión vertical (Madre-Hijo), pero en las zonas endémicas donde está presente, la presencia del virus se reduce durante el invierno, porque *Cx. quinquefasciatus* no realiza diapausa (estado fisiológico dinámico de baja actividad metabólica mediado por neurohormonas con factores desencadenantes y terminantes bien específicos, que usan algunos seres vivos para sobrevivir condiciones ambientales desfavorables y predecibles, tales como temperaturas extremas, sequía o carencia de alimento).

#### *Fiebre del Virus del Oeste del Nilo*

El Virus del Oeste del Nilo (VON) ó WNV “West Nile Virus” por sus siglas en inglés, ha surgido en los últimos años en regiones templadas de Europa y América del Norte y se ha convertido en una amenaza de salud pública, equina y animal. La manifestación más seria de la infección por VON es la encefalitis fatal (inflamación del cerebro) en humanos y caballos, así como la mortalidad entre ciertas especies de pájaros domésticos y salvajes. Investigaciones de Turell y colaboradores (2001) demostraron que *Cx. quinquefasciatus* es una especie importante en la transmisión de la encefalitis y la meningitis causada por el VON. Según los autores, una variedad importante de mosquitos es susceptible al virus, sin embargo, algunas especies pertenecientes del género *Culex* tienen mayor capacidad de transmitir al virus, especialmente conocido por su adaptación hematofágica a las aves y los seres humanos. El híbrido resultante del cruce de las subespecies *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* fue el centro de estudios en los Estados Unidos de America, por su potencial como vector puente de VON (Savage et. al., 2008). Uno de los factores más relevante para el potencial del vector híbrido es la tendencia de las hembras de alimentarse de sangre tanto de aves como de seres humanos. Estos hábitos son característicos de los padres por separado, mientras que el híbrido los adquiere en la misma proporción (Fonseca et. al., 2004). Esta condición sugiere otra dinámica, en las áreas de hibridación, de los ciclos epidemiológicos de las enfermedades transmitidas por vectores. (Kwan et. al., 2010).

El VON es un flavivirus proveniente de África, y ha sido extendido hacia el mundo a través de la migración de las aves infectadas. La enfermedad parece ser el producto de una cadena de transmisión: aves ↔ aves ↔ mosquito transmisor ↔ ave, hombre u otros mamíferos (caballos, vacas, perros, gatos) (McLean et. al., 2001). El primer caso en las Américas ocurrido en 1999 en Nueva York, EE.UU. Este caso motivo la preocupación de las autoridades de salud pública por su rápida propagación (Asnis et. al., 2001). Los primeros informes de actividad del VON en México se publicaron en julio de 2003, cuando se detectaron anticuerpos contra el VON en caballos en los estados de Coahuila y Yucatán. (Blitvich et. al., 2003. Lorono-Pino et. al., 2003). Comunicaciones más recientes incluyen la identificación de caballos, aves y mosquitos infectados, así como el informe de un caso confirmado en una persona en el estado de Sonora. (Elizondo-Quiroga et. al., 2005. Blitvich et. al., 2004. Deardorff et. al., 2006). En México, sobre todo en los estados del noreste (Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila) se activó un estado de alarma epidemiológica en los sistemas de salud por los informes de casos humanos, equinos infectados, aves silvestres y especies de mosquitos vectores positivos al VON notificados en los estados de Texas y Louisiana de EE.UU., ya que constituyen potencialmente un alto riesgo de producir epidemias de VON en

esta región. Este hecho resaltó la gran importancia de detectar de modo oportuno la presencia de este agente viral. La Secretaría de Salud de México inició la vigilancia seroepidemiológica del VON desde el año 2003. Hasta la fecha ya se han registrado casos positivos en aves y equinos. En el caso de personas, la Secretaría de Salud ha muestreado sueros de 24 estados de la República y todas las muestras resultaron negativas. Para el caso específico de la Ciudad de México recientemente se ha hecho énfasis en el movimiento de las aves migratorias desde el hemisferio norte, Estados Unidos y Canadá, donde el virus fue detectado. El desfile de las aves y los sitios de alta densidad de mosquitos favorecen el establecimiento de un ciclo enzoótico del virus y por tanto la infección de aves residentes y humanos.

### *Las Filariasis*

La filariasis constituye un grupo de enfermedades parasitarias en el humano y otros animales, y por lo general en áreas tropicales, causada por la infección de "filarias", nematodos del orden *Spirurida*, superfamilia *Filarioidea*, que son transmitidos en forma de larva o microfilaria a los vertebrados por un artrópodo, generalmente mosquitos de las familias *Culicidae* o *Phlebotomidae* o moscas de la familia *Tabanidae*, luego de lo cual las larvas se localizan adecuadamente para convertirse en adultos.

### *Dirofilariasis del gusano del corazón canino*

El agente causal de la dirofilariasis es el microfilarídeo *Dirofilaria immitis*, el gusano del corazón del perro, que es parásito de perros y otros mamíferos, siendo el hombre un hospedero terminal que desarrolla lo que se conoce como dirofilariasis pulmonar. (Simón et. al., 1991). En la dirofilariasis, el parásito adulto se instala en el corazón y libera microfilarias en la sangre, desencadenando una serie de complicaciones en el sistema circulatorio (Vezzani et. al., 2006). El papel del complejo *Culex pipiens* en la transmisión de la *Dirofilaria* ha sido poco estudiado, pero para Ahid y Lourenço de Oliveira (1999), *Cx. quinquefasciatus* es considerado un vector secundario del parásito del corazón canino en el sureste de Brasil y es el vector primario en el noreste de Brasil, en una zona enzoótica de la región. Los vectores de esta microfilaria son los mosquitos adaptados a los centros urbanos, que se alimentan de la sangre de perros infectados, y tiene la competencia vectorial y la longevidad suficientes para el desarrollo del agente causal en la fase infectiva y la capacidad de transmitirla a los seres humanos por la ingestión de sangre nueva. Entre los culicidos que han sido reportados como vectores de esta enfermedad en ciclos enzoóticos de la dirofilariasis se encuentran *Ae. aegypti*, *Ae. scapularis*, *Cx. nigripalpus*, *Cx. declarador* y *Cx. quinquefasciatus* (Labarthe et. al., 1998). Como se mencionó previamente, el ser humano es un hospedero accidental de *D. immitis*, donde no logra completar su ciclo biológico, pero están descritos casos humanos con Dirofilariasis pulmonar en distintos países del mundo (España, Italia, Estados Unidos, entre otros) (Theis, 2005). Recientemente, la enfermedad del gusano del corazón se ha informado en Buenos Aires, Argentina, siendo el mosquito *Cx. pipiens* junto con *Ae. aegypti*, considerados como vectores principales de la zoonosis (Vezani et. al., 2010).

### *Filariasis Americana de Bancroft (elefantiasis)*

La filariasis linfática o elefantiasis es una de las enfermedades tropicales más graves debido a que causa invalidez y desfigura a quienes la padecen; se encuentra en Brasil, República Dominicana, Guyana y Haití; actualmente, en las Américas, hasta 11 millones de personas siguen expuestas al riesgo de contraer la infección. La filariasis América de Bancroft (elefantiasis) tiene como agente etiológico un helminto de la familia Filariidae, la especie *Wuchereria bancrofti*. Este parásito presenta filaremia (tasa que indica la presencia circulante de microfilarias por milímetro cúbico de sangre en un tiempo determinado) periódica nocturna en la sangre periférica de individuos infectados. Los gusanos adultos forman conjuntos agrupados que dificultan la circulación de la linfa (líquido corporal carente de pigmentos que circula por los vasos linfáticos) (Raju et. al., 2010). El mosquito *Cx. quinquefasciatus* es considerado el principal vector en el ciclo la transmisión y propagación de la filariasis linfática (Regis et. al., 1995). Esta capacidad del mosquito es apoyada por su comportamiento, incluyendo la capacidad antropofílica alta, su alta capacidad de domicialización y sus hábitos nocturnos. *Cx. quinquefasciatus* es muy proclive a la infección por los embriones de *W. bancrofti*, lo que aumenta su capacidad en la transmisión de la enfermedad (Bartholomay et. al., 2010). Por otra parte, en las regiones endémicas, se ha demostrado que las hembras tienen un grado de longevidad suficiente para permitir el desarrollo del parásito en la fase infectiva (Forattini, 2002).

## JUSTIFICACIÓN.

En los últimos años el medio ambiente de nuestro planeta ha sufrido considerables transformaciones en muchas zonas como consecuencia del desarrollo de proyectos agrícolas, la urbanización, y otras actividades de desarrollo económico de la especie humana que repercuten en la utilización de los terrenos y del agua. Cabe suponer que muchos de los organismos de estas zonas, particularmente los insectos, están adaptándose a estas transformaciones, los cuales responden a esos cambios en el hábitat. Por esta razón el presente estudio sobre la Genética de Poblaciones en dípteros hematófagos como son los mosquitos, y particularmente los miembros del complejo *Culex pipiens*, es fundamental, a fin de contribuir como una medida preventiva, y visualizar el comportamiento actual de este vector, así como el potencial que tiene de distribuirse en la capital de nuestro país y sus alrededores. Dado que el mosquito *Culex pipiens* está directamente relacionado en la transmisión del VON (Smith y Fonseca, 2004), y tiene un alto grado de adaptación al ambiente humano, el conocer la distribución y la Genética de Poblaciones de este vector permitirá predecir el riesgo que existe de que se suscite una epidemia de esta enfermedad y se propague la misma en la zona conurbada de la capital del país; zona que se ha transformado de ser una región eminentemente agrícola a lograr un importante desarrollo urbano en un corto tiempo.

En México, los medios de comunicación informaron desde julio del 2002, la posible presencia del VON a través de aves provenientes de Estados Unidos, lo que causó natural alarma entre la población, sin embargo, funcionarios de la Secretaría de Salud informaron que México estaba preparado para enfrentar un eventual brote de esta enfermedad ya que, se habían lanzado campañas para controlar la proliferación de mosquitos por la epidemia de dengue que existía en Centroamérica y, por lo tanto, las mismas servirían también para controlar el vector del virus del Nilo; esas mismas autoridades, afirmaron que la posibilidad de que México sufriera el embate de este virus era reducida y que, en caso de que fallara ese pronóstico, se contaba con la infraestructura necesaria para detectar y controlar a tiempo cualquier brote.

Estas afirmaciones no son, ni fueron, convincentes, y queda claro cuando nos regresamos a observar otras enfermedades como el dengue a la cual no se le ha canalizado la atención ni los recursos necesarios para su control. Por otro lado el vector del VON se encuentra distribuido a altitudes mayores que el *Ae. aegypti*, por lo tanto las campañas para el control de *Aedes* no pueden ser las mismas que para el vector del VON. La ciudad de México presenta un esquema o panorama similar al de la ciudad de Nueva York, la cual presentó una de las epidemias más grandes de los últimos años; el vector de esta enfermedad está presente en esta ciudad y ello nos obliga a canalizar esfuerzos mayores a fin de comprender la biología y el comportamiento del vector y de esta enfermedad. En el presente trabajo se realizará el ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DEL VECTOR *Culex pipiens* TRANSMISOR DEL VON EN LA CIUDAD DE MÉXICO a fin de contribuir a este seguimiento y control de esta enfermedad, realizando la identificación de criaderos y fundamentando las medidas básicas para su erradicación y/o control en la Capital del país y su Zona conurbana.

## HIPÓTESIS

El VON es transmitido por los mosquitos del complejo *Culex pipiens*, por lo tanto el conocer la distribución y la genética de poblaciones de este vector permitirá predecir el riesgo que existe de que haya epidemias de esta enfermedad en el Área Metropolitana de la Ciudad de México.

## OBJETIVOS

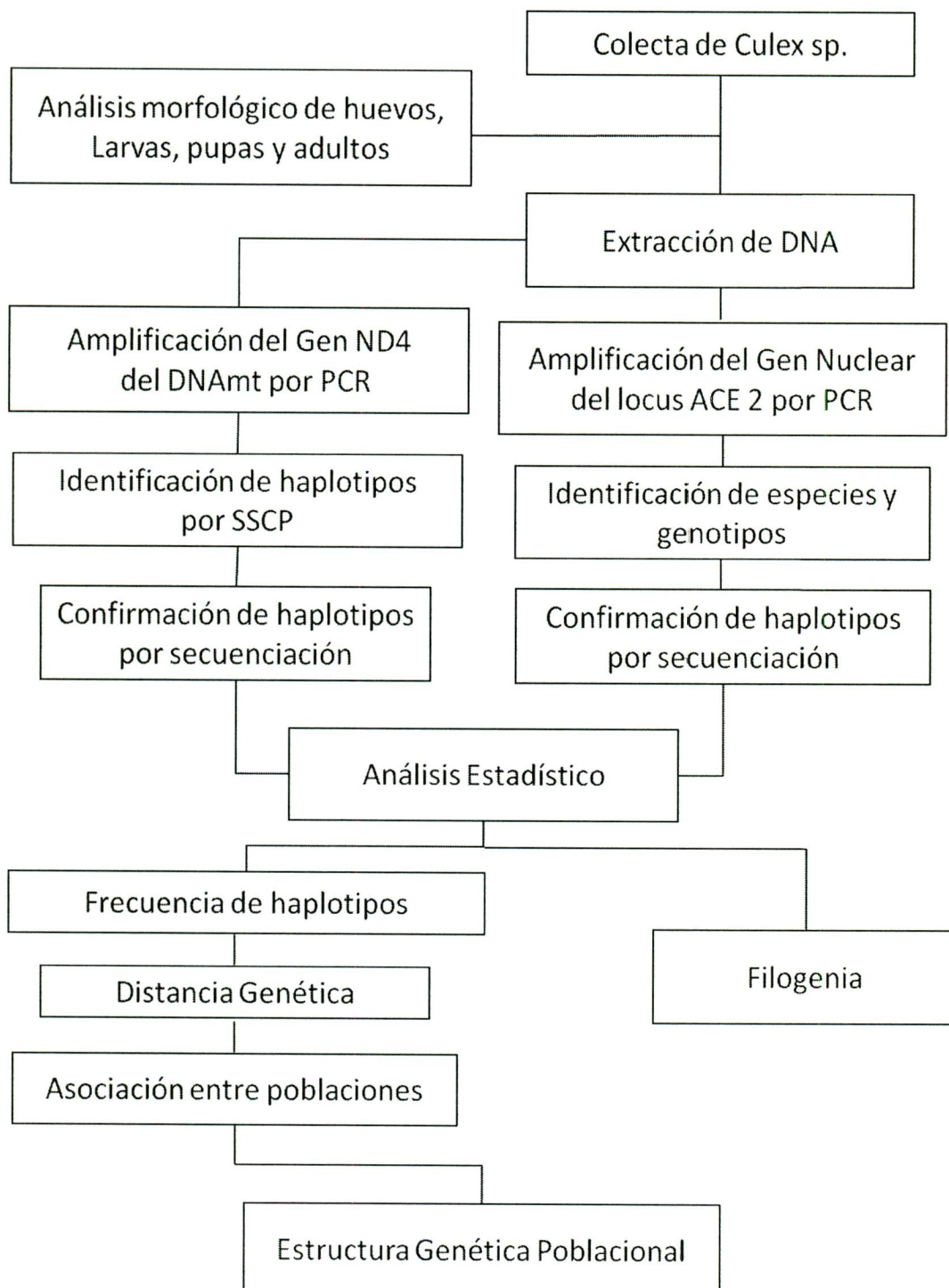
### Objetivo General

Determinar distribución y la estructura genética de poblaciones naturales de mosquitos del complejo *Culex pipiens* en la Ciudad de México, utilizando marcadores fenotípicos y moleculares.

### Objetivos Particulares

1. Conocer los valores morfométricos de las alas de las hembras adultas de las poblaciones colectadas determinando las variaciones morfológicas para establecer las especies en las distintas áreas geográficas del sitio muestreado.
2. Determinar los valores morfométricos de la genitalia masculina de los mosquitos adultos en las poblaciones colectadas para establecer las especies presentes en las distintas áreas geográficas del sitio muestreado.
3. Diseñar primers para amplificar la región de la NAD deshidrogenasa 4 del genoma mitocondrial de los miembros del complejo *Culex pipiens*, identificando los patrones de variación a partir de la secuencia del ADN mitocondrial, a través del análisis por SSCP para establecer el perfil genético de las poblaciones colectadas en las distintas áreas geográficas del sitio muestreado.
4. Identificar el perfil genético de los miembros del complejo *Cx. pipiens* a través de la amplificación de la región nuclear del segundo locus de la Acetilcolinesterasa (Ace 2); Identificando posibles eventos de introgresión genética e hibridación entre los taxones del complejo *Cx. pipiens*.
5. Analizar los diferentes factores medioambientales y sus relaciones con los vectores encontrados, que sugieren el establecimiento de una potencial epidemia del Virus del Oeste del Nilo en la Ciudad de México.
6. Relacionar el perfil genético y morfológico de las poblaciones colectadas en las distintas áreas geográficas del sitio de muestreo a fin de determinar la estructura genética de poblaciones naturales de mosquitos del complejo *Cx. pipiens* en la Ciudad de México.

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**



## **METODOLOGÍA**

### **Muestreo.**

Todos los procedimientos descritos a continuación se llevaron a cabo en las instalaciones del Insectario Anexo del Laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Las colectas de los estadios acuáticos de los mosquitos se realizaron con cucharones y succionadores para líquidos, de acuerdo a las recomendaciones hechas en el libro "The Biology of Disease Vectors" (Beaty y Marquardt, 1996) y las enseñanzas de los Drs. Barry Beaty y William Black IV de Colorado State University, Ildefonso Fernández de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Maestro Jorge Pascual Martínez del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Oaxaca (Ver figura 10B). Las capturas de mosquitos adultos se llevaron a cabo con aspiradores del tipo descrito por Natal y Marucci (1984), que pasan lentamente a través de la vegetación sin dañar los especímenes (Figura 10A y 10D).

Durante las colectas en campo, los mosquitos adultos fueron sacrificados por inhalación de acetato de etilo en cámaras letales y se colocaron individualmente en crio-tubos para ser colocados en ultracongelación, este procedimiento, que se acompaña de un proceso de secado con silica gel, se realiza para mantener la integridad de las características externas de los mosquitos, lo que facilita la identificación morfológica. Inicialmente, los mosquitos fueron identificados por morfología, con la ayuda de una lupa (20X en campo) y con el microscopio estereoscópico (40X-100X en laboratorio) y de acuerdo con las especificaciones de las claves taxonómicas de Darsie y Ward (2005) y Forattini (2002). Posteriormente fueron montadas laminillas con las estructuras de los órganos genitales de los machos adultos para la confirmación de caracteres morfológicos externos. En lugares distantes, se realizaron recolecciones de larvas, utilizando cucharones y pipetas entomológicas (Figura 10B) y envasados en botellas de plástico con agua y respiraderos para el transporte. En las casas aledañas a los sitios de colección cerca de los panteones, las hembras adultas grávidas fueron capturadas con las capturadoras de luz ultravioleta tipo CDC y se colocan en jaulas portátiles para su transporte al laboratorio (Ver figuras 10A y 10F). Con estos procedimientos, la intención fue obtener individuos de la primera generación (F1) y poder determinar la fuente de alimentación de sangre contenida en los intestinos de estas hembras.



Figura 10. Proceso de colecta y selección de individuos muestreados. (A) Capturadora tipo CDC-UV para colecta de adultos en sitios cerrados o abiertos. (B) Procedimiento de colecta de larvas y pupas en el sitio de colecta. (C) Análisis estereoscópico de las características morfológicas de los individuos colectados. (D) Capturadora tipo Succionador para colecta de adultos en sitios de colecta abiertos. (E) Selección de mosquitos adultos para su futura caracterización. (F) Acondicionamiento de las diferentes poblaciones colectadas dentro de los cuartos de cultivo del Insectario.

## Área de estudio

Se seleccionaron localidades dentro y fuera de la Ciudad de México con alta y baja densidad de mosquitos. Esta selección se hizo considerando las recomendaciones hechas por el CDC-Puerto Rico, la CSU-EU y la UANL-México. En estos sitios se realizaron las colectas de barquillas de huevos, larvas, preferentemente en primero y segundo estadio, pupas y adultos, para la extracción posterior del ADN, y el análisis genético mediante los métodos moleculares descritos posteriormente.

La Ciudad de México, capital de país, es el Distrito Federal. El Distrito Federal se encuentra en el mismo nivel de administración que el resto de los estados. Se encuentra ubicado en el Valle de México, también llamado la Cuenca de México o el Valle del Anáhuac, un gran valle situado en el Cinturón Neovolcánico de las altas mesetas en el centro de México. Tiene una altitud mínima de 2.200 metros sobre el nivel del mar y está rodeado de montañas y volcanes que alcanzan alturas de más de 5000 metros. La ciudad fue fundada principalmente en lo que fue el lago de Texcoco. Actualmente toda la periferia del lago está pavimentada y la mayoría de la ciudad se encuentra urbanizada localizando áreas boscosas que se encuentran en delegaciones del sur de la ciudad, Milpa Alta, Tlalpan y Xochimilco, principalmente. (Kottek et. al., 2006). El Distrito Federal se divide en 16 distritos o delegaciones (municipios). (Ver figura 11). Las delegaciones se componen de cientos de barrios y/o colonias. (Situación demográfica de la Ciudad de México).

La ciudad tiene un clima templado húmedo en las partes elevadas debido a su ubicación tropical y gran altitud. La zona inferior del valle recibe menos precipitaciones que las regiones más altas de la zona sur. Las delegaciones de menor elevación, Iztapalapa, Iztacalco, Venustiano Carranza y la parte oeste de Gustavo A. Madero son generalmente más secas y más calientes que la zona superior del sur donde se localizan las delegaciones de Tlalpan y Milpa Alta, una región montañosa con árboles de pino y roble conocido como el Ajusco, en Tlalpan. Estacionalmente, las temperaturas más bajas suelen registrarse durante enero y febrero, alcanzando de -2 A -5 ° C (28 a 23 ° F), a veces acompañadas por nieve en las regiones del sur del Ajusco. Las temperaturas máximas se producen durante la primavera y el verano que alcanzan hasta 32 ° C (90 ° F). El área recibe alrededor de 700 mm de precipitación anual, que se concentra de junio a septiembre/octubre, con poca o ninguna precipitación el resto del año. La Ciudad de México es un importante centro económico, industrial y cultural en el país y es la ciudad más poblada con más de 8.836.045 habitantes en 2008 (Estadísticas de población en México). El área metropolitana, Zona Metropolitana del Valle de México, consiste en el Distrito Federal y otros 60 municipios del Estado de México, ubicados principalmente al norte y al este de la ciudad. Esta área tiene una población total de aproximadamente 20 000 000 de habitantes (estimaciones personales para 2010).



Figura 11. Mapa físico de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Con indicación de las regiones aledañas a las zonas de colectas.

### Colección de Mosquitos e Identificación de Individuos

Las larvas de mosquitos fueron monitoreadas y colectadas en los cementerios de diversas zonas urbanas (Figura 12E), suburbanas (Figura 12G) y rurales (Figura 12I) en la Ciudad de México durante los años de 2004-2005. Esto represento el primer estudio que describe hábitats de las larvas de mosquitos en la Ciudad de México, su clasificación taxonómica y distribución. Las larvas se colectaron en huecos de árboles, zanjas, canales, estanques, baldes decorativos, charcas, fuentes, macetas y todo tipo de contención de agua de cada cementerio monitoreado (Ver figuras 12B, F, H y J). Es importante mencionar que el agua estuvo siempre presente en los diferentes intervalos de tiempo durante el periodo de muestreo.

*Monitoreo de Larvas y Mosquitos adultos durante todo el año.* Este proceso de monitoreo y recolección se aplicó con la finalidad de tener el dato espacial y temporal de las colectas seleccionadas durante todos los meses del año, en algunos panteones, a fin de realizar un análisis estadístico más detallado.

*Colectas de Mosquitos en periodos de lluvias.* Se colectaron las larvas y adultos de *Culex sp.* presentes en recipientes artificiales que almacenan agua, y que constituyen criaderos potenciales para este tipo de mosquitos (como se menciono previamente, tambos, llantas, floreros, piletas, botellas, envases de plástico y unicel, etc.). Las colectas se realizaron preferentemente después del inicio del patrón de lluvias establecido para la zona metropolitana para realizar un análisis temporal de la dinámica de las poblaciones de mosquitos, realizando colecciones mensuales en seis ocasiones de mayo a octubre de 2005. Los individuos adultos fueron colectados con el succionador portátil y colocados en tubos individuales. Las larvas fueron colectadas con cucharones, goteros y/o pipeteros y se colocaron en bolsas o recipientes de plástico, del tipo para muestreo de campo, debidamente etiquetadas para ser transportadas al insectario, de donde emergieron los adultos para la F1. Las larvas fueron criadas en condiciones normales de humedad y temperatura (20°C, 60% humedad relativa) y las pupas se colocaron (aproximadamente 200 pupas/ recipiente) en jaulas (30 × 30 × 30 cm) hasta la emergencia de los adultos (aproximadamente 400 adultos/jaula). Estos mosquitos se mantuvieron en los cuartos de cultivo del insectario a 28 °C ± 2 °C, con un fotoperíodo de 14:10 horas (Luz:Oscuridad). Estos individuos colectados fueron caracterizados e identificados adecuadamente, se separaron hembras y machos y seleccionaron exclusivamente aquellos del complejo *Culex pipiens*, que fueron colocados individualmente dentro de un tubo eppendorf y mantenidas a -80 °C para la posterior extracción del ADN.



Figura 12. Paisajes de los hábitats de los mosquitos en los sitios de recolección. Estado de desarrollo de los mosquitos colectados, (A) Huevos, (B) Larvas, (C) Pupas y (D) Adultos. (E-F) Zona urbana, área representativa en los cementerios de la Ciudad de México caracterizada por la alta densidad de población humana, transporte público y medios de comunicación abundantes y que contiene una pequeña cantidad de zonas verdes. (G-H) Zonas suburbanas, esta área está constituida por un equilibrio entre los edificios y las zonas verdes, con transporte público y medios de comunicación suficiente, pero donde la gente no se dedica a actividades agrícolas. (I-J) Zona rural, esta área es poco representativa y se caracteriza por la baja densidad de población humana, con medios de transporte y comunicación insuficiente, pero con áreas verdes y agrícolas. (F, H y J) Se muestra la variedad de recursos naturales y contenedores artificiales representativos de los hábitats de cada una de estas regiones de recolección en los cementerios de la Ciudad de México.

## Pruebas morfométricas

### Morfología del ala femenina

Se procesaron entre 30 y 50 hembras adultas de cada uno de los sitios de colecta para el análisis de los caracteres morfométricos de las alas. Estas fueron retiradas y montadas en portaobjetos y cubiertas con cubreobjetos para su posterior análisis en el microscopio. Se realizó la digitalización de las imágenes y se describió la distribución de los 18 puntos conforme a lo mostrado en las figura 5 y 13A. De aquí se determina la relación para cada individuo, dividiendo la longitud radial<sub>2</sub> ( $R_2$ ) por la longitud de la vena radial<sub>2+3</sub> ( $R_{2+3}$ ), utilizando los puntos 4, 16 y 17, de acuerdo con Linam y Nielsen (1962). Con los datos morfométricos fueron ordenados los diferentes grupos de hembras adultas.

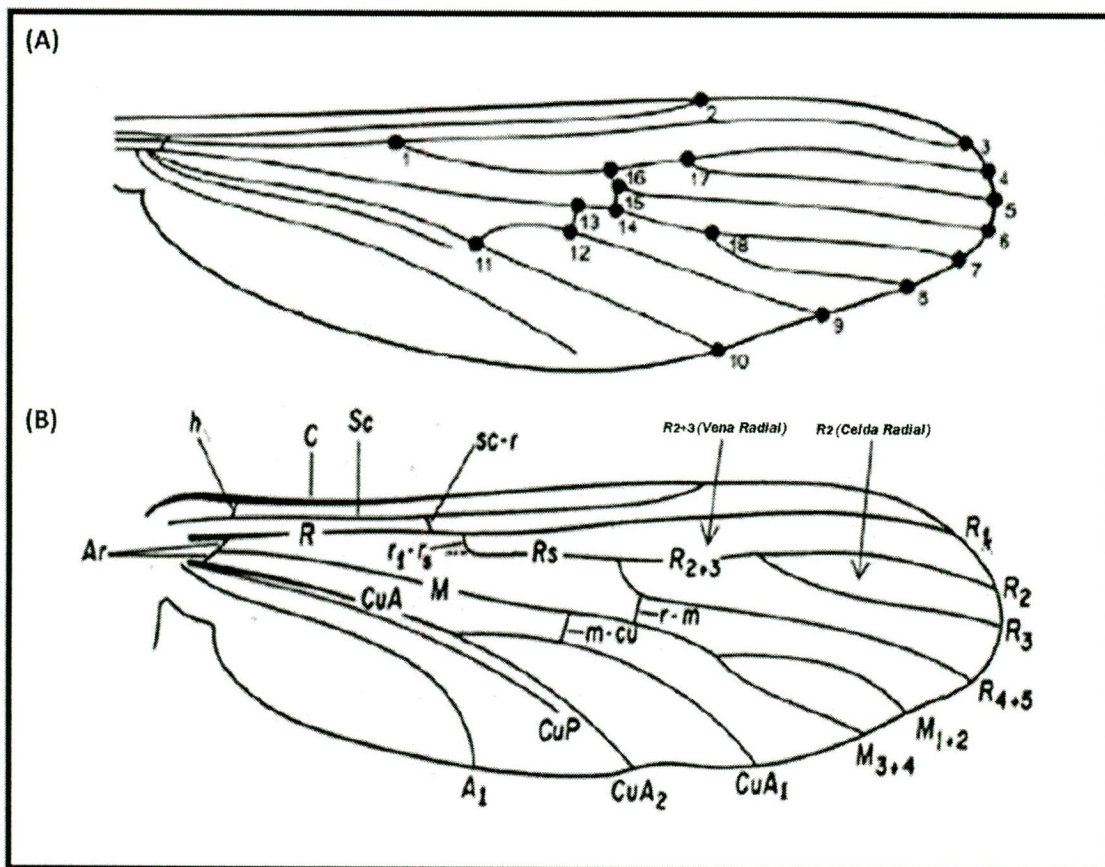


Figura 13. Análisis morfométrico del Ala de los mosquitos Hembras adultas. (A) El esquema del ala muestra los puntos importantes para el análisis morfométrico de las poblaciones. (b) Aspecto del ala del mosquito del complejo *Cx. pipiens*, donde se indica la ubicación de la celda Radial<sub>2</sub> ( $R_2$ ) y la vena Radial<sub>2+3</sub> ( $R_{2+3}$ ). Ambas pruebas utilizadas para este estudio morfométrico de las hembras adultas en las distintas poblaciones.

### Morfología de la genitalia masculina

Para realizar la identificación morfológica de los adultos machos de las distintas poblaciones se montaron 100 mosquitos de cada una de ellas seleccionados al azar y se observaron los caracteres morfológicos del falosoma mediante la técnica de montaje de los genitales (Figura 14) y de acuerdo a lo sugerido por Sundararaman (1949) y Consoli y de Oliveira (1994), con modificaciones. En primer lugar, se corta con una alicata entomológica los segmentos VII y VIII del abdomen de macho adulto, posteriormente, para aclarar, deshidratar, colorear y secar el segmento del material cortado, se utilizan las soluciones de Hidroxido de Potasio (KOH al 10%), alcohol etílico (EtOH al 70, 80, 90 y 95%, alcohol absoluto), aceite de creosota y bálsamo de Canadá. Como resultado, los genitales se separan y el resto del material se desecha. La estructura del edeago (aparato copulador masculino en los insectos) se aísla y se le añade una gota del bálsamo de Canadá, para posteriormente digitalizar las imágenes obtenidas en el microscopio. De acuerdo con Sundararaman (1949),  $S=DV/D$ , donde S=relación de Sundararaman, con DV=distancia entre los extremos de los brazos dorsal y ventral y D=distancia entre los extremos de los brazos dorsales. Por lo tanto, el valor promedio de la relación S es de aproximadamente 1.0 para *Cx. quinquefasciatus* y próximos a cero para *Cx. pipiens*.

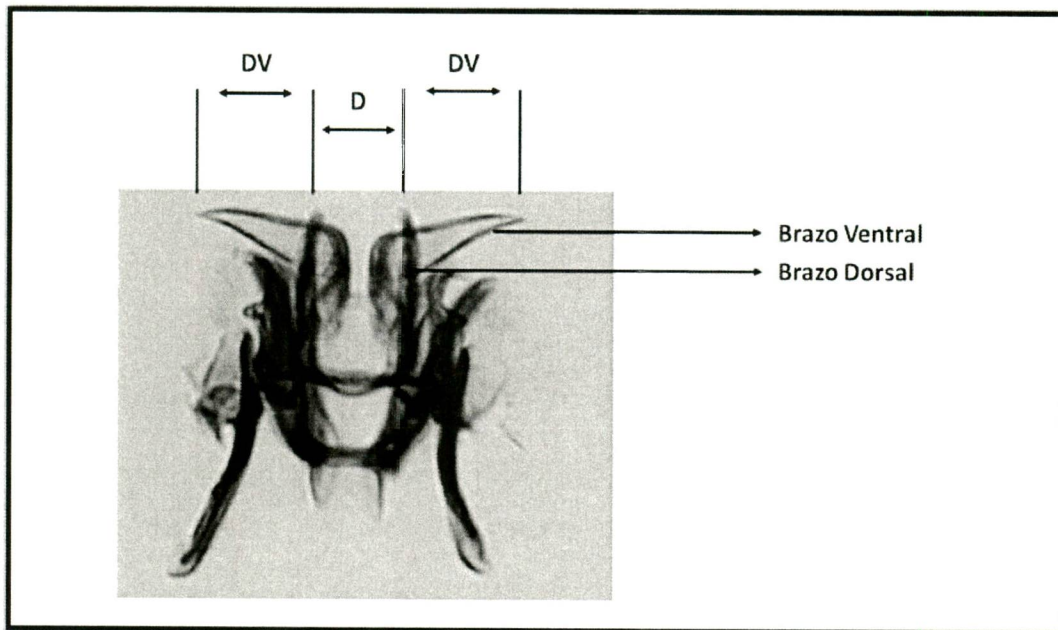


Figura 14. Aspecto general del falosoma de *Cx. quinquefasciatus* y la ubicación de los puntos para medir la relación DV / D (radio de distancia entre los brazos dorsal y ventral del edeago).

### **Aislamiento de ADN a partir de artrópodos individuales**

Se utilizó el método descrito por la Dra. Patricia Romans de la Universidad de Toronto y que es una modificación del procedimiento descrito por Coen y col. (1982) y Black (1992); a grandes rasgos se coloca el mosquito en un tubo con 25 microlitros de amortiguador de macerado, se tritura con un pistilo de plástico (Kontes). Se centrifugará brevemente hasta obtener un homogenizado. Se incuba dicho homogenizado a fin de desnaturalizar las proteínas. Se agregan 7 microlitros de Acetato de Potasio (KCH<sub>3</sub>COO 8M) y se mezcla ligeramente. Se incuba en hielo a fin de que el dodecilsulfato sódico (SDS) precipite. Se vuelve a centrifugar y se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y limpio. Se adicionan 100 microlitros de etanol absoluto y se incuba en hielo a fin de precipitar los ácidos nucleídos. Se centrifugará y se extraerá el etanol de modo que la pastilla con el ADN permanezca en el tubo. Se lava la pastilla con etanol al 75% y se centrifuga extrayendo posteriormente las trazas de etanol con un proceso de aire seco. Se resuspende la pastilla en 200 microlitros de TE (Tris-EDTA), alicuotando el ADN en dos partes, una para trabajo inmediato y la otra para su utilización posterior.

### **Diseño de primers para amplificar regiones específicas en el mtADN**

Simon y col. (1994) proporcionaron una revisión de primers usados para amplificar regiones del genoma mitocondrial en mosquitos. Brower y DeSalle (1998) enlistan regiones potenciales del genoma nuclear en insectos. El método más sencillo para el diseño de primers es el alineamiento de secuencias homologas de regiones conservadas que flanquean regiones hipervariables. Por lo cual en el laboratorio diseñamos primers degenerados a partir de regiones conservadas que flanquean regiones hipervariables para amplificar de 7 a 9 regiones del genoma mitocondrial en mosquitos. Realizamos un alineamiento de las secuencias homologas ya conocidas en el genoma de *An. gambiae*, *An. quadrimaculatus*, *Drosophila melanogaster* y *Drosophila yakuba*; dichos alineamientos se realizan utilizando el programa Vector NTI y se propusieron los siguientes primers de la tabla 2.

Tabla 2. Primers para la amplificación del ADN mitocondrial en mosquitos.

Nombre	Secuencia 5' ↔ 3'	Tamaño
12S+	TAC TAT GTT ACG ACT TAT	450 pb
12S-	AAA CTA GGA TTA GAT ACC C	
16S+	CCG GTY TGA ACT CAG ATC AYG T	550 pb
16S-	CRCCTGTTTAWCAAAAACAT	
CTB+	ACA TGA WTT GGW RMW CGA CCA GT	300 pb
CTB-	GGT ACW TTA CCT CGW WTT CGW TAT GAT	
16Sbl+	ACA TGA TCT GAG TTC AAA XXG G	300 pb
16Sbl-	GGT CCY TTA CGA ATTT GAA TAT AT	
16SbII+	ACA TGA TCT GAG TTC AAA CCG G	1321 pb
16SbII-	ACA TGA WTT GGW RMW CGA CCA GT	
ND5+	ATT AGG RTG AGA TGG NTT AG	390 pb
ND5-	AAT AAA TAW CAN CCW GCT GT	
ND4+	GTD YAT TTA TGA TTR CCT AA	387 pb
ND4-	CTT CGD CTT CCW ADW CGT TC	

El genoma mitocondrial, siendo haploide, no tiene pares de cromosomas o intercambios de alta complejidad. También son raros los casos de inserciones /deleciones a lo largo de la secuencia, así como los enlaces de doble cadena son menos estables, pero se sabe que la mayor cantidad de ligaciones dobles son del tipo del enlace A ↔ T. Como resultado, los fragmentos de genes son fácilmente amplificados, lo que da como resultado bandas de electroforesis más homogéneas y métodos de secuenciación directa para la lectura de la secuencia de bases. En este estudio, se utilizó un fragmento del gen mitocondrial de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa (ND4). Según Gray (1989), los genes codificantes de las subunidades de la nicotinamida adenina dinucleótido - NADH deshidrogenasa (ND1-6) y 3-COX1 son los que acumulan más rápidamente las sustituciones de bases en el genoma mitocondrial. Lo que causa mayor probabilidad de que sufra constantes impactos de estrés oxidativo durante los procesos metabólicos de la respiración intracelular y, más tarde, estos productos de los genes sufren la presión selectiva (Wei et. al., 1998). Esta dinámica contribuye a la diversidad y a la evolución de las especies. En base a estudios previos del laboratorio en *Aedes aegypti* (Gorochotegui-Escalante et. al., 2000) y considerando lo antes expuesto se seleccionó el gen ND4 para realizar el análisis de la región mitocondrial.

### **Establecimiento y corrimiento de las reacciones de PCR para el análisis SSCP**

Para cada reacción, 50 microlitros de volumen final, se adicionaran 43.5 microlitros de agua bidestilada, filtrada y esterilizada, 5 microlitros de amortiguador de PCR 10X, 0.5 microlitros de 20mM de dNTPs y 50 pM de cada primer. Se depositan 48 microlitros del amortiguador anterior (1X) dentro de un tubo estéril para PCR, se añaden 2 gotas (25 microlitros aproximadamente) de aceite mineral estéril. Se colocaran los tubos en proceso de CrossLinker (esterilización) a fin de destruir posibles contaminantes contenidos en la reacción. Se adiciona el ADN (20 a 30 nanogramos, 1 a 2 microlitros del resuspendido) atravesando la capa de aceite mineral de la mezcla 1X. Se colocan los tubos dentro de un termociclador y se calientan a 95°C por 5 minutos. Se reduce la temperatura a 80°C y se agregaran de 0.5 a 1 unidad de enzima Taq polimerasa en cada tubo. El ciclo para la reacción de PCR se describe a continuación: Desnaturalización 92°C/1min, Alineamiento 48°C/1min, Extensión 72°C/2min; lo anterior se repite por 10 ciclos. Desnaturalización 92°C/1min, Alineamiento 52°C/35seg, Extensión 72°C/2min; lo anterior se repite por 32 ciclos. Extensión final 72°C/7min, Almacenamiento 4°C/Tiempo indefinido. Para finalizar se realizara un gel de agarosa al 1.5% con TBE 1X para determinar si los productos fueron amplificados. Se revela con bromuro de etidio.

### **Montaje, carga y corrimiento de geles verticales para SSCP**

El análisis por SSCP (Single strand conformation polymorphism) requiere de la separación final de los fragmentos del ADN por electroforesis, para ello se necesita elaborar un gel con una malla que pueda resolver (revelar) las diferencias en tamaños debidas al cambio en un solo nucleótido; además se desean resolver las diferencias en la forma de la molécula de ADN de cadena sencilla renaturalizada. La electroforesis puede ser por lo tanto llevada a cabo bajo condiciones que no interrumpan el apareamiento de las bases dentro de la cadena. Para esto se utilizaran geles no desnaturizantes con bajo medio de porosidad; la matriz del gel con baja porosidad es más fácil de generar usando acrilamida. Para el montaje se le da un tratamiento exterior de la cara de la placa del vidrio con Xilano para así poder adherir el gel al vidrio para su posterior tinción con plata. La placa opuesta es lavada y tratada con Sigmacote o Acrilasa, con el fin de evitar la adhesión del gel a esta placa. La matriz la elaboramos mezclando 16.7 mililitros de acrilamida al 30%, 20 mililitros de TBE 5X, 58.3 mililitros de agua desionizada y de 4 a 5 mililitros de glicerol. Se filtra la solución y se le añaden 100 microlitros de Persulfato de Amonio mas 100 microlitros de TEMED (Tetrametil etilen diamina); el gel es cargado y después de la polimerización se remueven los peines y los pozos formados son lavados con TBE 1X. Para poder cargar las muestras se añaden de 0.5 a 1.0 microlitros de la muestra más 5.5 microlitros de buffer de corrida. Las muestras entonces son llevadas a un termociclador a 95 °C durante 4 minutos y se pasa directamente la muestra a una cama de hielo. Las muestras entonces son cargadas en el gel. La electroforesis es realizada a temperatura ambiente (20-26 °C) de 16 a 24 horas con un patrón de corriente constante de 16 miliamperes y utilizando un buffer de TBE 1X.

