

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación de los isótopos estables no radioactivos Carbono 13

(C<sup>13</sup>) y Nitrógeno 15 (N<sup>15</sup>) para marcaje de *Aedes (Stegomyia)*

*aegypti* (Diptera: Culicidae)

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por

Sofía del Carmen Cabañas Moscoso

para optar al grado académico de Licenciada en Biología

Guatemala

2019

Evaluación de los isótopos estables no radioactivos Carbono 13  
(C<sup>13</sup>) y Nitrógeno 15 (N<sup>15</sup>) para marcaje de *Aedes (Stegomyia)*  
*aegypti* (Diptera: Culicidae)

Vo. Bo:

(1)

M. Sc. José Guillermo Juárez

Tribunal Examinador:

(1)

M. Sc. José Guillermo Juárez

(1)

Dra. Pamela Pennington

(1)

M. Sc. Gabriela Alfaro

Fecha de aprobación: Guatemala, 27 de junio del 2019

## AGRADECIMIENTOS

Primero debo dar gracias a Dios por haberme acompañado y haberme brindado fortaleza para seguir adelante durante todo el proceso de este trabajo.

Son varias las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. Agradezco a mis padres: Magda Fabiola Moscoso de Cabañas y Willy Ricardo Cabañas Villagrán, por inculcarme a lo largo de mi vida valores imprescindibles como responsabilidad, educación y dedicación. Por haber financiado no solo mis estudios académicos, sino también la totalidad del viaje internacional de vital importancia para la realización de la presente investigación. Este trabajo no existiría sin ellos.

Agradezco a M.Sc José “Willy” Juárez, por ser el asesor principal de este trabajo. Por su paciencia y apoyo en el análisis de datos, correcciones del protocolo y trabajo final, desarrollo de la metodología, interpretación de resultados y la realización presentación final. Por exigirme dar un poco más, para así poder mejorar indiscutiblemente mis habilidades para la investigación científica. Le agradezco también por velar incondicionalmente por mi persona en el viaje a Weslaco y compartir conmigo conocimientos científicos y consejos de vida para una futura bióloga.

A la Dra. Pamela Pennington, por su asesoría en esta investigación; en especial, por ponerme en contacto con mi asesor principal, por darme las ideas que conllevaron a desarrollar este trabajo de investigación y por confiar en mí.

A mi directora de carrera, M.Sc Gabriela Alfaro, por confiar también en mi potencial académico, por sus oportunos consejos y por alentarme, no solo durante todo el proceso de tesis, sino también durante mi carrera como estudiante.

Por último, aunque no menos importante, agradezco también a Magda Odette Moscoso Arriola “Abuelita Ely”; quien, a pesar de estar enfrentando sus últimos días de vida, siempre estuvo pendiente de los avances de mi tesis, hasta la culminación de mi examen final.

A la Universidad de Texas A&M y al centro de estudios de investigación AgriLife Research Center por prestar sus instalaciones, proporcionar todo material biológico y de laboratorio necesario. Agradezco con especial cariño, a todo el equipo de investigación de entomología de AgriLife Research Center, por acompañarme con mi trabajo de campo y laboratorio. Siempre les agradeceré su amistad y el haber hecho de mi viaje a Weslaco, más que solo una pasantía, una experiencia de vida.

A la Universidad del Valle de Guatemala, sus autoridades y mis estimados profesores por abrirme un camino de oportunidades a través del conocimiento.

# ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>I.</b> Introducción.....	1
<b>II.</b> Antecedentes.....	2
A. Biología y ecología de <i>Aedes aegypti</i> .....	2
1. Ciclo de vida.....	2
2. Dieta larval para <i>Ae. aegypti</i> .....	3
3. Morfología del adulto.....	4
4. Ecología.....	5
5. Métodos de monitoreo y control entomológico.....	8
6. Herramientas de marcaje para mosquitos .....	10
B. Isótopos estables no radioactivos.....	12
1. Medición y cuantificación.....	14
2. Carbono 13 (C <sup>13</sup> ).....	15
3. Nitrógeno 15 (N <sup>15</sup> ).....	16
<b>III.</b> Justificación.....	17
<b>IV.</b> Objetivos .....	19
A. Objetivo general .....	19

B.	Objetivos específicos .....	19
<b>V.</b>	Hipótesis.....	20
<b>VI.</b>	Metodología.....	21
A.	Sujeto de estudio .....	21
B.	Diseño de investigación.....	21
C.	Criterios de exclusión .....	21
D.	Instrumentos de medición .....	22
E.	Técnicas de investigación .....	22
1.	Prueba experimental 1.....	22
2.	Prueba experimental 2 .....	26
3.	Prueba experimental 3 .....	28
4.	Análisis con Espectrofotometría de masa.....	30
F.	Plan de análisis de resultados .....	31
1.	Hipótesis 1.....	31
2.	Hipótesis 2.....	31
G.	Ética y bioseguridad .....	32
<b>VII.</b>	Resultados.....	33
A.	Objetivo 1: .....	33
B.	Objetivo 2: .....	34
C.	Objetivo 3: .....	38
<b>VIII.</b>	Discusión de resultados.....	41
A.	Objetivo 1: .....	41
B.	Objetivo 2: .....	42
C.	Objetivo 3: .....	44
<b>IX.</b>	Conclusiones y recomendaciones.....	47

<b>X.</b>	Literatura citada.....	49
<b>XI.</b>	Anexos.....	57

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Cuadro No. 1: Radios para los materiales de referencia usados para las escalas de delta.....	15
2. Cuadro No. 2: Medias y error estándar de las cantidades de isótopos $C^{13}$ de los mosquitos enriquecidos con diferentes concentraciones.....	33
3. Cuadro No. 3: Medias y error estándar de las cantidades de isótopos en las muestras, medidas durante 60 días.....	35
4. Cuadro No. 4: Resultados de la prueba de T de Student de la dietas de enriquecimiento individuales y dual .....	36
5. Cuadro No. 5: Medias y largo de las alas de los tres enriquecimientos y resultados de la prueba de Dunn.....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Figura No. 1. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .....	3
2. Figura No. 2. Características morfológicas de <i>Ae. aegypti</i> .....	5
3. Figura No. 3. Actual distribución potencial para <i>Ae. aegypti</i> .....	6
4. Figura No. 4. Distribución predicha para <i>Ae. aegypti</i> para el 2030, con base a datos climáticos.....	7
5. Figura No. 5. Marcaje de mosquito adulto con polvo fluorescente.....	12
6. Figura No. 6. Diagrama de un átomo de $C^{13}$ .....	16
7. Figura No. 7. Diagrama de un átomo de $N^{15}$ .....	16
8. Figura No. 8. Cuatro bandejas enriquecidas con diferentes dosis de concentraciones.....	23
9. Figura No. 9. Colocación de papeles en bandejas.....	24
10. Figura No. 10. Larvas L4 alimentándose .....	25
11. Figura No. 11. Jaula de emergencia con pupas.....	25
12. Figura No. 12. Caja utilizada para guardar tubos eppendorf con las muestras de mosquitos en el congelador .....	26
13. Figura No. 13: Bandejas con zacate para la crianza de larvas .....	27
14. Figura No. 14. Caja con mosquitos donde se almacenaron las muestras.....	27
15. Figura No. 15. Mosquitos colectados para disección de alas.....	28
16. Figura No. 16. Portaobjetos con 8 alas disectadas, dispuestas en la misma posición para medición en el microscopio.....	29
17. Figura No. 17. Medición de alas a través del microscopio.....	30
18. Figura No.18. Concentraciones del isótopo estable $C^{13}$ de la prueba experimental 1: concentraciones variadas del isótopo $C^{13}$ .....	34
19. Figura No. 19. Persistencia del isótopo estable $C^{13}$ y $N^{15}$ y la mezcla de ambos durante 60 días .....	37
20. Figura No. 20: Diagrama de caja y bigotes según las longitudes en mm de las alas derechas de los machos .....	40

## RESUMEN

Los isótopos estables son átomos de un mismo elemento que tienen un número de neutrones distinto al número de protones, debido a esta diferencia en peso molecular su identificación es fácilmente detectable. Estos ocurren naturalmente, no emiten radiación y tienen la capacidad de bioacumularse dentro de organismos. Estas propiedades los convierten en una útil herramienta para ser utilizados en el marcaje de distintos organismos. Los isótopos estables han sido utilizados en estudios de marcaje liberación y recaptura para observar dispersión de una gran variedad de familias de artrópodos.

El presente estudio se enfocó en evaluar, en condiciones de laboratorio, una dieta larval para *Aedes aegypti* enriquecida con dos isótopos estables: Carbono 13 ( $C^{13}$ ) y Nitrógeno 15 ( $N^{15}$ ). La metodología de marcaje consistió en emplear una dieta de zacate enriquecida con isótopos durante el desarrollo larval de mosquitos. Durante este estudio se evaluaron cuatro distintas concentraciones de  $C^{13}$  en la identificación positiva de adultos de *Ae. aegypti*. Se analizó si existe degradación de isótopos con marcaje individual ( $C^{13}$  y  $N^{15}$ ) y un marcaje dual ( $C^{13} + N^{15}$ ) en los mosquitos después de ocho semanas de la eclosión de las pupas. Se determinó mediante una prueba de Kruskal-Wallis si alguno de estos enriquecimientos tenía un efecto en el desarrollo fisiológico del mosquito, utilizando el largo de las alas de adultos machos como parámetro del desarrollo morfológico.

Se identificó por medio de una prueba de T de Student que el enriquecimiento de adultos de *Ae. aegypti* con un marcaje individual y dual mantienen niveles detectables de isótopos hasta 60 días luego del enriquecimiento. Se encontró que una concentración de 0.00035gr/L del isótopo  $C^{13}$  es detectable en los mosquitos, lo que sugiere una reducción en la dosis actual utilizada para enriquecimiento de mosquitos: 0.002gr/L. Se determinó que el enriquecimiento individual de adultos con los isótopos  $C^{13}$  y  $N^{15}$  no tienen efecto en la longitud de las alas de los adultos machos, comparados con mosquitos control no enriquecidos. Sin embargo, se observó que el enriquecimiento dual ( $C^{13} + N^{15}$ ) obtuvo una media de longitud de alas menor a las del control ( $x_{\text{dual}} = 2.083$  y  $x_{\text{control}} = 2.230$   $p=0.025$ ) y se recomienda agregar algún contenido nutricional adicional. La implementación de isótopos estables en la dieta de mosquitos permite la identificación certera de dichos organismos y su implementación en experimentos de marcaje-liberación y recaptura.

## ABSTRACT

Stable isotopes are atoms of the same element with a different number of neutrons and protons; due to this difference in the molecular weight their identification is easily detectable. Stable isotopes occur naturally, they do not emit radiation and have the capacity to bioaccumulate within organism. They have been adapted to many biological studies like mark-release recapture studies, which investigate the dispersion of several families of insects such as the Culicidae family.

This study focused on evaluating a larval diet for *Aedes aegypti* enriched with two stable isotopes: Carbon 13 ( $^{13}\text{C}$ ) and Nitrogen 15 ( $^{15}\text{N}$ ), under laboratory conditions. The labeling methodology consisted in using a hay larval diet, enriched with the stable isotopes to enrich the mosquito larvae. During this study, four different concentrations of  $^{13}\text{C}$  were evaluated to test the positive identification of adults *Ae. aegypti*. It was analyzed if there exists a degradation of any of the isotopes with individual labeling ( $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  separately) and a dual labeling ( $^{13}\text{C}$  plus  $^{15}\text{N}$ ) in mosquitoes. It was determined by a Kruskal-Wallis test, if any of these enrichments influenced the physiological development of the mosquito, the length of the wings of male adults was used as a parameter of morphological development.

By applying a Student T test, it was identified that the enrichment of adults *Ae. aegypti* with an individual and dual labeling maintained detectable level of isotopes up to 60 days after the enrichment. It was also determined that individual enrichment of adults with  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  isotopes has no effect on the length of the wings of male adults, in comparison with unmarked control mosquitoes. However, it was observed that the dual enrichment ( $^{13}\text{C}$  plus  $^{15}\text{N}$ ) obtained an average length of wings shorter than those of the control (dual  $x = 2,083$  and  $x_{\text{control}} = 2,230$   $p = 0.025$ ), so it is recommended to add some additional nutritional content to the larval diet. These experiments demonstrate that the implementation of stable isotopes in the mosquito diet allows the accurate identification of these organisms and their implementation in mark-release-recapture studies.

# I. INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* es el vector principal para enfermedades arbovirales como dengue, zika y Chikungunya, las cuales están muy extendidos en áreas tropicales (OMS 2018). Una de las problemáticas más graves de estas tres enfermedades es que ninguna de estas infecciones poseen tratamientos específico, solamente pueden aliviarse los síntomas y se debe hacer un seguimiento riguroso a los pacientes (División Zoonosis, Reservorio y Vectores. 2016).

Otro factor alarmante que constituyen estas enfermedades es el incremento de su incidencia a nivel mundial en las últimas décadas. En el 2016, se produjo un brote de dengue a nivel mundial, en el cual se reportaron, solo en América, 2.38 millones de casos de infección. A pesar de que disminuyeron en el 2017, han aumentado de nuevo, en el 2019 (OMS 2018). Por ende, surge la necesidad de conocer la etiología y ecología de la especie *Aedes aegypti*, en regiones en riesgo de transmisión vectorial con el fin de apoyar a los programas de control en caso de un brote epidémico. Por estas razones los estudios de marcaje liberación y recaptura han sido esenciales para mejorar los programas de control en caso de un brote epidémico. Es por ello que los estudios de marcaje liberación y recaptura han sido esenciales para mejorar nuestro entendimiento de como los mosquitos se dispersan (Conway *et al.* 1974, Marini *et al.* 2010).

Tradicionalmente, el marcaje de mosquitos es realizado mediante la implementación de polvos o tintes fluorescentes que conllevan efectos negativos en la capacidad de reproducción y longevidad de los adultos marcados (HAMER *et al.* 2012). Por lo que la implementación de isótopos estables como un medio de marcaje podría mejorar los estudios de dispersión si se determina una metodología adecuada para el enriquecimiento de organismos bajo condiciones de laboratorio.

## II. ANTECEDENTES

### A. **Biología y ecología de *Aedes aegypti***

La especie *Aedes aegypti* son insectos pertenecientes al filo Arthropoda, Clase Insecta, Orden Díptera, Familia Culicidae; Tribu Aedini, Género *Aedes* y Subgénero: *Stegomyia* (Wilkerson *et al.* 2015). Aunque son nativos del continente africano, fueron diseminados en América por medios antropogénicos (Marquetti Fernández, Bisset Lazcano 2008). Su ciclo biológico atraviesa por cuatro estadios principales: huevos, larvas, pupas y mosquitos adultos. Las etapas inmaduras son acuáticas y los adultos terrestres. Las hembras adultas de copular se alimentan de sangre en específico de humanos para el desarrollo de los huevos e inducir oviposición (Nelson 1986, Balta, 1997). Otra característica biológica importante es la resistencia a la desecación que tienen los huevos de *Ae. aegypti*; estos son capaces de sobrevivir varios meses en ambientes sin agua (Juliano y Lounibos 2005). Las variaciones en la distribución de este vector se rigen según la temperatura y por la presencia de poblaciones humanas (Slosek 1986).