### Tinción con plata de los geles SSCP

El complejo de la plata con muchas moléculas biológicas incluye a los ácidos nucleídos. La plata forma un complejo con los ácidos nucleídos que puede ser reducido con una ligera base (débil) para dar una forma oscura de tono negro-café y así de este modo los ácidos nucleídos que tienen complejo con la plata pueden ser detectados. En el gel de acrilamida, los ácidos nucleídos tienden a ser separados y son teñidos con plata, se asegura la fijación del gel en ácido acético, se lava con agua bi-distilada y des-ionizada, y finalmente se coloca el gel en una solución que contiene nitrato de plata. La metodología se sigue como lo propone Black y colaboradores. (1992).

### El gen de la Acetilcolinesterasa (Ace)

Para ayudar en la identificación de las especies, subespecies e híbridos o posibles especies crípticas (especies gemelas que son extremadamente similares en apariencia -morfología, fisiología y comportamiento- pero que se hallan reproductivamente aisladas entre sí) del complejo *Cx. pipiens* se utilizaron pruebas de PCR multiplex para poder ver el patrón de bandas de electroforesis, la región nuclear polimórfica del segundo intrón del locus de la acetilcolinesterasa (Ace 2). Las pruebas se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en la obra de Bourguet y colaboradores (1998), Sanogo y Colaboradores (2007 y 2008) y Smith & Fonseca (2004). El área molecular de estudio abarca una parte del exón 2, el fragmento completo del segundo intrón y parte del exón 3 (Ver figura 15).

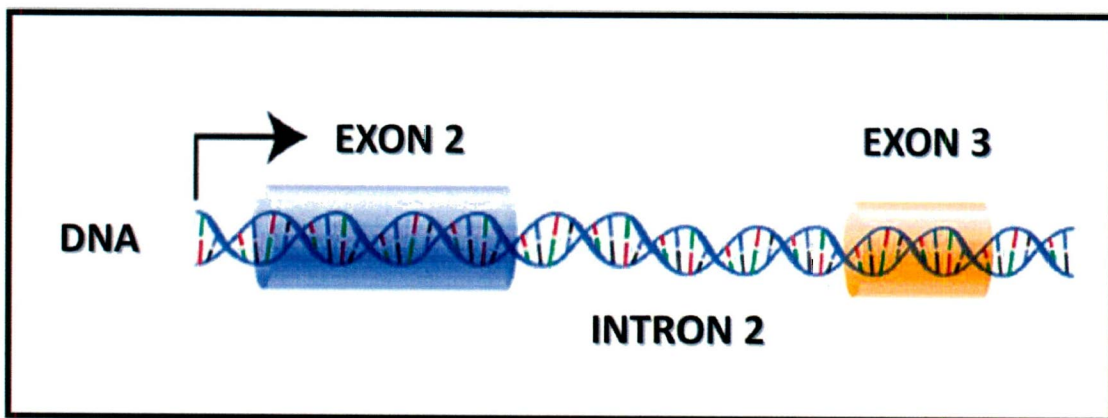


Figura 15. Fragmento Ace 2 de la Familia de genes de la acetilcolinesterasa.

Los estudios de Smith & Fonseca (2004) presentan una serie de polimorfismos del gene Ace 2 en la entre los miembros del complejo *Cx. pipiens*, haciendo énfasis en que en la región de los exones los polimorfismos son escasos. Casi todas las sustituciones de bases en el intrón Ace 2 de las especies *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* son diferentes entre las especies y similares dentro de cada especie. Por lo tanto, fue posible estandarizar los tamaños de las bandas de electroforesis, con el uso de enzimas de restricción y el diseño de primers o cebadores internos para la

amplificación de fragmentos por la técnica multiplex. En este estudio, inicialmente se utilizaron todos los primers descritos por Smith & Fonseca (2004), pero posteriormente se optó por un multiplex-PCR, que combina los dos primers forwards (hacia adelante), que son específicos de cada una de la especies encontradas en México, con el primer reverso (hacia atrás) localizado en el exón 3 de todas las especies del complejo (5'-ACEquin CCTTCTGAATGGCTGTGGCA- 3', 5'-Acepip GGAACAACGACGTATGTACT-3', 5'-B1246s TGGAGCCTCCTCTCACGG-3'), como se muestra en la figura 16. Para el análisis de los resultados de amplificación de Ace 2 las reacciones de amplificación de PCR se realizaron como se describió previamente para el ADN mitocondrial. El ciclo para la reacción de PCR se describe a continuación: Desnaturalización inicial 94 °C/5 min. Desnaturalización 94°C/30 seg, Alineamiento 56 °C/30 seg, Extensión 72°C/1 min; lo anterior se repite por 35 ciclos. Extensión final 72°C/7min, Almacenamiento 4°C/Tiempo indefinido. Para finalizar se realizara un gel de agarosa al 1.5 % con TBE 1X para determinar si los productos fueron amplificados. Se revela con bromuro de etidio.

	F1457	→ F1457						
Cx. quinquef		1	gaggagatgt	ggaatcccaa	cacgaacgta	toggaggact	gtctgtatct	gaacatttgg
Cx. pipiens		1	gaggagatgt	ggaatcccaa	cacaacgta	toggaggact	gtctgtatct	gaacatttgg
Cx. quinquef		61	gtaccaacga	agaccocggtt	gcgccatgga	cgaggactaa	actttggaaa	caacgatgta
Cx. pipiens		61	gtaccaacga	aaaccocggtt	gcgccaogga	cgaggactaa	acttt	
Cx. quinquef		121	agtactactt	cttcttggtta	gtacacagaa	cgccagaaaa	atatogatga	tg-ctctgtt
Cx. pipiens		121	actt	cttcttggtta	gtacacagta	cgacagaaaa	atgtogatga	tggctctgtc
Cx. quinquef		180	aggatttttt	tgacaatcgc	ttattgggtc	ttogatgatt	cgaaggaatt	tatagtaaaa
Cx. pipiens		181	agaagttttt	tgacaatcac	tttttgattc	ttogatcatt	cggaagaatt	tatagtgata
Cx. quinquef		240	tggttgagac	gcatgatact	aaatataaga	actaactgaa	cttttaaat	ttttctgtcg
Cx. pipiens		241	tggttgaaac	gcatgatacc	agatatgaga	actaactaaa	cttttgacat	ttttctgtcg
Cx. quinquef		300	agctgtgctt	gtggtgattt	agttgtgocg	ggctctgaga	ggacaggtc	cagagtgtat
Cx. pipiens		301	agctgtgctt	gtgatgattt	agttgttcgt	ggctctgaga	ggacaggtc	cagagtgtat
Cx. quinquef		360	tttttagtag	tagcgtaggc	gtttatgcac	ccacaaagga	gataattcac	aaggtttttt
Cx. pipiens		361	tttttagtag	ttgcgtaggc	gtttatgcac	ccacaaogga	gataattcac	aaggtttttt
Cx. quinquef		420	ttcttttctt	gtt--ttttt	cccaacagga	atggctgtgt	ccacctctt	attgcagta
Cx. pipiens		421	ttcttttctt	tttgtttttt	cccctctggc	atggcogtgg	ccacctctt	attgcagta
Cx. quinquef		478	ttccaggacg	atgaggactt	ccagcggcag	caccagtcca	agggcggcct	cgcgatgctg
Cx. pipiens		481	ttccaggacg	atgatgaact	ccagcggcag	caccagtcca	agggcggcct	cgcgatgctg
Cx. quinquef		538	gtctggatct	acgggggtgg	gtttatgagc	ggaacatcaa	cgctggacgt	ttacaacgca
Cx. pipiens		541	gtctggatct	acgggggtgg	gtttatgagc	ggaacatcaa	cgctggacgt	ttacaacgca
Cx. quinquef		698	gaaatactgg	cgggcogtgg	aaacgtaatc	gtggcctcga	tgcagtagcc	agtgggagca
Cx. pipiens		601	gaaatactgg	cgggcogtgg	aaacgtaatc	gtggcctcga	tgcagtagcc	agtgggagca
Cx. quinquef		658	ttcggtttct	tctaccttct	gccctacttg	aacggcogtg	aagaggaggc	tcca
Cx. pipiens		661	ttcggtttct	tctaccttct	gccctacttg	aacggcogtg	aagaggaggc	tcca

Figura 16. Alineación de secuencias del Gen Ace 2. Se alinearon las secuencias de las dos especies principales en México del complejo *Cx. pipiens*, mostrando las diferencias en las bases y ubicando los primers B1246S y F1457 que son los cebadores externos, así mismo se muestran los cebadores internos, que son específicos de cada una de las especies *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens*.

### **Secuenciación de los productos de PCR**

Para secuenciar los productos de amplificación de los genes, Nuclear y Mitocondrial, los fragmentos de ADN fueron purificados por columnas Quiaquick (Quiagen, Chatsworth, Calif.). La secuenciación automatizada fue hecha por el método de Sanger y colaboradores (1977), usando el kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems-Cycle Sequencing Ready Reaction) y utilizando el secuenciador ABIPRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de la Unidad de Ácidos Nucleídos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN.

### **Construcción y análisis de secuencias para los estudios de filogenia**

Las secuencias obtenidas se alinearon y compararon con las secuencias reportadas en el GenBank, por medio del programa Clustal W (Thomson et. al., 1994) y se tradujeron automáticamente usando el programa BioEdit 7.0.9 (Ibis Biosciencias). Para los análisis filogenéticos se usaron los métodos de Neighbor-joining, Máxima Parsimonia y Mínima evolución con corrección gamma y un bootstrap de 1000 repeticiones y el método de sustitución nucleotídica determinada por el "Model Selection" utilizando el programa MEGA V4 (Tamura et. al., 1993 y 2007).

## **RESULTADOS**

### **Especies de mosquitos recolectados**

Un total de 202148 larvas de mosquitos pertenecientes a los géneros *Culex* (77%), *Culiseta* (18%) y *Ochlerotatus* (5%) se obtuvieron de 3955 contenedores de cementerios en las 16 delegaciones de la Ciudad de México (Ver Tabla 3 y figura 17). Barquillas de huevecillos, larvas de 1°, 2°, 3<sup>er</sup> y 4° estadio, pupas y adultos se colectaron en todos los sitios (Ver figura 12); se elaboró una clave entomológica que sirvió como guía en los sitios de colecta a fin de diferenciar las distintas especies en campo, (Ver figura 18). El 49.5% de los sitios colectados tuvieron mosquitos del complejo *Cx. pipiens* exclusivamente; El 40.7% de los sitios además mostraron especies de *Ochlerotatus* y 33.9% de los sitios tenían además mosquitos del género *Culiseta*. Curiosamente, *Cx. tarsalis* sólo se identificó en el panteón del Peñón de los Baños (sitio 87-VC), cerca del aeropuerto internacional de la Ciudad de México (Ver figuras 17 y 19) coexistiendo con *Cx. p. quinquefasciatus*. Se observó que el complejo *Cx. pipiens* coexiste con especies de los géneros *Culiseta* y *Ochlerotatus* en 25 sitios, solo con *Culiseta* en 10 sitios y solo con *Ochlerotatus* en 17 sitios. En este estudio, utilizamos tres designaciones para el tipo de ambiente ecológico en el que se encuentran las áreas aleatorias de los panteones muestreados: Urbano, Suburbanas y Rurales (figura 12), a fin de caracterizar el paisaje en las diferentes regiones de la Ciudad de México. De los 10250 mosquitos del complejo *Cx. pipiens* examinados, el 54.5% eran hembras y el 45.5% eran machos (Ver Tabla 3). La razón Macho-Hembra fue de 0.84:1.

### **Índice Sifonal en el cuarto instar de las larvas**

Las características del sifón han sido una característica de valor diagnóstico para la caracterización de especies en el complejo *Cx. pipiens*; estas características incluyen en su forma, la relación de la longitud del diámetro basal (índice de sifón o índice sifonal), la naturaleza del Pecten, y las características de los mechones del sifón, (Ver figura 18). El índice de sifón se obtiene comparando la longitud del sifón, con exclusión del acus y las válvulas, con el diámetro de mayor anchura en el anillo de la base. Se dice que un sifón está "inflado" cuando es considerablemente más amplio el diámetro cerca de la mitad del mismo, comparado con la base. Las larvas de *Cx. pipiens* comúnmente son más largas que *Cx. quinquefasciatus*; los sifones de *pipiens* generalmente se exhiben como estructuras largas y delgadas, comparadas con las estructuras de *quinquefasciatus* que suelen ser cortas y gruesas (Jupp, 1978), (Ver figura 18), por tanto el Índice sifonal de las larvas de *Cx. pipiens* suele ser más grande que en *Cx. quinquefasciatus*. Diversos autores han abordado esta caracterización morfológica sin llegar a un consenso (Carpenter y LaCasse, 1955., Jupp, 1978., Brogdon, 1981, 1984a y 1984b; Vinogradova y Reznik, 1994; Vinogradova, 2000 y 2003). Por convención, en nuestro laboratorio se consideraron como parámetros los valores siguientes para las especies en estudio: *Cx. pipiens*-cerca de 4.0-5.0, *Cx. quinquefasciatus*-entre 3.0 y 4.0, *Culex* híbridos-cerca de 3.9 y *Cx. tarsalis*-entre 4.5 y 5.5, y considerando los valores aportados por Carpenter y LaCasse (1955) y Vinogradova (2000). La tabla 4 muestra los valores obtenidos en nuestras colecciones. (Ver figura 20).

Tabla 3. Localización Geográfica de los Cementerios Analizados y porcentaje de mosquitos adultos machos obtenidos.

Clave	Cementerio	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Fecha (2004)	Contenedores (numero)	Total de Larvas	Machos (%)
<b>AO</b>	<b>Alvaro Obregón</b> ☼							
01-AO	Guadalupe*	19°22'47.12"	99°11'53.24"	2293	04/04	24	2680	28
02-AO	San Ramón**	19°20'09.21"	99°16'43.71"	2694	03/04	14	1350	32
03-AO	Santa Rosa Axochiac**	19°20'03.32"	99°16'49.79"	2697	03/04	28	2030	39
04-AO	Guadalupe Tlacoyaque**	19°19'33.06"	99°16'09.52"	2698	03/04	12	1060	34
05-AO	San Rafael*	19°20'13.69"	99°11'31.23"	2297	04/04	16	1100	32
06-AO	Jardín-Nuevo**	19°20'58.08"	99°15'28.00"	2259	03/04	28	1650	49
07-AO	Jardín*	19°21'00.97"	99°13'04.34"	2413	03/04	72	6240	32
08-AO	Balcones De Cehuayo**	19°21'24.35"	99°14'27.58"	2541	03/04	8	420	33
09-AO	Tarango*	19°21'45.47"	99°12'30.23"	2330	04/04	22	1740	43
10-AO	Civil Santa Fe*	19°23'03.41"	99°13'50.32"	2413	04/04	28	960	46
<b>AZ</b>	<b>Azcapozalco</b> ☼							
11-AZ	Santa Lucia*	19°28'33.47"	99°11'57.30"	2257	01/05	25	2200	41
12-AZ	Santa Apolonia*	19°28'25.04"	99°11'35.28"	2254	01/05	20	1350	33
13-AZ	San Isidro*	19°29'12.91"	99°12'45.68"	2258	02/05	115	4235	39
14-AZ	San Juan Tlihuaca*	19°29'15.77"	99°12'21.05"	2256	02/05	19	1620	40
15-AZ	Santa Cruz De Las Salinas*	19°29'19.89"	99°09'18.06"	2245	04/09	16	1100	47
16-AZ	San José*	19°30'02.55"	99°11'50.95"	2252	02/05	17	890	38
<b>BJ</b>	<b>Benito Juárez</b> ☼							
17-BJ	Panteón Xoco*	19°21'33.97"	99°09'55.87"	2256	28/03	17	2130	42
<b>CO</b>	<b>Coyoacán</b>							
18-CO	Mausoleos Del Ángel*	19°18'25.48"	99°10'44.25"	2302	29/05	14	710	31
19-CO	San Pablo Tepetlapa*	19°19'19.33"	99°08'18.38"	2249	29/05	25	810	52
20-CO	San Francisco Culhuacan*	19°20'02.69"	99°07'13.64"	2242	29/05	20	2220	43
<b>CJ</b>	<b>Cuajimalpa</b> ☼							
21-CJ	El Calvario**	19°21'34.14"	99°18'02.07"	2792	05/06	42	2790	39
22-CJ	San Lorenzo***	19°19'53.48"	99°19'43.52"	2924	05/06	19	1360	48
23-CJ	La Concordia**	19°21'04.33"	99°19'07.00"	2753	05/06	22	865	48
<b>CU</b>	<b>Cuauhtémoc</b> ☼							
24-CU	Francés*	19°24'16.94"	99°09'14.00"	2241	28/03	32	1564	32
<b>GM</b>	<b>Gustavo A. Madero</b> ☼							
25-GM	Progreso*	19°29'03.23"	99°06'37.33"	2237	03/07	132	5620	48
26-GM	Del Tepeyac*	19°29'13.54"	99°06'56.71"	2270	03/07	36	710	43
27-GM	Santiago*	19°28'02.21"	99°05'23.50"	2235	03/07	24	1345	37
28-GM	Centenario*	19°30'02.52"	99°05'44.20"	2247	03/07	32	2640	39
29-GM	Dolores San Juanico*	19°30'17.57"	99°05'56.29"	2248	03/07	25	1660	51
30-GM	Nezahualcoyotl S. Isabel*	19°30'00.26"	99°06'57.01"	2245	04/07	20	1200	39
31-GM	Cartagena San Pedro*	19°30'17.26"	99°07'13.40"	2266	04/07	30	2530	40
32-GM	Santa Maria Ticoman*	19°31'12.35"	99°08'00.44"	2255	04/07	20	2260	41
33-GM	Santiago Atepetlac*	19°31'20.24"	99°09'41.25"	2246	04/07	35	2490	50
34-GM	Cuauhtepec*	19°33'05.39"	99°08'26.84"	2286	04/07	69	2930	47
<b>IC</b>	<b>Iztacalco</b>							
35-IC	San Jose Iztacalco*	19°23'34.92"	99°07'47.75"	2236	28/03	85	7300	23
<b>IP</b>	<b>Iztapalapa</b> ☼							
36-IP	De San José Aculco*	19°22'31.89"	99°06'08.60"	2238	28/03	25	3420	31
37-IP	Civil San Nicolás Tolentino*	19°20'32.07"	99°05'01.17"	2296	04/09	149	4765	55
38-IP	Civil San Lorenzo Tezonco**	19°18'36.10"	99°03'50.60"	2252	04/09	150	2345	44
39-IP	La Cueva*	19°21'24.48"	99°05'31.83"	2256	04/09	25	1710	52
40-IP	5 De Mayo-Galeana*	19°20'27.05"	99°02'58.92"	2246	28/08	35	1845	52
41-IP	Reforma Municipal*	19°20'21.72"	99°01'38.28"	2252	28/08	35	3075	39
42-IP	De Culhuacan*	19°20'24.82"	99°06'24.88"	2252	28/03	20	1730	29
43-IP	Mirador Santiago*	19°21'13.94"	99°00'08.08"	2273	28/08	20	875	49
44-IP	Santa Martha*	19°21'47.58"	99°00'44.06"	2250	28/08	35	2640	45
<b>MC</b>	<b>Magdalena Contreras</b> ☼							
45-MC	San Bernabe*	19°18'44.54"	99°15'21.48"	2674	31/07	92	845	48
46-MC	San Francisco*	19°18'50.21"	99°13'58.16"	2481	31/07	35	1255	49
47-MC	San Nicolás*	19°17'51.02"	99°14'04.31"	2518	31/07	25	995	47
48-MC	San Jerónimo*	19°19'99.24"	99°13'32.90"	2417	31/07	20	1485	51

Genética de Poblaciones del Complejo *Culex pipiens* (Diptera: culicidae) en la Ciudad de México

<b>MH</b>	<b>Miguel Hidalgo</b> ☼							
49-MH	Israelita*	19°24'09.88"	99°12'22.87"	2347	07/08	25	1320	53
50-MH	Civil De Dolores*	19°24'04.96"	99°12'44.20"	2372	07/08	214	4210	67
51-MH	Francés*	19°27'08.76"	99°12'42.74"	2274	21/08	60	4800	51
52-MH	Sanctorum*	19°27'15.81"	99°12'54.89"	2283	21/08	60	3960	52
53-MH	Español*	19°27'51.13"	99°12'36.42"	2265	14/08	230	3595	47
54-MH	Americano*	19°27'33.80"	99°12'02.86"	2259	14/08	25	1340	49
55-MH	Alemán*	19°27'38.52"	99°11'56.54"	2257	14/08	20	915	51
56-MH	Británico*	19°27'31.94"	99°11'57.20"	2257	14/08	20	1005	48
57-MH	Monte Sinaí*	19°27'31.56"	99°12'00.79"	2259	14/08	25	1150	51
<b>MA</b>	<b>Milpa Alta</b> ☼							
58-MA	Milpa Alta***	19°11'22.14"	99°00'49.03"	2413	10/07	25	1460	52
59-MA	San Francisco Tecoxpa**	19°11'41.65"	99°00'12.47"	2338	10/07	15	1130	60
60-MA	San Jerónimo Miaccatlan**	19°11'26.61"	99°00'04.05"	2406	10/07	15	950	47
61-MA	San Juan Tepenahuac**	19°11'23.45"	98°59'43.87"	2424	10/07	15	1160	51
62-MA	De Santa Ana Tlacotenco**	19°10'21.45"	99°00'07.54"	2671	10/07	30	2895	49
63-MA	Salvador Cuauhtenco***	19°11'03.33"	99°05'37.07"	2882	10/07	25	1845	48
64-MA	San Pablo Oztotepec***	19°10'32.46"	99°04'14.83"	2827	10/07	30	2420	56
65-MA	San Lorenzo Tlacoyucan**	19°10'33.96"	99°01'52.79"	2623	10/07	10	619	51
66-MA	San Pedro Atocpan**	19°12'04.38"	99°03'16.63"	2473	11/07	25	2560	39
67-MA	Bartolome Xicomulco***	19°12'04.91"	99°04'06.80"	2606	11/07	20	1310	49
68-MA	San Antonio Tecomitl***	19°12'49.69"	98°58'54.60"	2246	11/07	35	1725	50
<b>TH</b>	<b>Tlahuac</b> ☼							
69-TH	General San Pedro Tlahuac*	19°16'05.01"	99°00'01.93"	2240	17/07	260	3865	48
70-TH	Tierra Blanca*	19°14'28.09"	98°59'54.92"	2265	17/07	25	1020	38
71-TH	Lirios***	19°13'48.01"	98°59'05.02"	2243	17/07	15	740	46
72-TH	Tetelco***	19°12'34.24"	98°58'26.14"	2251	11/07	15	940	47
73-TH	San Andrés Mixquic*	19°13'31.64"	98°57'49.76"	2246	17/07	45	2680	43
74-TH	Tlaltenco San Francisco*	19°17'57.95"	99°01'17.21"	2248	18/07	62	1360	39
75-TH	Zapotitlan**	19°18'07.39"	98°01'31.52"	2246	18/07	30	1140	51
76-TH	San Rafael Atlixco***	19°18'18.20"	99°01'35.38"	2252	18/07	15	420	48
77-TH	Santa Catarina***	19°18'22.60"	98°58'32.96"	2243	18/07	20	1290	49
<b>TL</b>	<b>Tlalpan</b> ☼							
78-TL	San Marcos*	19°16'57.40"	99°10'10.28"	2295	11/09	35	3720	49
79-TL	Santa Ursula Xitle*	19°16'48.55"	99°10'39.86"	2324	11/09	20	1100	77
80-TL	Santo Tomas Ajusco***	19°12'51.40"	99°13'12.80"	3057	18/09	30	1450	51
81-TL	San Miguel Ajusco***	19°13'21.77"	99°11'51.34"	2846	18/09	30	1795	48
82-TL	De La Cruz Petlalcalco**	19°13'59.04"	99°10'57.84"	2749	18/09	30	2130	39
83-TL	San Miguel Xicalco**	19°14'02.57"	99°10'13.37"	2717	18/09	30	1690	46
84-TL	San Andrés**	19°14'54.96"	99°10'32.40"	2541	18/09	30	940	42
85-TL	San Pedro Mártir*	19°15'58.75"	99°10'27.77"	2372	11/09	20	1260	49
86-TL	De La Fuerzas Armadas*	19°15'21.74"	99°09'37.55"	2392	11/09	15	830	50
<b>VC</b>	<b>Venustiano Carranza</b>							
87-VC	Peñón De Los Baños*	19°26'32.44"	99°04'50.88"	2249	12/09	35	1230	62
<b>XO</b>	<b>Xochimilco</b> ☼							
88-XO	Jilotepec*	19°15'39.78"	99°07'19.21"	2257	10/09	35	2695	37
89-XO	Santiago Tepalcatlapan**	19°15'04.18"	99°07'40.33"	2271	10/09	25	2130	33
90-XO	Francisco Tlalnepantla***	19°11'37.51"	99°07'16.72"	2690	02/10	15	930	40
91-XO	San Miguel**	19°12'20.92"	99°08'05.44"	2609	02/10	35	2590	46
92-XO	Santa Cecilia Tepetlapa***	19°12'35.12"	99°06'08.33"	2523	09/10	19	985	63
93-XO	Montecristo Santa Cruz**	19°13'09.35"	99°07'37.19"	2470	02/10	15	1260	61
94-XO	San Andrés**	19°13'47.14"	99°06'30.25"	2412	09/10	35	2665	58
95-XO	San Lucas**	19°14'04.46"	99°06'37.85"	2349	09/10	35	1720	42
96-XO	San Lorenzo Los Olivos**	19°14'17.90"	99°05'58.58"	2312	25/09	14	1045	71
97-XO	Sal Lorenzo Atemoaya*	19°14'38.26"	99°05'50.02"	2274	25/09	35	3230	41
98-XO	Las Cruces*	19°14'35.21"	99°04'25.41"	2262	16/10	22	930	36
99-XO	Santa Cruz***	19°14'10.55"	99°04'00.69"	2344	16/10	35	1045	31
100-XO	Santiaguito**	19°15'18.56"	99°01'15.26"	2256	16/10	35	4735	67
101-XO	San José*	19°15'15.14"	99°02'09.01"	2267	16/10	20	1745	33
102-XO	San Gregorio*	19°15'15.78"	99°02'52.51"	2251	16/10	35	2395	51
103-XO	Santa María Tepepan*	19°16'31.40"	99°08'22.27"	2282	17/10	30	1335	47
<b>Total</b>	<b>103 cementerios</b>					3955	202,148	44.7

(\*) Urbana, (\*\*) Suburbana, (\*\*\*) Rural ☼ Delegaciones

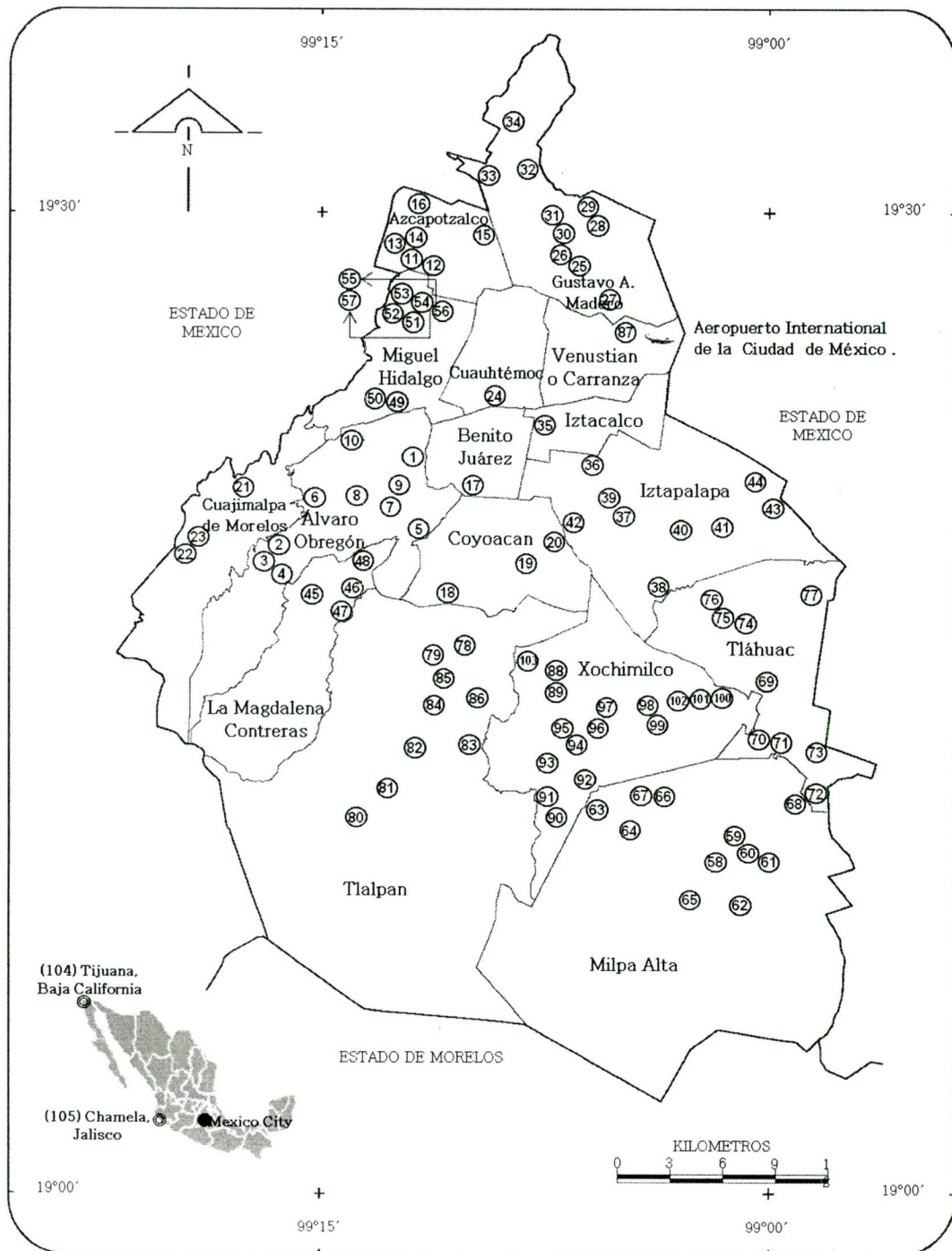


Figura 17. Localización geográfica de los sitios de muestreo en Cementerios de la Ciudad de México. El mapa indica los sitios considerados para el muestreo en cada delegación de acuerdo a la tabla 3; adicionalmente se muestran en el mapa de la República Mexicana (marco inferior izquierdo) los dos sitios donde se obtuvieron los controles positivos (Tijuana-*pipiens* y Chamela-*quinquefasciatus*).

**Tabla 4.** Localización Geográfica de los Cementerios Analizados para determinar el valor del Índice Sifonal en larvas de cuarto estadio.

NOMBRE DE LA DELEGACION	ABREVIATURA	SITIO DE COLECTA	COORDENADAS		ALTITUD		ESPECIE	N	INDICE SIFONAL	
			NORTE	OESTE	PIES	METROS			MEDIA	MIN-MAX
ALVARO OBREGON	07-AO	PANTEON JARDIN	19° 21' 06.26"	99° 12' 39.92"	7781	2371.656581	Q	100	3.6	3.1-3.8
AZCAPOTZALCO	13-AZ	PANTEON SAN ISIDRO	19° 29' 15.14"	99° 12' 43.80"	7407	2257.661007	Q	100	3.4	3.3-3.6
BENITO JUAREZ	17-BJ	PANTEON XOCO	19° 21' 31.78"	99° 09' 52.76"	7398	2254.917798	Q	100	3.4	3.2-3.8
COYOACAN	18-CO	PANTEON MAUSOLEOS DEL ANGEL	19° 18' 26.24"	99° 10' 41.95"	7562	2304.905162	Q	100	3.5	3.2-3.8
CUAJIMALPA	21-CJ	PANTEON EL CALVARIO	19° 21' 35.48"	99° 18' 06.36"	9126	2781.613926	PH	100	4.9	4.1-5.3
CUAUHTEMOC	24-CU	PANTEON FRANCES	19° 24' 20.46"	99° 09' 16.84"	7351	2240.592151	Q	100	3.5	3.2-3.9
GUSTAVO A. MADERO	27-GM	PANTEON SANTIAGO	19° 28' 02.65"	99° 05' 24.30"	7335	2235.715335	Q	100	3.4	3.1-3.7
IZTACALCO	35-IC	PANTEON SAN JOSE	19° 23' 34.76"	99° 07' 49.71"	7338	2236.629738	Q	100	3.4	3.3-3.8
IZTAPALAPA	37-IP	PANTEON SAN NICOLAS TOLENTINO	19° 20' 27.22"	99° 04' 43.88"	7391	2252.784191	QPH	100	4.8	3.2-5.4
MAGDALENA CONTRERAS	46-MC	PANTEON SAN FRANCISCO	19° 18' 47.79"	99° 14' 01.13"	8136	2479.860936	Q	100	3.5	3.0-4.1
MIGUEL HIDALGO	52-MH	PANTEON SANCTORUM	19° 27' 17.88"	99° 12' 47.38"	7476	2278.692276	Q	100	3.4	3.2-3.7
MILPA ALTA	58-MA	PANTEON MILPA ALTA	19° 11' 22.99"	99° 00' 51.22"	7910	2410.97591	Q	100	3.3	3.2-3.8
TLAHUAC	69-TH	PANTEON GENERAL SAN PEDRO T	19° 16' 02.77"	99° 00' 62.12"	7352	2240.896952	Q	100	3.6	2.9-3.9
TLALPAN	78-TL	PANTEON SAN MARCOS	19° 16' 55.33"	99° 10' 10.92"	7526	2293.932326	QH	100	3.9	3.2-5.6
VENUSTIANO CARRANZA	87-VC	PANTEON DEL PEÑON DE LOS BAÑOS	19° 26' 32.83"	99° 04' 51.87"	7360	2243.33536	Q,T	100	4.9	3.1-5.8
XOCHIMILCO	88-XO	PANTEON JILOTEPEC	19° 15' 34.59"	99° 07' 23.51"	7386	2251.260186	Q	100	3.4	3.3-3.6
CHAMELA, JALISCO	105-CHJ	VULCANIZADORA	19° 32' 00.40"	105° 04' 31.17"	30	9.14403	Q	52	3.3	3.1-3.5
MEXICALI, BAJA CALIFORNIA N	106-MBC	VULCANIZADORA	32° 39' 26.67"	115° 28' 55.75"	3	0.914403	QP	37	4.9	3.6-5.3

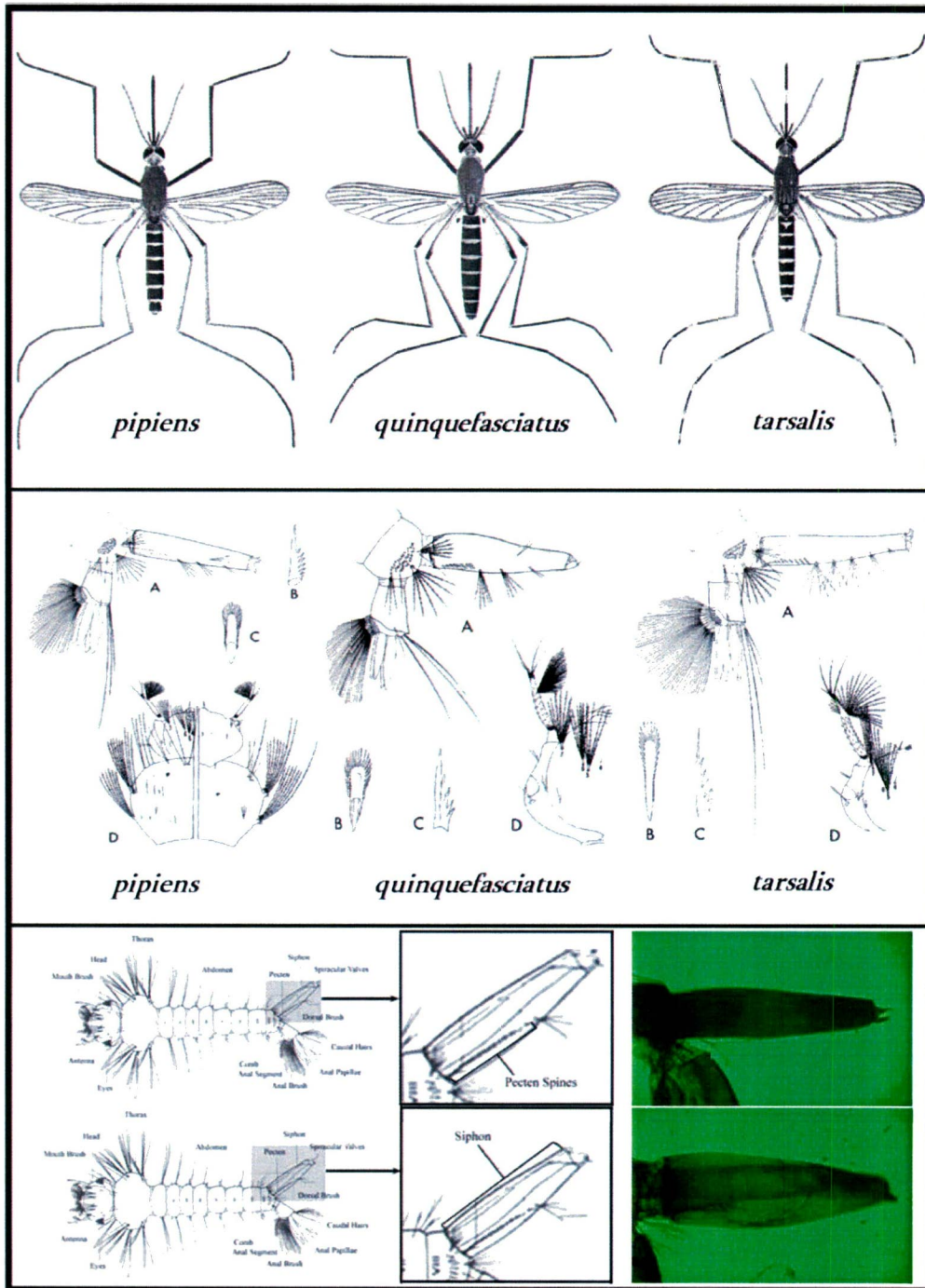


Figura 18. Clave entomológica para la diferenciación de los miembros del complejo *Cx. pipiens* en la Ciudad de México. En la parte superior de la figura, de izquierda a derecha, se muestran las representaciones de las hembras adultas de *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. tarsalis*. En la parte media de la figura se pueden observar las características más relevantes de las larvas de 4° estadio de los mismos mosquitos, (A) Segmentos terminales, (B) Dientes del pecten, (C) Escalas de los peines y (D) Cabeza y torax. En la parte baja de la figura se observa la medición de los sifones de *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* (arriba y abajo, respectivamente).