#### 1. **Ciclo de vida:**

Este se completa entre cinco a diez días; dependiendo de las condiciones ambientales como temperatura y humedad (Imam *et al.* 2014). Al momento de la oviposición, los huevos son blancos y de un milímetro de largo, pero cuando el endocorión (el cascarón del huevo) se seca produce eumelanina lo cual genera el cambio en la coronación del huevo a negro (Ver Figura 1 a) (Clements 1992). Los huevos son capaces de soportar condiciones de desecación y temperaturas elevadas hasta doce meses y al entrar en contacto con agua a una temperatura está entre  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  eclosionan (Gadelha y Toda, 1985, Gustavo L. Rezende 2017). Luego de la eclosión, sigue la etapa larval, que se divide en cuatro estadios (L1, L2, L3 y L4). Las larvas en promedio medirán un milímetro como L1, de dos a tres mm como L2, siete mm como L3 y hasta diez mm como L4. Su etapa larval durará de 5 a siete días aproximadamente, dependiendo si la temperatura se mantiene en  $27^{\circ}\text{C}$  y la humedad cerca del 70% (Ote & Kanuka 2018). Si estas condiciones se mantienen y la nutrición es favorable estas llegarán ser pupas (Figura 1c).

Las pupas entre cinco a siete días (Figura 1c) no se alimentan y les toma entre dos y tres días para que el adulto emerja. El adulto recién emergido se posará por varias horas para permitir el endurecimiento del exoesqueleto (Balta 1997, Marquetti 2008).



**Figura 1:** Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. a) Huevos de *Ae. aegypti* sin eclosionar b) Larvas de mosquitos c) Pupa hembra etapa acuática d) Mosquito hembra adulto.

## 2. Dieta larval para *Ae. aegypti*:

Las larvas en condiciones de campo se alimentan principalmente de fitoplancton, principalmente las clases Cyanophyceae y Chlorophyceae. Esto, al igual que factores abióticos (temperatura y humedad), determinan no solo el crecimiento de la larva sino el desarrollo de los adultos (Sánchez 2015 , Souza *et al.* 2019). Para las larvas de *Ae. aegypti* criadas en laboratorio, existe una amplia variedad de suplementos alimenticios que se recomiendan como dietas larvales, estas se dividen en las siguientes categorías:

- a. Proteína animal: sangre seca, hígado o camarones en polvo, leche descremada.
- b. Carbohidratos y sus derivados: pan triturado, harina de trigo o soya en polvo.

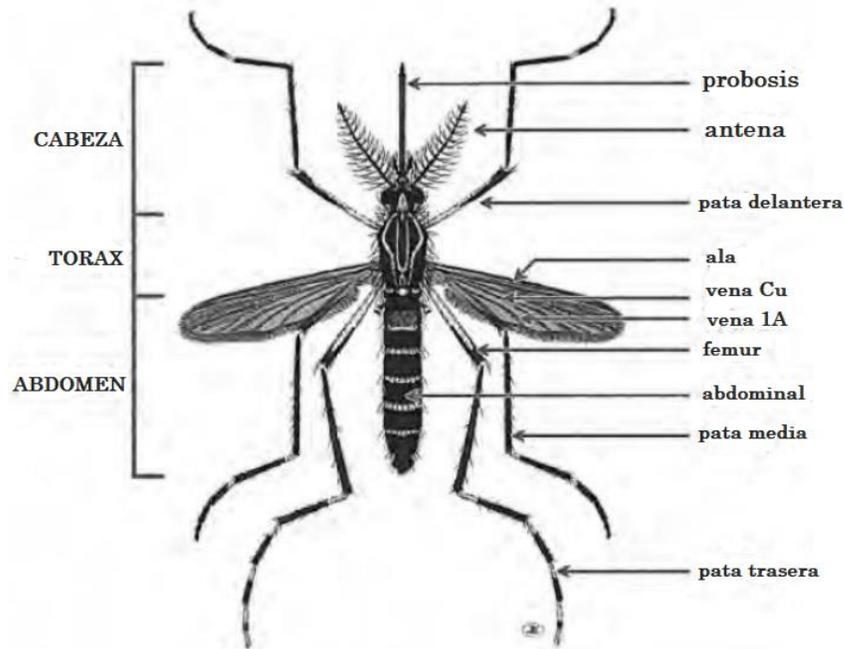
- c. Dieta artificial: esta incluye productos alimenticios para distintos animales (generalmente mascotas) como comida de peces, comida o galletas para perros o concentrado para conejos.
- d. Levadura: esta puede ser levadura para hornear o de cerveza.
- e. Infusiones: estas son una especie de caldo, que se preparan dejando reposar algún material (usualmente alguna hierba o zacate fresco) en agua. Para las larvas de *Ae. aegypti* es común usar infusiones de heno o gramas.
- f. Otros: hay otras opciones menos comunes como heces de conejillos de india.

(Asahina 1964, Imam *et al.* 2014)

Cualquiera de estos puede ser empleado en una crianza de laboratorio, según conveniencia. Estos suplementos aportan carbohidratos, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas. Además, ciertos microorganismos, como bacterias aeróbicas complementan la dieta de las larvas (Asahina 1964).

### **3. Morfología del adulto:**

*Ae. aegypti* es de coloración oscura y tiene unas escamas blanco-plateadas en sus patas y otras escamas plateadas sobre el tórax con forma de lira. (Figura 2). Posee dos líneas paralelas de la cabeza, que se doblan casi legando al escutelo; esta es la característica que los diferencia de: *Aedes albopictus* y otras especies del género *Aedes*. En sus alas generalmente se observa un lunar blanco en la base de la costa (Nelson 1986).



**Figura 2:** Características morfológicas de *Ae. aegypti*  
(Kaunang *et al.* 2014)

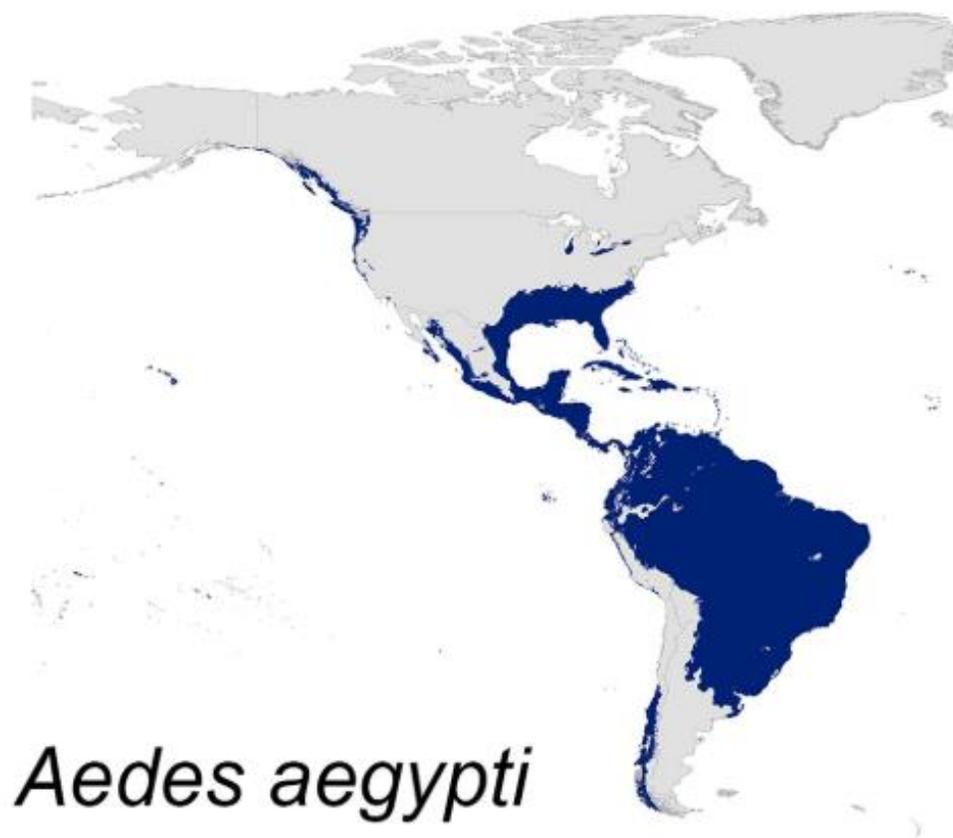
#### 4. **Ecología:**

*Ae. aegypti* puede encontrarse en áreas urbanas y también suburbanas, en especial en domiciliarios cerca de áreas industriales. Este es el nicho ecológico de la especie debido a la disponibilidad de recursos necesarios para su supervivencia y reproducción; por ejemplo: sitios óptimos para ovipostura, crianza de larvas y alimento (Carbajo *et al.* 2006). La distribución del *Ae. aegypti* no solo tiene una correlación con las áreas urbanas sino también con poblaciones con bajas condiciones socioeconómicas. La expansión urbana favorece la expansión de este mosquito. Diversos estudios plantean que la especie muestra nuevos patrones de desplazamiento y que existe un incremento en su abundancia (Rey & Lounibos 2015).

##### a. Distribución en el continente americano:

*Ae. aegypti* es originaria de África y se cree que llegó al continente americano durante los siglos XV al XVI a bordo de barcos que transportaban esclavos. La especie se adaptó exitosamente a las áreas tropicales, subtropicales y algunas regiones templadas (Powell y Tabachnick 2013, Rey & Lounibos 2015).

En el siglo XX, el mosquito se localizaba desde el sur de los Estados Unidos (Florida y Texas principalmente) hasta Buenos Aires, Argentina. A pesar de los esfuerzos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) durante los años 50' para erradicar la presencia del vector, *Ae. aegypti* expandió su distribución en América desde 1980 y con ella avanzó la infección del dengue en América (Evia, 2014). En la actualidad, se encuentra en todos los países de América, con excepción de Canadá (Montes, 2001). Por otro lado, en Sudamérica la especie se encuentra en todo el continente. En Norteamérica, se encuentra por el sureste de los Estados Unidos (Ver Figura 3)

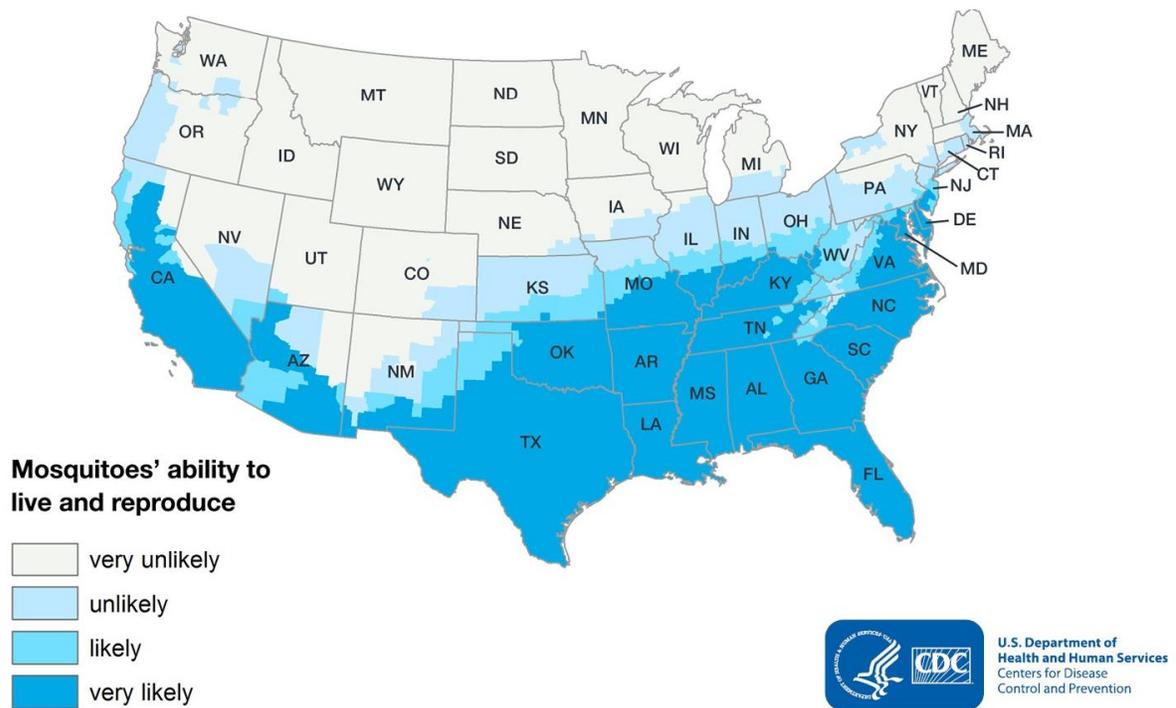


**Figura 3:** Actual distribución potencial para *Ae. aegypti*, con base a las condiciones climáticas actuales. El área azul es óptima para *Ae. aegypti* (Kamal *et al.* 2018).

b. Distribución en Estados Unidos:

Se cree que las especies *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* llegaron a los Estados Unidos a partir del siglo XVII. Estas especies han causado brotes de virus del dengue en dicho país (Eisen and

Moore 2013). También se les atribuye la aparición de casos de chikunguya en el 2013 y en el 2015, de pacientes infectados con el virus del Zika. Debido a esto ha crecido el interés en la realización de monitoreos de estos culícidos. Según los resultados de dichos esfuerzos, el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) publicó en el 2017 un mapa (Figura 4), mostrando los estados en que se ha hallado presencia de *Ae. aegypti*. Se debe aclarar que dicha Figura 4 explica la cantidad de mosquitos encontrados en dichos estados, ni el riesgo de transmisión de infecciones virales; solamente las regiones dónde se han encontrado individuos de *Ae. aegypti* (Hahn *et al.* 2016).



**Figura 4:** Distribución estimada del rango de distribución de *Ae. aegypti* en Estados Unidos (Tomado de: CDC, 2017. Adaptación de: Johnson, 2017).

Este estudio realizó una recopilación de archivos de datos de presencia de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* de 1995 a 1999. Durante estos años, *Ae. aegypti* se encontraba en once regiones incluidas Arizona, Texas y Florida. Mientras que para el 2004, el número de regiones incrementó a 80, alcanzando la ciudad de Washington DC. Cinco años después, el mosquito se encontraba en 29 regiones adicionales. En el 2016, se hicieron colectas en estados geográficamente aislados como Colorado, Kansas y Michigan; el número total de

regiones fue de 183. A pesar de su distribución y abundancia en diferentes regiones, la transmisión vectorial de enfermedades como el dengue y Zika han sido esporádicas debido a factores como clima, la presencia de contenedores artificiales de agua y factores sociales locales.

La transmisión vectorial de dengue ha sido registrada solamente en Florida, Hawaii y Texas durante el 2009. En el caso de Zika solamente Florida y Texas reportan transmisión vectorial. Los casos de Tejas solamente se han registrado en el territorio conocido como la Región Baja del Río Grande que se encuentra en la frontera entre México y Estados Unidos (CDC 2017).

Evaluar la distribución de *Ae. aegypti* en Estados Unidos está recibiendo atención significativa debido a la expansión de la especie. Esto se debe al cambio climático y extensión de áreas urbanas, muchos vectores son capaces de expandir su rango de latitudes y altitudes. *Ae. aegypti* posee una gran abundancia en el sureste de los Estados Unidos. A pesar de su abundancia, el que se den brotes de enfermedades transmitidas por picaduras de mosquito no necesariamente está relacionada con la abundancia de sus vectores. Por ejemplo, en los últimos 50 años los casos de esta fiebre se han vuelto escasos a pesar del incremento de *Ae. aegypti* en la región de Texas (Peper *et al.* 2017). A pesar de esto, el brote del virus del Zika ha llamado la atención significativamente en este estado por su rápida emergencia a inicios del 2016. Por lo tanto, instituciones como el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) están realizando esfuerzos por entender la dispersión y la ecología de *Ae. aegypti*; para encontrar la dinámica de transmisión de esta enfermedad (Reiter *et al.* 2003).