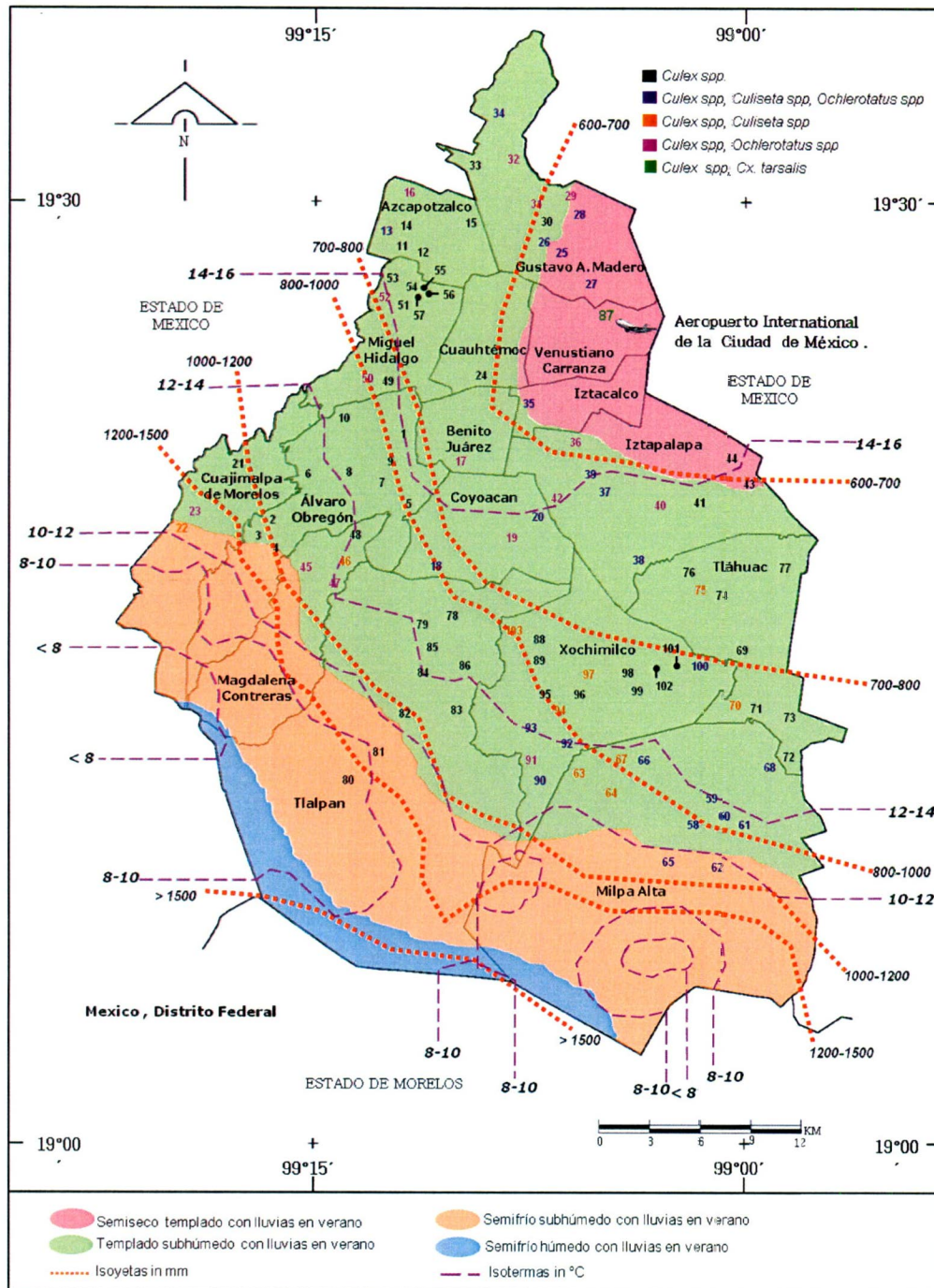


Figura 19. Ubicación de los sitios de muestreo de mosquitos del complejo *Cx. pipiens* y las especies detectadas en los cementerios durante el año 2004. El mapa de la ciudad de México muestra la distribución de las especies de mosquitos identificados en los sitios de recolección, con algunas de las características climáticas y geográficas como la humedad, las isoyetas (precipitación pluvial anual), las isothermas (temperatura promedio anual) y los estados circundantes. Los números en negro indican la identificación morfológica de *Culex spp.*, en azul la convergencia de *Culex spp., Culiseta spp.* y *Ochlerotatus spp.*, en rojo la convergencia de *Culex spp.* y *Culiseta spp.*, en color morado la convergencia de *Culex spp.* y *Ochlerotatus spp.*, y finalmente en marrón *Culex spp.* y *Cx. tarsalis*.

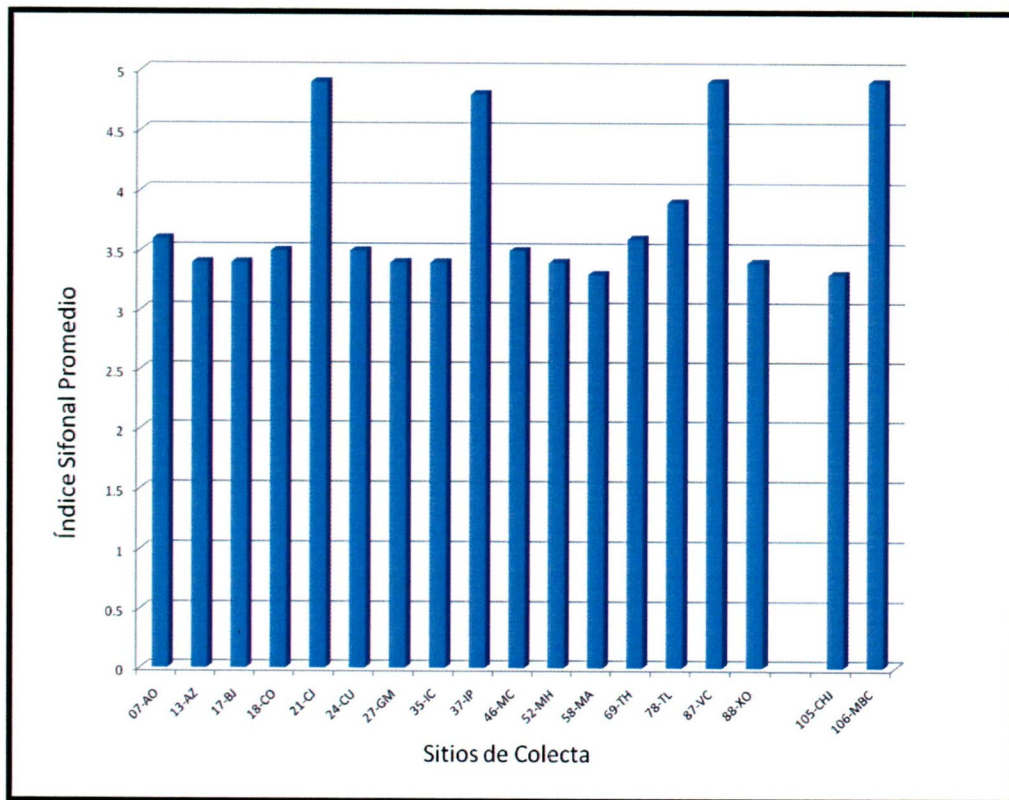


Figura 20. Valores promedio del Índice Sifonal determinado para 18 sitios colectados representativos de las 16 delegaciones del Distrito Federal más los dos sitios control para las especies Estudiadas.

### Identificación de los miembros del complejo *Culex pipiens* en la Ciudad de México por análisis morfológico de las alas de las hembras adultas

Como se ha visto previamente, el complejo *Cx. pipiens* en el continente Americano está integrado por dos especies principales, *Culex quinquefasciatus* Say, que se encuentra adapta a las zonas tropicales y *Culex pipiens* Lineus, que se encuentra distribuido en las zonas templadas del continente. En zonas intermedias, estos dos miembros son capaces de reproducirse formando híbridos y formas intermedias de las dos especies (Barr, 1957), como se observa en los procesos de flujo génico e introgresión (Humeres et. al., 1998, McAbee et. al., 2008, Kothera et. al., 2009). Como se indico en la introducción, los mosquitos del complejo *Cx. pipiens* son vectores potenciales de los gusanos de la filariasis en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Bockarie et. al., 2009) y arbovirus diversas, incluyendo al Virus del Nilo Occidental (Apperson et. al., 2004, Cook et. al., 2006). Las hembras adultas y los estados inmaduros del complejo *Cx. pipiens* son morfológicamente similares, como se pudo apreciar en la selección de huevecillos, larvas y pupas.

La diferenciación de los machos adultos se puede hacer mediante el análisis de los genitales, que incluye la medición de la relación de DV/D de los brazos dorsal y ventral del eedeago en el falosoma de los mosquitos, según lo visto anteriormente y lo informado por Sundararaman (1949). Debido a

que los miembros del complejo *Cx. pipiens* tienen una distribución geográfica amplia, otras diferencias fenotípicas más allá de las de los genitales masculinos se pueden encontrar; por ejemplo, algunos caracteres fisiológicos en las alas también se pueden usar para la identificación morfológica de las especies de mosquitos. Las claves taxonómicas compiladas por Forattini (2002) compararon la morfología de las alas de las hembras adultas. En dicho informe, la vena subcostal (Sc) se une a la vena costal (C) antes de la bifurcación de la vena radial<sub>2+3</sub> ( $R_{2+3}$ ) en *Cx. quinquefasciatus*, mientras que en *Cx. pipiens*, la vena subcostal (Sc) se une a la vena costal (C) en el mismo punto o más allá de la bifurcación de la vena radial<sub>2+3</sub> ( $R_{2+3}$ ), (Ver figura 21). A nuestro entender, estos hallazgos no han sido investigados en otras poblaciones geográficamente distantes. Linam y Nielsen (1962) informaron sobre el trabajo realizado por Bekku (1956), en el norte de Japón, quien también trató de utilizar las características de ala (la longitud de la célula radial  $R_2$  -segunda célula marginal- dividida por la longitud de la vena  $R_3$ ) para distinguir los adultos del complejo *Cx. pipiens*. Los resultados de Bekku (1956) no fueron concluyentes, ya que como se explicó más adelante, con el trabajo de Kamura (1958), se encontró que estas medidas de las alas, en particular, varían con la temperatura del medio ambiente. Nielsen y Rees (1961) y Linam y Nielsen (1962) informaron que el método más fiable para la separación de las hembras de *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* es por medio de la medición de la longitud de la celda de  $R_2$  dividida por la longitud de la vena  $R_{2+3}$  (radio  $R_2/R_{2+3}$ ). Estos autores informaron el valor de este índice en alrededor de 5.0 en las poblaciones de *Cx. pipiens* y de 3.0 o menos en *Cx. quinquefasciatus*, con valores intermedios presentes en los híbridos. Sin embargo, estos estudios no evaluaron los datos morfométricos de las poblaciones de mosquitos en función de los gradientes climáticos y geográficos.

En los insectos, las variaciones fenotípicas entre los miembros de los complejos de especies han sido intensamente investigadas, en especial las relativas al tamaño y la forma de las alas de los adultos (James y Partridge, 1998, Morin et. al., 1999). En *Drosophila*, que tiene una distribución mundial, importantes variaciones morfométricas en las alas fueron encontrados, en las poblaciones de diferentes regiones geográficas, grupos de formación y clinas latitudinales (Van'T Land et. al., 1999). Algunos estudios indican que las variaciones en las alas pueden estar relacionados con las variaciones de intrapoblacional genética, historia de vida (como las condiciones durante el desarrollo larvario (Swindell y Bouzat, 2006)), la dirección de la selección a través de las fuentes poblacionales (Hansen & Houle, 2008) y la aptitud o posibles objetivos de la selección natural (Buggs, 2007, Gay et. al., 2008). Otros estudios han relacionado las diferencias morfológicas con la divergencia de las especies o las adaptaciones ecológicas (James et al. 1997). Como puede verse, la taxonomía del complejo *Cx. pipiens* es difícil de interpretar, ya que los miembros del complejo presentan diversas similitudes en términos de genética y morfología. Morais y colaboradores (2006, 2007 y 2010) abundan con mejor detalle estas diferencias.

Es evidente que para distinguir correctamente los taxones, las investigaciones morfológicas y moleculares son necesarias, así como el conocimiento sobre las características de las poblaciones a lo largo de sus gradientes biogeográficos. Del mismo modo, la correcta identificación de las hembras adultas y los híbridos es de gran importancia epidemiológica, principalmente debido a las

diferencias ecofisiológicas, que incluyen la diapausa, autogénesis, reproducción, estenogamia, el comportamiento de la alimentación y el potencial como vector (Humeres et. al., 1998; Lenormand y Raymond, 2000; Vinogradova, 2000; Fonseca et. al., 2004; Savage et. al., 2008). No sobra mencionar que los marcadores moleculares se han convertido en una importante herramienta para resolver los problemas taxonómicos y para identificar especies hermanadas genéticamente, como se verá más adelante.

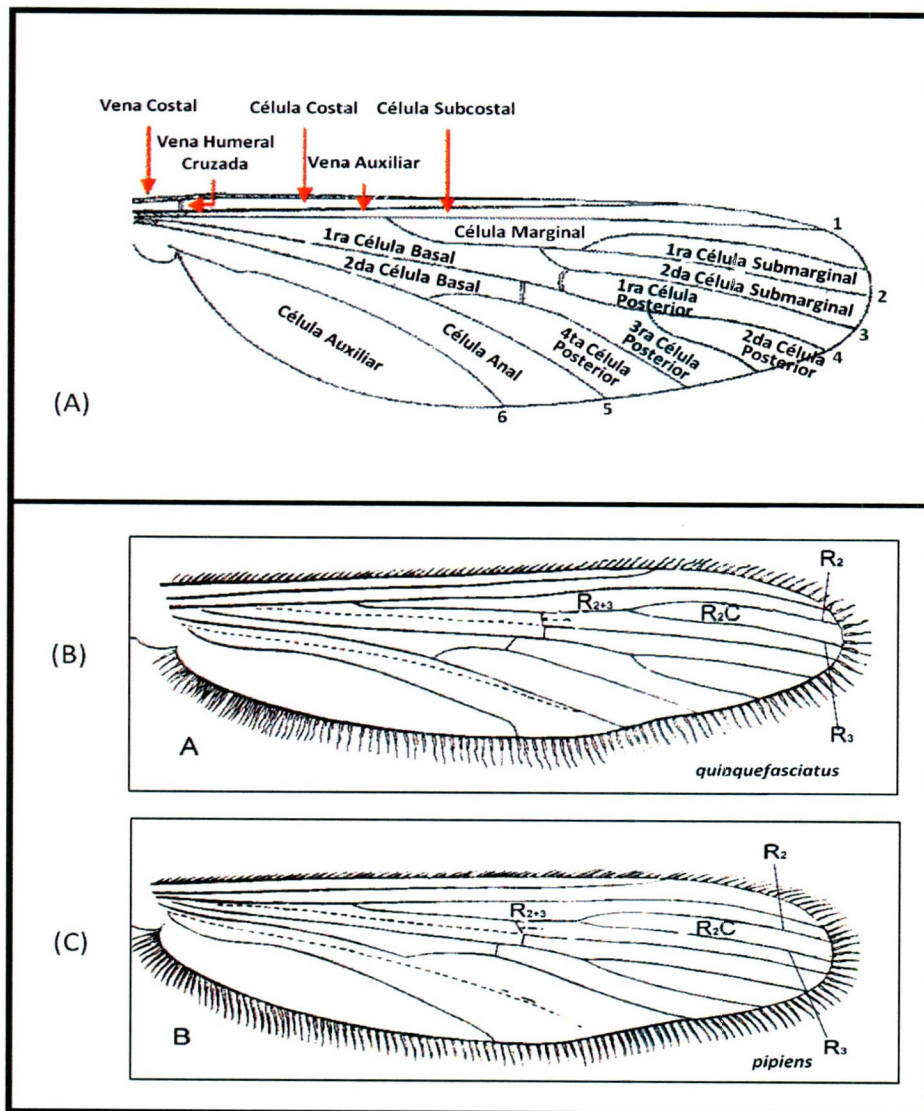


Figura 21. Guía para el análisis morfométrico de las alas de los mosquitos Hembras adultos. (A) El esquema del ala muestra los puntos y secciones importantes para el análisis morfométrico de las poblaciones. (B) Aspecto del ala del mosquito *Cx. pipiens quinquefasciatus*, donde se indica la ubicación de la celda Radial<sub>2</sub> (R<sub>2</sub>) y la vena Radial<sub>2+3</sub> (R<sub>2+3</sub>). (C) Aspecto del ala del mosquito *Cx. pipiens pipiens*, donde se indica la ubicación de la celda Radial<sub>2</sub> (R<sub>2</sub>) y la vena Radial<sub>2+3</sub> (R<sub>2+3</sub>).

Al realizar el montaje de las alas de nuestras colecciones y realizar sus mediciones nos fue posible visualizar las contrariedades que genera el análisis morfológico en poblaciones genéticamente emparentadas. (Ver figura 22). Los resultados que nosotros obtuvimos para los grupos seleccionados al azar en las diferentes delegaciones de la capital son mostrados en la tabla 5 y la figura 23.

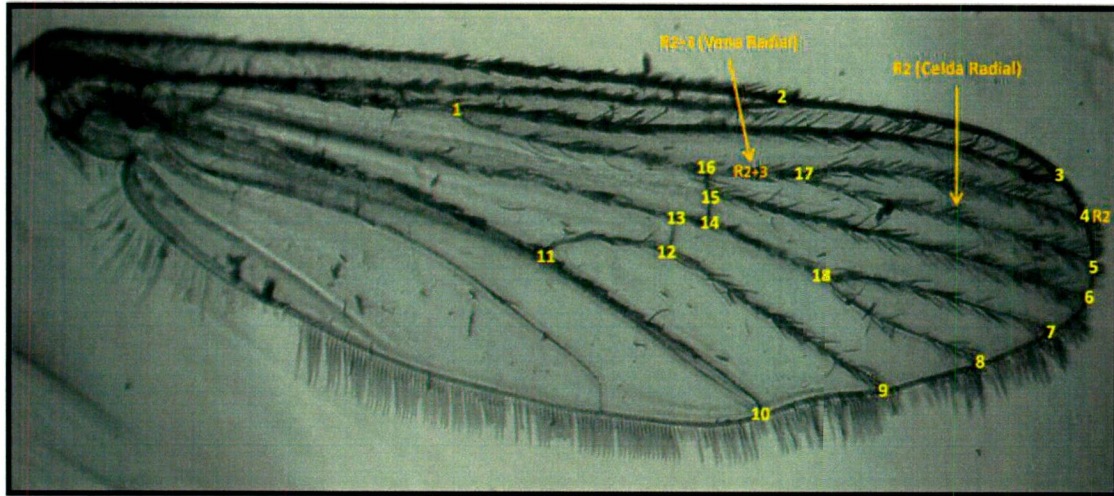


Figura 22. Análisis morfológico del ala de un mosquito *Cx. pipiens quinquefasciatus*, donde se indica la ubicación de los principales puntos de análisis y la ubicación de la celda Radial<sub>2</sub> (R<sub>2</sub>) y la vena Radial<sub>2+3</sub> (R<sub>2+3</sub>).

Tabla 5. Localización Geográfica de los Cementerios Analizados para determinar el valor del Índice de ala en hembras adultas seleccionadas al azar en la Ciudad de México y los sitios usados como controles positivos.

NOMBRE DE LA DELEGACION	COORDENADAS		ALTITUD		ESPECIE	N	INDICE DEL ALA		
	NORTE	OESTE	PIES	METROS			MEDIA	MINIMA	MAXIMA
ALVARO OBREGON	19° 21' 06.26"	99° 12' 39.92"	7781	2371.656581	Q	40	3.14	2.82	3.46
AZCAPOTZALCO	19° 29' 15.14"	99° 12' 43.80"	7407	2257.661007	Q	40	2.96	2.68	3.12
BENITO JUAREZ	19° 21' 31.78"	99° 09' 52.76"	7398	2254.917798	Q	40	3.09	2.13	3.53
COYOACAN	19° 18' 26.24"	99° 10' 41.95"	7562	2304.905162	Q	40	2.89	2.82	2.98
CUAJIMALPA	19° 21' 35.48"	99° 18' 06.36"	9126	2781.613926	PH	40	5.12	2.84	6.98
CUAUHTEMOC	19° 24' 20.46"	99° 09' 16.84"	7351	2240.592151	Q	40	2.68	2.44	3.1
GUSTAVO A. MADERO	19° 28' 02.65"	99° 05' 24.30"	7335	2235.715335	QH	40	3.55	3.12	3.96
IZTACALCO	19° 23' 34.76"	99° 07' 49.71"	7338	2236.629738	Q	40	2.76	2.15	3.12
IZTAPALAPA	19° 20' 27.22"	99° 04' 43.88"	7391	2252.784191	QPH	40	4.12	2.46	7.1
MAGDALENA CONTRERAS	19° 18' 47.79"	99° 14' 01.13"	8136	2479.860936	QPH	40	3.55	2.96	3.92
MIGUEL HIDALGO	19° 27' 17.88"	99° 12' 47.38"	7476	2278.692276	Q	40	2.77	2.64	2.81
MILPA ALTA	19° 11' 22.99"	99° 00' 51.22"	7910	2410.97591	QPH	40	3.26	2.84	4.69
TLAHUAC	19° 16' 02.77"	99° 00' 62.12"	7352	2240.896952	QPH	40	3.12	2.38	3.55
TLALPAN	19° 16' 55.33"	99° 10' 10.92"	7526	2293.932326	QPH	40	3.72	3.19	3.92
VENUSTIANO CARRANZA	19° 26' 32.83"	99° 04' 51.87"	7360	2243.33536	Q,T	40	2.89	2.12	3.26
XOCHIMILCO	19° 15' 34.59"	99° 07' 23.51"	7386	2251.260186	Q	40	3.12	2.68	4.16
CHAMELA, JALISCO	19° 17' 46.98"	105° 04' 31.17"	16	4.876816	Q	16	2.72	2.1	2.98
TIJUANA, BAJA CALIFORNIA	32° 32' 10.67"	117° 03' 21.56"	131	39.928931	QP	34	5.08	2.64	5.33

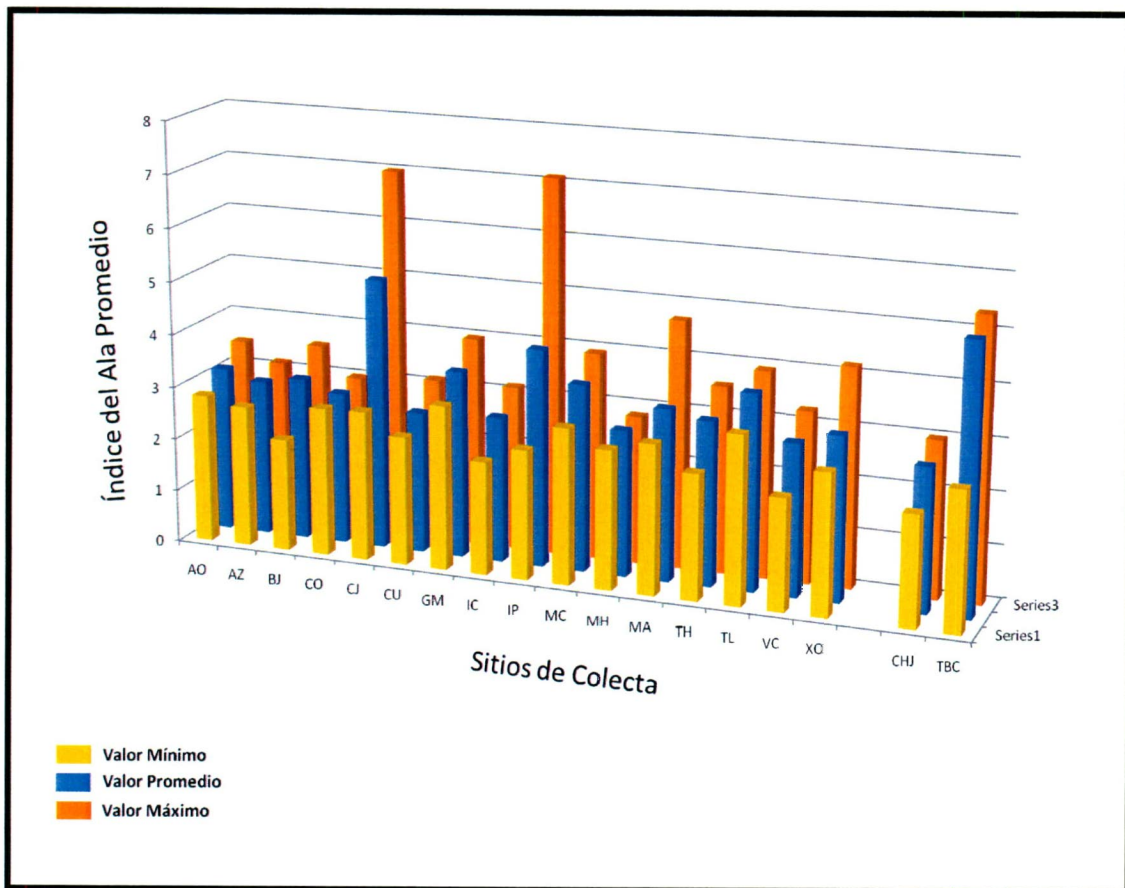


Figura 23. Grafica que muestra los valores promedio del Índice de Ala determinado para 40 hembras adultas, seleccionadas al azar en las 16 delegaciones del Distrito Federal más los dos sitios control para las especies estudiadas.

### Identificación de los miembros del complejo *Culex pipiens* en la Ciudad de México por análisis morfológico de la genitalia masculina

El análisis morfológico, mediante el montaje de los genitales masculinos, se enfocó a la determinación de tres morfotipos (Figura 24) de los adultos a lo largo del gradiente geográfico de la Ciudad de México, desde el norte de la delegación G. A. Madero hasta el Sur de la delegación Milpa Alta. (Figura 17). Las medidas de los Individuos machos representativos se muestran en la tabla 6 y la figura 25. Los valores morfométricos de la estructura del edeago en la Ciudad de México están de acuerdo con lo referido para *Cx. quinquefasciatus* ( $>0.4$ ), los híbridos ( $0.2-0.4$ ) y *Cx. pipiens* ( $<0.2$ ) de otras partes del mundo (Barr, 1957). Los autores más contemporáneos como Jakob y Francy (1980 y 1984) sugieren valores de DV/D hasta 0.50 para poblaciones puras de *Cx. quinquefasciatus* en América del Norte.

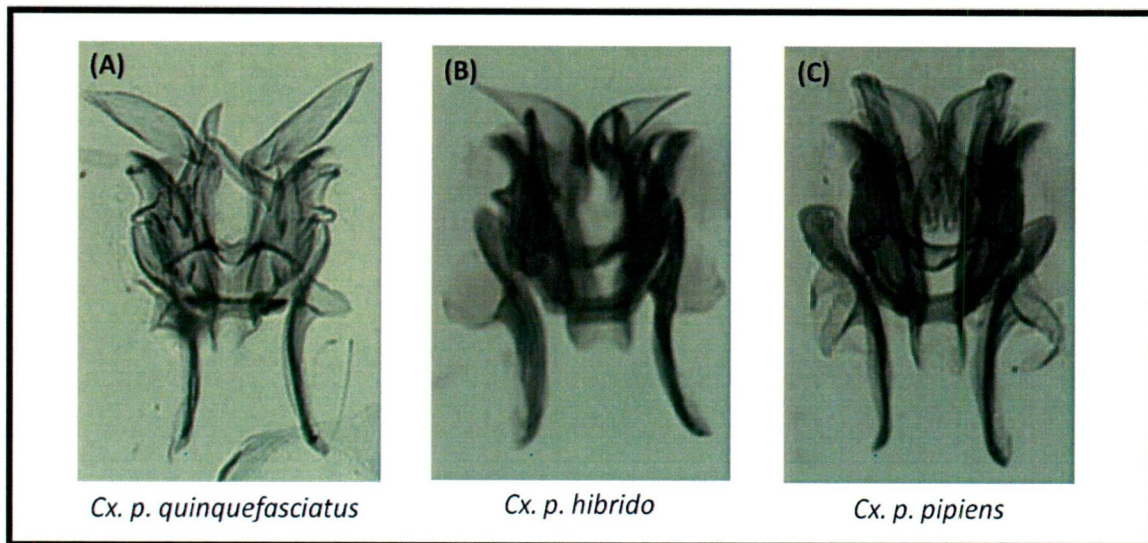


Figura 24. Morfotipos de la genitalia masculina de los mosquitos adultos del complejo estudiado, A) *Cx. quinquefasciatus*, B) *Cx. hibrido* y C) *Cx. pipiens*.

Tabla 6. Localización Geográfica de los Cementerios Analizados para determinar el valor del Índice DV/D en machos adultos seleccionados al azar en 16 cementerios de la Ciudad de México y 2 sitios usados como controles positivos.

NOMBRE DE LA DELEGACION	ABREVIATURA	SITIO DE COLECTA	COORDENADAS		ALTITUD		ESPECIE	N	INDICE DV/D	
			NORTE	OESTE	PIES	METROS			DV/D ratio/100. Adultos	
ALVARO OBREGON	07-AO	PANTEON JARDIN	19° 21' 06.26"	99° 12' 39.92"	7781	2371.656581	Q	100	0.94	±0.26
AZCAPOTZALCO	13-AZ	PANTEON SAN ISIDRO	19° 29' 15.14"	99° 12' 43.80"	7407	2257.661007	Q	100	0.98	±0.31
BENITO JUAREZ	17-BJ	PANTEON XOCO	19° 21' 31.78"	99° 09' 52.76"	7398	2254.917798	Q	100	1.22	±0.26
COYOACAN	18-CO	PANTEON MAUSOLEOS DEL ANGEL	19° 18' 26.24"	99° 10' 41.95"	7562	2304.905162	Q	100	0.88	±0.22
CUAJIMALPA	21-CJ	PANTEON EL CALVARIO	19° 21' 35.48"	99° 18' 06.36"	9126	2781.613926	PH	100	0.12	±0.09
CUAUHTEMOC	24-CU	PANTEON FRANCES	19° 24' 20.46"	99° 09' 16.84"	7351	2240.592151	Q	100	1.14	±0.23
GUSTAVO A. MADERO	27-GM	PANTEON SANTIAGO	19° 28' 02.65"	99° 05' 24.30"	7335	2235.715335	Q	100	1.06	±0.18
IZTACALCO	35-IC	PANTEON SAN JOSE	19° 23' 34.76"	99° 07' 49.71"	7338	2236.629738	Q	100	1.11	±0.13
IZTAPALAPA	37-IP	PANTEON SAN NICOLAS TOLENTINO	19° 20' 27.22"	99° 04' 43.88"	7391	2252.784191	QPH	100	0.19	±0.03
MAGDALENA CONTRERAS	46-MC	PANTEON SAN FRANCISCO	19° 18' 47.79"	99° 14' 01.13"	8136	2479.860936	Q	100	0.91	±0.34
MIGUEL HIDALGO	52-MH	PANTEON SANCTORUM	19° 27' 17.88"	99° 12' 47.38"	7476	2278.692276	Q	100	0.91	±0.28
MILPA ALTA	58-MA	PANTEON MILPA ALTA	19° 11' 22.99"	99° 00' 51.22"	7910	2410.97591	Q	100	0.86	±0.29
TLAHUAC	69-TH	PANTEON GENERAL SAN PEDRO T	19° 16' 02.77"	99° 00' 62.12"	7352	2240.896952	Q	100	0.91	±0.32
TLALPAN	78-TL	PANTEON SAN MARCOS	19° 16' 55.33"	99° 10' 10.92"	7526	2243.932326	QH	100	0.9	±0.17
VENUSTIANO CARRANZA	87-VC	PANTEON DEL PEÑON DE LOS BAÑOS	19° 26' 32.83"	99° 04' 51.87"	7360	2243.33536	Q,T	100	1.02	±0.36
XOCHIMILCO	88-XO	PANTEON JILOTEPEC	19° 15' 34.59"	99° 07' 23.51"	7386	2251.260186	Q	100	0.88	±0.21
CHAMELA, JALISCO	105-CHJ	VULCANIZADORA	19° 32' 00.40"	105° 04' 31.17"	30	9.14403	Q	52	0.09	±0.01
MEXICALI, BAJA CALIFORNIA N	106-MBC	VULCANIZADORA	32° 39' 26.67"	115° 28' 55.75"	3	0.914403	QP	37	0.88	±0.01

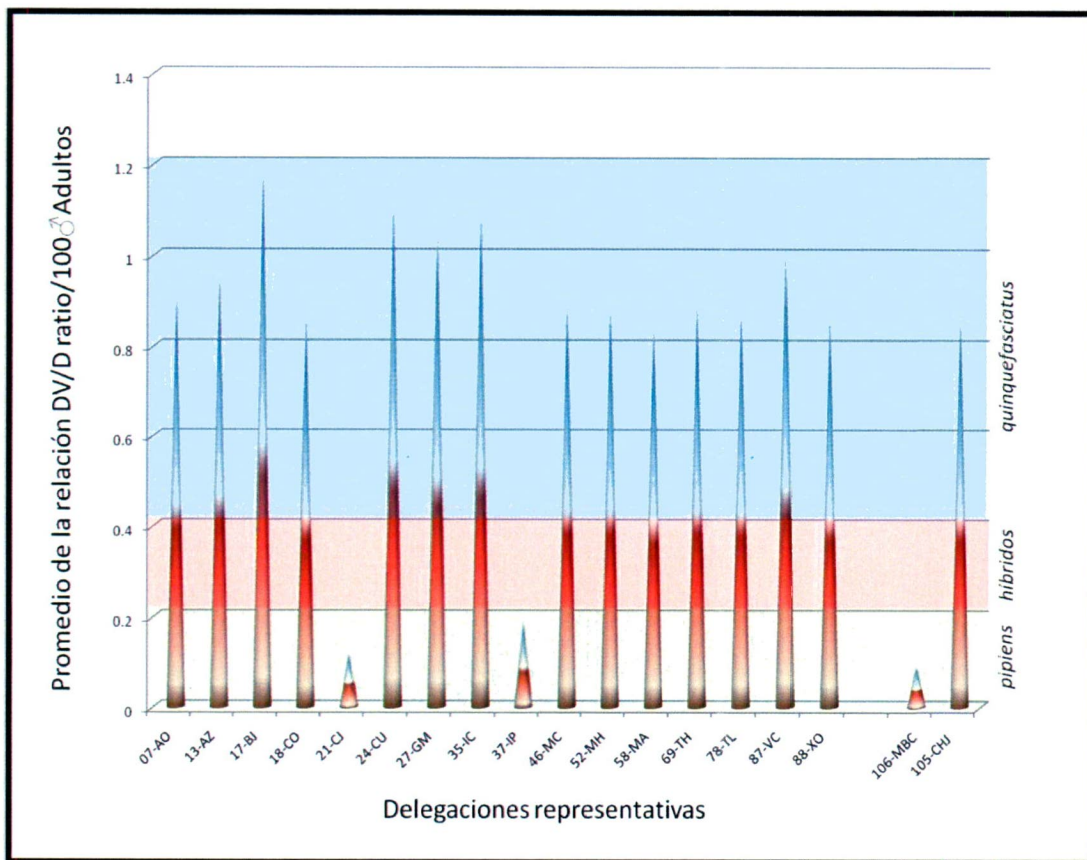


Figura 25. Valores promedio del Índice DV/D determinado para 18 sitios colectados representativos de las 16 delegaciones del Distrito Federal más los dos sitios control para las especies estudiadas. Las franjas, amarilla, rosa y azul, indican el status morfológico de los individuos, pipiens, híbridos y quinquefasciatus, respectivamente, y de acuerdo con los datos establecidos por Barr (1957).

Las estructuras más grandes de los brazos dorsales y ventrales del edeago se presentan mayoritariamente en las poblaciones del noreste de la Capital de México, y las más pequeñas se presentan en la región centro sureste del Distrito Federal. Variaciones fenotípicas en poblaciones de diferentes gradientes geográficos han sido informadas previamente en insectos y constituyen casos de clinas latitudinales (recordemos que una clina queda definido por el cambio gradual de rasgos fenotípicos de una misma especie por influjos y condiciones medioambientales), (Morin et. al., 1999; Gilbert et. al., 2004). Urbanelli y colaboradores (1997) revisaron la morfología de los genitales de los miembros del complejo *Cx. pipiens* en la zona norte del continente Americano y encontraron que la caracterización fenotípica de este desarrollo está influenciada por la temperatura, con valores reducido de DV/D en ambientes con temperaturas bajas, aumentando gradualmente hacia las altas temperaturas.

En este estudio, las diferencias fenotípicas de los brazos dorsales del edeago corroboraron los datos genéticos realizados en el intron Ace 2, por lo que se observa que la relación de distribución de datos de la razón DV/D constituyen un carácter biológico clinal, que bien puede estar

relacionado con las variaciones fenotípicas en tamaño y desarrollo geográfico de los mosquitos de las diferentes regiones terrestres.

La localización de los sitios de colecta de los mosquitos del complejo *Cx. pipiens* y su distribución en la zona geográfica de estudio se muestra en las figuras 19 y 34. Como se mencionó previamente, el valor promedio de la relación DV/D de los ejemplares examinados en este estudio se utilizó para distinguir *Cx. p. pipiens* de *Cx. p. quinquefasciatus* (Ver Tablas 6 y 7). Como se esperaba, las poblaciones de *Cx. p. pipiens* tuvieron radios de DV/D menores de 0.2, las de *Cx. p. quinquefasciatus* tuvieron radios de DV/D superiores a 0.4 y los especímenes híbridos mostraron radios intermedios entre 0.2 y 0.4. La mayoría de las colecciones consistió en *Cx. p. quinquefasciatus* (73.8%) y sólo cinco colecciones contenían sólo *Cx. p. pipiens* (4.3%). Dos colecciones consistieron en la combinación de *Cx. p. pipiens* y *Cx. p. quinquefasciatus* (1.9%). La combinación de *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* e híbridos represento el 7.8%; la coexistencia de *Cx. p. pipiens* e híbridos el 1.9% y la mezcla de *Cx. p. quinquefasciatus* e híbridos el 9.7%. La figura 23 muestra los lugares donde se localizó a *Cx. p. quinquefasciatus* (números en azul) o a *Cx. p. pipiens* (números en rojo) a través del análisis morfológico y confirmado por los análisis moleculares en el gen Ace.

**Tabla 7.** Condiciones climáticas de algunos sitios de colecta localizados en los Cementerios Analizados a fin de determinar la posición morfológica y molecular en machos adultos seleccionados al azar. Se muestra el porcentaje de mosquitos híbridos encontrados para cada uno de los cementerios enunciados.

Clave	Lluvia (mm/year)	T (°C)	† T. A. (°C)	‡ H. R. (%)	pH	Total larvas	Identificación Morfológica (%)			Identificación Molecular (%)		
							Cx. p. q	Cx. p. p	Hib	Cx. p. q	Cx. p. p	Hib
<b>AO</b>	<b>29.1</b>	<b>15.1</b>	<b>14.2</b>	<b>33.8</b>	<b>7.2</b>							
03-AO**	38	15.4	13.9	36	7.9	2030	91	0	9	100	0	0
<b>AZ</b>	<b>69.8</b>	<b>17.5</b>	<b>15.5</b>	<b>39.3</b>	<b>6.9</b>							
11-AZ*	61	17	15	42	7	2200	98	0	2	99	0	1
<b>CJ</b>	<b>225</b>	<b>13.3</b>	<b>11</b>	<b>43</b>	<b>7.1</b>							
21-CJ**	225	14	13	56	7.2	2790	0	81	19	0	100	0
22-CJ***	225	11	8	37	7	1360	0	100		0	100	0
23-CJ**	225	15	12	36	7.1	865	0	72	28	0	94	6
<b>GM</b>	<b>105.7</b>	<b>18</b>	<b>17.2</b>	<b>47.8</b>	<b>7.3</b>							
26-GM*	107	17	15	56	7.2	710	98	0	2	100	0	0
<b>IP</b>	<b>90.1</b>	<b>17.1</b>	<b>15.6</b>	<b>40.1</b>	<b>7.2</b>							
37-IP*	85	16	14	57	7.2	4765	22	39	39	31	41	28
38-IP**	85	17	15	52	7.5	2345	53	22	25	61	18	21
39-IP*	85	15.5	14	34	7.2	1710	99	1	0	100	0	0
44-IP*	94	16	16	36	7	2640	97	0	3	100	0	0
<b>MC</b>	<b>204</b>	<b>12.5</b>	<b>11.5</b>	<b>57.5</b>	<b>7.18</b>							
45-MC*	204	12	11	62	7.3	845	67	29	4	70	30	0
47-MC*	204	12	10	58	7.1	995	67	0	33	100	0	0
<b>MA</b>	<b>140</b>	<b>14.2</b>	<b>13.4</b>	<b>34.7</b>	<b>7.4</b>							
62-MA**	140	13.8	12.5	34	7.3	2895	73	0	27	87	0	13
63-MA***	140	13.2	11.8	36	7.7	1845	68	9	23	80	18	2
64-MA***	140	13.6	12.2	35	7.8	2420	87	13	0	87	13	0
65-MA**	140	13.9	13	33	6.9	619	94	0	6	100	0	0
<b>TH</b>	<b>111.2</b>	<b>16.2</b>	<b>15.9</b>	<b>59.1</b>	<b>7</b>							
73-TH*	107	16	16	82	7.2	2680	71	0	29	100	0	0
75-TH**	156	16	15.5	62	6.9	1140	56	3	41	97	0	3
77-TH***	96	17	16.5	52	6.6	1290	61	18	21	59	15	26
<b>TL</b>	<b>184.1</b>	<b>12.3</b>	<b>9.8</b>	<b>44.9</b>	<b>7.2</b>							

78-TL*	145	13.5	11	35	7	3720	82	0	18	100	0	0
80-TL***	219	8	6	55	7.8	1450	0	100	0	0	100	0
81-TL***	219	11.5	7	52	7.3	1795	0	100	0	0	100	0
82-TL**	219	12.5	7	54	7.1	2130	0	100	0	0	100	0
83-TL**	219	11	8	52	7.2	1690	0	100	0	0	100	0
84-TL**	145	13	11.5	42	7.2	940	12	37	51	0	84	16
<b>XOo</b>	<b>78.8</b>	<b>15.7</b>	<b>13.9</b>	<b>36.3</b>	<b>7.1</b>							
90-XO***	177	9	5	27	7.1	930	88	2	10	97	0	3
91-XO**	116	8	8	28	7	2590	76	0	24	100	0	0

Temperatura ambiente, <sup>T</sup>Temperatura del agua, <sup>h</sup>Humedad relativa, \*Urbana, \*\*Suburbana, \*\*\*Rural.