## **5. Métodos de monitoreo y control entomológico:**

Las estrategias actuales de control de mosquitos se enfocan en la reducción de sitios de cría y la reducción de su población adulta poblaciones. Entre estas estrategias se puede mencionar, por ejemplo, el rociar insecticidas dentro de las viviendas o el uso de pastillas fumígenas (Licastro *et al.* 2010). A pesar de su aceptación por parte de las comunidades, existen otros estudios realizados en países como Cuba, México, El Salvador y Venezuela en los que se reporta la resistencia de algunas poblaciones de *Ae. aegypti* a insecticidas o larvicidas (Álvarez *et al.* 2006, Lazcano *et al.* 2009, Rodríguez *et al.* 2010).

a. Técnica del Insecto Estéril:

Por a la creciente resistencia a insecticidas por parte de insecticidas se han elaborado métodos de control vectorial como mosquitos estériles genéticamente modificados. Una estrategia para control de plagas muy importante, que se ha ido expandiendo recientemente, la Técnica del Insecto Estéril o SIT (por sus siglas en inglés: Sterile Insect Technique), es un método de control vectorial el cual puede hacer uso de los isótopos estables. La técnica SIT funciona como un control de natalidad sobre una población deseada, la cual es reducida al prevenir que las hembras copuladas tengan una progenie viable (Klassen & Curtis 2005). Como sus siglas lo denominan, esta técnica ha sido implementada para control de plagas de varios tipos de artrópodos como coleópteros, lepidópteros y dípteros y se ha comprobado ser exitoso en la erradicación de plagas (Hood-Nowotny *et al* 2016; Klassen & Curtis 2005; Tobin *et al.* 2014).

La primera prueba piloto se realizó entre 1951 a 1953 en la costa de Florida, en la cual se liberaron moscas Tsé Tsé (*Drosophila*), estériles y marcadas. En promedio se logró recapturar treinta y nueve machos por área (Mastrangelo & Walder 2011). Aunque en esta prueba se marcaron las moscas con P<sup>32</sup>, los isótopos estables son los más ampliamente usados como herramientas de rastreo cuando se aplica esta técnica, evadiendo así, los problemas que presentan métodos de marcaje como la aplicación de radiación gamma, comúnmente utilizada para rastrear mosquitos en la década de 1990 (IAEA 2009).

b. Estudios de marcaje-liberación y recaptura:

Esta metodología consiste en marcar un grupo de individuos, liberarlos en campo y luego realizar esfuerzos de muestreo en un área y rango de tiempo delimitado para encontrar estos individuos marcados. Su objetivo es proveer información sobre la dispersión de los individuos, tamaño poblacional, ciclos reproductivos, tasas de supervivencia o patrones de alimentación, entre otros (Silver 2008). En el caso de los insectos, los estudios de marcaje-liberación y recaptura no se realizan solamente por recolectar datos fundamentales sobre su dispersión sino también con el objeto de predecir posibles nichos ecológicos y prevenir plagas (Osborne y Loxdale, 2002).

Sin embargo, este tipo de metodología de investigación se dificulta para el estudio de insectos por debido a su tamaño pequeño, sus ciclos de vida (usualmente cortos), diversidad de mecanismos de vuelo y por su capacidad de volar largas distancias (Hagler & Jackson 2001). Además, el proceso de crianza y marcaje de varios individuos puede afectar comportamiento el comportamiento de estos individuos en comparación de con las de campo (Reisen *et al.* 2003). A pesar de esto, estas limitaciones pueden superarse con el desarrollo de herramientas de marcaje adecuadas y elección adecuada.

Antiguamente, los métodos de marcaje recurridos para un estudio de marcaje-liberación y recaptura eran: mutilación, etiquetado y marcaje directo. El primero consiste en la amputación de alguna extremidad del animal, método que no se recomienda por ser demasiado invasivo y afectar el comportamiento (Gangwere *et al.*, 1964). El etiquetado consiste en pegar una etiqueta al insecto, aunque también es poco recomendado para insectos muy pequeños por afectar su etiología natural también. El marcaje directo involucra varias herramientas como polvos o tintes y son los más utilizados en la actualidad (Walker y Wineriter, 1981). El marcador más adecuado para un estudio de marcaje-liberación y recaptura dependerá de la especie a marcar, el ambiente en el que se encontrará el insecto y el objetivo del estudio. Se recomienda realizar una investigación previa y tomar en cuenta estos factores antes de elegir un marcador (Hagler & Jackson 2001).

## **6. Herramientas de marcaje para mosquitos:**

Las herramientas de marcaje para estudios de marcaje-liberación y recaptura que deben cumplir con ciertas características para ser consideradas eficientes; por ejemplo: tener una buena capacidad de retención en el organismo marcado, impacto nulo o mínimo en su comportamiento y supervivencia; la toxicidad debe ser nula para el medio ambiente y en la medida de lo posible, que esta herramienta de marcaje sea de bajo costo y que se puedan marcar varios individuos al mismo tiempo y que sea fácilmente detectable (Hagler & Jackson 2001, Garza-Hernández, 2015). A continuación, se mencionan algunos marcadores frecuentemente utilizados para marcar mosquitos.

a. Isótopos radioactivos:

El uso de isótopos estables para marcaje de mosquitos se publicó desde 1950, en el que se utilizó el isótopo radioactivo fósforo-32 ( $^{32}\text{P}$ ), en el marcaje de mosquitos *Anopheles* spp., en un estudio dispersión de vuelo en California. Se concluyó la eficiencia y factibilidad para estudios científicos pues pueden marcarse una gran cantidad de mosquitos (Thurman, *et al.* 1950). El marcaje con isótopos radiactivos que se realiza mediante el contacto directo del organismo a marcar con una solución con algún isótopo radiactivo (Abdel-Malek 1964, Hagler & Jackson 2001).

El uso de isótopos radioactivos en investigaciones biológicas se destaca para dos aplicaciones principalmente: como rastreadores de sustancias y para análisis de activación. Esta última se refiere primordialmente a análisis bioquímicos. Algunos radioisótopos radioactivos usados para marcaje de organismos biológicos son: calcio 45 ( $\text{Ca}^{45}$ ), carbono 14 ( $\text{C}^{14}$ ), hidrógeno 3, ( $\text{H}^3$ ), hierro 59 ( $\text{Fe}^{59}$ ), radiofósforo ( $\text{NaH}_2^{22}\text{PO}_4$ ), sulfuro 35 ( $\text{S}^{35}$ ) o Zinc 65 ( $\text{Zn}^{65}$ ) (Bruce-Chwatt 1956).

Trabajar con isótopos radioactivos conlleva ciertas dificultades ya que es necesario equipo especial para el procesamiento de muestras y este varía según el tipo de radioisótopo. Otro problema con esta herramienta de marcaje es que causa efectos secundarios en los organismos marcados. Todo esto, junto con el incremento de regulaciones medioambientales, el desarrollo de otros marcadores de menor costo a reducido la utilidad de los isótopos radioactivos (Bruce-Chwatt 1956, Silver 2008). A pesar de esto, en la actualidad, todavía se trabajan con isótopos radioactivos. En el 2016, se publicó una evaluación del uso del isótopo  $\text{P}^{32}$  en el marcaje de *Cx. pipiens* para determinación de una concentración de alimentación de sangre óptima. Se llegó a la conclusión de que el método de marcaje facilita el estudio de insectos hematófagos (Zhang *et al.* 2016).

b. Polvos fluorescentes:

Los polvos fluorescentes son el método más comúnmente usado para marcar mosquitos en estudios de marcaje-liberación y recaptura. Como su nombre lo indica, estos son polvos de colores llamativos como azul, rojo o amarillo, los cuales se colocan por el cuerpo del mosquito adulto como muestra la Figura 5 (Lapointe 2008). Los polvos son empleados frecuentemente porque permiten marcar una gran cantidad de individuos y son fácilmente identificables (Hagler

y Jackson 2001). Sin embargo, tienen ciertas desventajas como su durabilidad en el individuo, la cual se reporta entre diez hasta veinte días en promedio (Harrington *et al.* 2005) como su fácil transferencia a otros individuos (Hamer *et al.* 2012).



**Figura 5:** Marcaje de mosquito adulto con polvo fluorescente amarillo  
(Adaptado de: Garza-Hernández *et al.* 2015).

c. Tintes:

Los tintes utilizados para marcaje son solubles en aceite y se acumulan en fluidos y tejidos corporales. Son de bajo costo y su forma de incorporación consiste en diluir el tinte en algún aceite vegetal y agregarlo en el medio de crianza (Hagler y Jackson 2001). Algunos nombres de tintes son: Calco red N-1700, Sudan negro BB, Calco Blue II o tinte fluorescentes de diversos colores (Hendricks, Donovan 1971, Davis 1973, Schroeder y Mitchell, 1981). A pesar de esto, algunos tintes requieren ser detectados bajo luz ultravioleta (Verhulst *et al.* 2013). Estos tintes también son muy utilizados para marcaje de mosquitos estériles (SIT) de diferentes géneros como *An. arabiensis*, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Gilles *et al.* 2014).

**B. Isotopos estables no radioactivos**

Los isótopos estables son elementos cuyo número de neutrones difiere del número de protones. Estos isótopos no radioactivos ocurren naturalmente en el medioambiente. En teoría,

estos no se degradan y no emiten radiación (Katzenberg & Waters-Rist 2018). Esta última característica es una gran ventaja, pues su manejo no representa mayor peligro para sus usuarios ni para los organismos que son enriquecidos (IAEA 2009). Los isótopos estables poseen gran versatilidad de usos y pueden marcar diversos organismos como: aves, mamíferos, reptiles, peces, invertebrados como moluscos y artrópodos e incluso plantas (Kelly, J 2000, Cunjak *et al.* 2005, Wanner *et al.* 2006, Munro *et al.* 2009, English *et al.* 2015, Durso 2016). Algunos isótopos estables comunes para utilizar en estudios ecológicos son nitrógeno 15 o nitrógeno 14, carbono 13, sulfuro 32, hidrógeno 2, oxígeno 18 o rubidio (Peterson & Fry 1987, Wilkins *et al.* 2007, IAEA 2009).

Los isótopos estables son una herramienta de amplio uso científico, dependiendo del objetivo del estudio, los isótopos estables pueden emplearse en estudios paleontológicos para análisis de restos biológicos (Bickert *et al.* 1997, Wanner *et al.* 2006); para encontrar rutas bioquímicas en animales y plantas (White *et al.* 2009) o en estudios con enfoques ecológicos medioambientales (Hyodo 2015, Durso 2016). Los isótopos estables son útiles también para estudio fisiológicos, ya que mediante el análisis de los niveles de enriquecimiento de isótopos estables como  $C^{13}$  o  $N^{15}$ , se puede obtener información acerca de los ciclos de carbono y nitrógeno y en especial sobre interacciones tróficas (English *et al.* 2015, Hyodo 2015).

En el campo de la investigación entomológica, el uso de los isótopos estables se ha expandido por su alto potencial para marcar organismos criados y modificados en laboratorio, en especial en el caso de los métodos de monitoreo y control entomológico. El enriquecimiento se realiza adquiriendo el compuesto (isótopo estable) y agregarlo al medio de crianza o también enriqueciendo la comida que ingiere el insecto (Hood-Nowotny & Knols 2007). Hay varios tipos de isótopos estables que se usan para investigaciones exclusivamente de laboratorio. Por ejemplo, en un estudio con *Drosophilas* se determinó el impacto de elementos nutricionales adquiridos en estadios larvales en su reproducción; esto se realizó alimentando las larvas con isótopos estables de carbono, los cuales fueron rastreados en su estadio adulto (Aguila *et al.* 2013).

Los isótopos estables se incorporan al tejido de un organismo, propiedad que expande sus aplicaciones, no solo para experimentos de laboratorio, sino también para marcaje de organismos en su hábitat natural. Diversas especies del género *Anopheles*. sp. y *Culex* sp. fueron

marcados exitosamente por medio del enriquecimiento de criaderos larvales (suburbanos con isótopos estables  $C^{13}$  y  $N^{15}$  (Hamer *et al.* 2012, Opiyo *et al.* 2016).

Los isótopos estables pueden ser utilizados para un marcaje de forma no invasiva que permite recabar datos sobre la dispersión ecológica de especies vectores de enfermedades o para rastrear el destino final de los insecticidas en el medio ambiente. Por ejemplo, Lindquist (1987) reportó no solo un marcaje exitoso para el género *Culex* sp. Este estudio reportó no solo un marcaje exitoso, utilizando una metodología no invasiva, sino que también, la utilidad de los isótopos estables para recabar datos sobre la dispersión ecológica de especies vectores de enfermedades, lo cual sirve no solo para identificar áreas vulnerables a infecciones sino también a rastrear el destino final de insecticidas que se usan para el control de dichos vectores.

Los isótopos estables han demostrado ser seguros tanto para los organismos a marcar (no presentan efectos secundarios) y para el medio ambiente. Su forma de marcaje sencilla y la compra y envío de estos compuestos también se ha vuelto cada vez más accesible. Sin embargo, como toda herramienta desarrollada para uso científico, también el uso de isótopos estables presenta algunas desventajas. El costo de análisis para las muestras es alto ya que requiere de un espectrofotómetro de masas y personal capacitado para procesar las muestras. Además, el equipo puede llegar a costar más de cien mil dólares estadounidenses (IAEA 2009). Otra desventaja es que es necesario procesar la muestra biológica (ingresar físicamente en el espectrofotómetro de masas los organismos, en el caso de los insectos, el cuerpo entero) para identificar el marcaje. Caso contrario a otros métodos de marcaje que poseen costos más bajos y son visibles a simple vista (IAEA 2009).

## **1. Medición y cuantificación:**

La medida que se usa para cuantificar la cantidad de isótopos estables son unidad delta partes por mil (‰). Los valores naturales para los isótopos más comunes están en un rango de -100‰ a 100‰. Estos rangos sirven para diferenciar los isótopos acumulados naturalmente de aquellos organismos enriquecidos. Estos números son estándares convencionales que pueden usar de referencia distintos objetos, por ejemplo, los valores normales que se encuentran de un isótopo en el aire o en una piedra caliza.

En el Cuadro 1, aparecen los radios del material de referencia usados como para determinar las escalas delta de los isótopos  $C^{13}$  y  $N^{15}$ , junto con las dimensionales de medida de cada isótopo (IAEA 2009). La dimensional de medida para el isótopo  $C^{13}$  corresponde a un fósil marino del Cretácico: *Belemnitella americana*, encontrado en Viena, Austria. A este fósil se le encontraron niveles altos de  $C^{13}$ , su radio R isotópico (0.01224) se estableció como cero (Libes 1992). Mientras que para la dimensional del isótopo estable  $N^{15}$ , el radio R de 0.003676, es la cantidad de  $N^{15}$  que se encuentra en el aire de la atmósfera.

**Cuadro 1:** Radios para los materiales de referencia usados para las escalas de delta

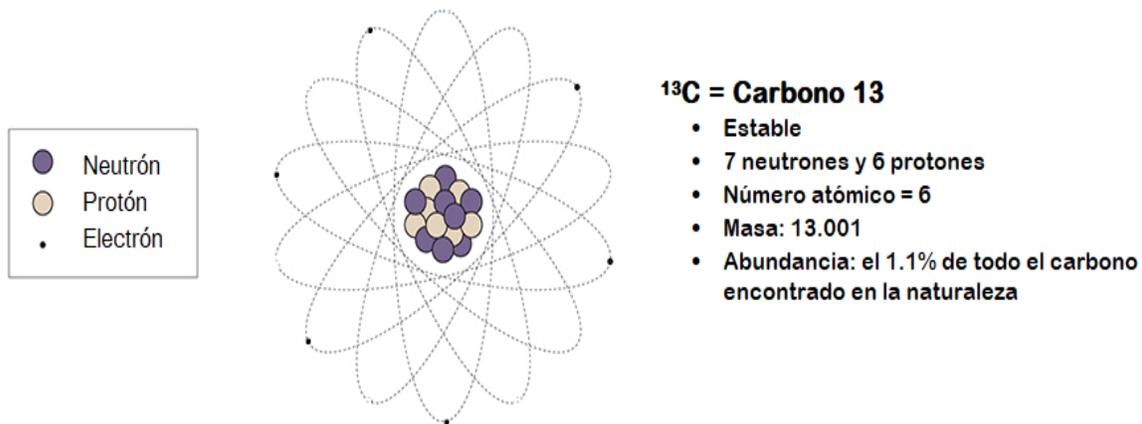
Elemento	Radio R isotópico del material de referencia	Material de referencia usado para escala delta	Dimensional
$C^{13}/C^{12}$	0.01224	ViennaPee Dee Belemnite	$\delta C^{13}_{vs\_VPDB}$
$N^{15}/N^{14}$	0.0036765	Aire (nitrógeno regular en la atmósfera)	$\delta N^{15}_{vs\_Air}$

(Adaptado de: IAEA 2009)

Para esta tesis, se utilizaron los isótopos  $C^{13}$  y  $N^{15}$ . Ambos ya han sido usados para estudios de captura-liberación y recaptura en los géneros *Anopheles* y *Culex*. y han demostrado niveles de enriquecimiento detectables en el espectrofotómetro de masas. La forma de enriquecimiento ocurre debido a un fenómeno de bioacumulación de isótopos, es decir, que el carbono y el nitrógeno se quedan acumulados en el cuerpo de los mosquitos al alimentarse en sus estadios larvales con algas, bacterias, plantas y otros organismos que han absorbido.

## 2. Carbono 13 ( $C^{13}$ ):

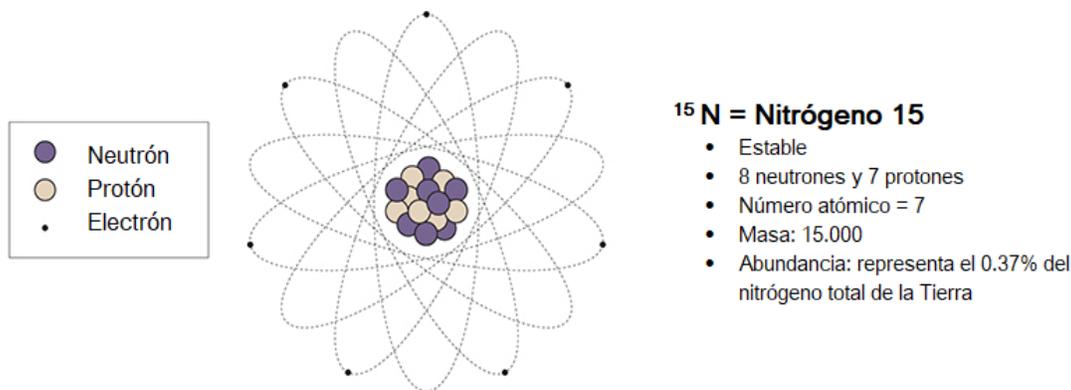
Este isótopo en particular se ha utilizado para marcar al mosquito *Cx. pipines*. En el estudio publicado por Hamer *et al.* (2012), se reporta que el  $C^{13}$ , se degradó; lo cual no sucedió con el isótopo estable  $N^{15}$ . Sin embargo, no se han hecho pruebas en *Ae. aegypti* para comprobar la degradación de este isótopo. El costo aproximado por gramo de compuesto de  $C^{13}$ -glucosa es de \$160 en Estados Unidos (IAEA 2009).



**Figura 6:** Diagrama de un átomo de  $C^{13}$ , cuenta con 6 protones y electrones y 7 neutrones (Shelley 2016).

### 3. Nitrógeno 15 ( $N^{15}$ ):

Este isótopo se utilizó para marcar géneros como *Ae. aegypti* y *Anopheles gambiae*, y se reportó niveles altos de enriquecimiento; es decir, alta cantidad de  $N^{15}$  en las dos especies. Se hipotetiza que esto puede deberse a simple preferencia de las larvas de buscar alimento con niveles de nitrógeno alto. Este isótopo no presenta diferencia entre machos y hembras marcadas del género *Culex sp* (Opiyo *et al.* 2016). El costo aproximado por gramo de compuesto de  $N^{15}$ -nitrato de potasio es de \$25 en Estados Unidos (IAEA 2009).



**Figura 7:** Diagrama de un átomo de  $N^{15}$ , cuenta con 7 protones y electrones y 8 neutrones (Shelley 2016).

### III. JUSTIFICACIÓN

*Ae. aegypti* es el principal vector del virus del dengue, cuya incidencia mundial ha crecido hasta 30 veces en las últimas tres décadas. Es uno de los vectores más mortíferos es su afinidad para vivir cerca de seres humanos. Les proveemos no solo sangre sino muchas veces ambientes adecuados para oviposición de sus huevos, viviendas con sitios oscuros a temperaturas adecuadas; es un mosquito altamente antropofílico (CDC 2018). Además, este mosquito es vector de muchas otras infecciones arbovirales: fiebre amarilla, Zika y chinkungunya, lo cual solo hace de esta especie un problema complejo y extenso en la entomología médica.

Los estudios de marcaje-liberación y recaptura aportan información clave para entender la ecología de diversos vectores, como lo es *Ae. aegypti* como: sitios reproductivos y dispersión. La información recabada sobre criaderos de mosquitos es útil conocer sitios urbanos o semiurbanos propensos a ser afectados por mosquitos. Los estudios de marcaje-liberación y recaptura por ende, ayudan a descubrir sitios clave para realizar estrategias de control vectorial como: técnicas de reducción población de mosquitos, rocío de insecticidas o larvicidas, etc (Silver 2008).

Existen diversos métodos de marcaje con fines de estudios científicos, pero insectos como los mosquitos siempre han representado un reto por su tamaño tan pequeño. Los instrumentos que se usen para marcaje de insectos deben cumplir con las siguientes características: ser lo menos intrusivos para el animal al momento de marcarlo, no interferir con su comportamiento o tasa de supervivencia, no ser tóxico para el medio ambiente y marcar varios individuos de forma homogénea a través de una metodología sencilla. Los isótopos estables son una herramienta de marcaje para monitoreo de mosquitos.

Aunque se ha estudiado los niveles de enriquecimiento de isótopos estables como  $C^{13}$  y  $N^{15}$  en especies del género *Aedes* spp., *Anopheles* spp. y *Culex* spp. aun hacen falta estudios sobre los impactos en la supervivencia que tiene en los primeros dos géneros mencionados y el ritmo de degradación de los isótopos (Hamer *et al.* 2012). Por su utilidad en estudios de

monitoreo, es tan importante seguir evaluando los isótopos estables no radiactivos como herramientas de marcaje y poder conocer sus ventajas frente a otros marcadores, sus limitaciones y cómo realizar un marcaje efectivo.

## IV. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Evaluar los efectos de una dieta larval enriquecida con isótopos estables de  $C^{13}$  y  $N^{15}$ , en el marcaje isotópico y desarrollo biológico de *Ae. aegypti* (L) en adultos criados en laboratorio.

### B. Objetivos específicos

1. Evaluación una dieta larval enriquecida con diferentes concentraciones de isótopos estables no radioactivos de  $C^{13}$  para determinar la concentración mínima necesaria para alcanzar un enriquecimiento detectable.
2. Medir la degradación en el tiempo del marcaje isotópico individual y combinado de los isótopos estables no radioactivos de  $C^{13}$  y  $N^{15}$  en adultos *Ae. aegypti*.
3. Evaluar los efectos de una dieta larval enriquecida con isótopos estables no radioactivos de  $C^{13}$  y  $N^{15}$  en el tamaño corporal de *Ae. aegypti* machos.

## V. HIPÓTESIS

H1: El marcaje con los isótopos estables no radioactivos  $C^{13}$  y  $N^{15}$  pierden habilidad de detección en el tiempo durante el ciclo de vida adulta de *Ae. aegypti*.

H2: Existe una diferencia en el tamaño corporal de mosquitos adultos de *Ae. aegypti* alimentados con una dieta larval enriquecida con isótopos estables no radioactivos de  $C^{13}$  y  $N^{15}$ .

## VI. METODOLOGÍA

### A. Sujeto de estudio

Los organismos vivos obtienen isótopos estables naturalmente del medio ambiente. Existen estudios que muestran que los animales pueden obtener isótopos estables tales como carbono, nitrógeno y sulfuro a través de su dieta (Tieszen *et al.* 1983, Kelly, J 2000, Vander Zanden *et al.* 2015). Diversos organismos, como insectos, cuentan con cierta cantidad natural de isótopos estables; los cuales son utilizados no solo como marcadores, sino que también funcionan como rastreadores. Estos son usados para estudiar ciclos bioquímicos y cadenas tróficas; en estudios de fisiología, bioquímica y ecología de diversos animales (Hyodo 2015).

*Ae. aegypti* al ser un vector de gran interés para su control vectorial y monitoreo, puede ser enriquecido en sus estados larvales a través de su dieta con diversos isótopos estables de varios elementos como carbono, oxígeno o nitrógeno. Aunque se han hecho estudios sobre enriquecimiento exitoso del género *Aedes sp.* (Hamer *et al.* 2012, Opiyo *et al.* 2016, Horvath *et al.* 2018), aún no se han probado características importantes de los isótopos estables  $C^{13}$  y  $N^{15}$  como marcadores de *Ae. aegypti*. Por ejemplo: la capacidad de retención corporal de los isótopos mencionados, su impacto en su desarrollo o la concentración más adecuada para el enriquecimiento.

### B. Diseño de investigación

Debido a que se cuantificará las variables dependientes – cantidad de isótopos estables retenidos en el cuerpo de los mosquitos adultos y el ancho de las alas. El diseño de este estudio es experimental cuantitativo ya que los parámetros con los que se medirán las propiedades son cuantitativos como la absorbancia de isótopos, el tiempo de degradación y volúmenes para marcaje.

### C. Criterios de exclusión

No se probarán más tres concentraciones distintas debido a los costos operacionales. Para la prueba experimental 2, solo se colectarán alas de machos, no de hembras. Esto debido a que los mosquitos que fueron enriquecidos en laboratorio suelen ser mosquitos utilizados para

programas de monitoreo. Por ende, estos mosquitos (modificados) son machos, nunca se liberan hembras y en este caso, son solo los machos el principal interés en el presente estudio. Se trabajará con los isótopos  $C^{13}$  y  $N^{15}$  debido a que son los más comúnmente utilizados para realizar marcajes. También los más utilizados para estudios, en especial ecológicos (Hyodo 2015, Vander Zanden *et al.* 2015).

## **D. Instrumentos de medición**

### **1. Espectrómetro de Masas de relaciones isotópicas DeltaV marca Thermo Scientific®:**

Las muestras fueron enviadas al laboratorio de la Universidad de Texas A&M, Estados Unidos, para su análisis. El funcionamiento del equipo y procesamiento de muestras se detalla en la parte 4) de la sección H. Técnicas.

### **2. Microscopio de laboratorio MZ4 con micrómetro ocular marca Leica®:**

Este fue prestado por la Universidad del Valle de Guatemala para la medición de las alas de los mosquitos macho. La metodología detallada de su uso se describe en el inciso d), de la parte 2): Prueba experimental 2, en la sección H. Técnica.

## **E. Técnicas de investigación**

Para la comprobación de las tres hipótesis se llevaron a cabo tres diferentes pruebas. Estas se ejercieron en un laboratorio IPM (Insect Pest Management) el cual se mantuvo entre los 25-30°C y para los períodos de luz y oscuridad fue controlado por luz natural. Las tres pruebas se probarán con colonias enriquecidas durante toda su etapa larval. A continuación, se describe el procedimiento de cada prueba experimental y en el Anexo 6: se presenta un diagrama resumiendo el procedimiento de las tres pruebas experimentales.

### **1. Prueba experimental 1: Concentraciones variadas de isótopos**

El objetivo de esta prueba experimental cumple con el objetivo 1, de este trabajo de investigación: encontrar los límites de detección del isótopo estable  $C^{13}$  en un mosquito *Ae. aegypti.*, según diferentes dosis de concentraciones.

a. Preparación de isótopos estables:

El isótopo  $C^{13}$  se preparó a partir de un compuesto liofilizado elaborados por Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA.; el nombre comercial del compuesto es  $U-^{13}C_6^-$  glucosa, 99% átomo%. El isótopo  $N^{15}$  también fue proporcionado por el mismo laboratorio, nombre comercial del compuesto es:  $^{15}N$ -nitrato de potasio  $KNO_3$ ,  $N^{15}$ , 99% átomo%. A partir de estos compuestos se realizaron las soluciones para enriquecimiento. La totalidad del volumen del frasco se diluyeron en 100mL de agua destilada, agitando suavemente en un Erlenmeyer de 500mL. Se agregaron 20mL y se agitaba hasta terminarse los 100mL del agua destilada. Posteriormente, las soluciones se trasladaron a tubos Falcon y se almacenaron en una refrigeradora a  $4^{\circ}C$ .

b. Preparación de bandejas:

En cinco bandejas de plástico blanco de 24x25cm, 2000mL de capacidad se agregó dos litros de agua destilada ( $H_2O_d$ ) y 3.0 gramos de zacate fresco y se dispersaron por cada bandeja. El zacate debe quedar sumergido bajo la superficie del agua, pero no es necesario hundirlo en su totalidad dentro de la bandeja. Con una micropipeta se agregó: 70uL, 100uL, 150uL y 200uL del isótopo estable  $C^{13}$  a cuatro bandejas. Las concentraciones respectivas son: 0.00035gr/L, 0.0005 gr/L, 0.00075gr/L y 0.001gr/L. A una bandeja de ellas no se le agregó isótopo estable pues esta sirvió como control. Las bandejas se etiquetaron con la concentración agregada. Las bandejas se cubrieron con una tapadera de vinil y se dejaron marinar por cinco días (Figura. 8).