## Análisis molecular

### *El gen mitocondrial ND4*

En relación con el gen mitocondrial ND4, Gorrochotegui-Escalante y colaboradores (2000 y 2002) y García-Franco y colaboradores (2002), compararon poblaciones de *Ae. aegypti* en varias regiones de México. Los autores encontraron que la estructura estándar de esta especie varía según la región. Bosio y colaboradores (2005) caracterizaron la estructura genética de *Ae. aegypti* en Tailandia, con el mismo gen ND4 y los autores señalan que la estructuración de esta especie no varían según la región, a diferencia de lo que sucedió en México. Lo anterior pudo haber ocurrido por las diferencias de tiempo en la ocupación de espacio (presentado anteriormente en Tailandia y recientemente en México) o el efecto de los esfuerzos en el control de estos mosquitos, haciendo que la población de Tailandia estuviese afectada por un cuello de botella, afectando profundamente la diversidad genética. En el presente estudio se examinó la variación haplotípica en un segmento de 349 pb de la región mitocondrial ND4 mediante la técnica de SSCP. Se extrajo el ADN de 100 mosquitos machos, adultos, seleccionados al azar en los distintos sitios de colecta. Se sometieron a un proceso de amplificación con los primers correspondientes al marcador mitocondrial de acuerdo a lo especificado en materiales y métodos. Se aplicó la técnica de SSCP y se seleccionaron 52 muestras que exhibieron bandas diferenciales. Se secuenciaron los productos de PCR de 23 mosquitos, los cuales representaron los diferentes patrones de migración de las bandas diferenciales de las muestras seleccionadas, esto permitió la identificación de 14 haplotipos para la Ciudad de México.

Los productos de extracción de ADN total de algunas muestras, los productos de amplificación característicos en algunas de ellas y el corrimiento diferencial por SSCP de algunos de estas muestras se muestran en las figuras 26, 27 y 28, respectivamente. Las secuencias de los 14 haplotipos encontrados seleccionados se alinearon en el programa Vector NTI Suite 6.0, donde pudimos observar los sitios de mutación, así como las bases correspondientes a dichos cambios que diferenciaban a un haplotipo de otro. Al observar los cambios en las secuencias pudimos corroborar la sensibilidad de la técnica de SSCP para detectar las mutaciones puntuales. Finalmente realizamos una comparación de estas secuencias con las secuencias reportadas en el GenBank por Rasgon y colaboradores (2006) por medio del programa Clustal W (Thomson et. al., 1994) y se tradujeron automáticamente usando el programa BioEdit 7.0.9 (Ibis Biosciencias). Para los análisis filogenéticos se usaron los métodos de Neighbor-joining, Máxima Parsimonia y Mínima

evolución con corrección gamma y un bootstrap de 10000 repeticiones y el método de sustitución nucleotídica determinada por "Model Selection" utilizando el programa MEGA V4 (Tamura et. al., 2007) y obtuvimos finalmente los arboles filogenéticos mostrados en la figura 29. Las frecuencias haplotípicas están representadas en la figura 30, (Ver los valores en la tabla 8).

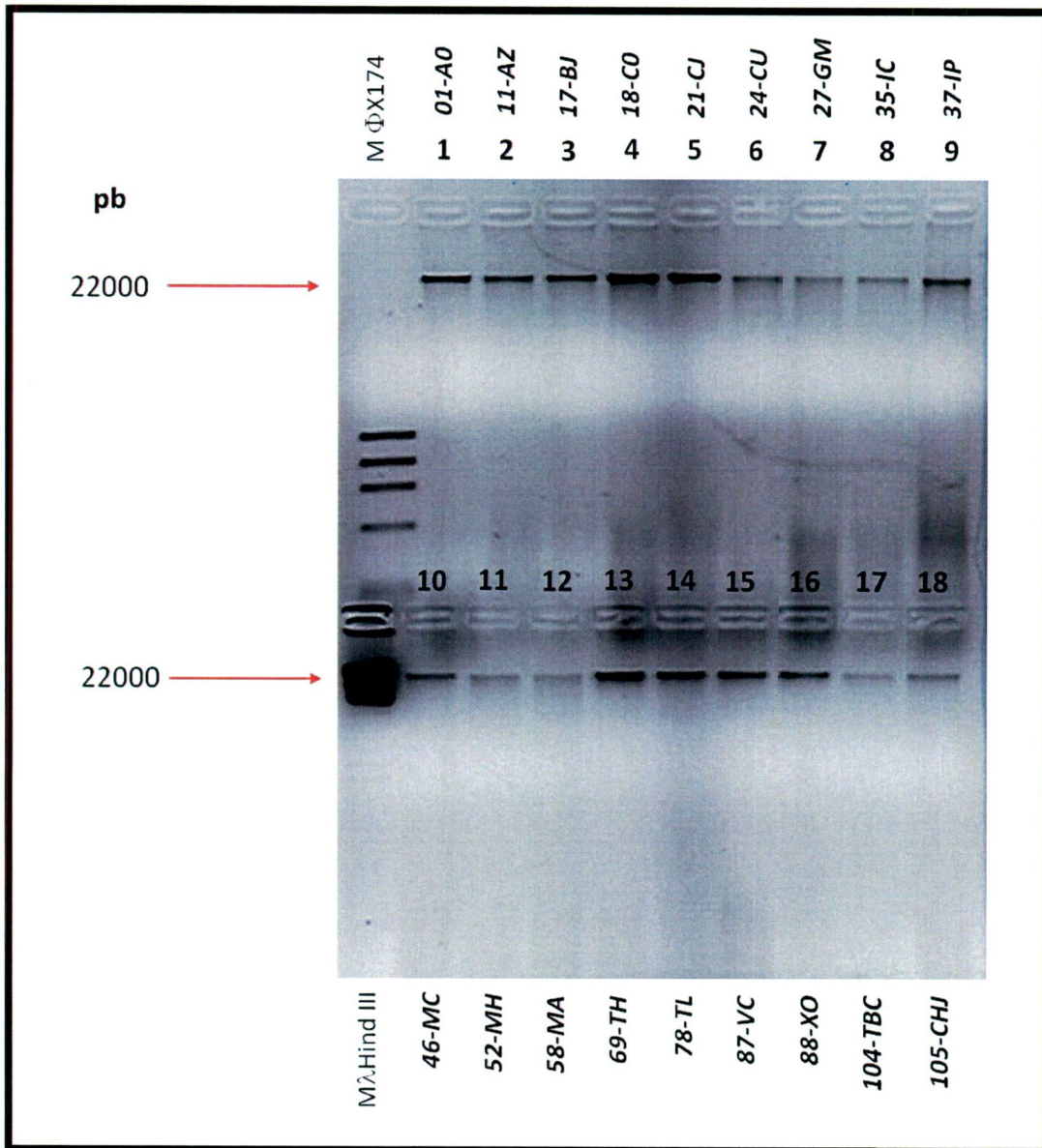


Figura 26. Extracción de ADN total de mosquitos del complejo *Cx. pipiens*. La imagen muestra los productos de extracción de 22000 pares de bases, aproximadamente, que reflejan la presencia de ADN total con alta integridad, de muestras de mosquitos colectados en diferentes panteones de la Ciudad de México.

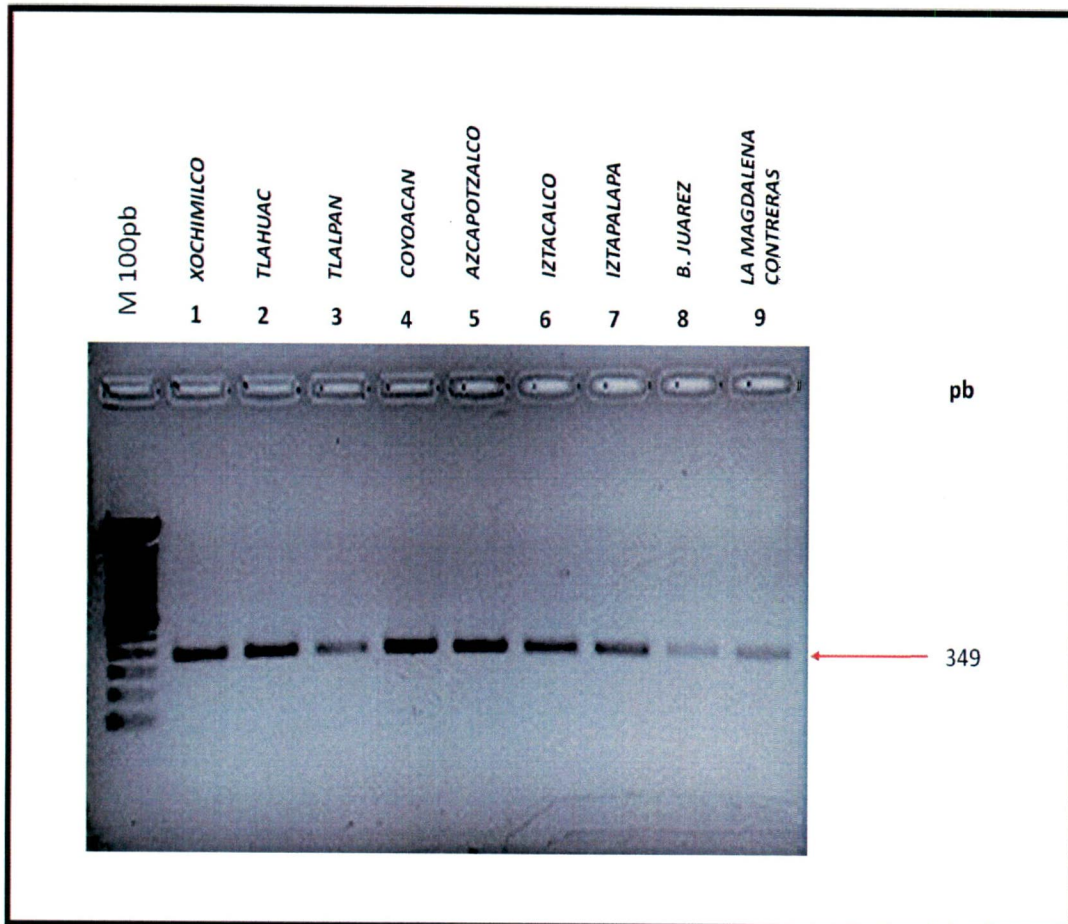


Figura 27. Amplificación del gen mitocondrial ND 4 en mosquitos del complejo *Cx. pipiens*. La imagen muestra un gel de agarosa con los productos de ADN mitocondrial amplificados (349 pb) con los primers específicos para la región de la NAD deshidrogenasa IV.

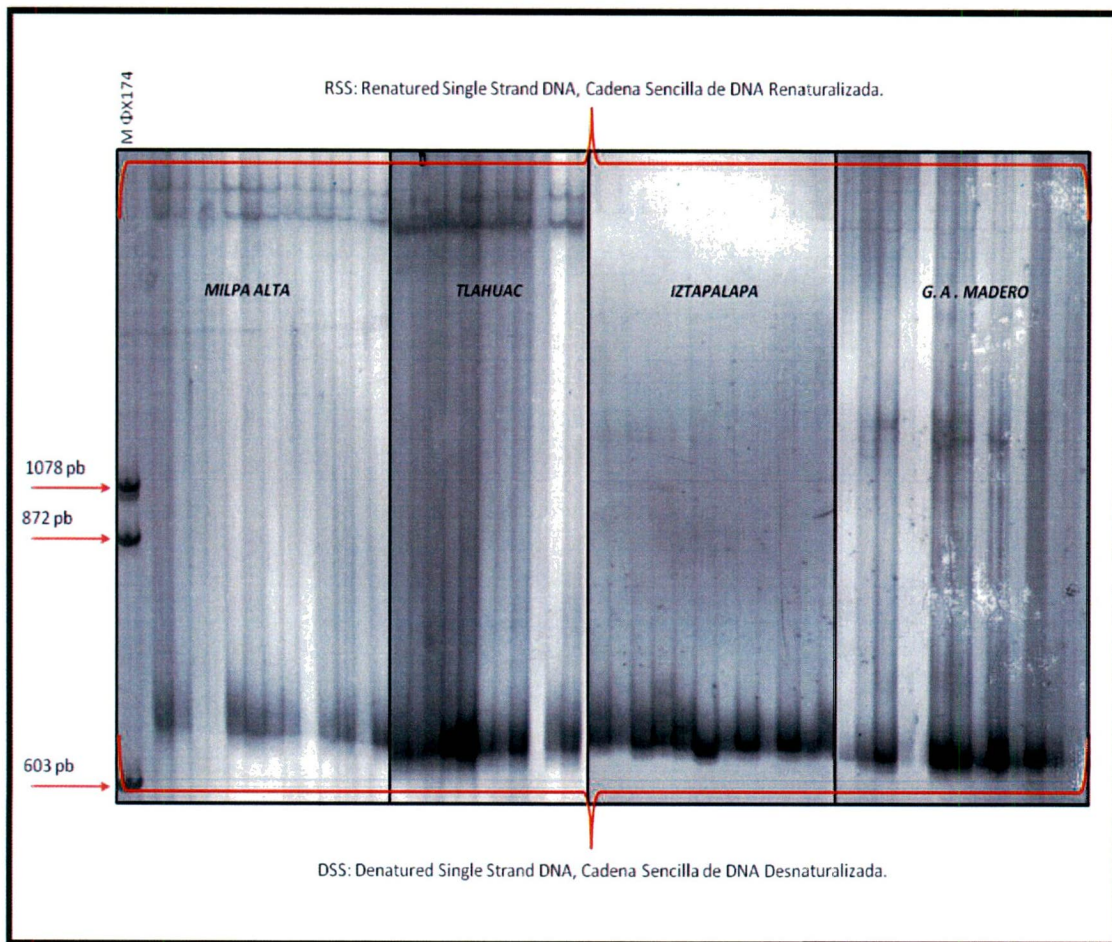


Figura 28. SSCP (Polimorfismos de conformación de cadena sencilla) de productos de amplificación del marcador molecular ND4. La figura muestra las bandas de la cadena sencilla del ADN renaturalizado (parte superior) y las bandas de cadena sencilla del ADN desnaturalizado (parte baja), mostrando los patrones diferenciales de algunas de las muestras amplificadas.

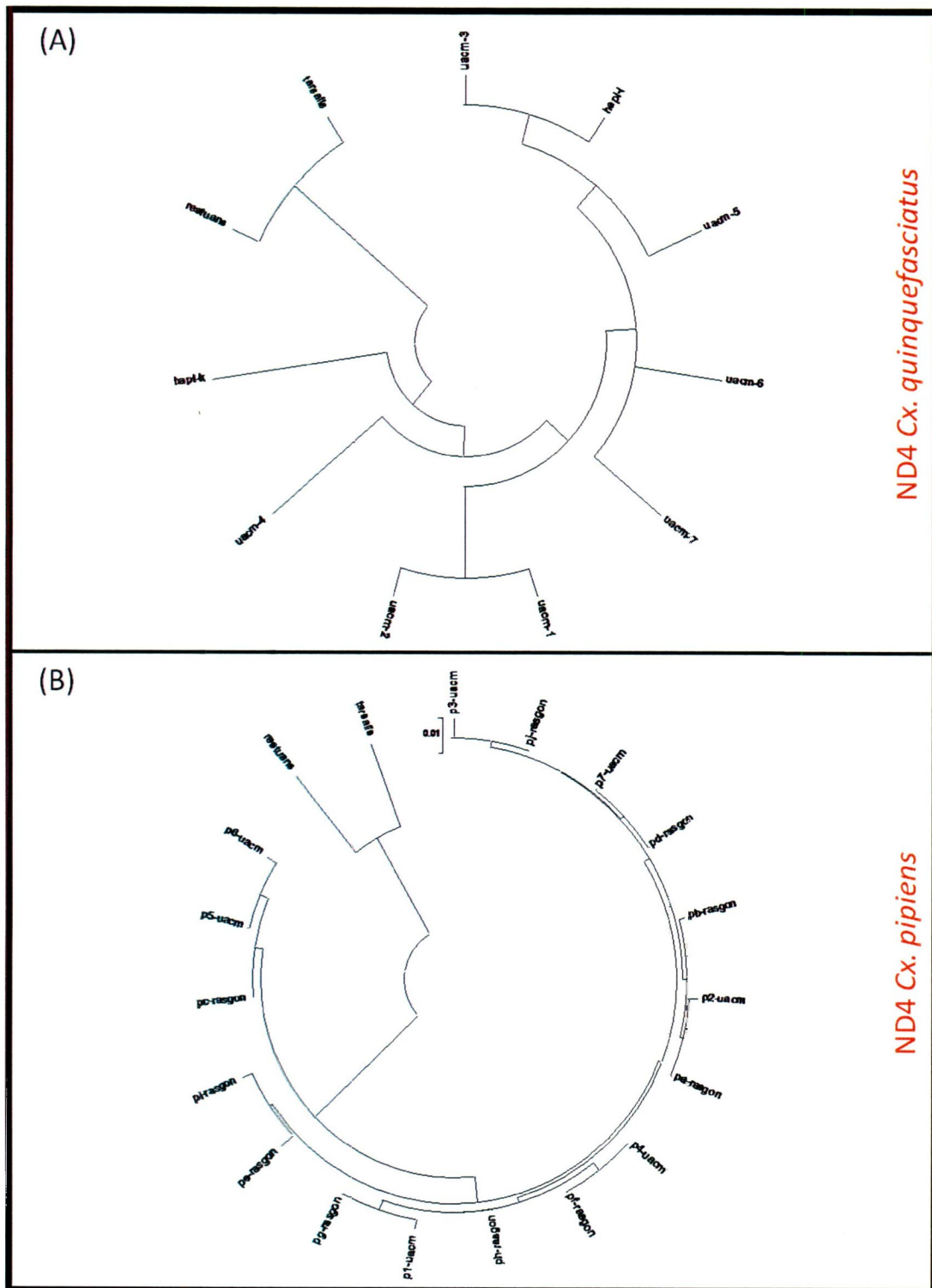


Figura 29. Representación filogenética de los haplotipos encontrados con el gen mitocondrial ND4 en muestras de la Ciudad de México. En la figura podemos observar la filogenia correspondiente a los 7 haplotipos de *Cx. quinquefasciatus* (A) y en (B) la filogenia correspondiente a los haplotipos para *Cx. pipiens*.

Tabla 8. Distribución haplotípica del gen mitocondrial ND4 en la Ciudad de México. Se puede observar los diferentes sitios representados para cada uno de los haplotipos encontrados en muestras de mosquitos del complejo *Cx. pipiens* en la Ciudad de México.

Haplotipo	Especie	Frecuencia	Sitios representados
<b>UACM1</b>	quinquefasciatus	11	10-AO,17-BJ,24-CU,87-VC, 27-GM,26-GM,32-GM,16-AZ
<b>UACM2</b>	quinquefasciatus	3	27-GM,31-GM
<b>UACM3</b>	quinquefasciatus	9	47-MC,48-MC,5-AO,7-AO
<b>UACM4</b>	quinquefasciatus	14	60-MA,58-MA,62-MA,59-MA,65-MA,58-MA
<b>UACM5</b>	quinquefasciatus	6	45-MC,4-AO,2-AO
<b>UACM6</b>	quinquefasciatus	12	26-GM,49-MH,50-MH,51-MH,52-MH,53-MH,36-GM, 15-GM
<b>UACM7</b>	quinquefasciatus	5	83-TL, 94-XO,58-MA,70-TH
<b>P1-UACM</b>	pipiens	7	21-CJ,22-CJ
<b>P2-UACM</b>	pipiens	2	21-CJ,22-CJ
<b>P3-UACM</b>	pipiens	1	21-CJ,22-CJ
<b>P4-UACM</b>	pipiens	1	21-CJ,22-CJ
<b>P5-UACM</b>	pipiens	6	82-TL,81-TL,83-TL
<b>P6-UACM</b>	pipiens	3	82-TL,83-TL
<b>P7-UACM</b>	pipiens	2	21-CJ,22-CJ

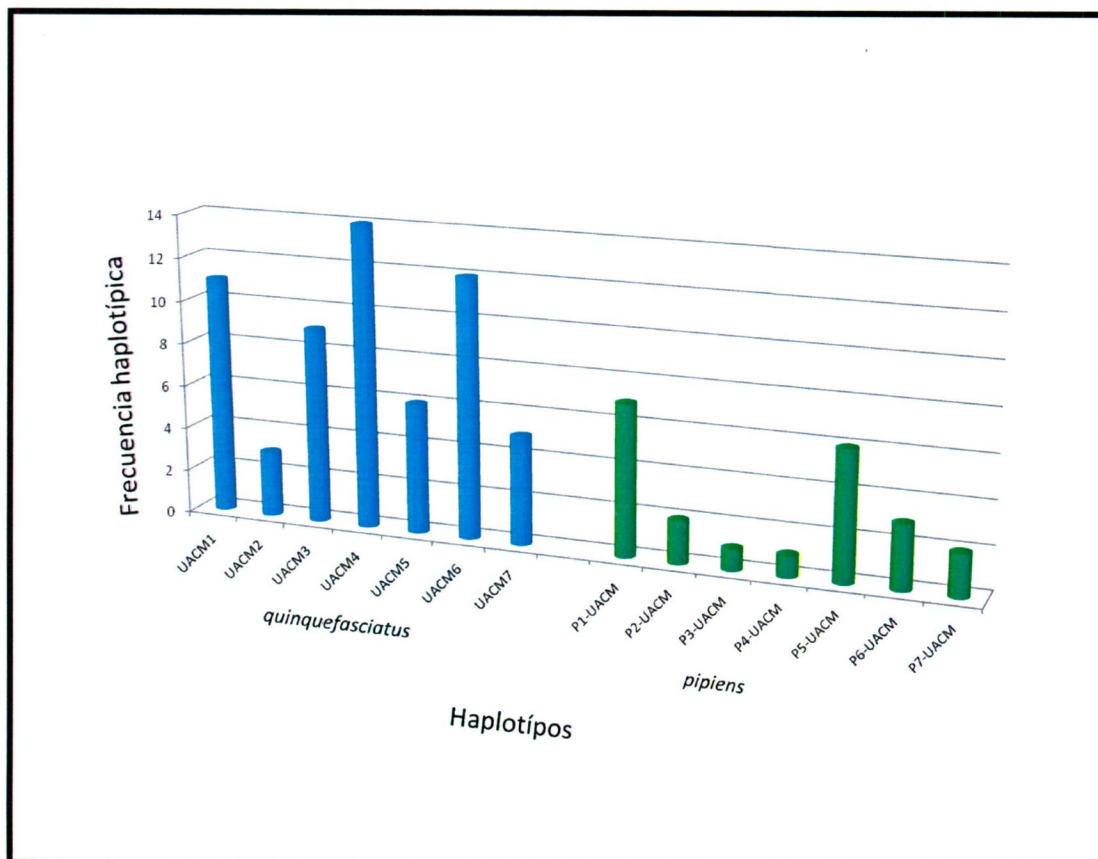


Figura 30. Representación gráfica de las frecuencias haplotípicas para el gen mitocondrial ND4 en la Ciudad de México.

### *El gen nuclear Ace 2*

Con el fin de distinguir los dos taxones nominales del complejo *Cx. pipiens*, el gen nuclear Ace 2 fue amplificado por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para detectar los amplicones específicos de dichos taxones. Los resultados representativos de la prueba de PCR para Ace 2 en mosquitos colectados en los cementerios de la Ciudad de México se muestran en la figura 31. Los productos de PCR de 610 y 274 pb se observaron para *Cx. p. pipiens* y *Cx. p. quinquefasciatus*, respectivamente, y ambos fragmentos fueron observados para los individuos híbridos (Figura 31-B y figura 32). Los mosquitos morfológicamente identificado como *Cx. tarsalis* no generaron ningún producto de amplificación por PCR, como ya se esperaba (Figura 31-A, línea 10).

Los resultados del radio DV /D fueron generalmente concordantes con los resultados de los ensayos moleculares (amplificación del gen Ace 2). Es importante mencionar que de todos los mosquitos analizados había nueve mosquitos identificados como híbridos por el análisis morfológico, análisis de radios DV/D, que se identificaron como *Cx. p. quinquefasciatus* por el análisis molecular en el sitio 03-AO (Santa Rosa Axochiac) (Tabla 7). En las zonas donde puede haber introgresión genética -la introgresión genética se refiere al hecho de introducir en una población genes de otra diferente- (Figura 34, línea gris débil), algunos individuos con radios de DV/D que fueron identificados como *Cx. p. pipiens*, mediante el análisis molecular se supo que eran híbridos y algunos identificados como *Cx. p. quinquefasciatus* en el análisis morfológico también fueron identificados como híbridos en el análisis molecular. Curiosamente, la banda mayormente "observable" correlaciona con la determinación morfológica. Nuestro análisis molecular, en la región nuclear, reveló que la frecuencia de los miembros del complejo *Cx. pipiens* en los sitios de recolección fue: *Cx. p. quinquefasciatus*=95.5%, *Cx. p. pipiens*=14% y los híbridos=10%. Mosquitos de las especies *Cx. p. pipiens* y/o *Cx. p. quinquefasciatus* fueron monitoreados e identificados durante todo el año en 2 sitios de colecta, El Calvario (21-CJ) en Cuajimalpa de Morelos y Sanctorum (52-MH) en Miguel Hidalgo, respectivamente, (Ver figura 33). Además fueron identificados mosquitos híbridos, durante el temporal de lluvias, en las muestras de Santa Lucía en Azcapotzalco (11-AZ), La Concordia en Cuajimalpa (23-CJ), San Nicolás Tolentino en Iztapalapa (37-IP), San Salvador Cuauhtenco en Milpa Alta (63-MA), Santa Catarina en Tlahuac (77-TH) y San Francisco Tlalnepantla en Xochimilco (90-XO) como se muestran en la figura 32. (Ver tabla 9).

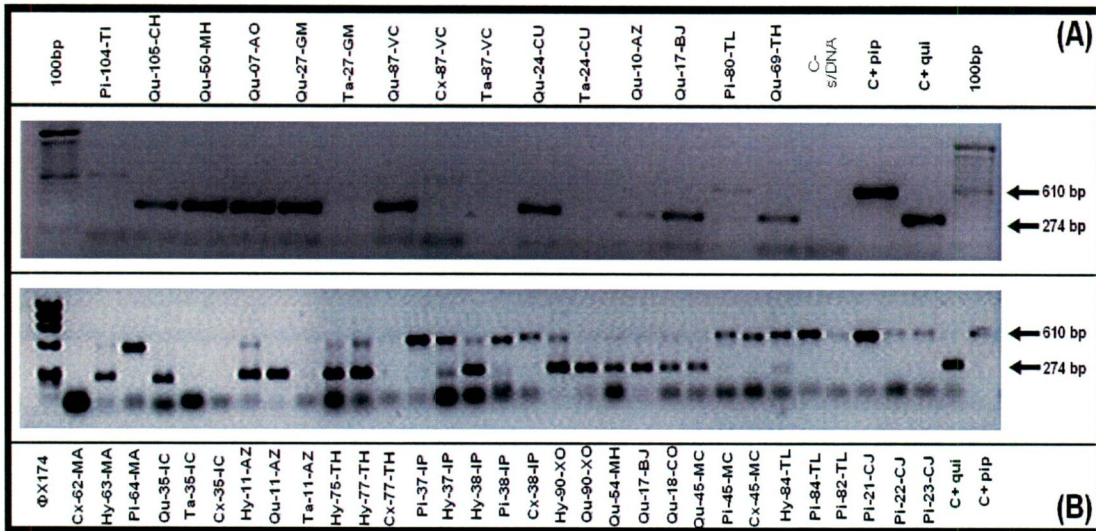


Figura 31. Amplificación del gen nuclear Ace 2 en mosquitos del complejo *Cx. pipiens*. La imagen muestra geles de agarosa con los productos de ADN nuclear amplificados (274 pb para *Cx. quinquefasciatus* y 610 pb para *Cx. pipiens*, ambas para los *Cx. híbridos*) con los primers específicos para la región de Acetilcolinesterasa 2.

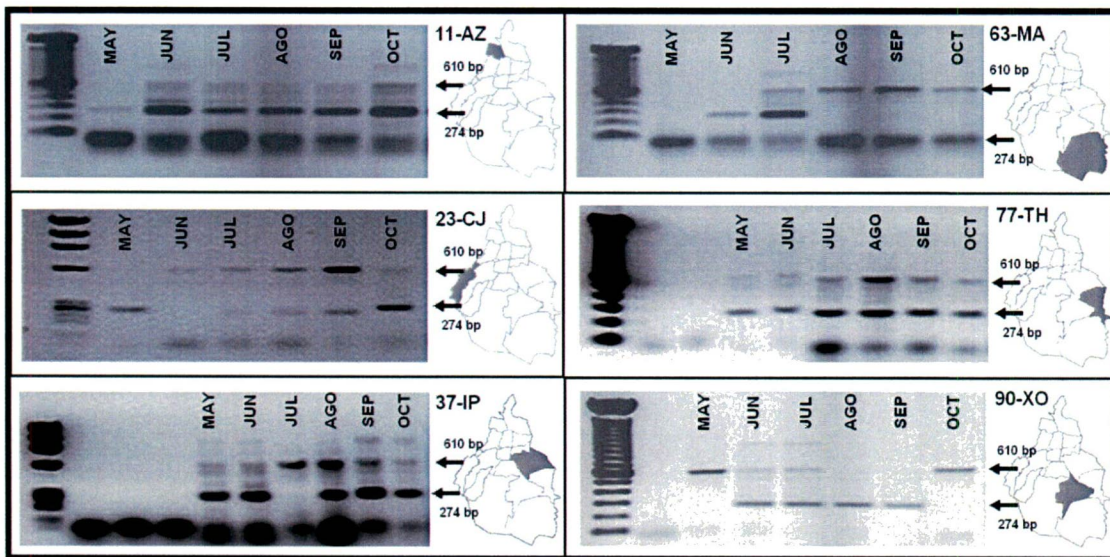


Figura 32. Amplificación por PCR del gen nuclear Ace 2 a partir de muestras de seis diferentes cementerios durante el temporal de lluvias en 2005. Se observa claramente la presencia de individuos híbridos que exhiben ambas bandas en el amplificado.

Tabla 9. Distribución de los miembros del complejo *Culex pipiens* e individuos híbridos identificados por la aplicación del marcador molecular Ace 2. La tabla muestra la distribución de especies de mosquitos en 6 cementerios de la Ciudad de México durante el temporal de lluvias del año 2005, donde se observó la presencia de individuos híbridos en el estudio previo durante 2004.

Cementerio	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT
Santa Lucía, Azcapozalco	q	h	h	h	h	h
La Concordia, Cuajimalpa	q	p	h	h	h	h
San Nicolás Tolentino, Iztapalapa	q	h	p	h	h	h
San Salvador Cuauhtenco, Milpa Alta	ND	q	h	p	p	p
Santa Catarina, Tlahuac	q	h	h	h	h	h
San Francisco Tlalnepantla, Xochimilco	p	h	h	q	q	p

\* Las muestras fueron tomadas de seis cementerios y probadas para el gen nuclear Ace2 para determinar la presencia de *Cx. p. quinquefasciatus* (q), *Cx. p. pipiens* (p) o sus híbridos (h).

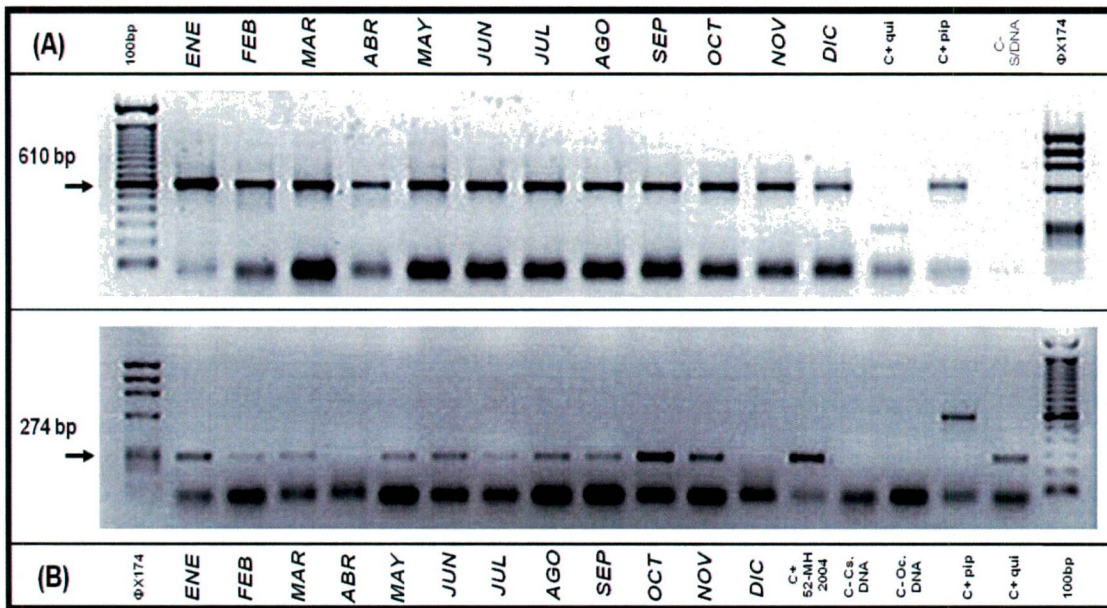


Figura 33. Amplificación por PCR del gen Ace 2 a partir de muestras de dos diferentes cementerios en 2005. (A) Las muestras de cementerio "El Calvario" en Cuajimalpa de Morelos. Todos los productos de PCR corresponden con la banda específica para *Cx. p. pipiens* (610 pb) en cada mes durante el año 2005. (B) Se muestran las amplificaciones del cementerio "Sanctorum" en Miguel Hidalgo donde los productos de PCR corresponden con *Cx. p. quinquefasciatus* (274 pb) en cada mes durante el año 2005. Los controles negativos son indicados como C-Cs.ADN (*Culiseta*) y C-Oc.ADN (*Ochlerotatus*). Los controles positivos son indicadas como C + pip, C + qui y 52 MH2004 (C +). La escalera de 100 pb corresponde al marcador de peso molecular, en las líneas 1 panel A, línea 19 del panel B. También se muestra el marcador de ADN  $\phi$  X174 /Hae III, en la línea 17 panel A, línea 1 panel B.

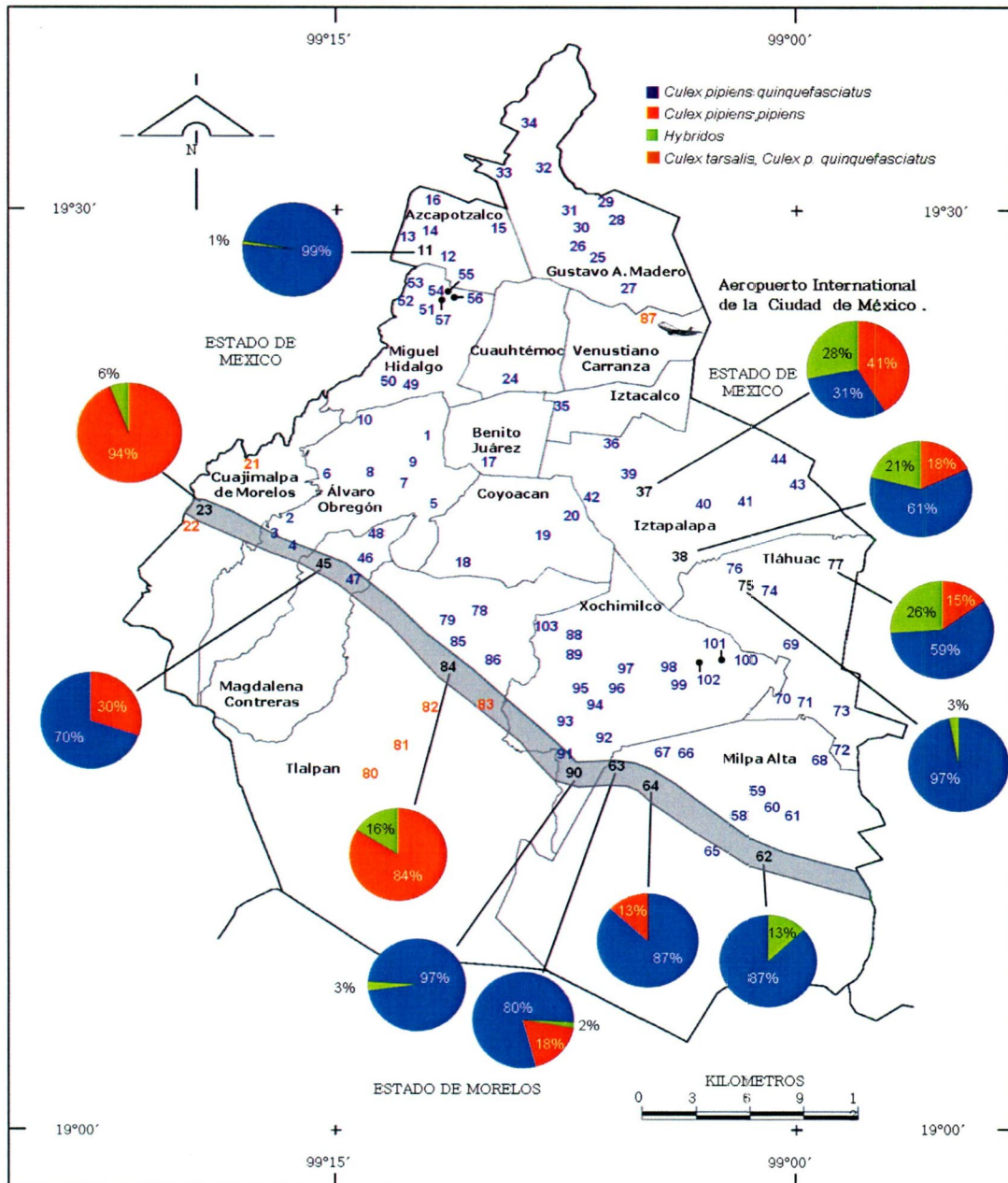


Figura 34. Distribución de mosquitos del complejo *Culex pipiens* en Ciudad de México. Mapa de distribución que muestra la localización de las poblaciones de *Cx. p. quinquefasciatus*, *Cx. p. pipiens* e híbridos de acuerdo con los resultados en la diferencia de nucleótidos en el gen Ace 2. Las gráficas de pastel o sectores (números en negro) indican la distribución de las frecuencias que identifican los linajes correspondientes. Los tamaños de los segmentos de las gráficas de pastel son proporcionales a la cantidad de mosquitos identificado como *Cx. p. quinquefasciatus* (azul), *Cx. p. pipiens* (rojo) o híbridos (verde). Los números en azul indican los sitios donde *Cx. p. quinquefasciatus* se identificó de manera exclusiva, de color rojo donde *Cx. p. pipiens* fue reconocido exclusivamente y en negro donde los híbridos fueron localizados de acuerdo a los gráficos y los datos de la tabla 7. Además, los números de color marrón indican los sitios donde *Cx. p. quinquefasciatus* coexiste con *Cx. tarsalis* (que es otro vector importante en la transmisión del VON). La línea gruesa de color gris refiere la probable área de introgresión genética. Los números corresponden a los sitios de recolección de muestra de la tabla 3.

Se secuenciaron algunos de los productos de PCR para el gen nuclear Ace 2, buscando que quedaran representados los diferentes sitios de colecta en la capital del país. Las secuencias de los 7 haplotípos encontrados en las muestras seleccionadas al azar se alinearon en el programa Vector NTI Suite 6.0, donde pudimos observar los sitios de mutación, así como las bases correspondientes a dichos cambios que diferenciaban a un haplotipo de otro. Para finalizar esta parte del estudio molecular realizamos una comparación de estas secuencias con las secuencias reportadas en el GenBank por Aspen y Savage (2003) por medio del programa Clustal W (Thomson et. al., 1994) y se tradujeron automáticamente usando el programa BioEdit 7.0.9 (Ibis Biosciencias). Para los análisis filogenéticos se usaron los métodos de Neighbor-joining, Máxima Parsimonia y Mínima evolución con corrección gamma y un bootstrap (una forma de medir el error de muestreo es tomar muchas muestras de la población estudiada y compararlas, el bootstrap simula esto pero en lugar de muestrear de una población “remuestra” los datos originando pseudoréplicas) de 10000 repeticiones y el método de sustitución nucleotídica determinada por “Model Selection” utilizando el programa MEGA V4 (Tamura et. al., 2007) y obtuvimos finalmente los arboles filogenéticos mostrados en la figura 36. Las frecuencias haplotípicas están representadas en la figura 35, (Ver los valores en la tabla 10).

Tabla 10. Distribución haplotípica del gen nuclear Ace 2 en la Ciudad de México. Se pueden observar los diferentes sitios representados para cada uno de los haplotípos encontrados en muestras de mosquitos del complejo *Cx. pipiens* en la Ciudad de México.

Haplotipo	Especie	Frecuencia	Sitios representados
Pipi 1	pipiens	3	21-CJ,22-CJ,23-CJ
Pipi 2	pipiens	7	37-IP,38-IP,80-TL,81-TL,82-TL,83-TL,84-TL
Pipi 3	pipiens	2	37-IP,38-IP
Pipi 4	pipiens	7	37-IP,38-IP,63-MA,64-MA,77-TH,83-TL,84-TL
Qui 1	quinquefasciatus	9	17-BJ,24-CU,25-GM,26-GM,27GM,35-IC,36-IP,39-IZ,76-TH
Qui 2	quinquefasciatus	21	02-AO,05-AO,11-AZ,17-BJ,20-CO,24-CU,25-GM,26-GM,27GM,34-GM,35-IC,36-IP,37-IP,38-IP,39-IZ,48-MC,76-TH,78-TL,84-TL,87-VC,95-XO
Qui 3	quinquefasciatus	9	10-AO,12-AZ,49-MH,50-MH,51-MH,53-MH,55-MH,56-MH,57-MH

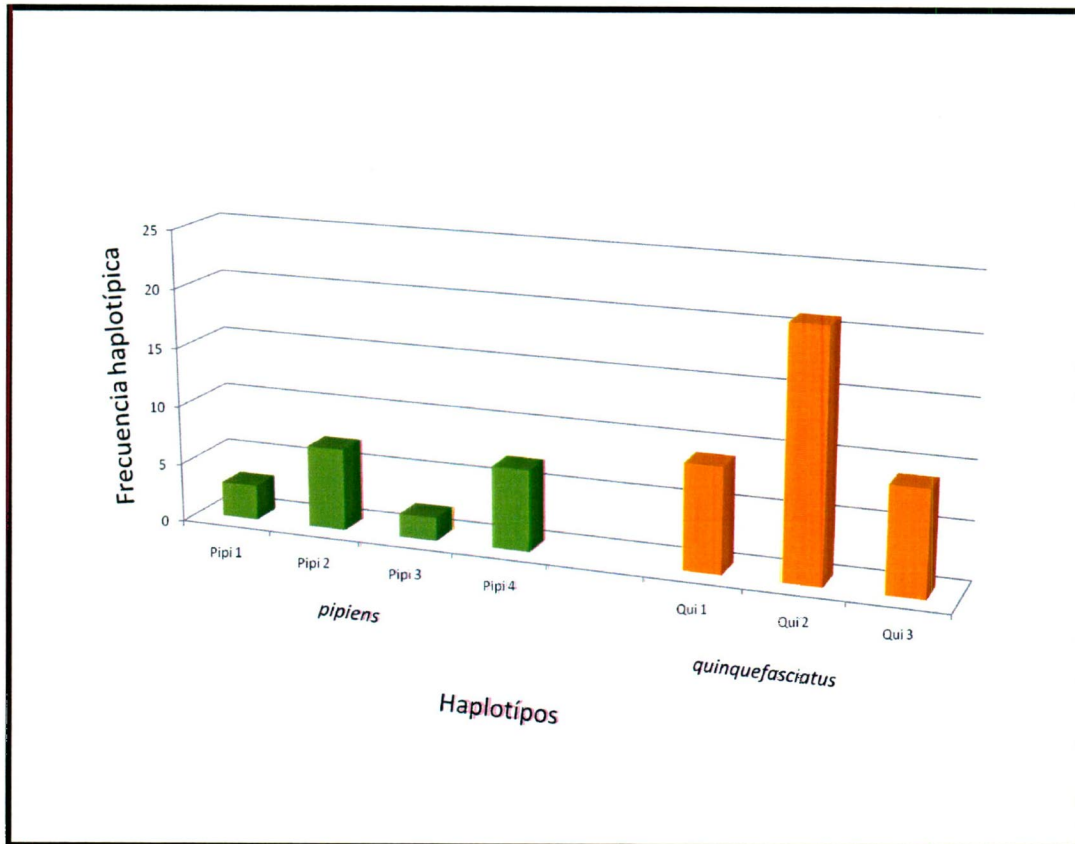


Figura 35. Representación gráfica de las frecuencias haplotípicas para el gen nuclear Ace 2 en la Ciudad de México.

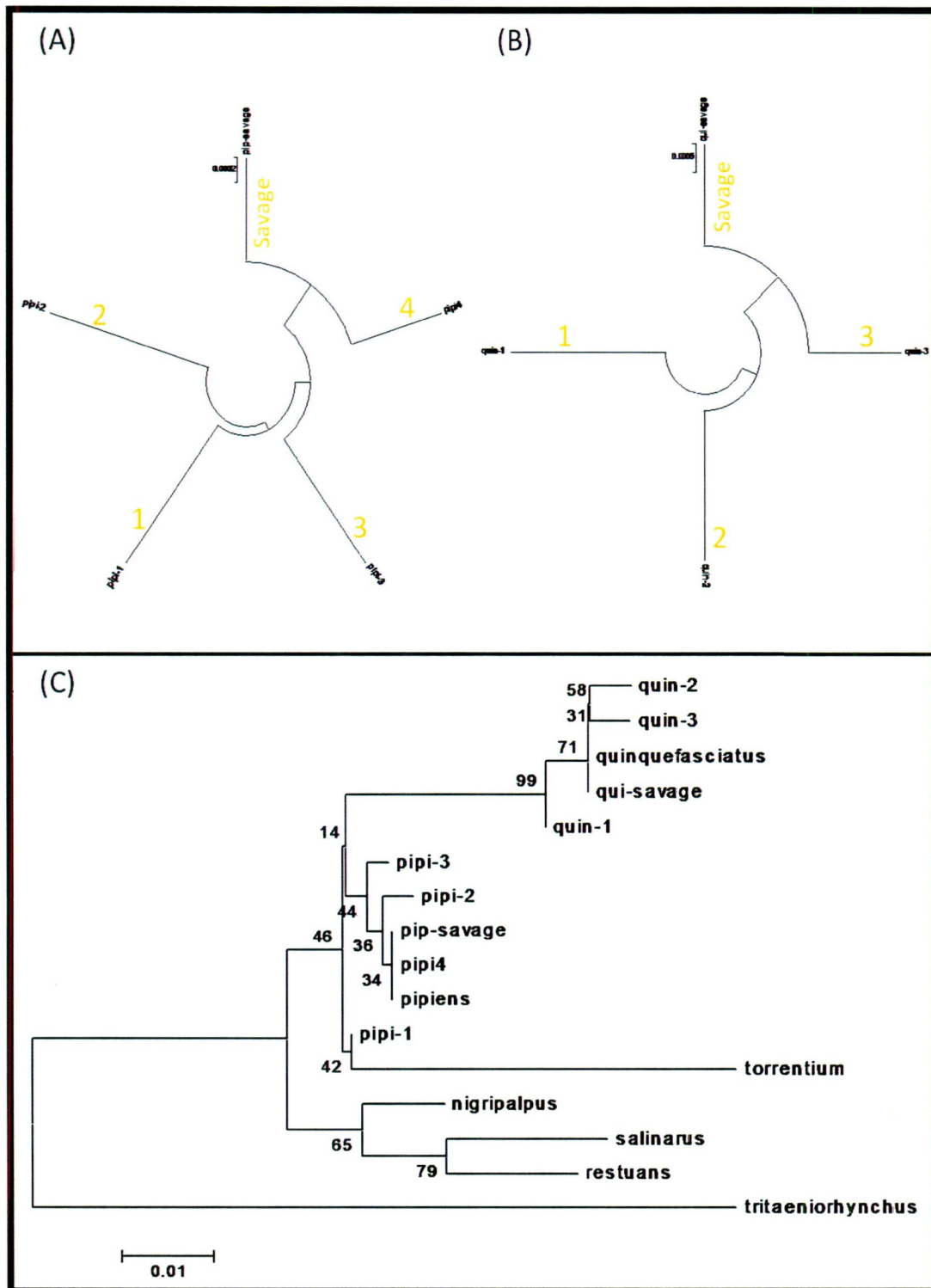


Figura 36. Representación filogenética de los haplotípos encontrados con el gen nuclear Ace 2 en muestras de la Ciudad de México. En la figura podemos observar la filogenia correspondiente a los 4 haplotípos de *Cx. pipiens* (A) y en (B) la filogenia correspondiente a los 3 haplotípos para *Cx. quinquefasciatus*. En (C) la filogenia de todo el complejo incluyendo a los otros miembros del complejo.

### **Contribución de las lluvias estacionales en la genética de los mosquitos**

Con el fin de determinar la influencia de las lluvias estacionales en la abundancia de los mosquitos del complejo *Cx. pipiens*, se analizaron molecularmente 600 mosquitos por mes, colectados en seis cementerios durante la estación lluviosa de mayo a octubre de 2005 (Tabla 9, figura 32). Mosquitos *Culex pipiens quinquefasciatus híbridos* se encontraron en los seis sitios de recolección. Los mosquitos fueron colectados una vez al mes a partir de 10 contenedores diferentes en cada sitio. Los híbridos se detectaron en el sitio de Azcapotzalco de junio a octubre, en el sitio de Milpa Alta, en julio, en el sitio de Cuajimalpa de julio a octubre, en el sitio de Tláhuac de junio a octubre, en el sitio de Iztapalapa en junio y de agosto a octubre y finalmente, en el sitio de Xochimilco en junio y julio (Tabla 9). Además, las densidades de mosquitos híbridos fueron cualitativamente superiores durante la temporada de lluvias. Es importante mencionar que los híbridos no se observaron durante todo el año. Cabe destacar que no se detectaron en los meses secos (Enero a mayo). Dos picos en la abundancia de mosquitos híbridos se observaron (Ver figura 29), el primero en junio y el segundo en agosto en el Panteón Civil San Nicolás Tolentino (37-IP). Las temperaturas en los sitios de recolección, de forma total, fluctuaron entre 8 ° C a 23 ° C. Los híbridos fueron encontrados a temperaturas entre 12.5 ° C a 17 ° C.

## **DISCUSIÓN**

De acuerdo a lo mostrado en la literatura, los mosquitos pertenecientes a los géneros *Culex*, *Culiseta* y *Ochlerotatus* recolectados e identificados en la Ciudad de México son capaces de transmitir agentes patógenos causantes de muchas enfermedades, tales como el VON. Los mosquitos pertenecen al complejo *Cx. pipiens*, sus híbridos, y *Cx. tarsalis* se consideran importantes vectores de VON, que puede causar fiebre, la muerte y secuelas a largo plazo en los seres humanos infectados, así como la muerte de caballos y otros mamíferos (Kulasekera et. al., 2001). La infección por VON es principalmente enzoótica entre las aves (Malkinson y Banet, 2002), y teniendo a los seres humanos y equinos como huéspedes accidentales o huéspedes terminales al causarles la muerte (Murge et. al., 2001). Las aves migratorias pueden propagar el virus a largas distancias (Hannoun et. al., 1972. Rappole et. al., 2000) El VON es responsable de brotes importantes de casos humanos en los Estados Unidos, Europa y el Oriente Medio (Hayes et. al., 2005. Bernard et. al., 2001. 2010 WNV-CDC, 2010). La Ciudad de México tiene las condiciones climáticas similares a otras ciudades donde los brotes de VON se han producido con consecuencias fatales para los seres humanos. El VON se ha reportado en seis estados mexicanos (Anuarios de morbilidad DGEPI, 2010. Rios-Ibarra et. al., 2010), lo que aumenta la probabilidad de introducción del virus en la capital del país. Poco se sabe sobre la distribución de mosquitos del complejo *Cx. pipiens* en la Republica Mexicana, mas aun hay escasa información para la Ciudad de México.

Esta información es esencial para evaluar el potencial que se tiene de que se presente una epidemia por el VON en la Ciudad de México. El VON se ha detectado en diversas especies de mosquitos del genero *Culex* en los Estados Unidos desde 1999, y se ha extendido por la mayoría de los estados de ese país (CDC, 2010), resultando en 30658 casos humanos con 1206 muertes a finales de 2010. El virus llegó a Canadá en 2001 y los países del Caribe y América Central en 2003 (Rios-Ibarra et. al., 2010. Elizondo-Quiroga et. al., 2005). El VON fue detectado en caballos en los estados mexicanos de Veracruz, Yucatán, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Tabasco en 2002 (Estrada-Franco et. al., 2003). Sin embargo, el virus no fue detectado en muestras de caballos de Durango, San Luis Potosí, Jalisco, Distrito Federal, Guerrero, Puebla, Oaxaca y Chiapas donde los resultados finales fueron negativos para VON (Estrada-Franco et. al., 2002). Los dos primeros casos autóctonos confirmados de humanos infectados por el VNO en México se registraron en Nuevo León y Sonora en 2005 (Elizondo-Quiroga et. al., 2005). A nuestro entender, sólo 8 casos humanos de infección por el VON se han producido en México, 3 de los cuales fueron graves, pero no ocasionaron la muerte (Rios-Ibarra et. al., 2010). Un caso humano mortal se registró en Nuevo León, México en 2005 (Rios-Ibarra et. al., 2010) y 6 casos más en el norte de México, en una encuesta de 2005 a 2007 (Rodriguez et. al., 2010).

Además, hay otros informes que sugieren que debido a que hay muchos casos de dengue (DENV) en México los posibles casos humanos mexicanos tienen anticuerpos contra el flavivirus del DENV que pueden bloquear al otro flavivirus de VON (Rodriguez et. al., 2010). Sin embargo, dado que no ha habido ninguna actividad de DENV en la Ciudad de México, la gente de la Capital podría estar mas expuesta a ser infectada por este virus, si es que los anticuerpos contra DENV tienen algún papel en el bloqueo de la infección por el VNO. La introducción y el establecimiento del VON en la

Ciudad de México -que bien podría resultar en un desastre de salud pública- es posible porque los principales vectores *Culex* están presentes en toda la ciudad, además de que la ciudad está dentro del trazo migratorio de muchas de las aves que han sido reportadas como reservorios naturales del VON (Rappole et. al., 2000), mas el hecho de que la Capital del país es una de las ciudades más pobladas del mundo. Como pudimos analizarlo, la introducción del virus puede ocurrir en una considerable variedad de maneras, incluyendo, como ya se menciona, la migración de las aves infectadas con el VON o por humanos o por mosquitos infectados en los aviones y otros medios de transporte. Los brotes de VON que se producen de forma esporádica en el sur de Europa se atribuyen a la importación del virus por las aves migratorias de África, que luego infectan a los mosquitos locales (Murge et. al., 2001 y 2002).

Los mosquitos *Culex spp* son frecuentemente capturados y colectado en aviones (Russell, 1987), y es posible que el VON se podría haber introducido en Nueva York en 1999 por un mosquito infectado transportado desde el Medio Oriente. En este sentido la Ciudad de México cuenta con los enormes servicios del Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México, que es el aeropuerto más grande y visitado de América Latina, con flujo regular de vuelos diarios a América del Norte, la parte continental de México, América Central y el Caribe, América del Sur, Europa y Asia, además de que tiene acuerdos políticos y comerciales con prácticamente todos los países del mundo. Se sabe que este aeropuerto actualmente es utilizado por más de 26 millones de pasajeros al año (AICM, 2010), y en 2008, aproximadamente 31 millones de personas pasaron por los aeropuertos de esta ciudad capital. Con este alto volumen de tráfico hacia y desde las zonas endémicas, la Ciudad de México está en riesgo de introducción del VON. Curiosamente, *Cx. tarsalis*, que actualmente es considerado uno de los mejores vectores del VON, sólo se detectó en un sitio cerca del aeropuerto internacional, sugiriendo su posible transportación a través de aviones como ha ocurrido en otros países (Russell, 1987). Esta sugerencia se basa en el hecho de que no encontramos a este mosquito en los otros sitios de colecta, aun cuando se realizaron las colectas en contenedores naturales de agua, con menos de una semana de depósito, sitios que son preferido por *Cx. tarsalis* (Russell,1987).

Nuestros resultados muestran por primera vez la prevalencia y distribución de mosquitos del complejo *Cx. pipiens* en la ciudad capital de México, lo que ayudará a los esfuerzos de control de vectores en el caso de la introducción del virus. Es importante tomar en cuenta que en este estudio sólo se utilizaron los hábitats de larvas en los cementerios y se tomaron muestras para hacer el uso más eficiente de los recursos disponibles. Una muestra más amplia de tipos y sitios de colecta esta disponible (por ejemplo, industrias, viviendas de alta densidad, comercios, etc.) y pueden producir resultados ligeramente diferentes. Del mismo modo, el uso de trampas de luz, para capturar especímenes adultos, muy probablemente produciría resultados diferentes, dadas las diferencias conocidas en respuesta a las trampas de luz por otras especies de mosquitos. En el caso del muestreo de larvas en comparación con las trampas de luz, el muestreo de larvas, si es lo suficientemente detallado, es más probable que muestre todo el complejo de especies representadas en los sitios. Se seleccionaron cementerios, debido a su accesibilidad, pues son una representación efectiva de la mayor superficie circundante, ya que localizamos una alta densidad

de unidades habitacionales rodeando a estos recintos públicos. Muestreos de otras clases y tipos ya han sido aplicados y están previstos en los proyectos presentes y futuros de nuestro grupo de trabajo. Es muy claro que *Cx. p. pipiens* y *Cx. p. quinquefasciatus* están estrechamente relacionados con los seres humanos. Las zonas de hibridación entre las dos especies han sido reportadas en América del Norte, Argentina y Madagascar (Cornel et. al., 2003. Humeres et. al., 1998. Urbanelli et. al., 1995). La Ciudad de México cuenta con aproximadamente 103 cementerios rodeados de casas y apartamentos, como ya se había mencionado (Ver la figura 12).

Las criptas tienen contenedores de agua durante todo el año y están rodeadas de vegetación considerable, proporcionando las condiciones adecuadas para los criaderos de mosquitos (Vezzani, 2007). Los cementerios muestreados en este estudio confirmaron la presencia del complejo *Cx. pipiens* y *Cx. tarsalis* en la Ciudad de México. Nuestros resultados muestran por primera vez que *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus*, sus híbridos y *Cx. tarsalis* están todos presentes en la Ciudad y coexisten bajo distintas condiciones ambientales. Anteriormente, se pensaba que *Cx. p. pipiens* sólo se encontraba en los Estados Unidos y Canadá (Barr, 1957). Además, la Ciudad de México no fue incluido en informes anteriores.

Estudios previos basados en los valores de DV/D y un análisis en el ADN ribosomal (Smith y Fonseca, 2004), muestran que los especímenes ubicados entre las isothermas 12-14 ° C en el norte de la ciudad de México se identificaron de forma inequívoca como *Cx. p. quinquefasciatus*. El nuestro es el primer informe de la Ciudad de México y que está de acuerdo con estudios previos donde se muestra que sólo *Cx. p. quinquefasciatus*, por lo general, se encuentran al sur del paralelo 36 ° N en América del Norte (Barr, 1957). *Culex pipiens pipiens* fue detectado por encima de las isothermas de 12-14 ° C en el sur de la Ciudad de México. Por último, mosquitos híbridos de *Cx. p. pipiens quinquefasciatus* se detectaron entre las isothermas de 10-12 ° C y las isothermas de 12-14 ° C en las delegaciones de Cuajimalpa, Álvaro Obregón, Magdalena Contreras, Tlálpán, Xochimilco y Milpa Alta (Figuras 19 y 34). Mosquitos *Culex p. pipiens*, también fueron colectados durante todo el año en el cementerio "El Calvario" en Cuajimalpa de Morelos, lo que sugiere la adaptación del mosquito a esta región. Los híbridos se colectaron durante la estación de lluvias, de junio a octubre, del noroeste al sureste de la ciudad, donde había alta densidad de mosquitos. La abundancia de mosquitos híbridos aumento a fines del verano (Cuajimalpa, Iztapalapa, Azcapotzalco, Xochimilco, Milpa Alta y Tláhuac) entre septiembre y octubre, asociado este fenómeno, con una disminución de la temperatura (Tabla 9).

Después de un exhaustivo análisis, nosotros estamos sugiriendo la ubicación de una región hipotética de hibridación (Figura 34) que revela los límites de distribución de *Cx. p. quinquefasciatus* y *Cx. p. pipiens* sin ningún tipo de barrera geográfica aparente. Esto se basa en los límites espaciales aparentes de las poblaciones de mosquitos de *Cx. p. quinquefasciatus* y *Cx. p. pipiens*, con la localización de mosquitos híbridos detectados entre estas dos zonas. Se necesitan estudios adicionales para demostrar que se trata de una zona de introgresión verdadera. *Culex pipiens pipiens* se detecto principalmente en zonas suburbanas o rurales y *Cx. p. quinquefasciatus* fue detectado principalmente en las zonas urbanas, concepto que ya ha sido se informó anteriormente (Huang et. al., 2008). De forma interesante, en las delegaciones del noreste,

Iztapalapa y Tláhuac, no se advierte una división natural aparente entre los miembros del complejo *Cx. pipiens*, donde *Cx. p. quinquefasciatus*, *Cx. p. pipiens* y los híbridos de estos, fueron encontrados en los mismos sitios de colecta (Figura 34).

Se ha sugerido que la hibridación entre *Cx. p. pipiens* y *Cx. p. quinquefasciatus* pudo facilitar la rápida propagación del VON en América del Norte (Fonseca et. al., 2004). Nuestros estudios confirman la presencia de una población auto-sustentable de mosquitos híbridos del complejo *Cx. pipiens* en la Ciudad de México (Figuras 19 y 34). Este fenómeno es similar a los resultados de estudios previos en Colorado (Aspen y Savage, 2003), California (Cornel et. al., 2003), y Tennessee (Jacob et. al., 1980). La naturaleza de las poblaciones híbridas en la Ciudad de México requiere más estudios, como ya se había detallado. Marcadores de tipo microsátélites se han utilizado para evaluar la introgresión entre *Cx. p. pipiens* y *Cx. p. quinquefasciatus* (Kothera et. al., 2009), y este enfoque de genética de poblaciones podría ser utilizado para definir el alcance y las regiones geográficas de la introgresión dentro de la zona de estudio. También hay que señalar que la presencia de *Cx. p. pipiens* podría plantear un riesgo para los humanos en la Ciudad de México, ya que hay informes que indican que esta especie puede cambiar las preferencias de alimentación de las aves a los seres humanos en las zonas urbanas a finales del verano y principios del otoño (Reisen et. al., 2010).

Nuestros análisis da una idea de la distribución de los miembros del complejo *Cx. pipiens* en la Ciudad de México. Esto es importante porque las diferencias de comportamiento, tales como las preferencias de hospederos para la alimentación de las hembras adultas, son importantes para determinar la capacidad vectorial de los mosquitos del complejo *Culex*. Esta información es necesaria para el establecimiento de una vigilancia eficaz y el establecimiento de programas específicos de control para prevenir o controlar los brotes de VON, u otras enfermedades relacionadas como la filariasis.

## Conclusiones

1. Los mosquitos *Culex pipiens pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* y *Cx. tarsalis* son importantes vectores de VON, y se reproducen en Ciudad de México.
2. Los valores de las forma morfométricas de las alas de las hembras adultas de los mosquitos del complejo *Cx. pipiens* tienen relación con las variaciones genéticas de las poblaciones. El tamaño de los datos de las alas está relacionado con las áreas geográficas donde viven los mosquitos. De igual forma, los valores de la razón DV/D de los brazos dorsales del edeago en la genitalia masculina no pueden distinguir taxones en el complejo *pipiens*, como se pensaba anteriormente, y sí, como se vio, son sólo el tamaño de las medidas que están más relacionadas con factores de desarrollo.
3. Los marcadores mitocondriales muestran algunos signos de la diversidad en los miembros del complejo *Cx. pipiens*. Sin embargo, las mutaciones encontradas son “silenciosas” porque no tienen efecto sobre la función de la proteína producida. Por lo que se sugiere realizar más estudios al respecto.
4. El segundo intrón del locus de la acetilcolinesterasa (Ace 2) demostró estar fijo en las poblaciones de mosquitos del complejo *Cx. pipiens*, ya que fue amplificado con los mismos primers, de forma eficiente y clara, en las muestras de mosquitos.
5. Las poblaciones híbridas del complejo *Cx. pipiens* parecen estar todavía en un proceso de fijación para el establecimiento de zonas de introgresión de genes. Este estudio fue esencial, a fin de conocer los límites de la introgresión entre estas dos especies en la Ciudad de México.
6. El mosquito *Cx. quinquefasciatus*, que es netamente urbano, recibe una gran cantidad de presión del medio donde vive, lo que reduce su diversidad genética. Entre estas presiones se encuentran, la aplicación indiscriminada de insecticidas para el control de las poblaciones adultas, la degradación ambiental característica del entorno urbano, la excesiva radiación solar por efectos del cambio climático, y los extremos en el rango de temperatura.
7. Los híbridos de *Cx. p. pipiens* y *Cx. p. quinquefasciatus* fueron detectados por análisis morfológico de la genitalia masculina (razon DV/D) y por el análisis molecular del ADN de los mismos (marcadores ND4 y Ace 2).
8. Los híbridos fueron identificados durante la temporada de lluvias de junio a octubre, en una región de introgresión que se extiende desde el noroeste al sureste de la ciudad. Queda claro que la Ciudad de México tiene una abundancia de vectores competentes del genero *Culex spp* y que corre el riesgo de la introducción de VON y otras enfermedades epidémicas. El incremento en los programas de vigilancia y control de vectores, eficaces, deben aplicarse con el fin de evitar el riesgo de una epidemia por el VON en esta región de la República Mexicana que se caracteriza por su densidad alta poblacional humana.
9. Los avances de este proyecto fueron presentados durante su desarrollo en distintos foros de discusión científica y de investigación, como se muestra en el Anexo.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

2010 West Nile Virus Human Infections in the United States (Reported to CDC as of December 14, 2010). Disponible en:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount10\\_detailed.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount10_detailed.htm)

Ahid S. M. M., Lourenço-de-Oliveira R. (1999). Mosquitos vetores potenciais de dirofilarirose canina na Região Nordeste do Brasil. Rev Saúde Pública. 33: 650-65.

Almirón W.R., Humeres S.G., Gardenal C.N. (1995). Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 90: 469-473.

Aeropuerto Internacional de la Ciudad de Mexico. Disponible en:

<http://www.aeropuertomexico.com/content/view/446/521/>

Anuarios de Morbilidad. Disponible en:

<http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

Apperson C.S., Hassan H.K., Harrison B.A., Savage H.M., Aspen S.E., Farajollahi A., Crans W., Daniels T.J., Falco R.C., Benedict M., Anderson M., McMillen L., Unnasch T.R. (2004). Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile virus in the eastern United States. Vector Borne Zoonotic Dis 4: 71-82.

Arensburger P., Megy k., Waterhouse R. M., et al. (2010). Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. Science. 330: 86.

Asnis D.S., Conetta R., Waldman G., Teixeira A.A. (2001). The West Nile virus encephalitis outbreak in the United States. Ann NY Acad Sci. 951: 161-71.

Aspen S., Savage H. M. (2003). Polymerase chain reaction assay identifies North American members of the *Culex pipiens* complex based on nucleotide sequence differences in acetylcholinesterase gene Ace 2. J Am Mosq Control Assoc. 19:323-8.

Bahnck C.M., Fonseca D.M. (2006). Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (culex) pipiens* L. (diptera: culicidae) and hybrid populations. Am J Trop Med Hyg. 75: 251–255.

Barr A.R. (1957). The distribution of *Culex p. pipiens* and *C. p. quinquefasciatus* in North America. Am J Trop Med Hyg 6: 153-165.

Bartholomay L. C., Waterhouse R. M., Mayhew G. F., Campbell C. L., et. al. (2010). Pathogenomics of *Culex quinquefasciatus* and Meta-Analysis of Infection Responses to Diverse Pathogens. Science. 88: 90.

Beaty B. J. and Maquardt W. C. (1996). The biology of disease vectors. Colorado, University Press of Colorado, 1996.

Beck S.D. (1968). Insect photoperiodism. New York: Academic Press.

Bekku H. (1956). Studies on the *Culex pipiens* group of Japan. I. Comparative studies on the morphology of those obtained from various localities in the Far East. Nagasaki Igakkai Zasshi 31: 956-966.

Belkin J.N. (1962). The Mosquitoes of the South Pacific (Diptera: Culicidae). Berkeley, CA: University of California Press.

Bernard K.A., Maffei J.G., Jones S.A., Kauffman E.B., Ebel G., Dupuis 2nd A.P., Ngo K.A., Nicholas D.C., Young D.M., Shi P.Y., et al. (2001). West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. Emerg Infect Dis. 7:679-685.

Bhargavi R., Vishwakarma S., Murty U.S. (2005). A secondary structural common core in the ribosomal ITS2 (internal transcribed spacer) of *Culex* species from diverse geographical locations. Bioinformation. 1: 52-55.

Binder S., Levitt A.M., Sacks J.J., Hughes J.M. (1999). Emerging infectious diseases: public health issues for the 21<sup>st</sup> century. Science. 284: 1311.

Black, W.C., DuTeau N.M., Puterka G.J., Nechols J.R. & Pettorini J.M. (1992). Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids. Bull. Entomol. Res. 82: 151-159.

Blitvich, B. J., Fernández-Salas, J., Contreras-Cordero, J.F., Marlenee, N.L., González-Rojas, J.I., Komar, N., Gubler, D. J., Calisher, C.H., Beaty, B.J. (2003). Serologic Evidence of West Nile Virus Infection in Horses, Coahuila State, Mexico. Emerging Infectious Diseases 9 (7): 853-6.

Blitvich, B. J., Fernandez-Salas I., Contreras-Cordero J.F., Lorono-Pino M.A., Marlenee N.L., Diaz F.J., et al. (2004). Phylogenetic analysis of West Nile virus, Nuevo Leon State, Mexico. Emerg Infect Dis. 10(7):1314-1317.

Bosio C.F., Harrington L.C., Jones J.W., Sithiprasasna R., Norris D.E., Scott T.W. (2005) Genetic structure of aedes aegypti populations in thailand using mitochondrial DNA. Am J Trop Med Hyg. 72: 434-42.

Bockarie M.J., Pedersen E.M., White G.B., Michael E. (2009). Role of vector control in the global program to eliminate lymphatic filariasis. Annu Rev Entomol 54: 469-487.

Bourguet D., Fonseca D., Vourch G., Dubois M. P., Chandre F., Severini C., Raymond M. (1998). The Acetylcholinesterase Gene ACE: A Diagnostic Marker for the pipiens and quinquefasciatus Forms of the *Culex pipiens* Complex. J Am Mosq Control Assoc. 14: 390-6.

- Brogdon, W. G. (1981). Use of siphonal index to separate *Culex pipiens* subspecies and hybrids. *Mosq. Syst.* 13:129–137.
- Brogdon, W. G. (1984a). The siphonal index. I. A method for evaluating *Culex pipiens* subspecies and intermediates. *Mosq. Syst.* 16:144–152.
- Brogdon, W.G. (1984b). The siphonal index. II Relative abundance of *Culex* species, subspecies and intermediates in Memphis, Tennessee. *Mosquito Systematics* 16:153-161.
- Brower A.V., DeSalle R. (1998). Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. *Insect Mol Biol.* 7(1):73-82.
- Buggs R.J. (2007). Empirical study of hybrid zone movement. *Heredity* 99: 301-312.
- Burger G., Forget L., Zhu Y., Gray M. W., Lang B.F. (2003). Unique mitochondrial genome architecture in unicellular relatives of animals. *Biochemistry.* 100: 892-7.
- Burke J.M., Arnold M.L. (2001). Genetics and the fitness of hybrids. *Annu Rev Genet.* 35:31-52.
- Carpenter S.J., LaCasse W.J. (1955). *Mosquitoes of North America (North of Mexico)*. University of California Press, Berkeley, CA. 360 pp.
- Carson, P.J., Konewko, P., Wold, K.S., Mariani, P., Goli, S., Bergloff, P., Crosby, R.D. (2006). Long Term Clinical and Neuropsychological outcomes of West Nile Virus Infection. *Clinical Infectious Diseases.* 43:723-30.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. (2007). Statistics, Surveillance and Control. Division of Vector Borne Infectious Diseases. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&control.htm#maps>
- CENAVECE, Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. (2005). Vigilancia entomológica. <http://www.cenave.gob.mx/von/>
- Cerezo J., Madrid V. (1995). Técnicas, estrategias y usos de biología molecular en medicina. *Rev Invest Clin,* 126, 603-11.
- Cheng M.L., Hacker C.S., Pryor S.C., Ferrel R.E., Kitto G.B. (1982). The ecological genetics of the *Culex pipiens* complex in North America, p. 581-627. In WWM Steiner, WJ Tabachnick, KS Rai, S Narang (eds), *Recent developments in the genetics of insect disease vectors*. Champaign, Illinois, Stipes.
- Clements, A. N. (1992). *The biology of mosquitoes. Vol. I. Development, nutrition and reproduction*. Chapman & Hall, London.
- Clements, A. N. (1999). *The biology of Mosquitoes. Vol. 2. Sensory reception and behaviour*. CAB International. London.

- Coen E., Strachan T., Dover G. (1982). Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *J Mol Biol.* 15;158(1):17–35.
- Conn E.E., Stumpf P.K. (1980). *Introdução à Bioquímica*. 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher.
- Consoli R.A.G.B., de Oliveira R.L. (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fundação Instituto Oswaldo Cruz.
- Cook S., Bennett S.N., Holmes E.C., De Chesse R., Moureau G., Lamballerie X. (2006). Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *J Gen Virol* 87: 735-748.
- Cornel A.J., McAbee R.D., Rasgon J., Stanich M.A., Scott T.W., Coetzee M. (2003). Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *J Med Entomol* 40: 36-51.
- Cunningham A.A., Daszak P., Rodríguez J.P. (2003). Pathogen pollution: defining parasitological threat to biodiversity conservation. *J Parasitol.* 89: 578-83.
- Darsie Jr. R.F., Ward R.A. (2005). *Identification and Geographical Distribution of the Mosquitoes of North America, North of Mexico*. University Press of Florida.
- Daszak P., Cunningham A.A., Hyatt A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-9.
- Daszak P., Tabor G.M., Kilpatrick A.M., Epstein J., Plowright R. (2004). Conservation Medicine and a New Agenda for Emerging Diseases. *Ann NY Acad Sci.* 1026: 1–11.
- de Merida A.M., de Mata M.P., Molina E., Porter C.H., Black WC 4th. (1995). Variation in ribosomal DNA intergenic spacers among populations of *Anopheles albimanus* in South and Central America. *Am J Trop Med Hyg.* 53(5):469-77.
- de Merida A.M., Palmieri M., Yurrita M., Molina A., Molina E., Black WC 4th. (1999). Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. *Am J Trop Med Hyg.* 61(2):230-9.
- Deardorff E., Estrada-Franco J., Brault A.C., Navarro-López R., Campomanes-Cortes A., Paz-Ramírez P., et al. (2006). Introductions of West virus strains to Mexico. *Emerg Infect Dis.* 12(2):314-318.
- Dobrotworsky N. V. (1967). Hybridization in the *Culex pipiens* complex. *Bull World Health Organ.* 37(2):267-70.
- Elizondo-Quiroga D., Davis C.T., Fernandez-Salas I., Escobar-Lopez R., Velasco Olmos D., Soto Gastalum L.C., et al. (2005). West Nile Virus isolation in human and mosquitoes, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 11(9):1449-1452.

Estadísticas de población en México. Disponible en:

<http://72.52.156.225/Estudio.aspx?Estudio=estadisticas-poblacion-mexico>

Estrada-Franco J.G., Navarro-Lopez R., Beasley D.W., Coffey L., Carrara A.S. Travassos da Rosa A., Clements T., Wang E., Ludwig G.V., Cortes A.C., et al. (2003). West Nile virus in Mexico: Evidence of widespread circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis.* 9:1604-1607.

Farfan-Ale, J.A., Blitvich, B.J., Marlenee, N.L., Lorono-Piño, M.A., Marlenee, N.L., Rosado-Paredes, E.P., García-Rejón, J.E., Flores-Flores L.F., Chulim-Perera, L., López Uribe, M., Pérez-Mendoza G., Sánchez-Herrera I., Santamaría W., Moo-Huchim, J., Gubler, D.J., Cropp, B.C., Calister, C.H., Beaty, B.J. (2004). Longitudinal studies of West Nile Virus Infection in avians, Yucatan State, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Diseases.* 4(1): 3-14.

Flores F.S., Diaz L.A., Batallán G.P., Almirón W.R., Contigiani M.S. (2010). Vertical Transmission of St. Louis Encephalitis Virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cordoba, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10 (10): 1999-1002.

Fonseca M.D., Keyghobadi N., Malcolm C.A., Mehmet C., Schaffner F., Mogi M., Fleischer F.C., Wilkerson R.C. (2004). Emerging Vectors in the *Culex pipiens* Complex. *Science.* 303: 1535.

Forattini O. P. *Entomología Médica.* São Paulo: EDUSP; 1965.

Forattini O. P. (2002). *Culicidología Médica.* v 2. EDUSP: São Paulo, 860pp.

García-Franco F., Muñoz M. de L., Lozano-Fuentes S., Fernández-Salas I., García-Rejón J., Beaty B., Black W.C., 4<sup>th</sup>. (2002). Large genetic distances among *Aedes aegypti* populations along the South Pacific coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 66:594-598.

Gay L., Crochet P.A., Bell D.A., Lenormand T. (2008). Comparing clines on molecular and phenotypic traits in hybrid zones: a window on tension zone models. *Evolution* 62: 2789-2806.

Gibert P., Capy P., Imasheva A., Moreteau B., Morin J.P., P'etavy G., & David J.R. (2004). Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability, clines and phenotypic plasticity. *Genetica.* 120: 165-79.

Gorrochotegui-Escalante N., Muñoz M.L., Fernández-Salas I., Beaty B.J., Black IV W.C. (2000). Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 62: 200-209.

Gorrochotegui-Escalante N., Gomez-Machorro C., Lozano-Fuentes S., Fernández-Salas I., Muñoz M.L., Farfan-Ale J.Á., García-Rejón J., Beaty B.J., Black IV W.C. (2002). Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am J Trop Med Hyg.* 66: 213–22.

Gray M.W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Bio.* 5:25-50.

Griffiths A.J., Wessler S.R., Lewontin R.C., Carroll S.B. (2008). Introduction to Genetic Analysis. 9 ed. New York: Freeman and Company.

Guillemaud T., Pasteur N., Rousset F. (1997). Contrasting levels of variability between cytoplasmic genomes and incompatibility types in the mosquito *Culex pipiens*. Proc R Soc Lond. 264: 245-251.

Hannoun C., Corniou B., Mouchet J. (1972). Role of migrating birds in arbovirus transfer between Africa and Europe. In Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses. Edited by Cherepanov Al. Novosibirsk, Russia: Nauka. 167-172

Hansen T.F., Houle D. (2008). Measuring and comparing evolvability and constraint in multivariate characters. J Evol Bio 21: 1201-1219.

Hasan A.U., Suguri S., Ahmed S.M., Fujimoto C., Harada M., Rahman S.M., Zaman R.U., Kakehi Y. (2009). Molecular phylogeography of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in central Bangladesh. Acta Trop. 112:106-14.

Hayashi K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods Appl. 1, p. 34-38.

Hayes E.B., Komar N., Nasci R.S., Montgomery S.P., O'Leary D.R., Campbell G.L. (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. Emerg Infect Dis. 11:1167-1173.

Hillis D.M., Dixon M.T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. Quart Rev Biol. 66: 411-53.

Hoy M.A. (2003). Insect Molecular Genetics. An introduction to principles and applications. 2 ed. London: Academic Press.

Huang S., Molaei G., Andreadis T. G. (2008). Genetic insights into the population structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Northeastern United States by using microsatellite analysis. Am J Trop Med Hyg. 79:518-527.

Humeres S.G., Almirón W.R., Sabattini M.S., Gardenal C.N. (1998). Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz 93: 57-62.

Jakob W.L., Taylor S.A., Francy D.B. (1980). Additional studies of male progeny of overwintering *Culex pipiens* complex mosquitoes from Memphis, Tennessee. Mosq Systemat. 12:386-391.

Jakob W.L., Francy D.B. (1984). Observations on the DV/D Ratio of male genitalia of *Culex pipiens* complex mosquitoes in the United States. Mosq Syst. 16: 282-288.

James A.C., Azevedo R.B., Partridge L. (1997). Genetic and environmental responses to temperature of *Drosophila melanogaster* from a latitudinal cline. Genetics 146: 881-890.

James A.C., Partridge L. (1998). Geographic variation in competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 151: 530-537.

Jupp P.G. (1978). *Culex (Culex) pipiens pipiens* Linnaeus and *Culex (Culex) pipiens quinquefasciatus* Say in South Africa: morphological and reproductive evidence in favor of their status as two species. *Mosq Sys.* 10:461-73.

Kamura T. (1958). Studies on the *Culex pipiens* group of Japan. On the seasonal changes of morphological characters in *Isahaya pallens*. *Nagasaki Igakkai Zasshi* 33 (Suppl.): 78-85.

Karesh W.B., Cook R.A., Bennett E.L., Newcomb J. (2005). Wildlife trade and global disease emergence. *Emerg Infect Dis.* 11: 1000-2.

Kothera L., Zimmerman E.M., Richards C.M., Savage H.M. (2009). Microsatellite characterization of subspecies and their hybrids in *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) mosquitoes along a north-south transect in central United States. *J Med Entomol* 46: 236-248.

Kottek M., Grieser J., Beck C., Rudolf B., Rubel F. (2006). World Map of the Koppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z.* 15:259-264.

Kulasekera V.L., Kramer L., Nasci R.S., Mostashari F., Cherry B., Trock S.C., Glaser C., Miller J.R. (2001). West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000. *Emerg Infect Dis.* 7:722-725.

Kwan J.L., Klugh S., Madon M.B., Reisen W.K. (2010). West Nile virus emergence and persistence in Los Angeles, California, 2003-2008. *Am J Trop Med Hyg* 83: 400-12.

Labarthe N., Serrão M.L., Melo Y.F., de Oliveira S.J., Lourenço-de-Oliveira R. (1998). Mosquito frequency and feeding habits in an enzootic canine dirofilariasis area in Niterói, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93: 145-54.

Labbé P., Berthomieu A., Berticat C., Alout H., Raymond M., Lenormand T., Weill M. (2007a). Independent Duplications of the Acetylcholinesterase Gene Conferring Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol.* 24:1056-67.

Labbé P., Berticat C., Berthomieu A., Unal S., Bernard C., Weill M., Lenormand T. (2007b). Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the mosquito *Culex pipiens*. *PLoS Genet.* 3: 205.

Leather S.R., Walters K.F.A., Bale J.S. (1995). The ecology of insect overwintering. Cambridge: University Press.

Lederberg J., Shope R.E., Oakes S.C.J. (1992). Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States. Institute of Medicine, National Academy Press. Washington DC, USA.