**Figura 8:** Cuatro bandejas enriquecidas con diferentes dosis de concentraciones.

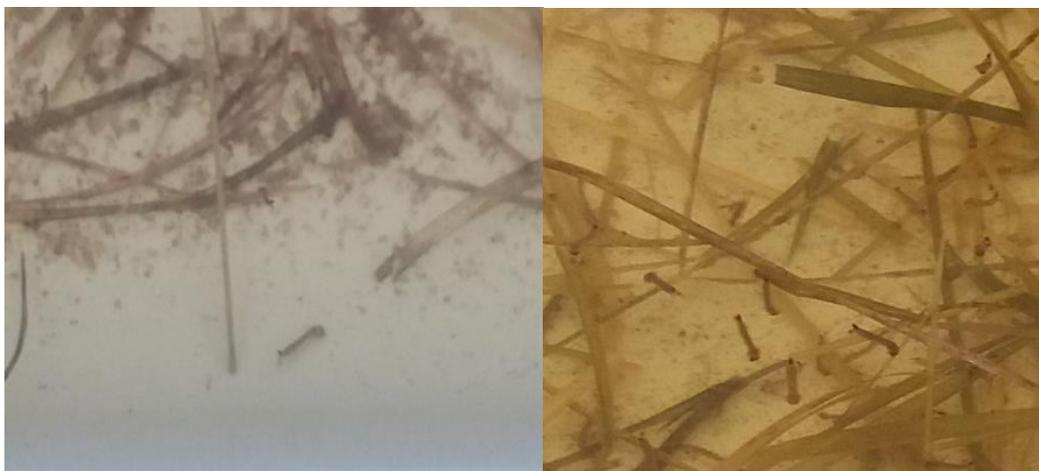
La primera bandeja (de izquierda a derecha) fue enriquecida con 0.00035gr/L (70ug agregados a la bandeja), 0.0005 gr/L (100ug agregados), 0.00075gr/L (150ug agregados) y 0.001gr/L 200ug agregados.

c. Desarrollo y cuidado de larvas:

Se colocaron papeles con 300 (o más) huevos *Ae. aegypti* F1 Liverpool y se dejaron en las bandejas por 24 horas (Figura 9). Se procuró que el número de larvas en cada bandeja fueran 250 como mínimo y 400 máximo. Se agregó 0.5 gr de comida de pescado para complementar la dieta, aunque en realidad, las larvas se alimentan, no del zacate sino de las bacterias acumuladas en la bandeja (Figura 10) Se monitoreó diariamente las bandejas para comprobar que no se encontraran plagas de hormigas u hongos. Las pupas se trasladaron a jaulas de emergencia hasta que eclosionaron a mosquitos. Para realizar el traslado, se agregó agua de la bandeja en al recipiente de la jaula de emergencia y con una pipeta plástica se tomaron las larvas de la bandeja y se colocaron en el agua trasladada dentro del recipiente de la jaula de emergencia (Figura 11). Las pupas sobrantes fueron descartadas para trabajar con adultos que iban sincronizados en su crecimiento. Los adultos se liberaron en cajas de emergencia para mosquitos de 30x30x30 pulgadas etiquetadas con la concentración con la cual fueron enriquecidos los *Aedes sp.* adultos.



**Figura 9:** Colocación de papeles con huevos en las bandejas 5 días después de su preparación



**Figura 10:** Larvas L4 alimentándose a) bandeja enriquecida con isótopo  $C^{13}$  b) bandeja enriquecida con isótopo  $N^{15}$  (Foto: S. Cabañas)



**Figura 11:** Jaula de emergencia con pupas (Foto: S. Cabañas)

**d. Colecta de muestras:**

Se colectaron al azar seis mosquitos de cada dosis (0.00035gr/L, 0.0005 gr/L, 0.00075gr/L y 0.001gr/L.), más seis mosquitos adultos de la bandeja control. Los mosquitos fueron capturados con un capturador de mosquitos. Las muestras de cada tratamiento (seis mosquitos) se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL; seis mosquitos en cada tubo. Debido a que se necesitaban por lo menos tres mosquitos adultos eclosionados el mismo día, se realizó solamente un día de colecta. Se enumeraron los tubos y se etiquetaron con la dosis y fecha de

colecta e iniciales del colector. Los tubos eppendorf fueron colocados en una caja de cartón para tubos eppendorf, la cual se almacenó en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 12).



**Figura 12:** Caja con mosquitos adultos donde se almacenaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$

## 2. Prueba experimental 2: Degradación de los isótopos $\text{C}^{13}$ y $\text{N}^{15}$ en *Ae. aegypti*.

Esta prueba consiste en medir el decaimiento de estos isótopos estables conforme transcurre el tiempo de vida adulto de *Ae. aegypti*. La preparación de isótopos ya fue descrita en el inciso a) de la descripción de la prueba experimental 1. El desarrollo y cuidado de larvas se trabajó de la misma forma que describe la prueba experimental 1, inciso c).

### a. Preparación de bandejas con $\text{C}^{13}$ y $\text{N}^{15}$ :

En cuatro bandejas de plástico blanco de 2000mL de capacidad se agregó dos litros de  $\text{H}_2\text{O}$  y 3.0 gramos de zacate fresco disperso en cada una. Se agregó 400 uL de los tres isótopos  $\text{C}^{13}$ ,  $\text{N}^{15}$  y  $\text{C}^{13}+\text{N}^{15}$  con una micropipeta a las tres bandejas; la cuarta es el control y no se agrega nada. Las cuatro bandejas se etiquetaron con el tipo de isótopo y la fecha. Las bandejas se cubrieron con una tapadera de plástico transparente y se dejaron marinar así por cinco días (Figura 15).



**Figura 13:** Bandejas con zacate para la crianza de larvas: primer día de reposo

b. Mantenimiento de colonia:

Los adultos se liberaron en cajas para mosquitos de 30<sup>3</sup> pulgadas (Figura 16). Se colocó un vaso con algodón empapado en solución sacarosa al 10% en cada caja de emergencia para su alimentación. Este vaso con solución sacarosa fue reemplazado dos veces por semana.



**Figura 14:** Cajas para almacenaje de mosquitos a) Mosquitos enriquecidos con N<sup>15</sup> b) Mosquitos enriquecidos con C<sup>13</sup> (Foto: S. Cabañas).

c. Colecta de muestras:

Se colectó al azar tres mosquitos de cada tratamiento y tres mosquitos del control. Se tomó una muestra durante dos días a la semana por ocho semanas; alcanzando hasta los 60 días

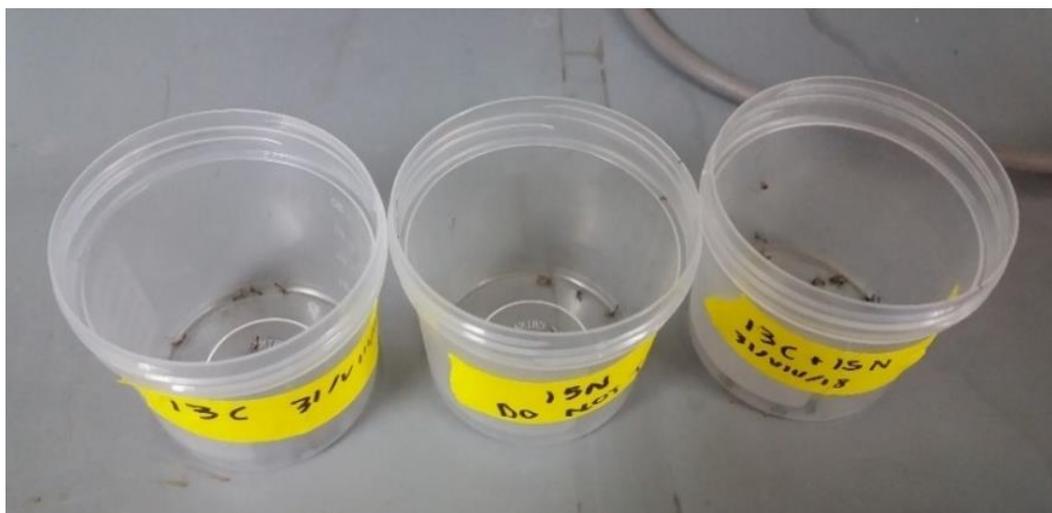
posterior a la eclosión de los mosquitos adultos. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1mL respectivamente. Estos fueron etiquetados y colocados en una refrigeradora a  $-20^{\circ}\text{C}$  para conservar las muestras.

### 3. Prueba experimental 3: Control de calidad de muestras según la morfología de las alas

Para esta prueba se colectaron mosquitos que fueron enriquecidos con los isótopos estables  $\text{C}^{13}$ ,  $\text{N}^{15}$  y la mezcla de ambos  $\text{C}^{13}$  y  $\text{N}^{15}$  para disectar las alas.

#### a. Colecta de muestras:

Se colectaron en vasos de muestras de laboratorio etiquetados, todos los adultos que estaban muertos en cada caja de emergencia, veinte días después de nacidas (Figura 15).

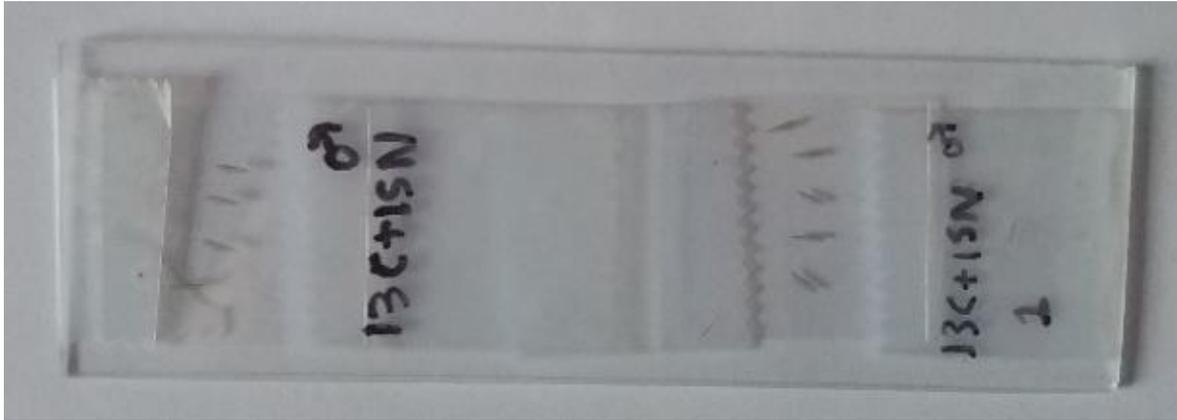


**Figura 15:** Mosquitos enriquecidos colectados para disección de alas

#### b. Preparación de portaobjetos:

Se disectó solamente las alas derechas de mosquitos machos. Se colocaron en un portaobjetos individualmente. Las alas disectadas fueron dispuestas en un portaobjetos en dos filas de cuatro alas, colocando dos filas por portaobjetos y cubriéndolos con un cubreobjetos,

el cual fue asegurado con cinta adhesiva. Las alas se dispusieron de forma horizontal y de la misma cara para facilitar la medición (Figura 16).



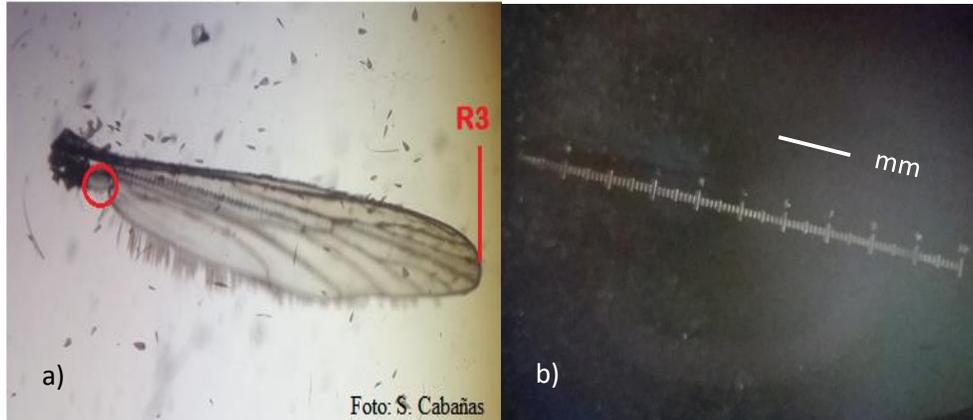
**Figura 16:** Portaobjetos con ocho alas disectadas, dispuestas en la misma posición para medición en el microscopio

c. Disección de alas:

La determinación del sexo del individuo y la disección del ala se llevará a cabo bajo un estereoscopio. Se usó un estilete y unas pinzas entomológicas, para separar con cuidado el ala desde la unión de la lúbula con el tórax tratando de no tocar el resto del ala. Aquellas que sean dañadas durante la separación se reemplazaron. No se colocaron alas de diferentes tratamientos de isótopos en el mismo portaobjeto.

d. Medición morfométrica:

Para las mediciones de las alas, se usaron dos puntos de referencia: la lúbula del ala y la vena R3 (Figura 17). Se midieron con un microscopio con micrómetro ocular marca Leica. El micrómetro ocular se asemeja a una regla, que se encuentra mirando por el objetivo del microscopio pero posee sus propias medias y se debe hacer una conversión a una medida conocida (Yeap *et al.* 2013). La conversión a mm se realizó midiendo con el micrómetro ocular un papel milimetrado. La equivalencia de las medidas fue de 120 unidades de medida son iguales a 12mm.



**Figura 17:** Medición de alas a través del microscopio a) Ala derecha de un mosquito macho enriquecido con C<sup>13</sup>, vista bajo el microscopio 40x. Lo señalado con rojo son los puntos de referencia para medir la longitud del ala total b) micrómetro del microscopio

#### 4. Análisis con espectrofotometría de masas.

Una muestra de mosquito se considera enriquecida con el isótopo estable  $\delta C^{13}$  si supera la cantidad de  $- \delta 13.5 \delta C^{13}$  vs. VPDB., y se considera enriquecido con isótopo estable N<sup>15</sup> si los valores encontrados en las muestras superan los  $\delta 20 N^{15}$  vs Air. Estos parámetros se basan con los datos registrados por Matthew, *et al.* (2017). Para introducir, las muestras deben ser secadas a 50<sup>0</sup>C de 18 a 24 horas y luego, se trasladan a un tubo eppendorf más pequeño en el cual son maceradas. Las muestras son colocadas en placas de microtitulación (96) que contienen las muestras enriquecidas y controles de pureza (no enriquecidos con isótopos). Los parámetros de medición se configuraron para mediciones estándares de los isótopos C<sup>13</sup>/C<sup>12</sup> y N<sup>15</sup>/N<sup>14</sup>. Las muestras fueron analizadas usando un Analizador Elemental Carlo Erba NA 1500 Serie 2, en conjunto con espectrofotómetro de masa ThermoFinnigan Delta Plus XP y un Conflo III. El analizador elemental combustiona las muestras a 1,200<sup>0</sup>C, luego estas pasan a dos reactores. Para el análisis de isótopo estable N<sup>15</sup>, los óxidos generados pasan a un reactor de oxidación de N<sub>2</sub> gaseoso. Mientras que el CO<sub>2</sub> y son separados por cromatografía y analizados en el espectrofotómetro de masas. De los picos de los radios de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> de las muestras combustionadas se calcula la masa total del nitrógeno y el oxígeno

y estos datos se convierten a las escalas de medida de los isótopos respectivos:  $\delta C^{13}$  vs. VPDB  $\delta N^{15}$  vs. Air, en los cuales se presentan los resultados (Matthew, *et al.* 2017).

## **F. Plan de análisis de resultados**

### **1. Hipótesis 1:**

Para comprobar si existe degradación del isótopo estable a través del tiempo, se aplicó una prueba de T de Student para dos muestras independientes o despareada para comparar las cantidades delta de los isótopos estables variaba durante las semanas. Se comprobó de antemano si la distribución de las muestras es normal. La prueba se realizó para encontrar si existe diferencia entre un enriquecimiento con un solo isótopo -enriquecimiento individual- y un enriquecimiento con la mezcla de ambos isótopos estables  $C^{13}$  y  $N^{15}$ : enriquecimiento dual. Adicionalmente, se calculó también las medias de las cantidades delta de cada isótopo por semana, para comprobar que los mosquitos hayan sido enriquecidos exitosamente. El promedio se comparó con los parámetros de enriquecimiento de cada isótopo estable para verificar si el enriquecimiento fue exitoso. Por último, se realizaron gráficas de barras para comparar la cantidad de isótopo a lo largo del tiempo (8 semanas) y verificar si algún isótopo se degradó.

Realizar análisis con espectrofotometría de masas tienen costos altos debido a que se necesita de un espectrofotómetro de masas y personal capacitado para analizar una muestra. En la Universidad de Texas A&M, cada muestra (Tubo eppendorf o vial) enviada para análisis tuvo un costo de \$6.00, por consiguiente, el número de muestras que se puede enviar para análisis de espectrofotometría se puede ver limitado. Por esta razón, se escogieron pruebas estadísticas que no fueran afectadas por un esfuerzo de muestreo con  $n < 30$ .

### **2. Hipótesis 2:**

Se comprobó si el enriquecimiento con alguno de los isótopos afecta de alguna forma al crecimiento morfológico del mosquito. Se comparó las medidas de los mosquitos enriquecidos con  $C^{13}$  y  $N^{15}$  contra un grupo control no enriquecido utilizando una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba de Dunn con control pues las distribuciones de las poblaciones no eran normales. Se elaboró gráficos de bigotes y cajas (boxplot) que muestren las medidas de las alas

divididos en cuartiles, para comprobar si existe algún grupo que sea distinto entre los isótopos estables y si son diferentes a mosquitos control, que fueron mosquitos criados en laboratorio sin ser sometidos a enriquecimiento alguno.

## **G. Ética y bioseguridad**

El uso de los isótopos estables al no ser radioactivos no requiere equipo especializado ni regulaciones de infraestructura para su manejo; pueden prepararse y manejarse como un reactivo químico común. El método de enriquecimiento para marcar individuos no es invasivo para los sujetos de estudio; ya que al enriquecer el medio dónde se desarrollan, obtienen el isótopo a través de su dieta (Hamer *et al.* 2012).

Debido a que el análisis de espectrofotometría de masas requiere material biológico y es necesario sacrificar adultos de *Ae. aegypti*. La eutanasia de estos individuos se realiza, colocándolos dentro de un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , minimizando dolor y estrés. Las alas se disectaron de individuos que ya habían muerto dentro de la jaula.

## VII. RESULTADOS

### A. Objetivo 1:

Evaluación una dieta larval enriquecida con diferentes concentraciones de isótopos estables no radioactivos de  $C^{13}$

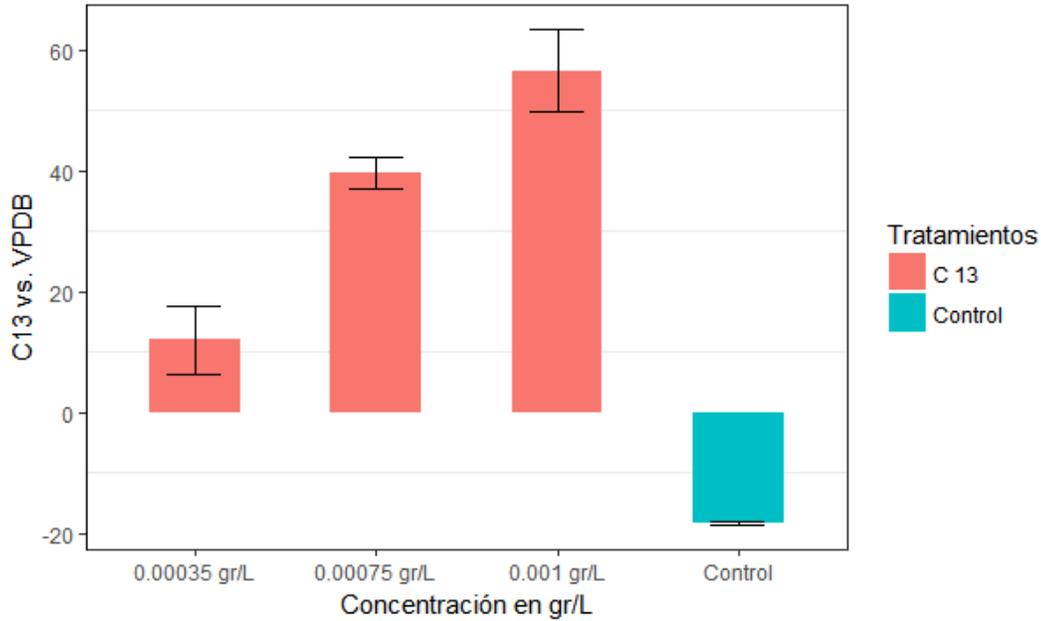
Para realizar el análisis de detección del isótopo estable  $C^{13}$ , se analizaron por espectrofotometría de masas, seis mosquitos que se enriquecieron con las siguientes concentraciones: 0.00035 gr/L, 0.00075gr/L y 0.001gr/L. En el Cuadro 2, se presentan las medias y errores estándares de las cantidades delta encontradas en los mosquitos.

**Cuadro No. 2:** Medias y error estándar de las cantidades de isótopo  $C^{13}$  de los mosquitos enriquecidos con diferentes concentraciones

Concentraciones	Medias
0.00035 gr/L	11.98±5.72
0.00075 gr/L	39.60± 2.59
0.001 gr/L	56.56± 6.83
Control	-18.3267± 0.28

La gráfica de barras en la Figura 20 representan el valor de las medias de las cantidades del isótopo  $C^{13}$  encontradas en las muestras. Las barras de error representan el error estándar, calculadas con un intervalo de confianza del 0.90. Un enriquecimiento exitoso del isótopo estable  $C^{13}$  se considera una cantidad mayor que  $\delta-13.5 C^{13}$  vs. VPDB. En la gráfica de barras evidencia que el grupo control obtuvo una media de ( $x=-18.32$ ), entonces no fue enriquecido.

Las cantidades de isótopos se reportan según en unidades de delta ( $\delta$ ) que corresponden a la firma isotópica según partes por mil (‰). Las unidades de medida específicas para cada isótopo distinto emplean unidades de delta según algún material de referencia. Para medir las cantidades del isótopo  $C^{13}$ , se utilizó la siguiente medida estándar:  $\delta C^{13}$  vs. VPDB, la cual es específica para  $C^{13}$  (IAEA 2009).



**Figura 18:** Concentraciones del isótopo estable  $C^{13}$  de la prueba experimental 1: concentraciones variadas del isótopo  $C^{13}$

## B. Objetivo 2:

Medición de la degradación del marcaje isotópico de los isótopos estables no radioactivos de  $C^{13}$  y  $N^{15}$

Para la comprobación de la hipótesis 2: existencia de la degradación de los isótopos estables se colectaron aleatoriamente un total de 18 muestras de cada tratamiento: una dieta larval enriquecida con  $C^{13}$ , una dieta enriquecida con  $N^{15}$  y una con ambos isótopos  $C^{13}$  y  $N^{15}$ . Cada muestra se conformó de tres mosquitos adultos: los individuos podrían ser hembras o machos. Las colectas se realizaron dos días a la semana por durante ocho semanas a partir de la eclosión de los mosquitos adultos. La colecta de muestras inició el 13 de agosto del 2018 y finalizó el 5 de octubre del 2018. Una muestra de cada semana se analizó por espectrofotometría de masas, procurando siete días de separación entre cada réplica. En total, se analizaron 57 mosquitos adultos, 18 de cada enriquecimiento más tres mosquitos que sirvieron como control de pureza para el espectrofotómetro de masas.

Las medias de cada tratamiento fueron:  $C^{13} = 12.248$ ,  $N^{15}=975.273$  y para el tratamiento dual:  $C^{13} = 8.264$ ,  $N^{15}=1011.552$ . Se calcularon las firmas isotópicas de  $C^{13}$  y  $N^{15}$  para todos los mosquitos, independientemente del isótopo con el que fueron enriquecidos, es decir, se midieron las cantidades  $\delta C^{13}$  vs. VPDB y de  $\delta N^{15}$  vs. Air para todas las muestras enviadas; independientemente de la dieta enriquecida. En el Cuadro 3, se muestran las medias y el error estándar de tres mosquitos según los días que fueron colectados (Ver Cuadro 3).

**Cuadro No. 3:** Medias y error estándar de las cantidades de isótopos en las muestras, medidas durante 60 días posterior al enriquecimiento. Se midieron las cantidades de  $C^{13}$  y  $N^{15}$  para las muestras de los tres tratamientos.

Días de análisis posterior al marcaje	Enriquecimiento con $C^{13}$		Enriquecimiento con $N^{15}$		Enriquecimiento con $C^{13} + N^{15}$	
	$\delta C^{13}$ vs. VPDB	$\delta N^{15}$ vs. Air	$\delta C^{13}$ vs. VPDB	$\delta N^{15}$ vs. Air	$\delta C^{13}$ vs. VPDB	$\delta N^{15}$ vs. Air
7	14.266± 4.206	10.164± 0.420	-21.87± 0.125	1087.218± 102.648	10.913 ± 3.705	1038.484 ± 51.860
14	17.405± 1.368	10.945± 0.154	-21.46± 0.290	906.3686± 70.407	8.087 ± 3.426	1020.316 ± 37.220
21	5.201± 3.773	5.200± 1.126	-21.61± 0.249	1019.689± 81.685	5.338 ± 1.283	983.772 ± 41.052
32	10.453± 1.902	10.454± 0.289	-21.44± 0.297	1029.949± 25.679	5.311 ± 1.513	1021.740± 49.373
39	10.782± 2.603	10.782± 0.282	-12.621± 7.825	727.004± 365.974	10.877 ± 0.891	1008.072 ± 26.774
60	15.316± 0308	15.316± 0.178	-20.602± 0.392	1081.408± 57.912	9.054 ± 2.624	996.929 ± 67.326

Para encontrar si existen o no diferencias entre un enriquecimiento individual de los dos isótopos vs. el enriquecimiento dual (mezcla de ambos isótopos), se realizó una prueba de T de Student de dos poblaciones independientes para cada día. Antes de hacer las pruebas se comprobó la distribución normal con pruebas de Shapiro-Wilk, calculadas con el programa RStudio versión 3.2. Los resultados se muestran en el Anexo También se graficaron tres

histogramas de los tres tratamientos, con el programa Geogebra 5.0 (ver Anexo 1) Las muestras del isótopo  $C^{13}$  y el isótopo  $N^{15}$  contra el enriquecimiento dual de  $C^{13} + N^{15}$ , siguen una distribución normal; las muestras enriquecidas con el isótopo estable  $N^{15}$  poseen una distribución normal, pero con sesgo a la izquierda. Los resultados de las pruebas de T de Student se presenta en el siguiente Cuadro 4.

**Cuadro No. 4:** Resultados de la prueba de T de Student de la dietas de enriquecimiento individuales  $C^{13}$  y  $N^{15}$  vs. el enriquecimiento dual, usando un valor de Alpha  $\alpha(0.05)$ .

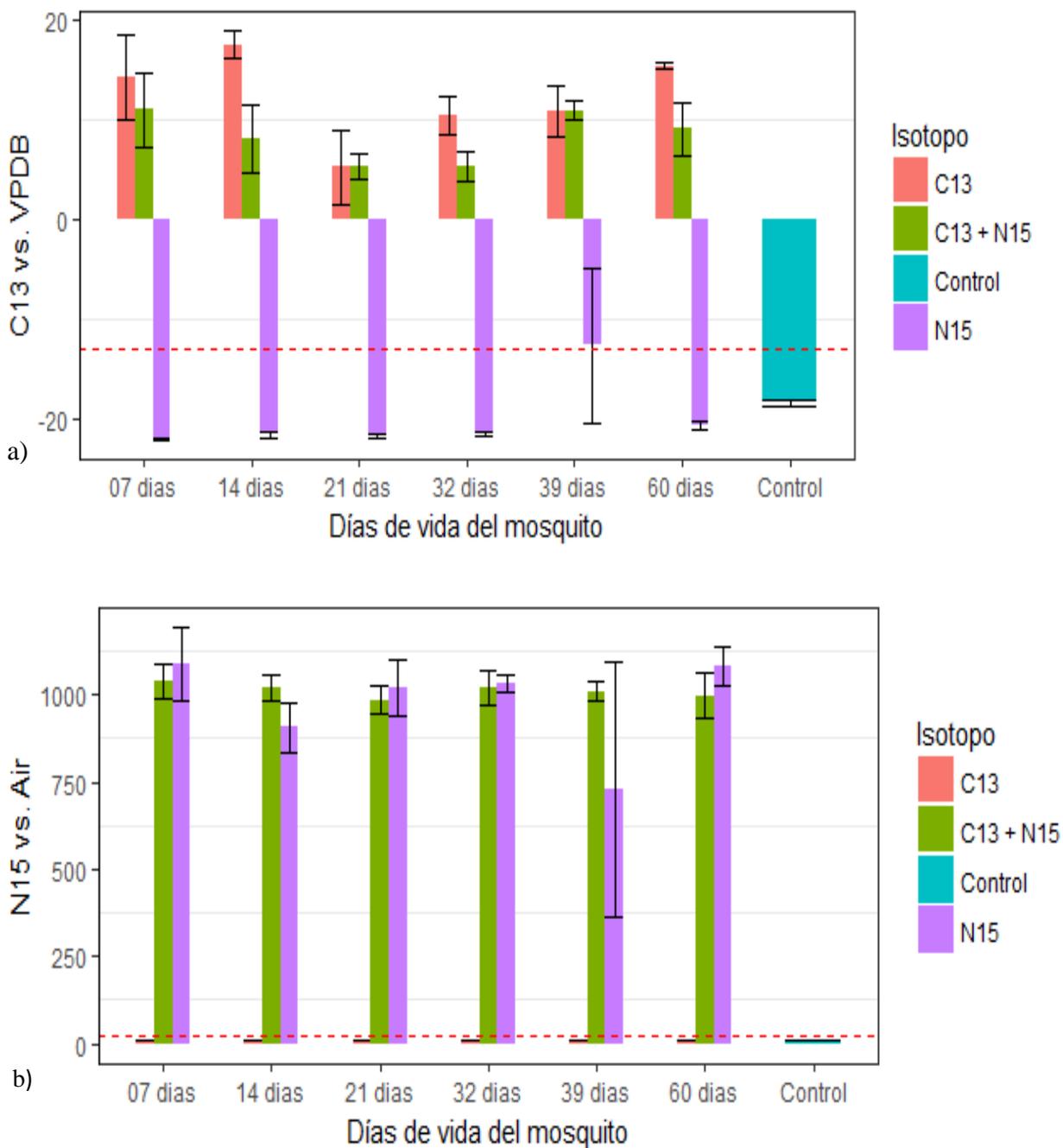
Los datos se muestran con sus intervalos de confianza.

Día	Valor p de $C^{13}$	Valor p de $N^{15}$
7	$0.586 \pm 12.309$	$0.700 \pm 19.014$
14	$0.048 \pm 3.441$	$0.246 \pm 22.078$
21	$0.975 \pm 14.564$	$0.721 \pm 14.290$
32	$0.040 \pm 1.742$	$0.891 \pm 12.027$
39	$0.656 \pm 10.039$	$0.656 \pm 9.851$
60	$0.030 \pm 4.817$	$0.396 \pm 17.381$

Debido a que todos los valores de p, a excepción de los días 14, 39 y 60 son mayores que el valor de Alpha  $\alpha$  (0.05). Por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula que afirma que las medias muestrales no son diferentes entre sí. Solo se rechaza la hipótesis nula para el día 14, existe diferencia estadística en este día entre el enriquecimiento individual con  $C^{13}$  y el enriquecimiento dual con ambos isótopos.