- Lehninger A. L., Nelson D. L. & Cox M. M. (1993). Recombinant DNA technology. En: Principles of biochemistry: with an extended discussion of oxygen-binding proteins. (pp. 984-1013). New York: Worth Publishers.
- Lenormand T., Raymond M. (2000). Analysis of Clines with Variable Selection and Variable Migration. *Am Nat.* 155: 70-82.
- Levinson G., Gutman G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol.* 4: 203-21.
- Linam J.H., Nielsen L.T. (1962). Notes on the taxonomic separation of adult females of *Culex pipiens* L. and *Culex quinquefasciatus* Say. *Mosq News.* 22: 390-393.
- Lorono-Pino M.A., Blitvich B.J., Farfan-Ale J.A., Puerto F.I., Blanco J.M., Marlenee N.L., et. al. (2003). Serologic evidence of West Nile virus infection in horses, Yucatan State, Mexico. *Emerg Infect Dis.* 9(7):857-859.
- Malcolm C.A., Bourguet D., Ascolillo A., Rooker S.J., Garvey C.F., Hall L.M.C., Pasteur N., Raymond M. (1998). A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. *Insect Mol Biol.* 7: 107-120.
- Malkinson M., Banet C. (2002). The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa. *Curr Top Microbiol Immunol.* 267:309-322.
- Martínez P. A. (1952). Nota sobre la distribución de los mosquitos *Culex* en México (Diptera: culicidae). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural.* Tomo XIII. Núms. 1-4.
- Martini E. (1935). Los Mosquitos de México. *Boletines Técnicos.* Departamento de Salubridad Pública. Serie A. Entomología y Parasitología. No. 1. 66 pp.
- McAbee R.D., Green E.N., Holeman J., Christiansen J., Frye N., Dealey K., Mulligan III F.S., Braut A.C., Cornel A.J. (2008). Identification of *Culex pipiens* complex mosquitoes in a hybrid zone of West Nile virus transmission in Fresno country, California. *Am J Trop Med Hyg* 78: 303-310.
- McLean R.G., Ubico S.R., Docherty D.E., Hansen W.R., Sileo L., McNamara T.S. (2001). West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann NY Acad Sci.* 951: 54-57.
- Morais S.A., Marrelli M.T., Natal D. (2006). Aspectos da distribuição de *Culex* (*Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) na região do rio Pinheiros, na cidade de São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Entomol.* 50: 413-18.
- Morais S. A., Marrelli M.T, Natal D. (2007). Observações sobre aplicações de controle em ecótopo com alta infestação de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae). *Rev Bras Entomol.* 51: 246-51.

- Morais S.A , Moratore C , Suesdek L , Marrelli M T. (2010). Genetic-morphometric variation in *Culex quinquefasciatus* from Brazil and La Plata, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105: 672-676.
- Mori A., Romero-Severson J., Severson D.W. (2007). Genetic basis for reproductive diapause is correlated with life history traits within the *Culex pipiens* Complex. *Insect Molecular Biology*. 16: 515–524.
- Morin J.P., Moreteau B., Pétavy G., Parkash R., David J.R. (1999). Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *J Evol Biol* 12: 329-339.
- Murgue B., Murri S., Zientara S., Durand B., Durand J.P., Zeller H. (2001). West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis*. 7:692-696.
- Murgue B., Zeller H., Deubel V. (2002). The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia. *Curr Top Microbiol Immunol*. 267:195-221.
- Nash, D., Mostashari, F., Fine, A., Miller, J., O’Leary, D., Murray, K., Huang, A., Rosenberg, A., Greenberg, A., Sherman, M., Wong, S., Leyton, M. (2001). The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *New England Journal of Medicine*. 344(24):1858-59.
- Natal D., Marucci D. (1984). Aparelho de sucção tipo aspirador para captura de mosquitos. *Rev Saúde Publica*. 18: 418-20.
- Natal D., Paganelli C.H., Santos J.L.F. (1991). Composição da população adulta de *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say, 1823 em ecótopos próximos à represa Edgard de Souza, no município de Santana de Parnaíba, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Entomol*. 35: 539-543.
- Nielsen L. T. and Ress D. M. (1961). An identification guide to the mosquitoes of Utah. Vol. XII. No. 3. University of Utah biological series.
- Petersen, L.R., Marfin, A.A. (2002). West Nile Virus: A Primer for the Clinician. *Annals of Internal Medicine* 137(3):173-79.
- Polanco C., Gonzalez A. I., de la Fuente A., Dover G.A. (1998). Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions. A possible mechanism to resolve this paradox. *Genetics*. 149: 243-56.
- Raju K., Jambulingam P., Sabesan S., Vanamail P. (2010). Lymphatic filariasis in India: epidemiology and control measures. *J Postgrad Med*. 56:232-238.
- Ramos, C., Falcon-Lezama, J.A. (2005). La fiebre del Nilo Occidental: Una enfermedad emergente en México. *Salud Pública de México*. 46(5): 488-490.
- Rappole, J.H., Derrickson, S.R., Hubalek Z. (2000). Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infectious Diseases*. 6(4):319-28.

- Rasgon J.L., Scott T.W. (2003). Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in the California *Culex pipiens* mosquito species complex: parameter estimates and infection dynamics in natural populations. *Genetics* 165: 2029-2038.
- Rasgon J.L., Cornel A.J., Scott T.W. (2006). Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proc R Soc B* 273: 1603-1611.
- Raymond M., Callaghan A., Fort P., Pasteur N. (1991). Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature*. 350: 151-53.
- Regis L., Silva-Filha M.H.N.L., Oliveira C.M.F., Rios E.M., Silva S.B., Furtado A.F. (1995). Integrated control measures against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in Recife. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 115-119.
- Reisen W.K., Thiemann T., Barker C.M., Lu H., Carroll B., Fang Y., Lothrop H.D. (2010). Effects of warm winter temperature on the abundance and gonotrophic activity of *Culex* (Diptera: Culicidae) in California. *J Med Entomol.* 47:230-237.
- Richards S.L., Lord C.C., Pesko K., Tabachnick W.J. (2009). Environmental and Biological Factors Influencing *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) Vector competence for Saint Louis Encephalitis Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 81(2):264–272.
- Ridley M. (2006). *Evolução*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Rios-Ibarra C., Blitvich B., Farfan-Ale J., Ramos-Jimenez J., Muro-Escobedo S., Martínez-Rodríguez H., OrtizLópez R., Torres-López E., Rivas-Estilla A. (2010). Fatal human case of West Nile disease, Mexico, 2009. *Emerg Infect Dis.* 16:741-742.
- Rodríguez M.L., Rodríguez D.R., Blitvich B.J., López M.A., Fernández-Salas I., Jimenez J.R., Farfán-Ale J.A., Tamez R.C., Longoria C.M., Aguilar M.I., Rivas-Estilla A.M. (2010). Serologic surveillance for West Nile virus and other flaviviruses in febrile patients, encephalitic patients, and asymptomatic blood donors in northern Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10:151-157.
- Roehrig, J. T., Layton, M., Smith, P., Campbell, G. L., Nasci, R., and Lanciotti, R. S. (2002). The emergence of West Nile virus in North America: ecology, epidemiology, and surveillance. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267:223–240.
- Russell R.C. (1987). Survival of insects in the wheel bays of a Boeing 747B aircraft on flights between tropical and temperate airports. *Bull World Health Organ.* 65:659-662.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12): 5463.
- Sanogo YO, Dobson SL, Bordenstein SR, Novak RJ 2007. Disruption of the Wolbachia surface protein gene *wspB* by a transposable element in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera, Culicidae). *Insect Mol Biol* 16: 143.154.

Sanogo Y.O., Kim C., Lampman R., Halvorsen J.G., Gad A.M., Novak R.J. (2008). Identification of Male Specimens of the *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) in the Hybrid Zone Using Morphology and Molecular Techniques. *J Med Entomol.* 45: 203-209.

Savage H.M., Anderson M., Gordon E., Mcmillen L., Colton L., Delorey M., Sutherland G., Aspen S., Charnetzky D., Burkhalter K., Godsey M. (2008). Host-Seeking Heights, Host-Seeking Activity Patterns, and West Nile Virus Infection Rates for Members *Culex pipiens* Complex at Different Habitat Types Within the Hybrid Zone, Shelby County, TN, 2002 (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 45: 276-288.

Scott M., A. G. Aguilar, et. al. (1996). Human settlements in a Changing climate: Impacts and adaptation. En Watson R. T. et al, (eds.), *Climate change 1995: Impacts, adaptation and mitigation of climate change: Scientific-technical analyses*, Cambridge University Press, Cambridge, EUA, pp. 399-426.

Sejvar, J.J., Haddad M.B., Tierney B.C., Campbell, G.L., Marfin A.A., Van Gerpen, J.A., Fleischauer A., Leis A.A., Stokic, D.S., Petersen, L.R. (2003). Neurological Manifestations and Outcome of West Nile Virus Infection. *Journal of American Medical Association* 290(4): 511-15.

Service M.W. (1968). The taxonomy and biology of two sympatric sibling species of *Culex*, *C. pipiens* and *C. torrentium* (Diptera, Culicidae). *J Zool Soc Lond.* 156: 313– 323.

Severini C., Silvestrini F., Mancini P., La Rosa G., Marinucci M. (1996). Sequence and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Insect Mol Biol.* 5: 181–186.

Simón F., Muro A., Cordero M., Martín J. (1991). A seroepidemiologic survey of human dirofilariasis in Western Spain. *Trop Med Parasitol.* 42(2):106-8.

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. and Flook P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, pp. 651–701.

Situación demográfica de la Ciudad de México. Disponible en:

[http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=269&Itemid=344](http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=269&Itemid=344)

Smith J.L., Fonseca D.M. (2004). Rapid assays for identification of members of the *Culex (culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg.* 70: 339–345.

Smithburn, K.C., Hughes, T.P., Burke, A.W., Paul, J.H. (1940). A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene.* 20:471-92

Sundararaman S. (1949). Biometrical studies on intergradation in the genitalia of certain populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* in the United States. *Am J Hyg.* 50: 307-314.

- Swindell W.R., Bouzat J.L. (2006). Associations between environmental stress, selection history and quantitative genetic variation in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 127: 311-320.
- Tabachnick W. J., Powell J.R. (1983). Genetic analysis of *Culex pipiens* populations in the Central Valley of California. *Ann Entomol Soc Am.* 76:715-720.
- Taibe-Lagos C.B., Natal D. (2003). Abundância de culicídeos em área metropolitana preservada e suas implicações epidemiológicas. *Rev Saúde Pública.* 37: 275-279.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.
- Tamura K, Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10(3):512-526.
- Taylor L.H., Latham S.M., Woolhouse M.E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 356: 983-9.
- Theis, J.H. (2005). Public health aspects of dirofilariasis in the United States, *Vet. Parasitol.* 133 pp. 157–180.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nu Acids Resear.* 22:4673-4680.
- Turell M.J., Sardelis M.R., Dohm D.J., O'Guinn M.L. (2001). Potential North American vectors of West Nile virus. *Ann NY Acad Sci.* 951: 317-24.
- Turelli, M., and A. A. Hoffmann. (1999). Microbe-induced cytoplasmic incompatibility as a mechanism for introducing transgenes into arthropod populations. *Insect Molecular Biology* 8: 243-255.
- Ulloa A., Langevin S.A., Mendez-Sanchez J.D., Arredondo-Jimenez J.I., Raetz J.L., Powers A.M., Villarreal-Trevino C., Gubler D.J., Komar N. (2003). Serologic survey of domestic animals for zoonotic arbovirus infections in the Lacandon Forest region of Chiapas, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 3(1):3-9.
- Upholt W.B, Dawid I.B. (1977). Mapping of mtDNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region. *Cell.* 11: 571-583.
- Urbanelli S., Silvestrini F., Sabatinelli G., Raveloarifera F., Petrarca V., Bullini L. (1995). Characterization of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in Madagascar. *J Med Entomol.* 32:778-786.

- Urbanelli S., Silvestrini F., Reisen W.K., De Vito E., Bullini L. (1997). Californian hybrid zone between *Culex pipiens pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* revisited (Diptera:Culicidae). *J Med Entomol.* 34: 116–27.
- Van'T Land J., Van Putten P., Zwaan B., Kamping A., Van Delden W. (1999). Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: heritabilities and reaction norms. *J Evol Bio* 12: 222-223.
- Vargas L. (1956). Especies y distribución de mosquitos mexicanos no anofelinos. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales.* 16(1):19-36.
- Vezzani D., Eiras D.F., Wisnivesky C. (2006). *Dirofilariasis* in Argentina: historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Vet Parasitol.* 136:259-273.
- Vezzani D. (2007). Artificial container-breeding mosquitoes and cemeteries: A perfect match. *Trop Med Int Health.* 12:299-313.
- Vezzani D., Mesplet M., Eiras D.F., Fontanarrosa M.F., Schnittger L. (2010). PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. *Parasitol Res.* 108(4):985-9.
- Vinogradova E.B., Reznik Sla. (1994). The siphonal index of *Culex pipiens* mosquito larvae (Diptera: Culicidae) from Russia and adjacent countries: its variability and use for the diagnosis of forms. *Parazitologiya.* 28(4):309-17.
- Vinogradova E. B. (2000). *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Sofia-Moscow: Pensoft, 250 pp.
- Vinogradova E.B. (2003). Ecophysiological and morphological variations in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex (Diptera, Culicidae). *Acta Soc. Zool. Bohem* 67(1): 41-50.
- Watson J. D., Myers R. M., Caudy A. A., Witkowski J. A. (2009). *DNA Recombinante: genes e genomas.* 3 ed. Porto Alegre: Artmed.
- Wei Y.H., Lu C.Y., Lee H.C., Pang C.Y., Ma Y.S. (1998). Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci.* 854:155-70
- Wesson D. M., Porter C. H., Collins F. H. (1992). Sequence and Secondary Structure Comparisons of ITS rDNA in Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol.* 1: 253-269.

Woolhouse M.E.J., and Gowtage-Sequeria S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis.* [publicación periódica en línea]. 11: 1842-7.

Zinser M., Ramberg F., Willott E. (2004). *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: Blood meal analysis indicates feeding on both humans and birds. *J Insect Sci.* 4:20.

ANEXO

Publicaciones generadas a partir del estudio



**SIMPOSIO MEXICANO  
DE ESPECTROMETRIA DE MASAS  
PROTEOMICA CELULAR Y MOLECULAR**

19-22 de Octubre del 2005  
Hacienda de Cocoyoc  
Cuernavaca, Mor.-México

*Organizadores*

CCG-UNAM CTAD IQ-UNAM CISE-NSP IBT-UNAM SINVESTAB

**SOCIEDAD MEXICANA DE PROTEOMICA**

## P2. DISTRIBUCIÓN DE MOSQUITOS DEL COMPLEJO CULEX (CULEX) PIIPIENS EN LA CIUDAD DE MÉXICO.

Alvaro Diaz-Badillo<sup>1,2</sup>, Minerva Camacho-Nuez<sup>2</sup>, Jorge Pascual Martínez-Munoz<sup>3</sup>, Barry Beaty<sup>4</sup>, William Black<sup>4</sup>, María de Lourdes Muñoz<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México D. F., <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D. F., <sup>3</sup>Laboratorio Estatal de Salud Pública de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, Mexico, <sup>4</sup>Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO, United States.

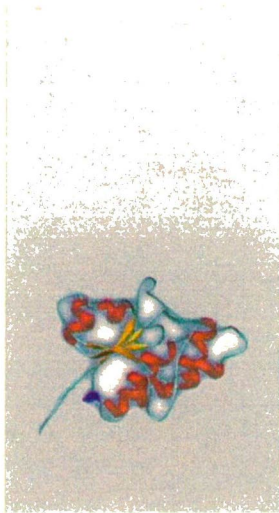
Palabras Clave: *Culex pipiens* Complex, Virus del West Nile, Genómica y Proteómica de Poblaciones.

La Encefalitis del Nilo, (West Nile), es una enfermedad emergente en las regiones templadas de Europa y, recientemente, en Norteamérica. La manifestación más grave es la encefalitis, que afecta tanto a humanos como a caballos y provoca la muerte de algunas aves silvestres y domésticas. Es una enfermedad viral producida por un flavivirus del grupo de las encefalitis víricas transmitidas por artrópodos. Se distribuye ampliamente en África, Oriente Medio, Europa, Asia Occidental y Central, Australia y, actualmente, en América del Norte. La enfermedad se transmite mediante la picadura de un mosquito infectado con el virus, el que a su vez se infecta al picar un ave infectada. El virus queda alojado en las glándulas salivales del mosquito, inoculándolo al picar para alimentarse con sangre. Hasta 1999, las aves circulaban sin una enfermedad aparente, siendo humanos y caballos hospederos terminales. La enfermedad no se transmite persona a persona. El virus necesita de vectores artrópodos, y los más frecuentes son el *Culex pipiens complex* en Israel, Sud Africa, India, Europa y ahora América del Norte y *Culex perexiguus/univittatus*, en Egipto, Israel y Sud Africa. Sin embargo, se ha aislado a este virus en más de 40 especies: *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, entre otros y también en garrapatas. El *Culex pipiens* es un mosquito que vive cerca de las casas, presente en casi todas las áreas urbanas. Las hembras ponen sus huevecillos sobre agua con mucha materia orgánica (charcos, recipientes artificiales, plantas de tratamiento de aguas negras, etc.). Se alimentan preferentemente de sangre de aves, pero pueden picar a humanos y otros mamíferos. En la Ciudad de México, los mosquitos que prevalecen son los *Culex sp*, conocidos como "moscos o zancudos" y que corresponden a *Culex pipiens (quinquefasciatus)* mayoritariamente. Su área de distribución no es muy variable y a la fecha no han tenido un rol en la transmisión de enfermedades en animales o humanos. Esta nueva enfermedad es una preocupación en la actualidad para los países de América del Sur y el Caribe debido a la existencia de aves migratorias, existencia generalizada de *Culex* y un alto número de población susceptible. Actualmente se ha reportado la presencia del virus en el norte de México (Monterrey) así como en el sur (Yucatán). Ello, debe alertarnos a investigar con mayor entusiasmo las encefalitis en el país y comunicar los casos dudosos para aclarar su etiología.

El objetivo de este estudio es determinar la distribución de los miembros de este complejo de mosquitos a través de técnicas morfológicas y moleculares, usando marcadores genéticos; determinando la estructura genética poblacional con marcadores RAPD y mitocondriales, y relacionando dicha estructura con estudios de capacidad y competencia vectorial.



1st MS/MS



## El Comité Organizador del 1<sup>st</sup> MS/MS y la Sociedad Mexicana de Proteómica A. C.

Otorgan la Presente

### CONSTANCIA

a:

*Alvaro Díaz*

Por su participación en el Primer Simposio Mexicano de Espectrometría de Masas, Proteómica Celular y Molecular que se llevó a cabo del 19-22 de Octubre de 2005.

Cocoyoc, Morelos a 22 de Octubre de 2005

Dr. Cesar V. Ferreira Batista  
Presidente  
Sociedad Mexicana de Proteómica

Q.F.B. Alicia Chagolla  
Representante del Comité organizador



Biomedicina in the Post-genomic Era  
Instituto Nacional de enfermedades Respiratorias  
December 1<sup>st</sup>-December 3<sup>rd</sup>, 2005

**"CULEX PIPENS COMPLEX SPECIES (DIPTERA: CULICIDAE): MOLECULAR AND MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION AND PHYLOGENOMIC RELATIONSHIPS IN MEXICO CITY."**

**Díaz-Badillo A. (1,2), Martínez-Muñoz J. P. (3), Beatty B. J. (4), Black IV W. C. (4) and Muñoz M. L. (1).**

(1) Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México., [alvaro@cinvestav.mx](mailto:alvaro@cinvestav.mx), (2) Genomic Sciences Program, Universidad Autónoma de la Ciudad de México., (3) Laboratorio Estatal de Salud Pública de Oaxaca. SS., (4) Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO-USA.

Abstract

West Nile virus (WNV) was initially isolated in America from species of *Culex* mosquitoes and birds in New York City in 1999. Subsequently, the virus spread in the United States and many human cases were reported. Members of the *Culex pipiens* complex are the principal vectors of St. Louis encephalitis (SLE) virus in the central and eastern United States with the exception of Florida, and in urban areas elsewhere in the U.S.A. *Cx. quinquefasciatus* and *Cx. pipiens* are also vectors of other encephalitis diseases such as dog heartworm cause by *Dirofilaria immitis*, periodic lymphatic filariasis (*Wuchereria bancrofti*), avian malaria and other encephalitides across the world. Members of the complex may also be important pest mosquitoes, particularly in urban areas in association with feed lots and farms. The *Culex pipiens* complex in North America is represented by four members. *Culex pipiens*, the northern house mosquito, is encountered in areas above 39° N latitude. At latitudes of less than 36° N, *Cx. quinquefasciatus*, the southern house mosquito is found. Between 36° and 39° N latitudes, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, and hybrids are encountered. The distribution of the fourth member, *Cx. pipiens molestus* and *Forsk.*, remains poorly known. Adults of the *Cx. pipiens* complex are light brown mosquitoes that lack distinctive markings on the proboscis and legs, and are not really separated from other *Culex* (*Culex*) mosquitoes. Adult females of the complex are usually identified by the presence of distinctive, basal, pale abdominal bands. Abdominal bands are broadly rounded medially and distinctly constricted sublaterally before joining large, lateral scale patches. Male adults of *Cx. pipiens* and *Cx. quinquefasciatus*, and with less precision *Cx. pipiens-quinquefasciatus* hybrids, can be identified by use of the DV/D ratio of the genitalia. Larvae of the *Cx. pipiens* complex can be identified by: the presence of a moderately long siphon that has 6-13 pecten teeth located on the first third of the basal region and 4-branched siphonal tufts. One of them is inserted laterally and out-of-alignment with the other three; and double-branched lateral setae on abdominal segments III-IV. The shape of the siphon and number of branches on setae I on abdominal segments 3-4 can be used to characterize *Cx. pipiens* and *Cx. quinquefasciatus*. However, there is not a reliable method for specific larval identification in areas where hybrids may occur. Recent molecular studies have lead to the development of specific polymerase chain reaction (PCR) primers that can be used in a PCR "cocktail" to identify *Cx. salinarius*, *Cx. restuans*, and the *Cx. pipiens* complex. Furthermore, variation between *Cx. pipiens* and *Cx. quinquefasciatus* was insufficient to develop diagnostic primers for these taxa. Recently *Culex* complex mosquitoes are considered to be the most important vectors, although WNV has been isolated or detected from approximately 20 species of mosquitoes in the United States. WNV was initially detected in equines and birds in Monterrey, Tamaulipas, Coahuila and Yucatan. Because the importances of this vector the aim of the present research was to investigate the *Culex* species distribution in Mexico City and some states as Mexico, Tlaxcala, Jalisco, Oaxaca, Saltillo, Nayarit and Morelos to know the potential to spread WNV in Mexico. A total of 32 sites were sampled during 2004-2005 for mosquito larva stage. The major aim of this study is to determine the members in the *Cx. pipiens* complex (*Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*) in Mexico City to know the potential of West Nile transmission. We are studying the members of this complex by morphology and molecular techniques. Furthermore, we are determining the genetic population structure of these mosquitoes by RAPD and mitochondrial markers. Our morphological studies showed *Cx. quinquefasciatus* in Mexico City. Detection of *Cx. pipiens* is in processes and the morphological studies will be supported by molecular techniques. *Culex quinquefasciatus* was the dominant larva collected during the year.

Key words: West Nile viruses, *Culex pipiens* complex, Phylogenomics analysis

© 2005 by The European Molecular Biology Organization

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico





# LA SOCIEDAD MEXICANA DE MEDICINA TROPICAL

Otorga la presente

## CONSTANCIA

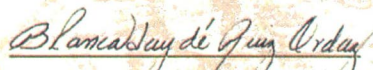
Por Su Participación en Trabajos Orales:

ANALISIS MORFOLOGICO Y MOLECULAR DE LA DISTRIBUCIÓN DE MOSQUITOS  
DEL COMPLEJO CULEX (CULEX) PIFIENS EN LA CIUDAD DE MÉXICO.

A. Diaz-Badillo<sup>12</sup>, M. Camacho-Nuez<sup>2</sup>, J. P. Martínez-Munoz<sup>3</sup>, B. Beaty<sup>4</sup>, W. Black<sup>4</sup>, M. de  
L. Muñoz<sup>1</sup>.

A:

“3er. Congreso Nacional de la  
Sociedad Mexicana de Medicina Tropical.”  
7 al 10 de Diciembre de 2005 en Acapulco, Guerrero.

  
Dra. Blanca H. Ruiz Ordaz  
PRESIDENTA

  
Dr. José Luis Sánchez Salas  
VICE-PRESIDENTE

  
Dr. José Arturo Farfán Alé  
SECRETARIO GENERAL

  
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez  
SECRETARIA TESORERA



THE AMERICAN JOURNAL OF  
**Tropical Medicine  
and Hygiene**

*Official Journal of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*

Volume 73

December 2005

Number 6

**Abstract Book**  
**American Society of Tropical Medicine and Hygiene**  
**54th Annual Meeting**

ASTMH  
Annual Meeting **54<sup>th</sup>**

December 11–15, 2005

Hilton Washington Hotel and Towers

washington, DC, USA

*Supplement to*

**The American Journal of  
Tropical Medicine and Hygiene**

between population genetic variation and observed geographic variation in WNV transmission. Inter-simple sequence repeat (ISSR) screening, in which regions between microsatellites are amplified, indicated that microsatellite motifs (AG)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> and (CAG)<sub>n</sub> are common in the *Cx. tarsalis* genome. Genomic libraries enriched for these repeats were generated. An additional library was enriched for the repeat (ATG)<sub>n</sub>, which was not investigated by ISSR. ISSR-guided libraries were highly enriched for microsatellites, with library-specific enrichment rates ranging from 81-96%. Library ATG was not as highly enriched (41%). Out of 98 total sequenced clones, 79 contained microsatellites of which 77 were unique. PCR primers were designed for 55 loci. Initial efforts have identified 11 loci that amplify reliably and are polymorphic. A preliminary screen of wild individuals from Coachella Valley, California has revealed high levels of genetic variation, with 3 to 9 alleles per locus and heterozygosity ranging between 0.18 and 1.0. The application of these microsatellite markers to the genetic structure of *Cx. tarsalis* will be discussed.

(ACMCIIP Abstract)

436

#### MALARIA TRANSMISSION AND OCCUPATIONAL RISK FACTORS IN RURAL SOUTH WESTERN VIETNAM

Thuy Q. Truong

Hospital For Tropical Diseases, Ho Chi Minh City, Viet Nam

As in much of South East Asia, malaria incidence in Vietnam has dropped dramatically in the past 10 years due to rigorous control programs, namely the distribution and retreatment of impregnated bed nets, indoor spraying, improved early diagnosis and treatment at the commune level. However, in small pockets of the country there continues to be a significant burden of malaria. In 2001 to 2003 in the rural commune of Dak O in Binh Phuoc province, South West Vietnam, there were between 150 to 200 cases of slide positive malaria presenting at the commune health station each month. At the same time there was no evidence of malaria transmission from infected mosquitoes in the villages. We conducted intensive entomological studies in three habitats: hamlets, fields and forests, to investigate the dynamics of malaria transmission in this commune. In parallel, we carried out knowledge, attitude and practise questionnaires (KAP) with all health station attendees (6350 people), to identify ethnic and behavioural malaria risk factors. The entomological studies revealed *Anopheles dirus* and *Anopheles minimus* as the primary vectors of malaria. Using RFLP-PCR and multiplex PCR we identified *An. minimus* species A and *An. dirus* species A. *An. minimus*, which is found mainly in the hamlets and has traditionally been implicated as the main vector, had relatively low infection rates. *An. dirus* had significantly higher infection rates and was caught in high densities in the forests and fields. The annual entomological inoculation rates (EIR) in the hamlets, fields and forests are 4.3, 17.3 and 51.3 infective bites per year respectively. The KAP studies highlighted that the main burden of malaria is in young men between 20-39 years old, and of Kinh majority ethnicity. We identified that the risk of malaria is significantly greater for migrant workers (OR= 2.7, p <0.001), and for people working in the forests (OR = 3.6, p<0.001). We conclude that the burden of malaria transmission has shifted from the hamlets to the forests and *An. dirus* A is the primary vector. We identified a high-risk group of individuals who are not covered by current control strategies and may be responsible for maintaining malaria transmission in this area.

(ACMCIIP Abstract)

437

#### ESTABLISHMENT OF ROBUST SALIVARY GLAND-SPECIFIC TRANSGENE EXPRESSION SYSTEM IN ANOPHELINE MOSQUITOES

Shigeto Yoshida, Hiroyuki Watanabe

Jichi Medical School, Minamikawachimachi, Japan

Recent advances in the genetically engineering of *Anopheles* mosquitoes have raised hopes for their use as new strategies for malaria control and provided a powerful tool to investigate parasite-mosquito interactions. The interruption of the parasite cycle in the mosquito using transgenic strategies can occur at the midgut level, interfering with ookinete invasion or oocyst differentiation, and at the salivary gland level, blocking invasion of gland cells or the transmission of infective sporozoites from the salivary glands. So far, only the *carboxypeptidase* and *vitellogenine* promoters have been used for driving transgenes in mosquitoes for the gut- and fat body- specific expression, respectively. Therefore, research on transmission blockade using transgenic mosquitoes has been limited to the midgut stage of the parasites. It has been postulated that establishment of salivary gland-specific transgene expression system would make it possible to elucidate the parasite-salivary glands interaction. However, robust salivary gland-specific expression in any transgenic mosquitoes has not been achieved yet. Here, we generate transgenic *Anopheles stephensi* mosquitoes that specifically express *Dicosoma sp. red* fluorescent protein (DsRed) in their salivary glands. Using advanced 3D confocal microscopy, we show robust expression of DsRed in the distal-lateral lobes of the salivary glands, where the sporozoites invade preferentially, driven by a newly isolated salivary gland-specific promoter in a living mosquito as well as in dissected salivary glands. Furthermore, by using GFP-expressing sporozoites, we could observe the parasites passing through the salivary glands from the outer surface. These results open up the possibility of elucidating the process and molecules involved in the salivary glands-parasites interactions, and may lead to the development of transmission-blocking strategies by using genetically modified mosquitoes that express anti-parasitic genes in a salivary gland-specific manner.

438

#### DISTRIBUTION OF MOSQUITOES IN THE CULEX (CULEX) PIPENS COMPLEX IN MEXICO CITY, MEXICO

Alvaro Diaz-Badillo<sup>1</sup>, Minerva Camacho-Nuez<sup>2</sup>, Jorge Pascual Martinez-Munoz<sup>3</sup>, Barry Beaty<sup>4</sup>, William Black<sup>4</sup>, Maria de Lourdes Munoz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico D. F., Mexico, <sup>2</sup>Universidad Autonoma de la Ciudad de Mexico, Mexico D. F., Mexico, <sup>3</sup>Laboratorio Estatal de Salud Publica de Oaxaca, Servicios de Salud, Oaxaca de Juarez, Mexico, <sup>4</sup>Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO, United States

The disease vectors in the *Culex pipiens* complex have become very important in transmission of West Nile virus and St. Louis encephalitis in the eastern United States. West Nile has been also detected in the north of Mexico (Monterrey) as well as in the South (Yucatan). In addition, these mosquitoes transmit periodic lymphatic filariasis (*Wuchereria bancrofti*) avian malaria and other encephalitides across the world. Distribution of these mosquitoes is uncertain in Mexico City, consequently the major aim of this study is to determine the members in the *Cx. pipiens* complex (*Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* and híbridos)

www.astmh.org

146

in Mexico City to know the potential of West Nile transmission. We are studying the members of this complex by morphology and molecular techniques. Furthermore, we are determining the genetic population structure of these mosquitoes by RAPD and mitochondrial markers. Our morphological studies showed *Cx. quinquefasciatus* in Mexico City. Detection of *Cx. pipiens* is in process and the morphological studies will be supported by molecular techniques.

439

#### PHYSICAL MAPPING OF THE *ANOPHELES STEPHENSI* GENOME

**Maria V. Sharakhova**, Sarah I. McAllister, Ai Xia, Igor V. Sharakhov

Virginia Tech, Blacksburg, VA, United States

*Anopheles stephensi* is one of about 200 species in subgenus *Cellia* which includes the most important vectors of malaria in the tropics. This species is a convenient choice for experimental genetics. It can be readily bred in a laboratory environment. *An. stephensi* is a perfect model for studying host - malaria parasite interactions. In addition, stable genetic germ-line transformation has been developed only for this *Anopheles* mosquito. Presence of high quality polytene chromosomes in different tissues makes this species a superior model for cytogenetic research. Chromosome rearrangements place an important role in mosquito evolution and adaptations related to malaria transmission. Availability of sequenced *An. gambiae* genome provides an opportunity for comparative genomic studies with other important malaria vectors. However, no physical map exists for *An. stephensi* and only drawn cytogenetic maps were so far available for this species. The goals of our research are to determine types, rates, and chromosomal distribution of genomic rearrangements in subgenus *Cellia*. We have developed a high resolution cytogenetic photomap for *An. stephensi* polytene chromosomes from ovarian nurse cells. Using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) we have mapped about 50 conserved cDNAs of *An. gambiae* and *An. funestus* to the chromosomes of *An. stephensi*. We determined the correspondence between chromosomal arms among *An. stephensi*, *An. gambiae*, and *An. funestus* which supports previous cytogenetic observations about whole chromosomal arm translocations between species.

440

#### MICROSATELLITE AND LIFE HISTORY ANALYSIS OF THE *CULEX PIPPIENS* COMPLEX IN THE EASTERN UNITED STATES

**Joseph H. Vineis**

New York State Department of Health, Slingerlands, NY, United States

In the southeastern United States *Culex quinquefasciatus* is considered to be the main enzootic vector of West Nile virus, biting indiscriminately, both birds and humans. In the northeast, *Culex pipiens* feeds mainly on avian hosts, but will occasionally bite humans. Both species are considered important vectors in maintaining the enzootic cycle and serving as a possible bridge vectors contributing to human infection. Intermediate forms exist between the two species and may serve as more potent bridge vectors, leading to increased severity in human infection. We used eight polymorphic microsatellite loci and measured several life history traits to characterize populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes on the east coast of the United States. Analysis of microsatellite alleles

revealed significant population structure between northern populations but none between the southern populations. Geographic distance limited gene flow between northern populations. Significant heterozygote deficits and associated linkage disequilibrium were revealed in three populations where the two species occur sympatrically indicating inbreeding, a Wahlund effect, or selection. Differentiation between extreme north and south populations was as high as would be expected from different species. Six sites representing the north, south and sympatric zones demonstrated a large degree of variability in life history traits. The north and south were significantly different in all traits examined and the sympatric sites demonstrated similarities to the northern and southern zones for some traits. The significant isolation by distance between the northern populations of *Culex pipiens* may be the result of extreme winter conditions resulting in annual population reduction. In sympatric locations there is evidence of individuals exhibiting mixed ancestry, and three populations demonstrate strong evidence of a Wahlund effect or assortative mating. Southern populations of *Culex quinquefasciatus* demonstrate low differentiation with no boundaries to gene flow. The heterogeneity in population structure may contribute to regional differences in West Nile virus transmission on the East Coast.

441

#### SELECTION AND THE ORIGIN OF INCIPIENT SPECIES WITHIN THE AFRICAN MALARIA MOSQUITO, *ANOPHELES GAMBIAE*

**Aram D. Stump**<sup>1</sup>, Meagan C. Fitzpatrick<sup>1</sup>, Neil F. Lobo<sup>1</sup>, Sekou Traore<sup>2</sup>, N'Fale Sagnon<sup>2</sup>, Carlo Costantini<sup>2</sup>, Frank H. Collins<sup>1</sup>, Nora J. Besansky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Notre Dame, Notre Dame, IN, United States,

<sup>2</sup>Centre National de Recherche et Formation sur le Paludisme, Ouagadougou, Burkina Faso

The M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* are undergoing speciation, despite ongoing gene flow which maintains genetic homogeneity across much of their genomes. We hypothesized that regions that are differentiated between the two forms, such as the centromeric (proximal) end of the X chromosome, had been affected by genetic hitchhiking on positive selection in one or both of the forms. We sequenced introns from 22 genes located on the X chromosome in specimens of both forms, from two locations in West Africa where the forms are sympatric. In both forms, nucleotide diversity was generally high in divisions 1-4 of the X chromosome, lower in division 5, and very low in division 6 near the centromere. Conversely, differentiation between the forms was virtually zero in divisions 1-4 and very high in divisions 5-6. Pairwise comparisons to a close relative, the sibling species *A. arabiensis*, demonstrated uniformly high divergence regardless of position along the X chromosome, suggesting that this pattern cannot be explained solely by heterogeneity in mutation or recombination rate between distal and proximal regions. Instead, the joint pattern observed for M and S strongly suggests the action of divergent natural selection countering gene flow at this end of the X chromosome. Comparison of sites with fixed differences between M and S, to the corresponding sites in the recent common ancestor *A. arabiensis* revealed that derived substitutions had been fixed in both forms, further supporting the hypothesis that both have been under selection. For both forms, these derived substitutions are fixed in the two West African samples, as well as samples of the S form from western and coastal Kenya, suggesting that selection occurred before the forms expanded to their current ranges.

www.astmh.org



**This certifies that:**

**Alvaro Diaz-Badillo, Jorge Pascual Muñoz, Barry Beatty, William Black,  
María de Lourdes Muñoz**

**Presented the paper:**

**Culex mosquito distribution in Mexico**

**At the 72nd Annual AMCA Meeting and 16th Latin  
American Symposium in Detroit, Michigan.**

**February 27 to March 2, 2006**

William Opp  
Presidente

Gary G. Clark, Ph.D.  
Coordinador

Yasmín Rubio-Palis, Ph.D.  
Director Regional para  
América Latina y el Caribe





THE AMERICAN JOURNAL OF  
**Tropical Medicine  
and Hygiene**

*Official Journal of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*

Volume 75

November 2006

Number 5

# Abstract Book

American Society of Tropical Medicine and Hygiene  
55th Annual Meeting



November 12–16, 2006

Atlanta Marriott Marquis

Atlanta, Georgia, USA

*Supplement to*

**The American Journal of  
Tropical Medicine and Hygiene**

### COUNTRYWIDE DISTRIBUTION AND CHROMOSOMAL POLYMORPHISM OF *ANOPHELES GAMBIAE* MOLECULAR FORMS IN BURKINA FASO

Wamdaogo M. Guelbeogo<sup>1</sup>, Ismael H. Bassole<sup>1</sup>, Marco Pombi<sup>2</sup>, Corentin Y. Some<sup>3</sup>, Alessandra della Torre<sup>2</sup>, Frédéric Simard<sup>4</sup>, Nora J. Besansky<sup>5</sup>, Didier Fontenille<sup>6</sup>, N'Fale Sagnoni<sup>1</sup>, Carlo Costantini<sup>7</sup>  
<sup>1</sup>Centre National de Recherche et Formation sur le Paludisme, Ouagadougou, Burkina Faso, <sup>2</sup>Parasitology Unit, Department Public Health, University Rome «La Sapienza», Rome, Italy, <sup>3</sup>Ecole Inter-Etats d'Ingénieurs de l'Équipement Rural, EIER-ET-SHER, Ouagadougou, Burkina Faso, <sup>4</sup>Institut de Recherche pour le Développement - UR016, and Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, Yaounde, Cameroon, <sup>5</sup>Department Biological Sciences, University Notre Dame, Notre Dame, IN, United States, <sup>6</sup>Institut de Recherche pour le Développement - UR016, Montpellier, France, <sup>7</sup>Institut de Recherche pour le Développement - UR016, and Institut de Recherche en Sciences de la Santé, Bobo Dioulasso, Burkina Faso

A countrywide survey of *Anopheles gambiae* s.l. taxa was carried out in Burkina Faso during the peak of the rainy season. Samples of 20 half-gravid females were collected from each of 300 georeferenced villages, chosen according to a stratified random sampling protocol across an area spanning 9°45'N-14°40'N and 5°30'W-1°45'E. Individual mosquitoes (n=4,362) were scored both for their karyotype and rDNA pattern defining the chromosomal / species / molecular form status. Overall, the molecular form S of *An. gambiae* s.s. was the most abundant (48%), followed by the M-form (29%), and *An. arabiensis* (23%). The distribution of the two molecular forms followed a clear geographic pattern: the M-form dominated in the northern arid areas; the S-form was most abundant in the more humid southern regions. This transition was rather abrupt at c. 12°30'N latitude. *An. arabiensis* was most prevalent in the central plateau—between 11°30'N and 13°30'N—decreasing in abundance when moving centrifugally away from this region. Contingency analysis of presence/absence of each pair of taxa in any village, showed that the M-form and *An. arabiensis* co-occurred significantly more than expected, whereas the M- and S-forms were significantly less associated than expected (P<0.0001 in both cases); for *An. arabiensis* and the S-form, support for statistically lower association was less (P=0.035). Chromosomal analysis of each molecular form revealed divergent patterns of polymorphism characterized by contrasting inversion frequencies. No chromosomal arrangement was exclusive of either molecular form. With the exception of inversion 2Rb in the S-form, all inversions showed variable clinal changes in frequency with latitude. Our results support the view that molecular forms of *An. gambiae* represent diverging taxonomic units defining an incipient speciation process, whose chromosomal polymorphism modulate ecological niche partitioning in relation to eco-geographical clines at the macro-geographic scale.