El parámetro de enriquecimiento para el isótopo estable  $N^{15}$  es de  $\delta^{20} N$  vs. Air. Para encontrar si existe degradación conforme pasan los días de vida de mosquito se realizó una gráfica en la cual se muestra la cantidad de  $C^{13}$  y la cantidad de  $N^{15}$  encontradas en todos los individuos sometidos a los tres tratamientos. Las cantidades se midieron en  $\delta C^{13}$  vs. VPDB y  $\delta N^{15}$  vs. Air. Se colocó también una muestra de tres mosquitos que sirvió para verificación de la pureza de los tratamientos, es decir, se criaron mosquitos en un tratamiento no enriquecido para comparar la pureza de las lecturas de cada uno de los isótopos durante el análisis de espectrofotometría de masas. A esta muestra se le denominó: “control”; sin

embargo, no es un control estadístico, ya que solo cuenta con tres muestras, sino cumple como un control de pureza



**Figura 19:** Persistencia del isótopo estable  $C^{13}$  y  $N^{15}$  y la mezcla de ambos durante 60 días a) cantidad de isótopo  $C^{13}$  encontradas en todos los mosquitos muestreados b) cantidad de isótopo estable  $N^{15}$  encontradas en todos los mosquitos muestreados

Las columnas de la gráfica de la Figura 19 representan la distribución de cantidades obtenidas para las muestras enviadas a espectrofotometría de masas; las barras de error son el error estándar de la media poblacional de cada tratamiento según los días de cuantificación de enriquecimiento o días de vida del mosquito. Se puede observar una línea roja punteada que representa los parámetros de enriquecimiento para  $C^{13} = \delta -13.5$  y  $N^{15} = \delta 20.0$  respectivamente. En el inciso a) se muestran las cantidades de  $N^{15}$  de todas las muestras. Debido a que ninguna de las barras muestra una disminución significativa, ni disminuyen por debajo del parámetro, se razona que no existe degradación para los mosquitos enriquecidos con  $N^{15}$  a los 60 días posteriores al enriquecimiento. En el inciso b) se muestran las cantidades de  $C^{13}$  y, de igual forma que para los mosquitos enriquecidos con  $N^{15}$ , sus barras no muestran disminución a lo largo de los 60 días de análisis. Los mosquitos criados bajo una dieta enriquecida con isótopo  $C^{13}$ , no superan el parámetro establecido. Esto indica que el tratamiento para enriquecimiento con  $N^{15}$  fue exitoso. Para los mosquitos criados bajo la dieta de enriquecimiento dual, sucede lo mismo: no muestran disminución a lo largo de 60 días para el análisis de  $\delta C^{13}$  ni para el análisis de  $\delta N^{15}$ .

### **C. Objetivo 3:**

Evaluación los efectos de una dieta larval enriquecida con isótopos estables  $C^{13}$  y  $N^{15}$  en el tamaño corporal de mosquitos adultos.

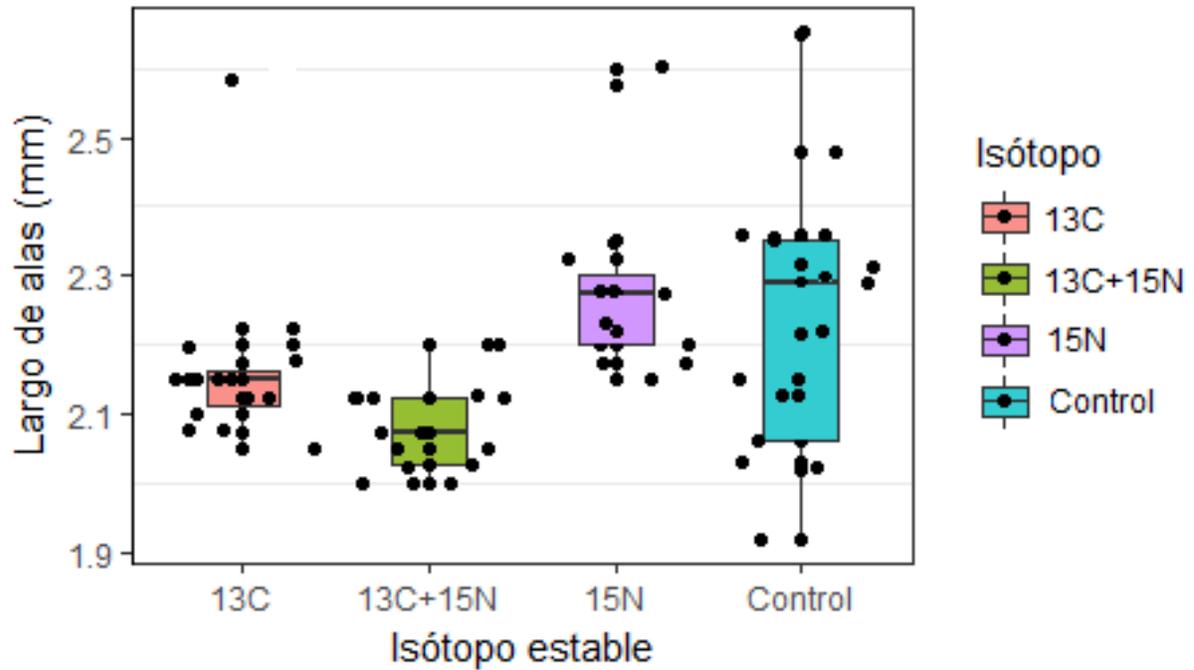
Para la comprobación de la tercera hipótesis, se disectaron quince alas derechas de mosquitos machos. Estos fueron enriquecidos con  $C^{13}$  con  $N^{15}$ , con una combinación de ambos isótopos ( $C^{13}+N^{15}$ ) e individuos criados en laboratorio que no fueron enriquecidos, como grupo control. Los datos de las mediciones se muestran el Cuadro del Anexo 4 y las medias en el Cuadro 5. En total, se midieron 60 alas y los rangos de las medidas estuvieron entre dos y tres mm: La media de los mosquitos enriquecidos con isótopo  $C^{13}$  es de: 2.140; la media de los enriquecidos con  $N^{15}$  es de: 2.290; la media de los enriquecidos con los dos isótopos es de 2.083 y la media del grupo no enriquecido: 2.235

Se pretendía comparar cada grupo mediante una prueba de T de Student para dos muestras independientes; sin embargo, los histogramas elaborados para cada distribución (ver anexo 3) demostraron que los datos no son normales, previniendo así una prueba de T de Student. Por esta razón y siendo que la muestras es pequeña y se optó por aplicar una prueba no paramétrica. Se hizo una prueba de Kruskal-Wallis con una prueba de Dunn control para rangos conjuntos y un ajuste suave de Bonferroni. Los resultados para la prueba de Kruskal-Wallis fueron: chi-cuadrado= 23.49, un valor de p de 0.00003, grados de libertad= 3 y un alpha de 0.05. Debido a que el valor de p es menor a alpha, la prueba indica significancia estadística en la diferencia de por lo menos dos grupos. Los resultados de la prueba de Dunn se detallan en el Cuadro 5 a continuación.

**Cuadro No. 5:** Medias del largo de las alas de los tres enriquecimientos y valores de p de prueba de Dunn según los tres tipos de enriquecimiento vs. el grupo control

	C <sup>13</sup>	C <sup>13</sup> + N <sup>15</sup>	N <sup>15</sup>	Control
<b>Medias</b>	2.14	2.29	2.08	2.24
<b>Valor de p</b>	0.3362	0.0025	0.5420	--

Según la diferencia entre el control y los tratamientos determina cuál es el grupo estadísticamente significativo. Se rechaza la hipótesis nula si el valor de p es menor a un medio de alpha. Por lo tanto, el único valor menor a alpha es la diferencia entre el tratamiento dual y el control. Diferencia entre valores  $p(0.0025) < \alpha(0.05)$ . Se realizó un diagrama de flujos para muestra la distribución por cuartiles de las longitudes de las alas de los mosquitos enriquecidos y los que no fueron enriquecidos.



**Fi gura 20:** Diagrama de caja y bigotes según las longitudes en mm de las alas derechas de los machos enriquecidos con isótopos y los del grupo control, no enriquecidos.

Debido a que las cajas de los grupos se traslapan entre ellas, se concluye que no hay diferencia significativa entre las medias de ninguno de los grupos. Los puntos negros representan los datos de las longitudes y las barras de error son la desviación estándar de la muestra. Las cajas de la gráfica demuestran también que las cantidades más bajas de enriquecimiento fueron las del enriquecimiento dual.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### A. Objetivo 1:

Evaluación una dieta larval enriquecida con diferentes concentraciones de isótopos estables no radioactivos de  $C^{13}$  para determinar la concentración mínima necesaria para alcanzar un enriquecimiento detectable.

La razón principal de este objetivo es encontrar la dosis más adecuada para enriquecimiento exitoso. Para el marcaje de mosquitos de laboratorio, el agregar una concentración demasiado alta de los isótopos puede ser tóxico para las larvas de mosquitos (Hamer *et al.* 2011); mientras que agregar un volumen demasiado bajo arriesga a que algún individuo no quede enriquecido para su detección por análisis por espectrofotometría de masas. Para un marcaje de mosquitos de campo, enriqueciendo el sitio de crianza, la lluvia puede diluir la concentración del isótopo, por lo cual, el conocer los límites de enriquecimiento pueden ayudar a estimar la concentración mínima a agregar, para que la concentración del isótopo sea suficiente. La gráfica de barras en la Figura 18 evidencia, primeramente, que hay una correlación positiva entre la concentración agregada y las unidades de  $\delta C^{13}$  vs. VPDB., porque al aumentar la concentración también aumenta la cantidad de isótopo estable que se bioacumula dentro de los mosquitos adultos.

Para esta prueba experimental se probó también una concentración de 0.0005 gr/L, (100uL de solución del isótopo); sin embargo, durante la realización de la prueba, a la bandeja enriquecida con la dosis de 0.0005gr/L se le dejaron muy poquitos huevos y consecuentemente, solo nacieron cuatro larvas. Aunque después se volvió a agregar más huevos y se logró una densidad similar a la de las otras bandejas enriquecidas con las otras dosis, los tres mosquitos que se tomaron como muestras, fueron los primeros 4, ya que estos emergieron como adultos varios días antes que las demás larvas agregadas. Al analizar estos mosquitos se encontraron niveles de enriquecimiento muy altos y gran variabilidad en el grupo. Dicha variabilidad, se sospecha que se debe a que estas cuatro larvas tuvieron, mayor disponibilidad de isótopo estable, en relación a todas las demás. Sin embargo, esto no se puede asegurar por lo que el tratamiento con una concentración de 0.0005gr/L fue retirada

**Se pudo determinar que a una dosis de 0.0035 gr/L todavía existe una diferencia en la dosis de delta C<sup>13</sup> comparada al control debido a que se detectó el isótopo C<sup>13</sup> con la concentración de 0.00035gr/L, para una cantidad de larvas de 150 a 200 larvas por un litro de agua destilada. Para el límite superior, es decir el volumen con el cual se deja de percibir un incremento en la cantidad de isótopos en el mosquito parece estar entre los 0.00075 y los 0.001gr/L. En conclusión, debido a estos resultados se recomienda una concentración de 0.00035gr/L, ya que sigue siendo detectable en espectrofotometría de masas. Se recomienda repetir este experimento y realizar una colecta mayor para elaborar una curva dosis-respuesta.**

Todas las hembras enriquecidas fueron alimentadas solamente con una solución de sacarosa solamente; a ninguna se le proporcionó alimento de sangre. No se conoce si un alimento con sangre podría encubrir el marcaje con C<sup>13</sup> en *Ae. aegypti*. Aunque en el género *Culex* sp, esto ya se ha estudiado y no se encontró evidencia de que la alimentación con sangre afectara el enriquecimiento (Hamer *et al.* 2012), se deben realizar una investigación con mosquitos del género *Aedes*.

## **B. Objetivo 2:**

Medición de la degradación del marcaje isotópico de los isótopos estables no radioactivos de C<sup>13</sup> y N<sup>15</sup>

Al trabajar con isótopos estables como marcadores, se debe tener en cuenta que los organismos tendrán cierta cantidad de estos isótopos estables acumulados en su organismo por causas naturales. Es necesario, entonces, conocer los parámetros de enriquecimiento que cada isótopo posee para poder realizar comparaciones. Con los parámetros se puede concluir más eficazmente si el enriquecimiento de los mosquitos fue positivo. Los parámetros de los isótopos utilizados para comprobar el enriquecimiento de los *Ae. aegypti*, fueron establecidos por Hamer, *et al.* (2011) en un estudio con mosquitos *Culex spp.*

Los parámetros también son ideales para realizar pruebas estadísticas como la T Student para poblaciones independientes. Como se puede observar en la Figura 19, las cantidades de delta ( $\delta$ ) de los mosquitos enriquecidos con C<sup>13</sup>, no son mayores a  $\delta 25$ ; sin embargo, todas las cantidades son mayores al parámetro de:  $\delta -13.5$ . Estos mosquitos fueron enriquecidos

exitosamente con el isótopo  $C^{13}$ . Para los mosquitos enriquecidos con  $N^{15}$ , se registraron valores entre  $\delta$  800 a  $\delta$  1,200 y también están sobre el parámetro de enriquecimiento para este isótopo:  $\delta 20$ . Para el tratamiento experimental de los isótopos combinados  $C^{13}+N^{15}$ , se obtuvieron valores por encima de ambos parámetros (Hamer *et al.* 2011), esto indica que los individuos de los tres tratamientos fueron enriquecidos exitosamente.

El objetivo de realizar una prueba de enriquecimiento con ambos isótopos se llevó a cabo para verificar que ninguna de las dos firmas isotópicas, interfirieran en las lecturas de la otra; es importante que las señales de un isótopo no impidan detectar la del otro. Debido a que ambos isótopos perduran hasta dos meses en el organismo, la metodología de marcaje y detección es la misma, realizar una combinación de dos isótopos estables para marcar los mismos individuos, es redundante. Sin embargo, cuando se marcan larvas en campo, pueden llegar a mezclarse ambos isótopos, pero esto no impedirá un marcaje positivo del individuo.

Según la prueba de T de Student (Cuadro No. 4), no se rechaza la primera hipótesis nula: la cantidad de isótopo estable no varía significativamente en el tiempo. El  $C^{13}$  y el  $N^{15}$ , no se degrada conforme el tiempo, lo cual indica que los isótopos como marcadores, son útiles para estudios de recaptura y liberación. En estudios de esta índole, es necesario poder detectar cual mosquito fue enriquecido y poseer la certeza del poder de detección de los individuos que se marcaron originalmente. Además, si los isótopos perduran hasta dos meses de la vida del mosquito, con estos isótopos no sería necesario, volver a marcar los mismos individuos y en estudios de liberación-recaptura pueden realizarse muestreos durante este tiempo.