### DISTRIBUTION OF *CULEX PIPIENS* COMPLEX IN MEXICO CITY AND THE POTENTIAL OF WEST NILE

Alvaro Diaz-Badillo<sup>1</sup>, Jorge P. Martínez-Muñoz<sup>2</sup>, Barry Beatty<sup>3</sup>, William Black<sup>3</sup>, María de Lourdes Muñoz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City, Mexico, <sup>2</sup>Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Oaxaca., Oaxaca City, Mexico, <sup>3</sup>Department of Microbiology, Immunology, and Pathology, Colorado State University, Fort Collins, CO, United States

West Nile virus (WNV) was initially isolated in America from species of *Culex* mosquitoes and birds in New York City area in 1999. Subsequently, the virus spread in the United States and many human cases were reported. *Culex* mosquitoes are considered to be the most important vectors of WNV, although this virus has been isolated or detected in more than 20 species of mosquitoes in the United States. Because

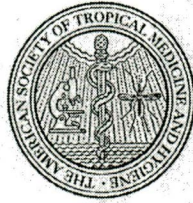
the importance of this vectors the aim of the present research was to investigate the *Culex* species distribution in Mexico. This studies were focus in Mexico City and the surrounding states to know the potential to spread WNV in this city. WNV has been detected in equines and birds in Monterrey, Yucatan among others. A total of 42 sites were sampled from 2004 to 2005 for mosquito larva stage principally. *Culex quiquefaciatus* was the dominant larva collected along the year. Vertical stratification may be influenced by humidity, temperature, light, and possibly by availability of hosts. The maximum mosquito density was during the temporal rain. *Culex pipiens*, species that preferentially feeds on birds is an important and competent vector of WNV in both the Old and New Worlds was also collected in Mexico city. The likely importance of this species in the natural history of WNV in the northeastern United States prompted us to evaluate the breeding sites of *Cx. pipiens* and associated species to the potential of future epidemics of WNV in Mexico. The molecular and morphological studies showed that the species *Culex quiquefaciatus*, *Culex pipiens* and their hybrids are circulating in Mexico City.

### POPULATIONS OF THE *ANOPHELES GAMBIAE* M-FORM CAN HAVE TYPICAL SAVANNA-FORM INVERSION KARYOTYPES AT THE NORTHWESTERN LIMITS OF ITS GEOGRAPHICAL RANGE

Beniamino Caputo<sup>1</sup>, Davis Nwakanma<sup>2</sup>, Musa Jawara<sup>2</sup>, Ibrahimia Dia<sup>2</sup>, Lassana Konate<sup>2</sup>, Mario Coluzzi<sup>1</sup>, Vincenzo Petrarca<sup>2</sup>, David J. Conway<sup>2</sup>, Alessandra della Torre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Parasitology Unit, Department Public Health Sciences, University "La Sapienza", Rome, Italy, <sup>2</sup>Medical Research Council (MRC) Laboratories, Fajara, Banjul, Gambia, <sup>3</sup>Institut Pasteur, Unit of Insects and Infectious Diseases, Dakar, Senegal, <sup>4</sup>University of Dakar, Dakar, Senegal, <sup>5</sup>Department Genetic and Molecular Biology, University "La Sapienza", Rome, Italy

Scanty data are available on the relative frequencies of *Anopheles gambiae* molecular forms and on their chromosomal inversion polymorphism patterns at the western extremes of their geographical range. At the end of the 2005 malaria transmission season (Oct-Nov), we conducted a cross-sectional survey by pyrethrum-spray and hand aspirator catches at 8 sites covering a west-to-east transect from the coastal region of The Gambia to eastern Senegal. Molecular identifications showed the presence of *An. melas* (N=144) in the 3 sites within 200 km from the coast, and of *An. gambiae* s.s. (N=259) and *An. arabiensis* (N=668) at all sampling sites. A cline was observed in the relative frequencies of *An. gambiae* molecular forms: the S-form (i) was reported for the first time in the "coastal" sites; ii) was absent in samples from central Gambian areas, characterised by extensive rice cultivation; and, iii) predominated in eastern Senegal. The M-form was present at all the sampling sites and largely predominated over S in the 5 Gambian sites. Throughout the study area, both molecular forms showed high frequencies of inverted arrangements 2Rb, 2Rd and 2La, typical of the SAVANNA chromosomal form. S-populations from Senegal were characterised by the presence of the 2Rj arrangement, mostly associated with 2Rb and/or 2Rd. Rare carriers of the typical MOPTI-specific polymorphism (2Rbc/1+) and BISSAU-specific karyotypes (2Rd/d\_2L+/a) were recorded in the M-form only. Unexpectedly, individuals characterised by the most typical SAVANNA karyotype (2Rb/2La/a) were identified mostly as M-form. The absence of the S-form in the intensely rice cultivated Gambian areas and its predominance in Guinea-savannah eastern localities, suggests a greater ability of the M-populations to adapt to the rice ecosystem, even in the absence of the inversion set-up typical of the MOPTI chromosomal form (2Rbc/a), which is usually found in comparable ecosystems of Mali and Burkina Faso. Collections along the same transect are planned in 2006 to confirm these preliminary data.



## Certificate of Participation

This certificate recognizes that

Alvaro Diaz-Badillo

---

Participated in the

American Society of Tropical Medicine and Hygiene  
Young Investigator Award Competition  
November 12, 2006  
Atlanta Marriott Marquis  
Atlanta, Georgia USA



## Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR U.N.A.M.  
APARTADO POSTAL 70-600  
C.P. 04510 MÉXICO, D.F.  
TEL. Y FAX: 5622-5742  
TEL. 5622-5803  
<http://www.ifc.unam.mx/smb/>  
Correo electrónico: [smbq@ifc.unam.mx](mailto:smbq@ifc.unam.mx)

### MESA DIRECTIVA 2005 - 2007

#### PRESIDENTE

**DR. VÍCTOR CALDERÓN SALINAS**

#### VICE-PRESIDENTE

**DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES**

#### SECRETARIO TESORERO

**DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN**

#### SUB-SECRETARIO TESORERO

**DR. JORGE RAMÍREZ SALCEDO**

Guanajuato, Gto., a 17 de noviembre de 2006.

*A quien corresponda:*

Se hace constar que

### SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguín Lozano  
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval  
Dr. Joaquín Cravioto (+)  
Dr. Carlos del Río Estrada (+)  
Dr. Silvestre Frank Freund  
Dr. Mario García Hernández  
Dr. Jesús Guzmán García  
Dr. Jesús Kumate Rodríguez  
Dr. José Laguna García  
Dr. Guillermo Massieu Helguera (+)  
Dr. Raúl Ondarza Vidaurreta  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

## DÍAZ BADILLO ÁLVARO

presentó el trabajo titulado

### DESARROLLO DE MICROARREGLOS PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR DE LA DISTRIBUCIÓN DE MOSQUITOS DEL COMPLEJO CULEX PIPPIENS EN LA CIUDAD DE MÉXICO.

Durante el XXVI Congreso Nacional de Bioquímica que se le celebró del 12 al 17 de noviembre de 2006 en la ciudad de Guanajuato, Gto.

*Atentamente  
El Comité Organizador*

**Dr. Federico Martínez Montes**

Vice-Presidente de la SMB

Facultad de Medicina, UNAM

Tel.: 5623 2168

Fax. 5616 2419

Correo electrónico [fedem@bq.unam.mx](mailto:fedem@bq.unam.mx)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
RED DE BIOTECNOLOGÍA

Otorga la presente

# CONSTANCIA

A: Álvaro Díaz-Badillo,  
M. Camacho-Nuez,  
J. P. Martínez-Muñoz,  
Muñoz M. L

Por la presentación del trabajo:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES DE MOSQUITOS DEL  
COMPLEJO *Culex pipiens* EN LA CIUDAD DE MÉXICO.

En la modalidad: ORAL

## V Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN

Dr. Enrique Durán Páramo  
Coordinador General

Dr. Edgar Salgado Manjarrez  
Coordinador del Comité Científico

Noviembre 28 a Diciembre 1 de 2006  
MÉXICO, D.F.

# AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION

CERTIFIES THAT

Alvaro Diaz-Badillo, Minerva Camacho-Nuez, Jorge P. Martínez-Munoz, Barry Beaty,  
William Black IV, Gary G. Clark, and M. L. Munoz

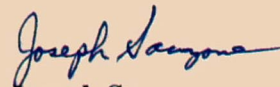
PRESENTED


Molecular and morphological identification and phylogenomic  
relationships of *Culex pipiens* complex species from Mexico City, Mexico


IN THE

17th Latin American Symposium  
73rd AMCA Annual Meeting  
Orlando, Florida, April 1-5, 2007



  
Joseph Sanzone  
Presidente

  
Gary G. Clark, Ph.D.  
Coordinador

  
Yasmín Rubio-Palís, Ph.D.  
Directora Regional para  
América Latina y el Caribe





GOBIERNO DEL  
ESTADO DE MÉXICO



Tecámac, Estado de México a 01 de noviembre del 2007.

## CONSTANCIA

A QUIEN CORRESPONDA  
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que el **Dr. Álvaro Díaz Badillo** fungió como **Director y Sinodal de la Tesis** de la alumna **Balderrama Martínez Karla**, alumna de la carrera de Biotecnología de la **Universidad Tecnológica de Tecámac** con número de matrícula **57060**. El título de la tesis fue "**Análisis molecular de 3 poblaciones de mosquitos *Culex pipiens* (Diptera Culicidae), en el municipio de Tecámac, Estado de México y su posible relación con la transmisión del Virus del Oeste del Nilo**". El trabajo de tesis se desarrolló del 7 de mayo al 17 de septiembre del presente año.

Esta actividad se enmarca como parte del convenio existente entre la Universidad Tecnológica de Tecámac y el Instituto Politécnico Nacional y por el cual el Dr. Díaz Badillo no percibió remuneración económica alguna de parte de nuestra Universidad.

Sin más por el momento, se extiende la presente para los fines que al interesado convenga, el día 01 de noviembre de 2007.

Atentamente

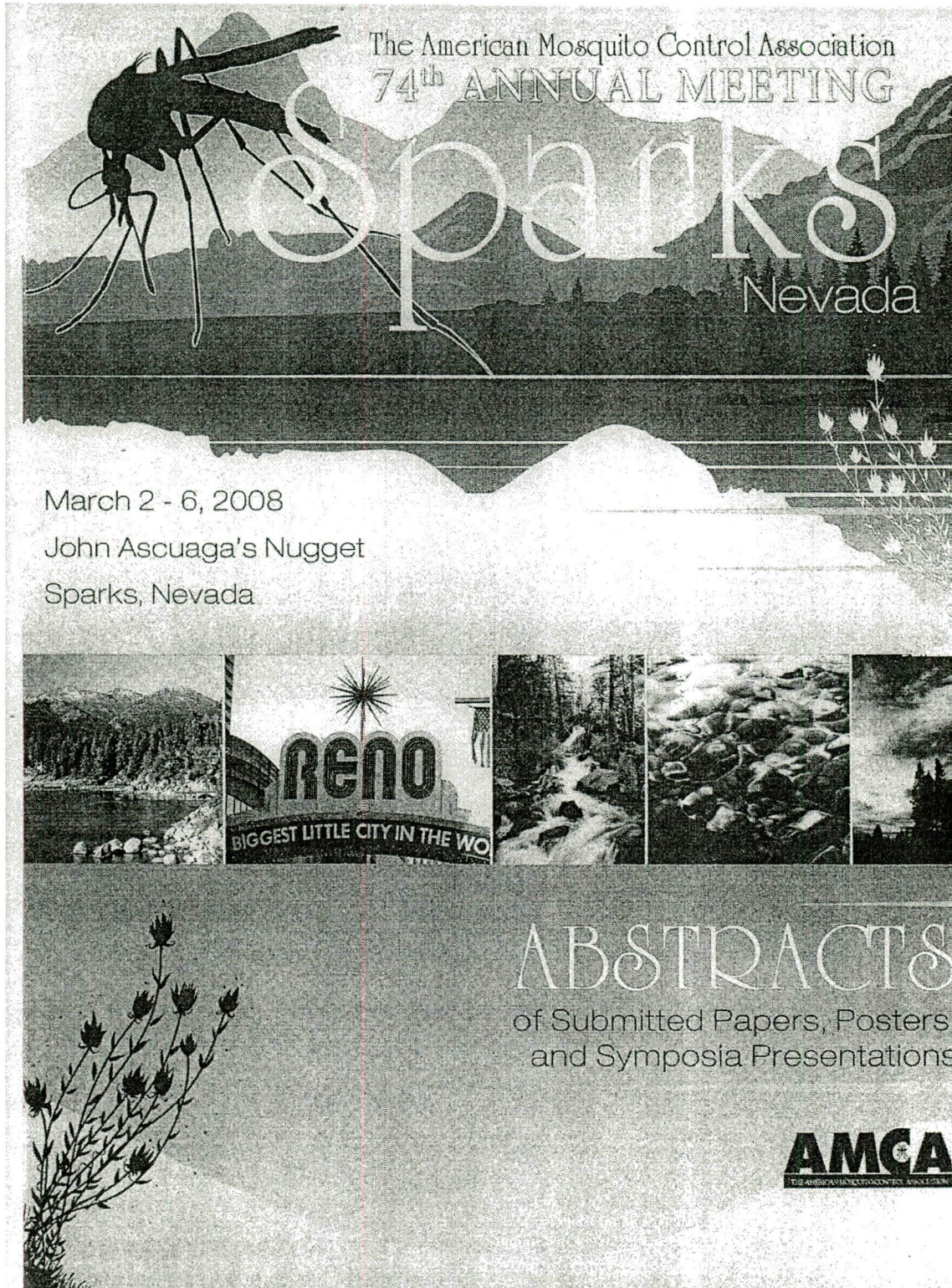


**M. V. Z. ADRIANA LUCILA GARULO FUENTES**  
Directora de la División de Biotecnología



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN  
SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR Y SUPERIOR  
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE TECÁMAC

KM. 37.5 CARRETERA FEDERAL MÉXICO - PACHUCA, PREDIO SIERRA  
HERMOZA  
TECÁMAC, ESTADO DE MÉXICO, C.P. 55740  
TELFAX: 5936 1213. CONMUTADOR: 5938 8400  
CORREO ELECTRÓNICO: [uftecamac@mail.uftecamac.edu.mx](mailto:uftecamac@mail.uftecamac.edu.mx)



**Abstracts**

treatments were discontinued for 7 d and the wild *Culex* density rebounded to pre-treatment levels. The third treatment reduced *Culex* densities by 7.1 mosquitoes/trap/d ( $P < 0.2$ ), but the last treatment at the beginning of September had no effect on population density. Overall, multiple ground ULV treatments suppressed wild *Culex* density and this supports the recommendations by the CDC for controlling *Culex* mosquitoes especially *Culex pipiens*.

- 99 Knowledge and attitudes toward prevention and control of dengue in a slum area in Brasília, Brasil**  
Ivenise Leal Braga, ivenise.braga@saude.gov.br, Ricardo-Pimenta Faria, Iraci Crillanovick, Lígia Maria Paixão Silva, Marisa Pacini Costa, and Ima Braga

A knowledge, attitude, and behavior survey was conducted among residents of a slum area in Brasília, Brasil regarding dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF). A random sample of 421 houses (2.1% of the area) was visited and a questionnaire was applied. About 94% of those interviewed had heard about dengue and 73.7% knew that the disease was transmitted by mosquito bites; 83.1% knew dengue symptoms and 14.4% informed us they had had dengue before; 47.5% knew the practices to avoid the mosquito found in containers and tires. Nearly 95% of slum-dwellers use barrels and drums for water storage, common sources of *Aedes aegypti*. The results show that adequate knowledge of dengue and prevention methods are found in close association with high *Ae. aegypti* domiciliary infestation rates. This suggests that traditional education strategies, although efficient in transmitting information, have failed to change the population's behavior. The study presents important data that appear to explain these attitudinal difficulties in avoiding infestations of household water storage containers because of sanitation problems in this community.

- 100 Serologic evidence for West Nile virus activity in two areas of Chiapas, México**

Armando Ulloa, aulloa@insp.mx, José Domingo Méndez Sánchez, José Alfredo Juárez, Mauricio Casas Martínez, Juan Guillermo Bond Compean, Rogelio Danis Lozano, José Arturo Farfan Ale, Julián García Rejon, Luis Flores Flores, and Nicholas Komar

West Nile virus (WNV) is a member of the Japanese encephalitis virus complex within the genus *Flavivirus*, family Flaviviridae. In Chiapas, a serologic survey of 200 domestic animals conducted during 2001 detected a single animal (cow) with WNV-neutralizing antibody, a result considered inconclusive because of the complexities of determine the prevalence of WNV in several communities from the "Lacandon Forest" and the "Encrucijada," 2 natural protected areas in Chiapas. We sampled blood from 343 domestic animals, including 215 chickens, 50 turkeys, 44 cattle, 34 ducks, 4 horses, 2 geese, 2 pigs and tested them for WNV-specific antibodies using a blocking ELISA. Of 36 reactive sera, 19 samples were confirmed by plaque-reduction neutralization test, including 8 chickens, 5 cattle, 4 turkeys, 1 horse, and 1 goose. After combining results for all species tested, the serologic prevalence in Benemérito de las Américas, Roberto Barrios and Nuevo Orizaba from Lacandon Rain Forest was 19% (6/31), 7% (4/56) and 5% (2/42), respectively. Seroprevalence was lower ( $X^2=5.6$ ,  $P=0.03$ ) on the Pacific coastal plain in the communities of Rio Arriba (6%, 6/94) and Zacapulco (1%, 1/120).

- 101 First West Nile virus isolations from mosquitoes in the Neotropics**

Roberto Barrera, rbarrera@cdc.gov, Manuel Amador, Annette Diaz, Joshua Smith, Elizabeth Hunsperger, Jorge L Munoz-Jordan, Kovi Bessof, Manuela Beltran, Edgardo Vergne, Mark Verduin, and Wellington Sun

There is ample evidence of West Nile virus (WNV) circulation in the Caribbean and other tropical areas of Latin America. Virus identification in the region has been difficult because of an absence of patent epizootics or epidemics. WNV surveillance in North America has used dead birds, horses, sentinel chickens, and mosquitoes. We are not aware of surveillance programs in tropical America using sentinel chickens coupled with mosquito trapping to detect active WNV transmission and isolate the virus. We initiated a sentinel chicken WNV surveillance program in July 2006 in eastern Puerto Rico, targeting areas where WNV antibodies had previously been detected in a resident bird and 3 horses in 2004. Surveillance was conducted by taking blood samples every 2 wk from 60 non-immune chickens distributed across the 6 most representative terrestrial habitats. Blood specimens were tested by a chicken-specific IgM MAC-ELISA that would reflect a recent infection. The first positive chickens were detected in June 2007 in evergreen and mangrove forests. After this information was obtained, mosquito trapping was initiated around the sites where the cages were located and blood samples were taken weekly. Within 2 wk, WNV seroconversions were detected in all habitats. The WNV virus was isolated from *Culex nigripalpus* and *Cx. bahamensis* and also detected in *Cx. quinquefasciatus* by RT-PCR. This is the first report of WNV isolations from mosquitoes in the Neotropics. We recommend sentinel chicken surveillance coupled with mosquito trapping to detect recent or active transmission of WNV in the tropics.

- 102 Culex mosquito distribution in Tecamac, Mexico State, Mexico**

Karla Balderrama-Martínez, krepkar85@hotmail.com, Alvaro Díaz-Badillo, América Alejandra Padilla-Viveros, and María de Lourdes Muñoz

West Nile Virus (WNV) was initially isolated in America from *Culex* species and birds in New York City area in 1999. Subsequently, the virus spread in the United States of America (USA) and many human cases have been reported. *Culex* mosquitoes are the most important vectors, although WNV has been isolated or detected in more than 20 mosquito species in USA. WNV was previously detected in equines and birds in Nuevo Leon, Tamaulipas, Coahuila and Yucatan states in Mexico. Because of the importance of this vector, the objective of the present

**Abstracts**

research was to investigate the distribution of *Culex* species in Tecamac, Mexico State, Mexico, since the states of Mexico, Jalisco, Oaxaca, Michoacan, Tlaxcala, Saltillo, Nayarit and Morelos are potential states where WNV can spread in Mexico. During May 2007, a total of 32 sites were sampled for mosquito eggs, larvae, and pupae. *Culex quinquefasciatus* was the dominant larval species collected. The likely importance of this species in the natural history of WNV in the northeastern USA prompted us to evaluate the oviposition sites of *Culex* species and associated species as potential future foci of WNV transmission in Mexico. We have demonstrated the presence of *Cx. quinquefasciatus* in the State of Mexico.

- 103 Preferred indoor resting sites of *Culex quinquefasciatus* Say in Monterrey, Nuevo Leon, Mexico**  
 Maricela Laguna-Aguilar, A. E. Flores, Gustavo Ponce-García, Ildefonso Fernandez-Salas, ifernand@fcb.uanl.mx

The study of adult *Culex quinquefasciatus* Say mosquitoes and the ambient dwelling factors explaining its presence are analyzed in this study. Description of this species' preferred resting was the goal of this work. Abundant *Cx. quinquefasciatus* populations are found in human settlements in Monterrey, northeastern Mexico. This fact represents a potential for West Nile virus (WNV) transmission, a disease with low endemicity to date but with the potential to cause large human outbreaks. Mosquito collections were made inside and outside houses using a backpack aspirator. Several variables were recorded concurrently, such as resting site, height above the floor, wall material and color, as well as blood digestion stages. The collected data were analyzed using the statistical program SPSS 10. Results showed a clear preference of this species to rest in bathrooms and bedrooms with smooth and rough wall surfaces. In addition, wall material was mostly dark colored cement. The higher presence of resting mosquitoes was recorded when the wall had less than 50 cm height. Most of resting sites had an average relative humidity of 50-60% and an average temperature of 30-35 °C. The distribution of females according to blood digestion status showed that gravid female *Cx. quinquefasciatus* preferred indoor resting sites. We concluded that indoor environments in Monterrey provided enough resources to allow this incriminated WNV vector species to potentially maintain human epidemics.

- 104 Host-feeding preference of *Culex quinquefasciatus* in Yucatan State, Mexico**  
 Julian Garcia-Rejon, grejon@uady.mx, Jose Farfan-Ale, Maria Loroño-Pino, Wilberth Chi-Chim, Luis Flores-Flores, Ely Rosado-Paredes, Carlos Baak-Baak, Bradley Blitvich, Jose Perez-Mutul, Victor Suarez-Solis, Ildefonso Fernández-Salas, and Barry J. Beaty

Studies were conducted to determine the host-feeding preference of *Culex quinquefasciatus* in urban areas of Merida, Yucatan State, Mexico. Mosquitoes were collected in the backyards of houses using wooden resting boxes. Collections were made 5 times per wk from January to December 2005. DNA was extracted from engorged females and tested by PCR using universal avian and mammalian-specific primers. DNA extracted from avian-derived blood was further analyzed by PCR using primers that differentiate among 3 avian orders: passeriformes, columbiformes and galliformes. PCR products obtained from mammalian-derived blood were subjected to restriction enzyme digestion to differentiate between human, dog, cat, pig, cow, and horse-derived blood meals. Overall, 82% of engorged mosquitoes had fed on birds and 18% had fed on mammals. The most common sources of avian-derived blood were galliformes and passeriformes. The most common sources of mammalian-derived blood were dogs and humans. The overall human blood index (HBI) was 6.7%. The overall forage ratio for humans was 0.1 indicating that humans are not a preferred host for *Cx. quinquefasciatus* in Merida.

- 105 Control of culicine mosquito larvae (Insecta: Diptera) using micronized suspensions of calcium hydroxide**  
 A. Martínez-Ibarra, A. Estrada Aguilar, R. M. Sánchez Manzano, A. D. Camacho, and B. Noguera-Torres, bnogueta@yahoo.com

Laboratory bioassays and preliminary field tests were conducted to evaluate the larvicidal effect of micronized suspension calcium hydroxide (the main component of lime) and the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) was determined. Fourth instar mosquito larvae were kept in a mixture of drinking water and original pond water from selected locations (Mexico City for *Culex* spp. and Ayala City, Morelos state for *Aedes* spp.). The control with Temephos® at 0.1 ppm (commercial concentration) caused 100% mortality of larvae 6 h after application and also killed pupae 28 h post-application. The LD<sub>50</sub> for calcium hydroxide for *Culex* spp. larvae was 0.084% (w/v) 24 h after application, for *Aedes* spp. the CD<sub>50</sub> for larvae was 0.035%. The effects of calcium hydroxide on pupae showed much variation; therefore, we do not consider this compound effective against pupae. Preliminary field testing conducted in ponds in Ayala City indicate that calcium hydroxide seems an effective larvicide at LD<sub>50</sub>. Our results show the potential of micronized suspensions of calcium hydroxide as mosquito larvicide. It is worth mentioning that lime is cheap and the people in the rural areas of Mexico and other countries are familiar with the handling procedures for this compound.

- 106 Brain cell karyotype of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) at three temperatures from Colombia**  
 Jesus Escovar, jeescobar@jalsalle.edu.co, Carolina García, Yesica Londoño, Ligia Moncada, and Estrella Cárdenas

The objective was to analyze the chromosomes of *Culex quinquefasciatus* at 3 temperatures. The adults were collected in the following places: El Muña (elevation 2,565m and 15 °C avg.), Fusagasugá (elevation 1,700m and 20 °C avg.) and Girardot (elevation 289m and 28°C avg.) in Cundinamarca Department, Colombia. Fourth instar larvae were obtained from first generation of the 3 colonies. The larvae were placed in colchicine; the heads were then placed in orcein stain on a microscope slides and the tissue was squashed. Forty slides were examined and

**KU** THE UNIVERSITY OF  
KANSAS

**GENETICS PROGRAM**

Molecular and Morphological  
Typing of *Culex pipiens*  
Mosquitoes in Mexico City:  
Potential for West Nile Infection

**Dr. Alvaro Diaz-Badillo**

Department of Genetics and Molecular Biology  
Centre for Research and Advanced Studies of the  
National Polytechnic Institute  
Mexico City, Mexico

**2:30 PM**  
**Thursday**  
**January 15, 2009**

**252 Robinson**  
**Lawrence Campus**



## THE AMERICAN MOSQUITO CONTROL ASSOCIATION

CERTIFIES THAT

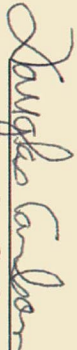
Analysis of genetic variation of *Culex pipiens* complex in  
Mexico City using Ace 2 gene and prediction of the transmission of  
West Nile virus

AUTHORED BY


Alvaro Diaz, America A. Padilla-Viveros, Barry Beaty,  
Minerva Camacho-Nuez, Jorge P. Martinez-Munoz,  
William Black, Gary Clark, and Maria de L. Munoz


WAS PRESENTED AT

The 20<sup>th</sup> Latin American Symposium at the 76<sup>th</sup> AMCA Annual Meeting  
March 28 – April 1, 2010 • Lexington, Kentucky, USA

  
Douglas Carlson  
AMCA President

Douglas Carlson  
AMCA President

  
Gary G. Clark, PhD  
Symposium Organizer

  
Yasmin Rubio-Palis, PhD  
AMCA Regional Director,  
Latin America and Caribbean



RESEARCH

Open Access

## The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City

Alvaro Díaz-Badillo<sup>1,5</sup>, Bethany G Bolling<sup>2</sup>, Gerardo Perez-Ramirez<sup>1</sup>, Chester G Moore<sup>2</sup>, Jorge P Martínez-Munoz<sup>3</sup>, América A Padilla-Viveros<sup>4</sup>, Minerva Camacho-Nuez<sup>5</sup>, Alfonso Díaz-Pérez<sup>6</sup>, Barry J Beaty<sup>2</sup> and María de Lourdes Muñoz<sup>1\*</sup>

### Abstract

**Background:** *Culex* spp. mosquitoes are considered to be the most important vectors of West Nile virus (WNV) detected in at least 34 species of mosquitoes in the United States. In North America, *Culex pipiens pipiens*, *Culex pipiens quinquefasciatus*, and *Culex tarsalis* are all competent vectors of WNV, which is considered to be enzootic in the United States and has also been detected in equines and birds in many states of Mexico and in humans in Nuevo Leon. There is potential for WNV to be introduced into Mexico City by various means including infected mosquitoes on airplanes, migrating birds, ground transportation and infected humans. Little is known of the geographic distribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes and hybrids in Mexico City. *Culex pipiens pipiens* preferentially feed on avian hosts; *Culex pipiens quinquefasciatus* have historically been considered to prefer mammalian hosts; and hybrids of these two species could theoretically serve as bridge vectors to transmit WNV from avian hosts to humans and other mammalian hosts. In order to address the potential of WNV being introduced into Mexico City, we have determined the identity and spatial distribution of *Culex pipiens* complex mosquitoes and their hybrids.

**Results:** Mosquito larvae collected from 103 sites throughout Mexico City during 2004-2005 were identified as *Culex*, *Culiseta* or *Ochlerotatus* by morphological analysis. Within the genus *Culex*, specimens were further identified as *Culex tarsalis* or as belonging to the *Culex pipiens* complex. Members of the *Culex pipiens* complex were separated by measuring the ratio of the dorsal and ventral arms (DV/D ratio) of the male genitalia and also by using diagnostic primers designed for the *Ace2* gene. *Culex pipiens quinquefasciatus* was the most abundant form collected.

**Conclusions:** Important WNV vectors species, *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* and *Cx. tarsalis*, are all present in Mexico City. Hybrids of *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* were also collected and identified. The presence and abundance of these WNV competent vectors is a cause for concern. Understanding the distribution of these vectors can help improve viral surveillance activities and mosquito control efforts in Mexico City.

### Background

Arthropod-borne viral (arboviral) infections are a major public health concern, causing considerable morbidity and mortality in humans and livestock throughout the world. There are more than 100 arboviruses that cause disease in humans, including members of the

*Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, and *Togaviridae* families [1]. Arboviral infections produce a broad spectrum of disease, ranging from asymptomatic infection to mild febrile illness or more severe conditions, such as encephalitis or hemorrhagic fever, which may result in long-term sequelae or death [2,3]. Human and animal pathogenic arboviruses such as West Nile virus (WNV), Chikungunya virus (CHIKV), Rift Valley fever virus (RVFV) and Bluetongue virus (BTV) have emerged and caused epidemics in North America, Europe and the Arabian Peninsula [1]. *Culex* are important vectors of West Nile virus and other arboviruses [2,3] in North

\* Correspondence: [lmunoz@cinvestav.mx](mailto:lmunoz@cinvestav.mx)

<sup>1</sup>Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ave. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, San Pedro Zacatenco-Gustavo A. Madero, México D.F., C.P. 07360, México  
Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Díaz-Badillo et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

America, and consequently prediction and monitoring of their abundance are central to arboviral surveillance and control programs.

West Nile virus (WNV) was first isolated in America from *Culex* mosquitoes and birds in New York City in 1999. Subsequently, the virus has spread westward across the country with the total numbers of reported cases exceeding 30,000 and more than 1200 fatalities occurring in the past 12 years [4]. WNV is maintained in nature by a bird-mosquito transmission cycle [5,6]. The most important mosquito vectors belong to the genus *Culex*, a very closely related group of mosquitoes originating in Africa [7,8]. *Culex* spp. mosquitoes are widespread and can be found in tropical and temperate climate zones on all continents except Antarctica [9].

*Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus*, and *Cx. tarsalis* are considered to be the primary vectors of WNV in North America for several reasons. First, they are the most common mosquitoes in urban areas [10-14]; WNV outbreaks typically occur during the peak abundance period of these vector species [15]; they are competent laboratory vectors of WNV [16]; and they have repeatedly been found infected with WNV in nature in the United States [17]. Unlike most other arboviruses, WNV has been detected in several genera and numerous species of mosquitoes, including 60 North American species and over 75 species from more than 10 genera worldwide [18]. *Culex pipiens* complex mosquitoes also serve as important vectors of St Louis encephalitis [19], Rift Valley fever [20] and Japanese encephalitis viruses [21].

The global distribution of the *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* and the North American distribution of *Cx. tarsalis* poses a threat for introduction and transmission of WNV into Mexico including Mexico City. *Culex* spp. mosquitoes are frequently detected on airplanes [22,23], and the international airport in Mexico City receives numerous flights from WNV endemic areas daily. WNV was introduced into Northern Mexico from the central United States in 2002, presumably via migration of viremic birds [24]. Either of these mechanisms could result in the introduction of WNV into the metropolitan area of Mexico City. The presence of a susceptible human population, approximately 20 million people, and abundant *Cx. pipiens* complex mosquitoes is of great public health concern.

The *Cx. pipiens* complex mosquitoes in Europe differ in behavior and physiology compare to the American mosquitoes and there is little evidence of gene flow between species [16]. *Cx. p. pipiens* have been implicated in urban outbreaks of WNV in Europe; however these outbreaks were nonrecurring and localized [16], whereas in the United States WNV is enzootic and widespread outbreaks occur. Interestingly, hybrids

between *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* are widely found in the United States [16]. These hybrids, which presumably feed on birds as well as humans, may contribute to the sustained transmission of WNV to humans and horses in North America.

Because of their potential importance in serving as bridge vectors for WNV from avians to humans, we were interested in determining the frequency and distribution of *Cx. p. pipiens*-*Cx. p. quinquefasciatus* hybrids in Mexico City.

The *Cx. pipiens* complex is considered a controversial topic in mosquito taxonomy [25], because divergent physiological and behavioral traits occur without distinctive morphological differentiation. Two methods used to distinguish between *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* are: 1) DV/D ratio, and 2) PCR amplification of acetylcholinesterase (*Ace.2*) gene sequences. The DV/D ratio refers to the relative overlap and measurement of the dorsal and ventral arms in male genitalia. DV/D ratios for *Cx. p. pipiens* are less than 0.2, for *Cx. p. quinquefasciatus* they are greater than 0.4, and hybrids have intermediate ratios between 0.2-0.4 [26,27]. PCR amplification of *Ace.2* gene sequences result in amplicons of different sizes specific for the two taxa [28-30].

In this study, mosquitoes were differentiated by both the male DV/D ratio measurements and by the *Ace.2* gene PCR product analysis [30]. Mosquito larvae were collected from breeding sites, reared to adults, and DV/D ratios were determined in males. Morphological and molecular results were used to determine whether the mosquito was *Cx. p. quinquefasciatus*, *Cx. p. pipiens* or a hybrid between the two species.

Determining the distribution of *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus*, their hybrids and *Cx. tarsalis* is necessary to determine the epidemic potential of WNV in Mexico City. This information will provide base-line information for initiating surveillance programs and initiating control activities in the event that WNV is introduced into the region.

## Methods

### Study area

Mexico City, the capital city of Mexico, is a Federal District. The Distrito Federal is at the same administrative level as the states. It is located in the Valley of Mexico, also called the Basin of Mexico or the Valley of Anáhuac, a large valley located in the Trans-Mexican Volcanic Belt in the high plateaus at the center of Mexico. It has a minimum elevation of 2,200 meters above sea level and is surrounded by mountains and volcanoes that reach elevations of over 5,000 meters. The city primarily rests on what was once Lake Texcoco. The entire lakebed is now paved over and most of the city's remaining forested areas lie in the southern boroughs of

Milpa Alta, Tlalpan and Xochimilco. The city has a temperate highland climate [31], due to its tropical location and high elevation. The lower region of the valley receives less rainfall than the higher regions of the south. The lower boroughs of Iztapalapa, Iztacalco, Venustiano Carranza and the west portion of Gustavo A. Madero are usually drier and warmer than the upper southern boroughs of Tlalpan and Milpa Alta, a mountainous region of pine and oak trees known as the range of Ajusco, Tlalpan. Seasonally, the lowest temperatures usually register during January and February, reaching -2 to -5°C (28 to 23°F), sometimes accompanied by snow showers on the southern regions of Ajusco. The maximum temperatures occur during late spring and summer reaching up to 32°C (90°F). The area receives about 700 mm of annual rainfall, which is concentrated from June through September/October with little or no precipitation the remainder of the year. Mexico City is a prominent economic, industrial, and cultural center in the country and is the most populous city with over 8,836,045 inhabitants in 2008 [32]. The Federal District is divided into 16 districts or boroughs. The boroughs are composed of hundreds of neighborhoods [33]. The metropolitan area, Zona metropolitana del Valle de México, consists of the Federal District and 60 other municipalities, mainly located north and east of Mexico City. This area has a total population of approximately 20,000,000 inhabitants (2010 estimate, 29).

#### Mosquito collection and identification

Mosquitoes were collected as larvae aboveground from various urban (Figure 1A), suburban (Figure 1B) and rural cemeteries (Figure 1C) in Mexico City during 2004-2005. This represents the first study describing mosquito larval habitats in Mexico City. Larvae were collected from tree holes, ditches, decorative ponds, flower pots, buckets, and water-retaining debris from each cemetery (Figure 1D-I). The water in the collection sites was present for different periods of time. Temporal analysis of mosquito population dynamics was addressed by performing monthly collections on six occasions from May through October 2005. Larvae were carried alive to the insectary where they were reared to adults and examined after emergence. Larvae were reared under standard conditions and pupae were placed (approximately 200 pupae/cup) in cages (30 × 30 × 30 cm) for adult emergence (approximately 400 adults/cage). Mosquitoes were maintained at 28°C ± 2°C and photoperiod of 14:10 (L:D) h.

Specimens were identified to species with the aid of a stereomicroscope by using standard identification keys and recently described characters [34] including the DV/D ratio descriptive key [35]. *Culex pipiens* complex specimens were further subjected to a species-specific

polymerase chain reaction (PCR) test based on ribosomal DNA (Ace.2 gene) to confirm the results of morphologic identifications [30,34]. Identified specimens were either processed immediately for genomic DNA extraction or stored at -80°C.

#### Genomic DNA extraction

Genomic DNA extraction was performed on individual male mosquitoes. Each mosquito was homogenized with the aid of a microtube pestle (USA Scientific, Enfield, CT) in a 1.5 ml tube containing 180 µl phosphate buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and subjected to DNA extraction according to Garcia-Franco, et al. [36]. Isolated DNA from each mosquito was reconstituted in 50 µl Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), and stored at -20°C for PCR [28,30].

#### Polymerase chain reaction assay

The PCR reaction was carried out by incubation of 0.20 µM of the corresponding sense and antisense PCR primers, 1× PCR buffer, 250 µM of each dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mg/ml of bovine serum albumin, 2.5 units of Taq polymerase (Applied Biosystems), and approximately 6 ng of genomic DNA per the manufacturer's recommendations.

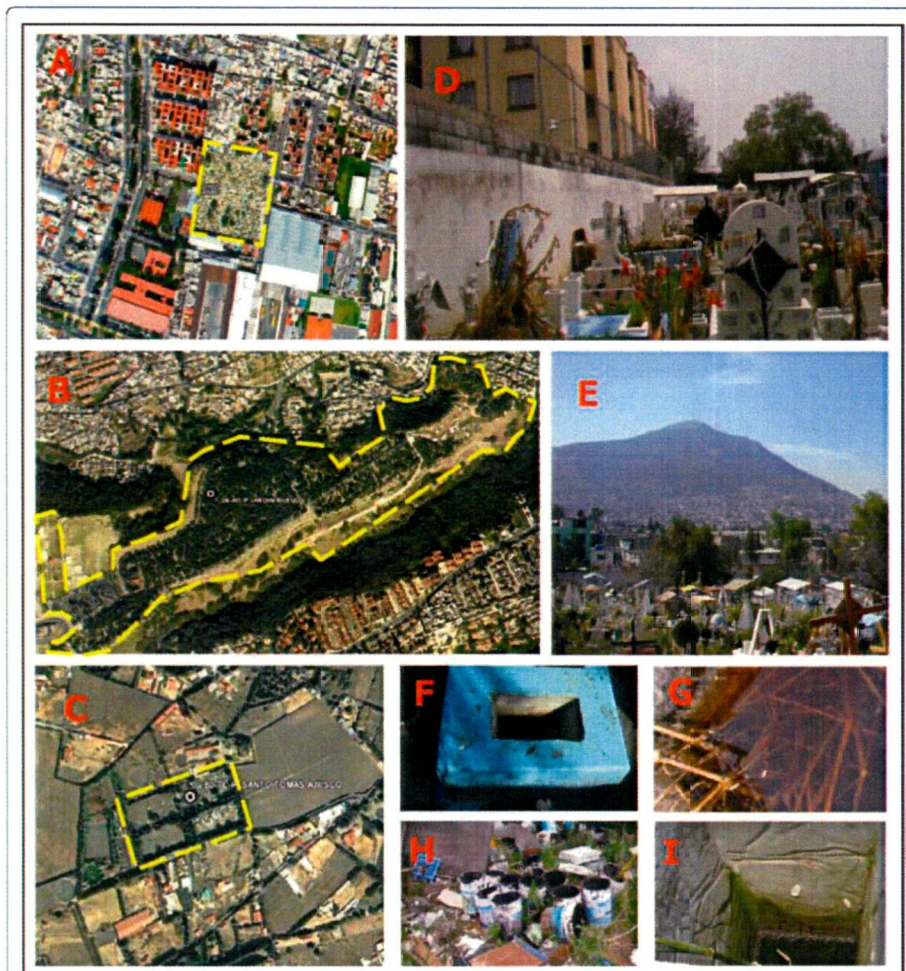
Amplification of the Ace.2 gene was performed using primers:

ACEquin (5'-CCTTCTTGAATGGCTGTGGCA-3'),  
ACEpip (5'-GGAAACAACGACGTATGTACT-3') and  
B1246 (5'-TGGAGCCTCCTCTTACGGC-3') described previously [30]. The PCR conditions were as described previously, briefly: one cycle at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 56°C for 30 seconds, 72°C for 60 seconds, and one final extension of 72°C for 5 min.

## Results

#### Species of collected mosquitoes

A total of 202,148 mosquito larvae belonging to the genera *Culex* (77%), *Culiseta* (18%) and *Ochlerotatus* (5%) were collected from 3,955 containers from cemeteries in 16 Districts in Mexico City (Additional file 1). Larvae were collected in all sites; 49.5% of the collected sites yielded *Cx. pipiens* complex mosquitoes exclusively; 40.7% of the sites yielded *Ochlerotatus* mosquitoes, and 33.9% of the sites yielded *Culiseta* mosquitoes. Interestingly, *Cx. tarsalis* was identified only in Peñon de los Baños (site 87-VC) close to the international airport (Figure 2, 3) coexisting with *Cx. p. quinquefasciatus*. Furthermore, *Cx. pipiens* complex were coexisting with *Culiseta* and *Ochlerotatus* in 25 sites, with *Culiseta* in 10 sites, and with *Ochlerotatus* in 17 sites (Figure 2). In this study, we used 3 different land cover classes, urban, suburban and rural areas (Figure 1A-C) to characterize the landscape in different regions of Mexico City. The



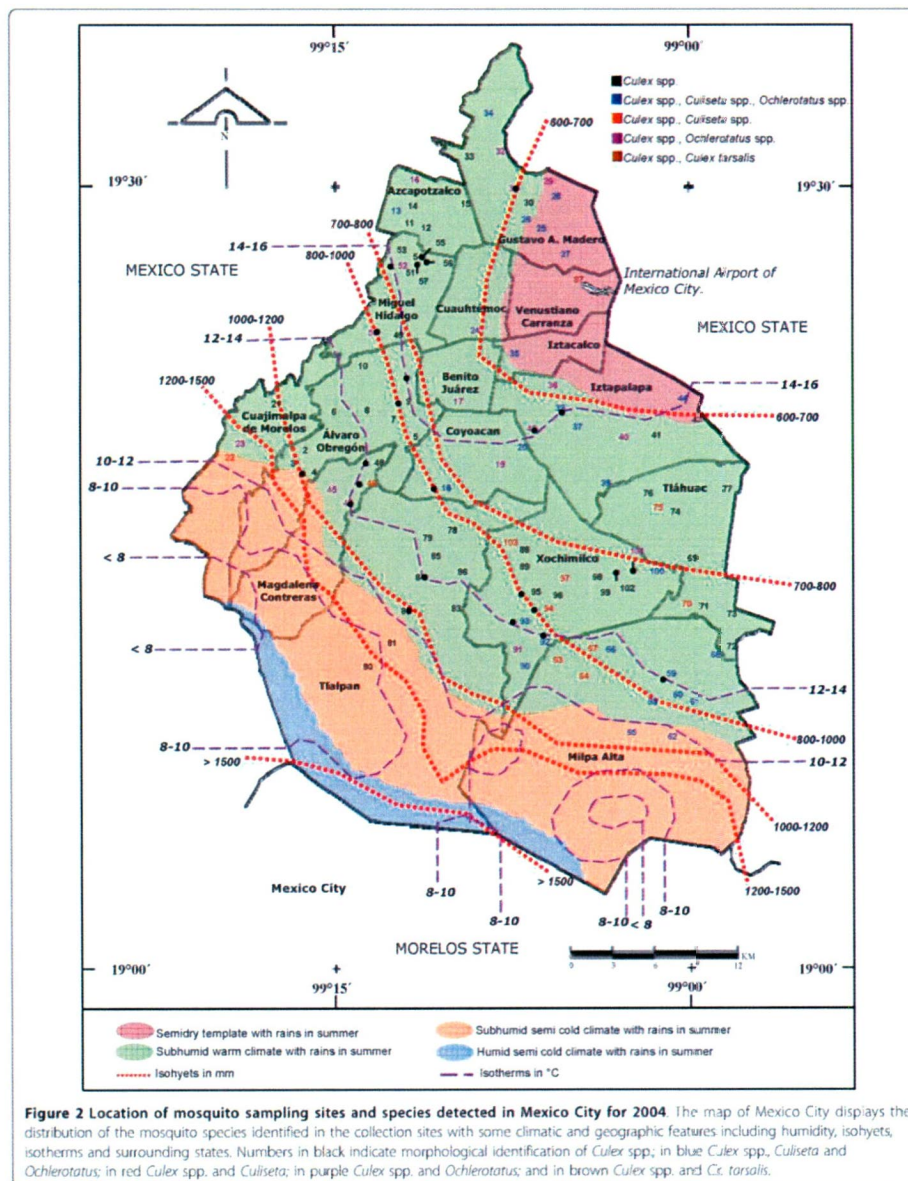
**Figure 1 Landscape and habitats of mosquito larval collection sites.** (A) Urban area, representative urban area in cemeteries of Mexico City characterized by high human population density, public transportation and communication containing a small amount of green areas. (B) Suburban, this area is constituted for a balance between buildings and green areas with sufficient public transportation and communication but where the people are not dedicated to agricultural activities. (C) Rural, this representative area is characterized by low density human population, with little public transportation and communication and extensive green and agricultural areas. (D-I) Display all varieties of natural and man-made containers representative of the mosquito larval habitats in the collection sites at the cemeteries.

locations of all mosquitoes belonging to the different genera are displayed in Figure 2.

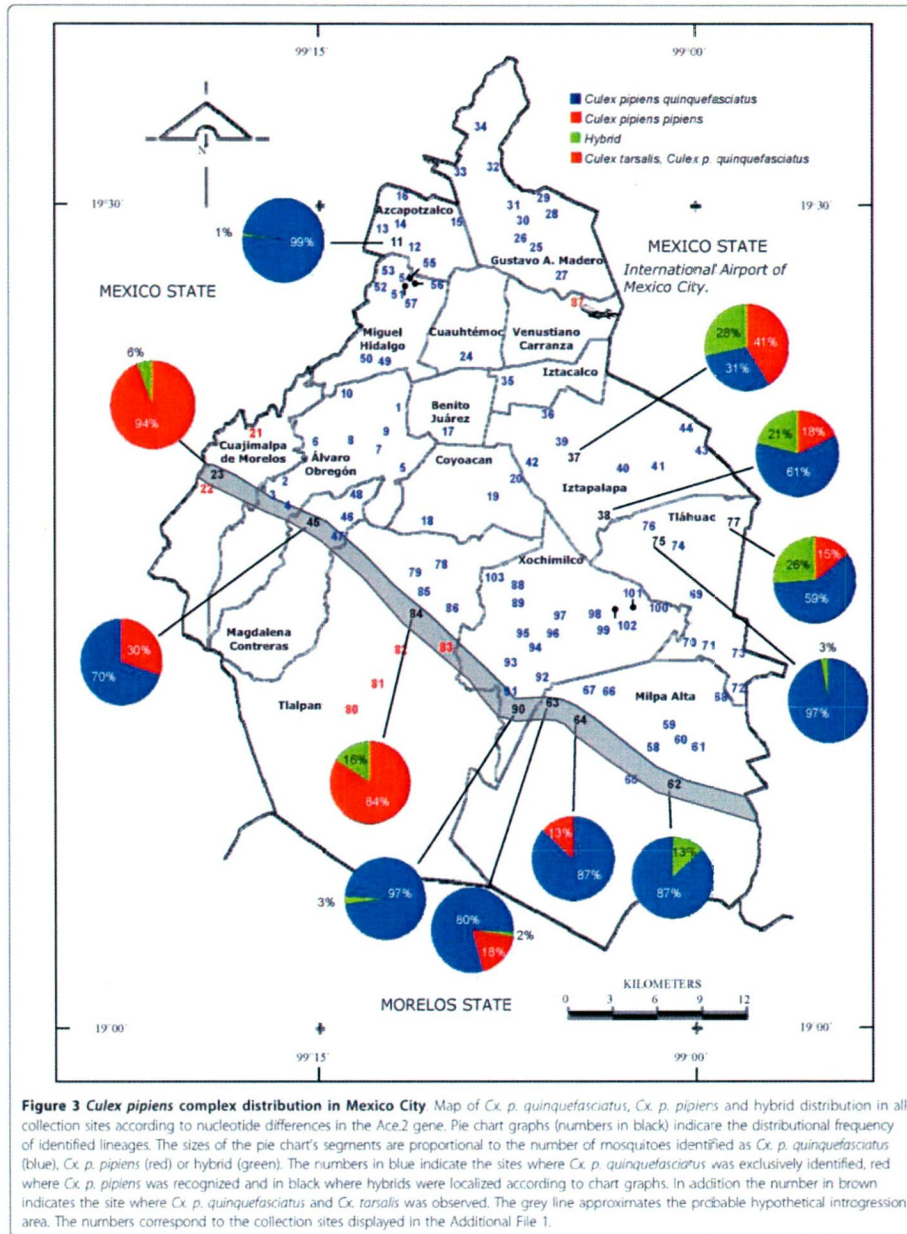
Out of 10,250 *Cx. pipiens* complex mosquitoes examined, 54.5% were females and 45.5% were males (Additional file 1). The male to female ratio was 0.84:1.

#### Identification of *Culex pipiens* complex members in Mexico City by DV/D analysis

The locations of the *Culex* complex mosquito collection sites are shown in Figure 3. The mean value of DV/D ratio of the specimens examined in this study was used



to distinguish *Cx. p. pipiens* from *Cx. p. quinquefasciatus* (Table 1). *Cx. p. pipiens* had DV/D ratios of less than 0.2, *Cx. p. quinquefasciatus* had DV/D ratios greater than 0.4 and hybrids displayed intermediate



ratios of 0.2-0.4 (Table 1). Most collections consisted of *Cx. p. quinquefasciatus* (73.8%) alone and five collections contained only *Cx. p. pipiens* (4.3%). Two collections consisted of a combination of *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* (1.9%); *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* and hybrids (7.8%); *Cx. p. pipiens* and hybrids (1.9%) or *Cx. p. quinquefasciatus* and hybrids (9.7%). Figure 3 shows the locations where *Cx. p. quinquefasciatus* (numbers in blue) or *Cx. p. pipiens* (numbers in red) were identified by morphological analysis and confirmed by molecular analyses (Ace.2 gene).

#### Molecular Analyses

In order to distinguish the two nominal taxa, the Ace.2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) to detect taxa-specific amplicons. The representative results of the Ace.2 PCR assay for mosquitoes collected from cemeteries in Mexico City are shown in Figure 4. The PCR products of 610 and 274 bp were observed for *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* respectively and both fragments were detected for hybrids (Figure 4-B). The mosquitoes morphologically identified as *Cx. tarsalis* did not yield any PCR product as expected (Figure 4-A, line 10). The DV/D results were generally concordant with the results from the molecular (Ace.2 gene amplification) results. Out of all mosquitoes analyzed there were only 9 mosquitoes identified as hybrids by DV/D analyses that were identified as *Cx. p. quinquefasciatus* by molecular analysis in (03-AO) Santa Rosa Atochicac (Table 1). In areas where there may be introgression (Figure 3, faint gray line), individuals with *Cx. p. pipiens* DV/D ratios were identified as hybrids by molecular analysis and a few with *Cx. p. quinquefasciatus* DV/D ratios were also identified as hybrids. Interestingly, the most "observable" band correlated best with the morphological analysis. Our molecular analysis revealed that the frequency of members of the *Cx. pipiens* complex in the collection sites was: *Cx. p. quinquefasciatus* = 95.5%, *Cx. p. pipiens* = 14% and hybrids = 10%.

*Cx. p. pipiens* or *Cx. p. quinquefasciatus* were identified during the whole year in El Calvario (21-Cf), Cuajimalpa de Morelos and in Sanctorum (52-MH), Miguel Hidalgo respectively (Additional file 2). Furthermore hybrids identified in the samples from San Nicolas Tolentino in Ixtapalapa (37-IP) and from La Concordia in Cuajimalpa (23-Cf) are displayed in the Additional file 2.

#### Seasonal Rainfall Contribution

In order to determine the influence of seasonal rainfall on the abundance of *Cx. pipiens* complex-mosquitoes, we analyzed molecularly 600 mosquitoes/month collected in six cemeteries during the rainy season from May to October in 2005 (Table 2). *Culex pipiens-*

*quinquefasciatus* hybrid mosquitoes were found in all six collection sites. Mosquitoes were collected once per month from 10 different containers at each site. Hybrids were detected in the Azcapotzalco site from Jun to October, in the Milpa Alta site in July, in the Cuajimalpa site from July to October, in the Tlahuac site from June to October, in the Ixtapalapa site in June and from August to October, and finally in the Xochimilco site in June and July (Table 2). Furthermore, hybrid mosquito densities were qualitatively higher during the rainy season. Hybrids were not observed throughout the year. Notably they were not detected in the dry months (January to May). Two peaks in abundance of hybrid mosquitoes were observed (Additional file 2): the first in June and the second in August at the cemetery Civil San Nicolas Tolentino (37-IP site). Temperatures at the collection sites fluctuated from 8°C to 23°C. Hybrids were found at temperatures from 12.5°C to 17°C.

#### Discussion

The mosquitoes belonging to the genera *Culex*, *Culiseta* and *Ochlerotatus* collected and identified in Mexico City are capable of transmitting pathogens causing many different diseases, including WNV. Mosquitoes belonging to the *Cx. pipiens* complex, their hybrids, and *Cx. tarsalis* are considered important vectors for WNV, which can cause fever, death, and long term sequelae in infected humans and also death in horses [37]. WNV is primarily enzootic among birds [38], with humans and equines serving as incidental or dead-end hosts [39]. Migratory birds can spread the virus over long distances [40,41]. WNV is responsible for human outbreaks in the United States, Europe, and the Middle East [6,15,42]. Mexico City has similar climatic conditions to other cities where outbreaks of WNV have occurred. West Nile virus has been reported in six Mexican states [43,44], which increases the probability of introduction of the virus into Mexico City. Little is known about the distribution of *Cx. pipiens* complex mosquitoes in the city. This information is essential for assessing the epidemic potential of WNV in Mexico City. West Nile Virus has been detected in *Culex* spp. mosquitoes in the United States since 1999, and has spread across most states [42], resulting in 30,658 human cases with 1,206 deaths by the end of 2010. The virus reached Canada in 2001 and countries of the Caribbean and Central America by 2003 [44,45]. WNV was detected in horses in the Mexican states of Veracruz, Yucatan, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Tabasco in 2002 [24]. However, the virus was not detected in horse samples from Durango, San Luis Potosí, Jalisco, Distrito Federal, Guerrero, Puebla, Oaxaca and Chiapas were negative for WNV [24]. The first two autochthonous human cases of confirmed WNV infection in Mexico were reported in Nuevo Leon

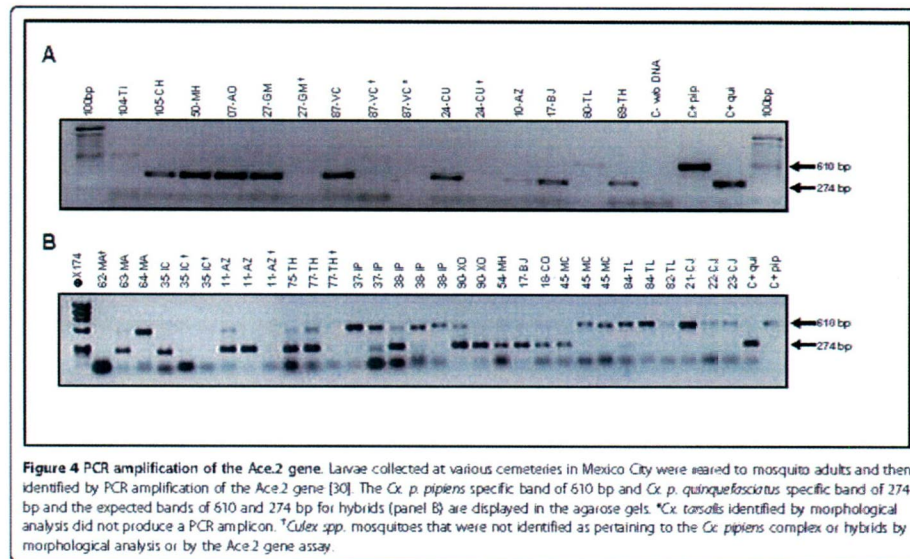
**Table 1 Climatic conditions and percentage of hybrids collected from the different cemeteries**

Key	Rain(mm/year)	<sup>1</sup> T (°C)	<sup>1</sup> W. T. (°C)	<sup>2</sup> R. H. (%)	pH	Total larvae	Morphological Identification (%)			Molecular Identification (%)		
							<i>Cx. p. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. p. pipiens</i>	Hybrid	<i>Cx. p. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. p. pipiens</i>	Hybrid
<b>AO</b>	<b>29.1</b>	<b>15.1</b>	<b>14.2</b>	<b>33.8</b>	<b>7.2</b>							
03-AO**	38	15.4	13.9	36	7.9	2030	91	0	9	100	0	0
<b>AZ</b>	<b>69.8</b>	<b>17.5</b>	<b>15.5</b>	<b>39.3</b>	<b>6.9</b>							
11-AZ*	61	17	15	42	7	2200	98	0	2	99	0	1
<b>CJ</b>	<b>225</b>	<b>13.3</b>	<b>11</b>	<b>43</b>	<b>7.1</b>							
21-CJ**	225	14	13	56	7.2	2790	0	81	19	0	100	0
22-CJ**	225	11	8	37	7	1360	0	100	0	0	100	0
23-CJ**	225	15	12	36	7.1	865	0	72	28	0	94	6
<b>GM</b>	<b>105.7</b>	<b>18</b>	<b>17.2</b>	<b>47.8</b>	<b>7.3</b>							
26-GM*	107	17	15	56	7.2	710	98	0	2	100	0	0
<b>IP</b>	<b>90.1</b>	<b>17.1</b>	<b>15.6</b>	<b>40.1</b>	<b>7.2</b>							
37-IP*	85	16	14	57	7.2	4765	22	39	39	31	41	28
38-IP**	85	17	15	52	7.5	2345	53	22	25	61	18	21
39-IP*	85	15.5	14	24	7.2	1710	99	1	0	100	0	0
44-IP*	94	16	16	36	7	2640	97	0	3	100	0	0
<b>MC</b>	<b>204</b>	<b>12.5</b>	<b>11.5</b>	<b>57.5</b>	<b>7.18</b>							
45-MC*	204	12	11	62	7.3	845	67	29	4	70	20	0
47-MC*	204	12	10	58	7.1	995	67	0	33	100	0	0
<b>MA</b>	<b>140</b>	<b>14.2</b>	<b>13.4</b>	<b>34.7</b>	<b>7.4</b>							
62-MA**	140	13.8	12.5	34	7.3	2895	73	0	27	87	0	13
63-MA**	140	13.2	11.8	36	7.7	1845	68	9	23	80	18	2
64-MA**	140	13.6	12.2	35	7.8	2420	87	13	0	87	13	0
65-MA**	140	13.9	13	33	6.9	619	94	0	6	100	0	0
<b>TH</b>	<b>111.2</b>	<b>16.2</b>	<b>15.9</b>	<b>59.1</b>	<b>7</b>							
73-TH*	107	16	16	81	7.2	2580	71	0	29	100	0	0
75-TH**	156	16	15.5	62	6.9	1140	56	3	41	97	0	3
77-TH**	96	17	16.5	52	6.6	1290	61	18	21	59	15	26
<b>TL</b>	<b>184.1</b>	<b>12.3</b>	<b>9.8</b>	<b>44.9</b>	<b>7.2</b>							
78-TL*	145	13.5	11	35	7	3720	82	0	18	100	0	0
80-TL**	219	8	6	55	7.8	1450	0	100	0	0	100	0
81-TL**	219	11.5	7	52	7.3	1795	0	100	0	0	100	0
82-TL**	219	12.5	7	54	7.1	2130	0	100	0	0	100	0
83-TL**	219	11	8	52	7.2	1690	0	100	0	0	100	0
84-TL**	145	13	11.5	42	7.2	940	12	37	51	0	84	16
<b>XOo</b>	<b>78.8</b>	<b>15.7</b>	<b>13.9</b>	<b>36.3</b>	<b>7.1</b>							
90-XO**	127	9	5	27	7.1	930	88	2	10	97	0	3
91-XO**	116	8	8	28	7	2590	76	0	24	100	0	0

<sup>1</sup>Temperature, <sup>2</sup>Water temperature, <sup>3</sup>Relative humidity, \*Urban, \*\*Suburban, \*\*\*Rural.

and Sonora in 2005 [45]. To our knowledge, only 8 human cases of WNV infection have occurred in Mexico, 3 of which were severe but did not result in death [41]. One fatal human case was reported in Nuevo Leon, Mexico in 2005 [44] and 6 more cases in the

northern Mexico in a survey from 2005 to 2007 [46]. In addition there are other reports that suggest that because there are many cases of dengue (DENV) in Mexico it also may be that the human Mexican hosts had antibodies against DENV that can block WNV



activity [46]. However, since there has been no DENV activity in Mexico City, people from Mexico City could more likely be infected by the virus, if antibodies against DENV have any role in blocking WNV infection. The introduction and establishment of WNV in Mexico City which would be a public health disaster is a possibility because the *Culex* vectors are present throughout the city.

Virus introduction could occur in a variety of ways including migration of WNV infected birds or humans or by infected mosquitoes on airplanes. WNV outbreaks that occur sporadically in southern Europe are attributed to importation of the virus by migratory birds from Africa, which then infect local mosquitoes [47]. *Culex*

spp. mosquitoes are frequently collected from airplanes [48], and it is possible that WNV could have been introduced into New York City in 1999 by an infected mosquito transported from the Middle East. In this regard Mexico City is served by Mexico City International Airport, Latin America's busiest and largest airport, with regular (daily) flights to North America, mainland Mexico, Central America and the Caribbean, South America, Europe and Asia, has code share agreements spanning the entire globe. It is now used by over 26 million passengers per year [49], and in 2008, about 31 million people went through the city's airports. With high traffic volume to and from endemic areas Mexico City is at risk for introduction of WNV. Interestingly, *Cx. tarsalis* was only detected in one site close to the international airport suggesting possible transport of this mosquito via aircraft as has occurred in other countries [48]. This suggestion is based on the fact that we did not find this mosquito in any other collection sites, even though collections were made in natural ground pools and water present for less than a week that is preferred by *Cx. tarsalis* [48]. Our results display for the first time the prevalence and distribution of the *Cx. pipiens* complex in the city, which will help to vector control efforts in the event of introduction of the virus. We note that in this study only larval habitats from cemeteries were sampled to make the most efficient use of available resources. A broader sample of land use classes (e.g., industrial, high-density housing, commercial, etc.) may have produced

**Table 2** Members of the *Culex pipiens* complex and hybrids identified by *Ace*

Cemetery	MAY	JUN	JUL	AUG	SEP	OCT
Santa Lucía, Azcapotzalco	q	h	h	h	h	h
La Concordia, Cuajimalpa	q	p	h	h	h	h
San Nicolás Tolentino, Iztapalapa	q	h	p	h	h	h
San Salvador Cuauhtenco, Milpa Alta	ND	q	h	p	p	p
Santa Catarina, Tlahuac	q	h	h	h	h	h
San Francisco Tlalhepantla, Xochimilco	p	h	h	q	q	p

Samples were taken from six cemeteries and tested for *Ace.2* gene to determine *Cx. p. quinquefasciatus* (q), *Cx. p. pipiens* (p) or their hybrids (h).

slightly different results. Similarly, the use of light traps would likely produce different relative abundances given the known differences in response to light traps. In the case of larval sampling versus light traps, larval sampling—if it is sufficiently thorough—is more likely to sample the entire complex of species. Cemeteries, because of their accessibility, are an effective proxy for the larger surrounding area. Surveys of other land use classes are planned in future projects.

It is very clear that *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* are closely associated with humans. Hybrid zones between the two species are known to occur in North America, Argentina, and Madagascar [25,50,51]. Mexico City has approximately 103 cemeteries surrounded by houses and apartments (Figure 1). The crypt vases contain water throughout the year, providing mosquito breeding sites [52]. Cemeteries sampled during this study confirmed the presence of *Cx. pipiens* complex and *Cx. tarsalis* mosquitoes in Mexico City. Our results show for the first time that *Cx. p. pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus*, their hybrids and *Cx. tarsalis* are all present in Mexico City. Previously, *Cx. p. pipiens* was thought to be found only in the United States and Canada [26]. Furthermore, Mexico City was not included in those previous reports.

Based upon DV/D values and ribosomal DNA analysis [30], specimens from extreme isotherms 12-14 °C to the North of Mexico City were unambiguously identified as *Cx. p. quinquefasciatus*. This is the first report for Mexico City and it is in agreement with previous studies showing that only *Cx. p. quinquefasciatus* is usually found south of 36° N in North America [26]. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes were detected above isotherms 12-14 °C to the South of Mexico City. Finally, *Cx. p. pipiens-quinquefasciatus* hybrids were detected between isotherms 10-12 °C and isotherms 12-14°C at Cuajimalpa, Alvaro Obregon, Magdalena Contreras, Tlalpan, Xochimilco and Milpa Alta Districts (Figure 2). *Culex pipiens pipiens* mosquitoes were also collected during the whole year in the cemetery “El Calvario” in Cuajimalpa de Morelos, suggesting mosquito adaptation to this region.

Hybrids were collected in the rainy season from June to October from northwest to southeast of the city, where there was high mosquito density. The abundance of hybrid mosquitoes increased in the late summer (Cuajimalpa, Iztalapa, Azcapozalco, Xochimilco, Milpa Alta and Tlahuac) between September and October associated with a decrease in temperature (Table 2).

We are suggesting a hypothetical hybridization region (Figure 3) revealing the distribution limits of *Cx. p. quinquefasciatus* and *Cx. p. pipiens* without any apparent geographic barrier. This is based on the apparent

spatial limits of *Cx. p. quinquefasciatus* and *Cx. p. pipiens* populations, with the localization of hybrid mosquitoes occurring between them. Additional studies are needed to demonstrate that this is a true introgression area. *Culex pipiens pipiens* were detected principally in suburban or rural lands and *Cx. p. quinquefasciatus* were detected primarily in urban zones, which has been reported previously [53]. Interestingly, in the Northeast districts of Iztapalapa and Tlahuac, there was no apparent division between the *Cx. pipiens* complex mosquitoes: with *Cx. p. quinquefasciatus*, *Cx. p. pipiens* and hybrids found in the same collection sites (Figure 3).

It has been suggested that hybridization between *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* mosquitoes may have facilitated the rapid spread of West Nile virus in North America [16]. Our studies support the presence of a self-sustaining hybrid population in Mexico City (Figure 2). This is similar to results of previous studies in Colorado [28], California [25,54], and Tennessee [55]. The nature of the hybrid populations in Mexico City requires further study. Microsatellite markers have been used to assess introgression between *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* [56], and this population genetic approach could be used to further define the extent and geographic regions of introgression. It should also be noted that the presence of *Cx. p. pipiens* itself could pose a risk to humans in Mexico City, as there are reports that this species may shift feeding preferences from birds to humans in urban areas during late summer and early fall [57].

Our analyses provide insight into the distribution of *Cx. pipiens* complex mosquitoes in Mexico City. This is important as behavioral differences, such as host-feeding preferences, are important in determining the vectorial capacity of mosquitoes from this complex. This information is necessary for establishing effective surveillance and targeted control programs to prevent or control WNV outbreaks.

## Conclusions

*Culex pipiens pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus* and *Cx. tarsalis* are important vectors for WNV, that occur in Mexico City. Hybrids of *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. quinquefasciatus* were detected by DV/D ratio and molecular analysis. Hybrids were identified during the rainy season from June to October, in an introgression region extending from the northwest to southeast of the city. Clearly, Mexico City has an abundance of competent *Culex* spp. vectors and is at risk for introduction of WNV and epidemic disease. Increased surveillance and effective vector control should be implemented in order to avoid the risk of an epidemic of WNV in this highly populated city.

## Additional material

**Additional File 1: Geographic location of cemeteries and percentage of male mosquitoes obtained**

**Additional File 2: PCR amplification of the Ace-2 gene from two different cemeteries in 2005.** (A) Samples from cemetery "El Calvario" in Cuajimalpa de Morelos borough. All PCR products correspond with the *Cx. p. pipiens* (610 bp) in each month during 2005. (B) Samples from cemetery "Sanctorum" in Miguel Hidalgo borough where the PCR products correspond with *Cx. p. quinquefasciatus* (274 bp) in each month during 2005. (C) Samples from "San Nicolas Tolentino" in Iztapalapa (37-4P) and from "La Concordia" in Cuajimalpa (23-CJ) boroughs where the PCR products correspond with hybrids (610 and 274 bp). Negative controls are indicated as C-Cs.DNA (Culiceta). Positive controls are indicated as C+pip, C+qui and 52-MH2004(C+). 100 bp DNA Ladders are in lines 1 panel A, line 17 panel B and line 1 panel C on the right side; and  $\phi$ X174 DNA/Hae III ladder on panel C left side. Arrows show the bands of 274 bp and 610 bp in all panels.

## Acknowledgements

We wish to thank the Biotechnological Engineer Juan José Alcalá Huerta and the Technician in Biotechnology Karla Balderama Martínez for their assistance in mosquito rearing during the course of these experiments.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ave. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, San Pedro Zacatenco-Gustavo A. Madero, México D.F., C.P. 07360, México. <sup>2</sup>Department of Microbiology, Immunology & Pathology, Colorado State University (CSU), Fort Collins, Colorado, USA. <sup>3</sup>Public Health Laboratory of State of Oaxaca, Km. 18.5 Carr. Oaxaca-Sola de Vega, Reyes Mantecon-Oaxaca de Juárez, C.P. 68000, Oaxaca México. <sup>4</sup>University of Tecamac, Tecamac-Estado de México, México. <sup>5</sup>Genomics Science Program, Autonomous University of Mexico City, Ave. San Lorenzo No. 290, Del Valle-Benito Juárez, C.P. 03100, México. <sup>6</sup>Campamento de Citras Viales, Departamento del Distrito Federal, México D.F., México.

## Authors' contributions

ADB made all mosquito collections, carried out the morphological and molecular analysis of mosquitoes and participated in the writing and discussion of results; BGB and CGM supported molecular analysis confirmation, read and approved the final manuscript; GPR helped to rear the mosquitoes, participated in the writing and discussion of results and assisted with the literature validation; JPNM helped to confirm the morphological mosquito analysis of all collections; AAPV participated in the molecular analysis of the mosquitoes collected; MCN participated in discussion of results; ADP helped to make all mosquito collections; BGB and CGM participated in discussion of results, review of the manuscript, assisted with the literature selection and validation, and proof-read the manuscript; MLM participated in writing, analysis and discussion of results, review the manuscript, assisted with the literature validation and proof-read and assembled the manuscript. All authors participated in the discussion of results and read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 23 February 2011 Accepted: 9 May 2011  
Published: 9 May 2011

## References

1. **Viral hemorrhagic fevers.** [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/sph/mnpages/dspages/vhvf.htm].
2. **Arboviral encephalitides.** [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Arbor/Index.htm].
3. Van den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS. **Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus.** *Annual Review of Entomology* 2009, 54:17-35.
4. **West Nile virus.** [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.htm].
5. Blitvich R. **Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus.** *Annu Rev Entomol* 2008, 53:81-106.
6. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DP, Campbell GL. **Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease.** *Emerg Infect Dis* 2005, 11:1167-1173.
7. Navar JK, Knight JW, Munstemann LE. **Temporal and geographic genetic variation in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Florida.** *J Med Entomol* 2003, 40:882-889.
8. Urbaneles S, Bullini L, Villani F. **Electrophoretic studies on *Culex quinquefasciatus* Say from Africa: genetic variability and divergence from *Culex pipiens* L.(Diptera: Culicidae).** *Bull Entomol Res* 1985, 75:291-304.
9. Vinogradova EB. ***Culex pipiens pipiens* mosquitoes. Taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control.** Moscow: Pensoft Publ; 2000.
10. Anderson JF, Andreadis TG, Vossbrinck CR, Timell S, Wakem EM, French PA, Gammella AE, Van Kruiningen H. **Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crows, and a Cooper's hawk in Connecticut.** *Science* 1999, 286:2331-2333.
11. Bell JA, Mickelson NI, Vaughan JA. **West Nile virus in host-seeking mosquitoes within a residential neighborhood in Grand Forks, North Dakota.** *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2005, 5:373-382.
12. DiMenna MA, Bueno R Jr, Farmeret RR, Norris DE, Sheyba JM, Molina JL, LaBeau EM, Hatten ES, Glass GE. **Emergence of West Nile virus in mosquito (Diptera: Culicidae) communities of the New Mexico Rio Grande Valley.** *J Med Entomol* 2006, 43:594-599.
13. Goddard LB, Roth AE, Reisen WK, Scott TW. **Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus.** *Emerg Infect Dis* 2002, 8:1385-1391.
14. Reisen W, Lathrop H, Chiles R, Madon M, Cossen C, Woods L, Husted S, Kramer V, Edman J. **West Nile virus in California.** *Emerg Infect Dis* 2004, 10:1369-1378.
15. Bernard KA, Maffei JG, Jones SA, Kaulfman EB, Ebel G, Dupuis AP, Ngo KO, Nicholas DG, Young DM, Shi PR, et al. **West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000.** *Emerg Infect Dis* 2001, 7:679-685.
16. Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC, Wilkerson RC. **Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex.** *Science* 2004, 303:1535-1538.
17. Andreadis TG, Armstrong PM, Bajwa W. **Studies on hibernating populations of *Culex pipiens* from a West Nile virus endemic focus in New York City: Parity rates and isolation of West Nile virus.** *J Am Mosq Control Assoc* 2010, 26:257-264.
18. Higgs S, Snow V, Gould EA. **The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: A consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, 98:82-87.
19. Pesko K, Mores CN. **Effect of sequential exposure on infection and dissemination rates for West Nile and St. Louis encephalitis viruses in *Culex quinquefasciatus*.** *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2009, 9:281-286.
20. Turell MJ, Presley SM, Gad AM, Cope SE, Dohm EJ, Morrill JC, Arthur RR. **Vector competence of Egyptian mosquitoes for Rift Valley fever virus.** *Am J Trop Med Hyg* 1996, 54:136-139.
21. Weng MH, Lien JC, Lin CC, Yao CW. **Vector competence of *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) from Taiwan for a sympatric strain of Japanese encephalitis virus.** *J Med Entomol* 2000, 37:780-783.
22. Evans BR, Joyce CR, Porter JE. **Mosquitoes and other arthropods found in baggage compartments of international aircraft.** *Mosq News* 1963, 23:9-12.
23. Goh KT, Ng SK, Kumarapathy S. **Disease-bearing insects brought in by international aircraft into Singapore.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1985, 16:49-53.
24. Estrada-Franco JG, Navarro-Lopez R, Hensley DW, Coffey L, Canales AS, Travassos da Rosa A, Clements T, Wang E, Ludwig GV, Gomes AC, et al. **West Nile virus in Mexico: Evidence of widespread circulation since July 2002.** *Emerg Infect Dis* 2003, 9:1604-1607.
25. Corniel AJ, McAbee RD, Reason J, Stanich MA, Scott TW, Goertzel M. **Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa.** *J Med Entomol* 2003, 40:26-31.
26. Barr AR. **The distribution of *Culex p. pipiens* and *Culex p. quinquefasciatus* in North America.** *Am J Trop Med Hyg* 1957, 6:153-165.

27. Sanogo YO, Kim CH, Lampman R, Halvorsen JG, Gad AM, Novak RJ: **Identification of male specimens of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in the hybrid zone using morphology and molecular techniques.** *J Med Entomol* 2008, **45**:203-209.
28. Aspen S, Savage HM: **Polymerase chain reaction assay identifies North American members of the *Culex pipiens* complex based on nucleotide sequence differences in the acetylcholinesterase gene *Ace2*.** *J Am Mosq Control Assoc* 2003, **19**:323-328.
29. Bahnt CM, Fonseca DM: **Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**:251-255.
30. Smith JL, Fonseca DM: **Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae).** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **70**:337-345.
31. Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F: **World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated.** *Meteorol Z* 2006, **15**:259-264.
32. **Estadísticas de población en México.** [http://72.52.156.225/Estudio.aspx?Estudio=estadísticas-poblacion-mexico].
33. **Situación demográfica de la Ciudad de México.** [http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com\_content&view=article&id=301&Itemid=418].
34. McAbee RD, Green EN, Holeman J, Christiansen J, Frye N, Dealey K, Mulligan FS, Brault AC, Cornel AJ: **Identification of *Culex pipiens* complex mosquitoes in a hybrid zone of West Nile virus transmission in Fresno County, California.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**:303-310.
35. Sundararaman S: **Biometrical studies on intergradation in the genitalia of certain populations of *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* in the United States.** *Am J Epidemiol* 1949, **50**:307-314.
36. García-Franco F, Muñoz Mde L, Lozano-Fuentes S, Fernández-Salas I, García-Rejón J, Besty B, Black WC: **Large genetic distances among *Aedes aegypti* populations along the South Pacific coast of Mexico.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:594-598.
37. Kulasekera VL, Kramer L, Nasci RS, Mostashari F, Cherry B, Trock SC, Glaser C, Miller JR: **West Nile virus infection in mosquitoes, birds, horses, and humans, Staten Island, New York, 2000.** *Emerg Infect Dis* 2001, **7**:722-725.
38. Mallinson M, Banet C: **The role of birds in the ecology of West Nile virus in Europe and Africa.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **267**:309-322.
39. Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP, Zeller H: **West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years.** *Emerg Infect Dis* 2001, **7**:692-696.
40. Hannoun C, Comiou B, Mouchet J: **Role of migrating birds in arbovirus transfer between Africa and Europe.** In *Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses*. Edited by: Cherepanov AI. Novosibirsk, Russia: Nauka; 1972:167-172.
41. Rappole JH, Derrickson SR, Hubalek Z: **Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere.** *Emerg Infect Dis* 2000, **6**:319-328.
42. **2010 West Nile Virus Human Infections in the United States (Reported to CDC as of December 14, 2010).** [http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/surv&controlCaseCount10\_detailed.htm].
43. **Anuarios de Morbilidad.** [http://www.dgeps.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html].
44. Ríos-Ibarra C, Blitvich B, Farfán-Ale J, Ramos-Jiménez J, Muro-Escobedo S, Martínez-Rodríguez H, Ortiz-López R, Torres-López E, Rivas-Estilla A: **Fatal human case of West Nile disease, Mexico, 2009.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**:741-742.
45. Elizondo-Quiroga D, Davis CT, Fernández-Salas I, Escobar-López R, Olmos DM, Gastalum LCS, Acosta MA, Elizondo-Quiroga A, González-Rojas JI, Cordero JFC: **West Nile virus isolation in human and mosquitoes, Mexico.** *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1449-1452.
46. Rodríguez ML, Rodríguez DR, Blitvich BJ, López MA, Fernández-Salas I, Jiménez JR, Farfán-Ale JA, Tamez RC, Longoria CM, Aguilar MI, Rivas-Estilla AM: **Serologic surveillance for West Nile virus and other flaviviruses in febrile patients, encephalitic patients, and asymptomatic blood donors in northern Mexico.** *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, **10**:151-157.
47. Murgue B, Zeller H, Deubel V: **The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe and Asia.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2002, **267**:195-221.
48. Russell RC: **Survival of insects in the wheel bays of a Boeing 747B aircraft on flights between tropical and temperate airports.** *Bull World Health Organ* 1987, **65**:659-662.
49. **Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México.** [http://www.aeropuertomexico.com/content/view/full/446/521/].
50. Humeres SG, Almirón WR, Sabatini M, Gardinal CN: **Estimation of genetic divergence and gene flow between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, **93**:57-62.
51. Urbanelli S, Silvestrini F, Sabatinelli G, Havelaariferia F, Petrarca V, Bullini L: **Characterization of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in Madagascar.** *J Med Entomol* 1995, **32**:778-786.
52. Vezzani D: **Artificial container-breeding mosquitoes and cemeteries: A perfect match.** *Trop Med Int Health* 2007, **12**:299-313.
53. Huang S, Molaei G, Andreadis TG: **Genetic insights into the population structure of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Northeastern United States by using microsatellite analysis.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **79**:518-527.
54. Tabachnick WJ, Powell JR: **Genetic analysis of *Culex pipiens* populations in the Central Valley of California.** *Ann Entomol Soc Am* 1983, **76**:715-720.
55. Jakob WL, Taylor SA, Francy DB: **Additional studies of male progeny of overwintering *Culex pipiens* complex mosquitoes from Memphis, Tennessee.** *Mosq Systemat* 1980, **12**:386-391.
56. Kothera L, Zimmerman EM, Richards CM, Savage HM: **Microsatellite characterization of subspecies and their hybrids in *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) mosquitoes along a north-south transect in the central United States.** *J Med Entomol* 2009, **46**:236-248.
57. Reisen WK, Thiemann T, Barker CW, Lu H, Carroll B, Fang Y, Lothrop HD: **Effects of warm winter temperature on the abundance and gonotrophic activity of *Culex* (Diptera: Culicidae) in California.** *J Med Entomol* 2010, **47**:230-237.

doi:10.1186/1756-3305-4-70

Cite this article as: Diaz-Badillo et al: The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasites & Vectors* 2011 **4**:70.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 19 de Agosto del 2011, en la Ciudad de México, Distrito Federal, para optar al Grado de Doctor en Ciencias Genómicas, al M. en C. Alvaro Diaz Badillo.

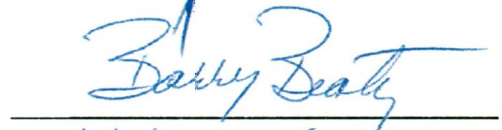
Dra. Maria de Lourdes Muñoz Moreno



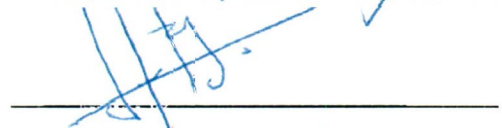
Dra. Minerva Camacho Nuez



Dr. Barry J. Beaty



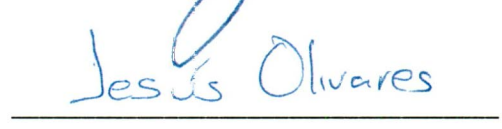
Dr. Ildelfonso Fernandez Salas



Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga



Dr. José de Jesús Olivares Trejo





Este trabajo se termino de imprimir  
y empastar en C&T Group



Av. Instituto Politécnico Nacional 1905  
Col. Lindavista México D.F.  
51-19-59-39  
55-86-50-03