Según la prueba de T de Student el enriquecimiento individual con  $C^{13}$ , es significativamente mayor al tratamiento dual en los días 14, 32 y 60. Se debe considerar que el carbono es un elemento involucrado en el metabolismo del mosquito ya que forma compuestos como glucosa y grasas (triglicéridos). Estos se acumulan junto con otros elementos necesarios durante el estadio larval. Al eclosionar como adultos y consumir una dieta rica en azúcares se acumula como reservas calóricas. Sin embargo, estas reservas se acumulan en las hembras de forma continua mientras que con las reservas calóricas en los machos van desapareciendo (Florida Medical Entomology Laboratory 1984). Al tomar aleatoriamente los tres mosquitos del tratamiento dual fueron machos durante estos días, mientras que para el tratamiento de  $C^{13}$  sí se colectó por lo menos una hembra. Debido a que las hembras acumulan carbono en forma de

calorías pudieron incrementar así la media de estos días y por eso, las medias fueron significativamente distintas según la prueba de T de Student.

Las medias del enriquecimiento individual de los isótopos  $C^{13}$  ( $\bar{x}=12.248$ ) y  $N^{15}$  ( $\bar{x}=975.273$ ) muestran que las cantidades del isótopo bioacumuladas en los mosquitos son muy distintas. El enriquecimiento con  $N^{15}$  muestra cantidades de delta muy altas en comparación con las lecturas de delta de los mosquitos enriquecidos con  $C^{13}$ . Durante el proceso de enriquecimiento, son las larvas las que incorporan ambos elementos en su organismo a través de su alimentación. Sin embargo, el  $C^{13}$  se utiliza en procesos bioquímicos, como la respiración; mientras que el nitrógeno es probable que se incorpore en compuestos como la quitina y forme parte del esqueleto del mosquito adulto (Hamer *et al.* 2012). A pesar de que el metabolismo de la sacarosa explica la variabilidad entre los días de las cantidades  $\delta C^{13}$ , la Figura 19 a. muestra también que el isótopo estable en ambos tipos de enriquecimientos (individual y dual) siguen siendo detectables hasta los 60 días. Estos, contrario a los polvos fluorescentes (el método de marcaje más común) son retenidos en el mosquito y no se transfieren mediante el contacto de dos mosquitos adultos.

En la Figura 19 b. las barras de error muestran poca una variabilidad en los grupos (días) excepto para el día 39. Esto se debió a que uno de los mosquitos, no fue enriquecido ( $\delta 10.44 N^{15}$  vs. Air). Se hipotetiza que esto puede deberse a que este macho copuló con una o varias hembras. Los machos pierden nutrientes y reservas calóricas después de copular y esta puede ser una razón. A pesar de esto, al igual que en el caso del marcaje con  $C^{13}$ , no existe degradación en el día 60.

### **C. Objetivo 3:**

Evaluación los efectos de una dieta larval enriquecida con isótopos estables  $C^{13}$  y  $N^{15}$  en el tamaño corporal de mosquitos adultos.

La longitud de las alas de *Ae. aegypti* están correlacionadas con otras medidas corporales como el torax (Siegel, *et al.* 1992). Las alas son utilizadas como una medida de control de calidad, debido a las condiciones de densidad larval, alimentación y condiciones ambientales,

el estado físico de los mosquitos adultos puede ser afectada (Jinrakanjanakit, *et al.* 2007). Además, las alas están asociadas con el desplazamiento del mosquito y su comunicación. Por estas implicaciones, son puntos de referencia importantes, muy utilizados en estudios de liberación de mosquitos modificados, ya que se necesita liberar individuos que puedan comportarse como los encontrados en campo (Yeap *et al.* 2013).

Se disectaron solamente las alas de los adultos machos porque hay dimorfismo sexual en las alas de los *Ae. aegypti* (Garzón & Schweigmann 2018) y porque se tenían una mayor cantidad de machos que de hembras. Además, para proyectos de control vectorial, en los cuales se liberan mosquitos marcados al campo, estos son en la mayoría de los casos de machos. Por lo cual, se consideran estas medidas más pertinentes.

El diagrama en dónde se muestran las longitudes de las alas en la Figura 20, muestran que el grupo con la mayor dispersión de datos es el grupo control. La dispersión de los otros datos es bastante reducida para los tres grupos enriquecidos con isótopos; en especial para los mosquitos enriquecidos con el isótopo  $C^{13}$ , los cuales mostraron una dispersión mínima y ningún dato atípico. Entre los grupos enriquecidos con isótopos, el que más datos atípicos tiene fue el grupo enriquecido con  $N^{15}$ . Estos podrían explicar por qué de los grupos enriquecidos con isótopos este se diferencia de los otros dos tratamientos ( $C^{13}$  y  $C^{13}+N^{15}$ ). Las cantidades de enriquecimiento que se lograron con este isótopo Nitrógeno 15 son mayores que la de los demás. A pesar de esto, no sobrepasan los rangos normales de las alas de la especie del mosquito *Ae. aegypti*. Se concluye que los dos isótopos  $C^{13}$  y  $N^{15}$  no afectan el desarrollo anatómico del ala del mosquito.

Se encontró un efecto de la dieta enriquecida con ambos isótopos en el largo de las alas de los mosquitos machos. La prueba de Duun muestra que hay una diferencia significativa entre el tamaño de los mosquitos control ( $X_{control}=2.24$ ;  $X_{C^{13}+N^{15}} = 2.08$ ). Para los tratamientos individuales de los dos isótopos no son estadísticamente diferentes con el control ni entre ellos. Sin embargo, todos los individuos criados obtuvieron alas por debajo de la medida normal de mosquitos de campo: 2.64mm (Nasci 1986). Por ende, es probable que sea necesario enriquecer la dieta de las larvas con algún complemento alimenticio. Por ejemplo, durante las pruebas experimentales, se agregó 0.3gr de comida de pez a las bandejas con zacate al llegar las larvas al estadio L3. A pesar de esto, se cree que es mejor agregar el suplemento cuando las larvas

estén entre L1. Sobre esta problemática ya existe ya un estudio en que se evaluó agregar hígado en polvo adicionalmente a la dieta con zacate usada para este trabajo. Se encontró que el enriquecimiento con  $C^{13}$  y con  $N^{15}$  fue efectivo para marcar mosquitos adultos de *Ae. aegypti* (García-Luna, *et al.* 2019).

## IX. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El marcaje con isótopo  $C^{13}$  es detectable a una concentración mínima de 0.00035 gr/L en adultos de *Ae. aegypti*, para una cantidad de 150-200 larvas por litro de agua. Por lo tanto, esta concentración es efectiva para marcar de mosquitos en laboratorio con  $C^{13}$ . También se recomienda realizar experimentos con concentraciones menores a 0.00035gr/L, para encontrar un límite de detección. También se recomienda realizar esta prueba experimental, pero colectando 20 individuos de cada concentración para elaborar una curva-dosis respuesta.

Se comprobó a través de una prueba de T de Student que no existe degradación de los isótopos  $C^{13}$  y  $N^{15}$  60 días (8 semanas) posteriores al enriquecimiento individual ni dual. Esto demuestra que el marcaje con isótopos estables puede realizarse solamente una vez y que las unidades delta serán detectadas por el espectrofotómetro de masa aún después 60 días de vida del mosquito adulto. Esto implica que en un estudio de marcaje-liberación y recaptura, se pueden realizar muestreos durante dos meses posterior a la liberación de individuos y poder reconocer los individuos marcados.

Se recomienda realizar estudios con el género *Aedes* sobre cómo afecta el marcaje con isótopos estables, la alimentación con sangre en mosquitos hembras. Aunque en el género *Culex spp.*, no se ha encontrado evidencia de que una alimentación con sangre afecte el marcaje con los isótopos estables (Hamer *et al.* 2011), no se tiene evidencia científica que no suceda con el género *Aedes sp*, por consiguiente, se recomienda realizar un estudio sobre esto.

Se comprobó a través de una prueba de Dunn que existe una diferencia en el tamaño corporal de los mosquitos criados bajo una dieta larval con enriquecimiento dual y los mosquitos no enriquecidos. Al elaborar una dieta enriquecida con  $C^{13}$  o  $N^{15}$  con zacate, es necesario complementarla con un suplemento alimenticio como hígado en polvo o comida de pescado para que el tamaño corporal de los adultos no se vea afectado. Agregar el suplemento cuando las larvas estén en el estadio L1. Esto se recomienda para asegurar que los mosquitos marcados estén sanos y no vean disminuidas sus posibilidades de supervivencia, comunicación y apareamiento frente a los mosquitos de campo.

Este trabajo de investigación se diseñó principalmente para evaluar las capacidades y limitaciones de los isótopos estables como marcadores para estudios de captura y liberación. El estudio demostró que los isótopos estables  $C^{13}$  y  $N^{15}$  no se degradarán en prácticamente una gran parte del tiempo de vida de un mosquito adulto en campo y durante un enriquecimiento dual, ambos niveles de enriquecimiento son detectables a través de espectrofotometría de masa. Los isótopos estables  $C^{13}$  y  $N^{15}$  son marcadores que al ser introducidos en la dieta larval de los mosquitos permite la identificación de estos individuos de forma certera. Los isótopos estables superan las desventajas que presenta la herramienta de marcaje más utilizada: los polvos fluorescentes. Ya que los isótopos estables, contrario a los polvos fluorescentes, permanecen en el individuo, no se transfirieren a otros individuos y no poseen gran impacto en la supervivencia del mosquito. Esto los hace marcadores ideales para estudios de marcaje-liberación y recaptura, siendo herramientas efectivas para estudios ecológicos.

## X. LITERATURA CITADA

Abdel-Malek, A.A 1994. *Study of the feeding habits of male Anopheles sergenti Theo. at Siwa Oasis using radio-phosphorus*. Bull World Health Organ 30: 137–139.

Aguila, J. Hoshizaki. D.K y A.G Gibbs. 2013. *Contribution of larval nutrition to adult reproduction in Drosophila melanogaster*. Journal of Experimental Biology. 216: 399-406

Álvarez, L., A. Briceño, y M. Oviedo. 2006. *Resistencia al Temephos en poblaciones de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela*. Revista Colombiana de Entomología 32: 172–175.

Anon. 2017. *Surveillance and Control of Aedes aegypti and Aedes albopictus in the United States*. 16.

Asahina, S. 1964. *Food material and feeding procedures for mosquito larvae*. Bull World Health Organ 31: 465–466.

Balta, L. R. 1997. *Guía práctica para la identificación de Aedes aegypti. Toolkit for identification of Aedes aegypti*. Available at: <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/138> [Accessed September 5, 2019].

Bickert, T., J Patzold, C. Samtleben, y A. Munnecke. 1997. *Paleoenvironmental changes in the Silurian indicated by stable isotopes in brachiopod shells from Gotland, Sweden*. Geochimica et Cosmochimica Acta 61: 2717–2730.

Bruce-Chwatt, E. J. 1956. *Radioisotopes for research on and control of mosquitos*. Bull World Health Organ 15: 491–511.

Tobin, C., P. J. Kean., Suckling, D. Mccullough, D., Herms, A., y L. Stringer. 2014. *Determinants of successful arthropod eradication programs*. Biological Invasions 16: 401–414.

Schweigmann. 2006. *Spatial distribution pattern of oviposition in the mosquito Aedes aegypti in relation to urbanization in Buenos Aires: southern fringe bionomics of an introduced vector*. Medical and Veterinary Entomology 20: 209–218.

CDC. 2018. *Entomology & Ecology | Dengue | CDC*. Available at: <https://www.cdc.gov/dengue/entomologyecology/index.html> [Accessed September 10, 2018].

Conway, G. R., Trips, M. y G.A.H McClelland. 1974. *Population Parameters of the Mosquito Aedes aegypti (L.) Estimated by Mark-Release-Recapture in a Suburban Habitat in Tanzania*. Journal of Animal Ecology 43: 289–304.

Cunjak, R. A., Roussel, J.M., Gray, M.A., Dietrich, J.P., Cartwright, D.F., Munkittrick, K.R., y T.D Jardine. 2005. *Using stable isotope analysis with telemetry or mark-recapture data to identify fish movement and foraging*. Oecologia 144: 636–646.

Shelley, D.C 2016. *Isotopes in environmental science* (U.S. National Park Service). Disponible en: [https://www.nps.gov/articles/parkscience32\\_2\\_67\\_shelley\\_3839.htm](https://www.nps.gov/articles/parkscience32_2_67_shelley_3839.htm) [Visitado el: Julio 1, 2019].

David, F.M 1973. *Calco Oil Red N-1700® for Marking Adults and Eggs of the Southwestern Corn Borer*,. Ann Entomol Soc Am 66: 1167–1168.

DIVISIÓN ZOONOSIS, RESERVORIO Y VECTORES. 2016. *Dengue, Chinkuygunya y Zika*.

DURSO, A. M. 2016. STABLE ISOTOPES AND THE ECOLOGY AND PHYSIOLOGY OF REPTILES. 160. *Stable isotopes and the ecology and physiology of reptiles*. Disponible en: <https://digitalcommons.usu.edu/etd/5064/> [Visitado: Julio 1, 2019].

English, M.D., Robertson, G.J., y M.L. Mallory. 2015. *Trace element and stable isotope analysis of fourteen species of marine invertebrates from the Bay of Fundy, Canada*. Mar. Pollut. Bull. 101: 466–472.

Evia, J. R. B. 2014. *Dengue. Problema que preocupa y ocupa a la salud pública*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica Medicina de Laboratorio 61: 18.

Florida Medical Entomology Laboratory. 1984. Metabolism of Nutrients in the Adult Mosquito. Disponible en: [https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MN\\_V44\\_N4\\_P573-579.pdf](https://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/MN_V44_N4_P573-579.pdf).

Garza-Hernández, J.A., Reyes-Villanueva, F., Russell, T.L., Braks, M.A.H., García-Munguia, A.M., y M.A Rodríguez-Pérez. 2015. *Copulation Activity, Sperm Production and Conidia Transfer in Aedes aegypti Males Contaminated by Metarhizium anisopliae: A Biological Control Prospect*. PLOS Neglected Tropical Diseases 9: e0004144.

Garzón, M.J y N. Schweigmann. 2018. *Wing morphometrics of Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus (Macquart, 1838) (Diptera: Culicidae) from different climatic regions of Argentina*. Parasit Vectors 11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5956753/> [Visitado el: Septiembre 17, 2018].

Gilles, J.R.L, Schetelig, M.F., Scolari, F. Marec, F. Capurro, M.L., Franz, G., y K. Bourtzis. 2014. *Towards mosquito sterile insect technique programmes: Exploring genetic, molecular, mechanical and behavioural methods of sex separation in mosquitoes*. Acta Tropica 132: S178–S187.

Rezende, G.L, 2017. *Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in Aedes, Anopheles and Culex vectors*. PLOS ONE 11. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006063> [Visitado en: Mayo 24, 2019].

Hagler, J.R y C. G Jackson. 2001. *Methods for Marking Insects: Current Techniques and Future Prospects*. Annu. Rev. Entomol. 46: 511–543.

Hahn, M.B., Eisen, R. J., Eisen, L., Boegler, K.A., Moore, C. G., McAllister, J. Savage, H.M., y J.P, Mutebi. 2016. *Reported Distribution of Aedes (Stegomyia) aegypti and Aedes (Stegomyia) albopictus in the United States, 1995-2016 (Diptera: Culicidae)*. J. Med. Entomol.

Hamer, G.L., Donovan, D.J., Hood-Nowotny, R. Kaufman, M.G., Goldberg, T.L. y E.D Walker. 2012. *Evaluation of a Stable Isotope Method to Mark Naturally-Breeding Larval Mosquitoes for Adult Dispersal Studies*. J Med Entomol 49: 61–70.

Hamer, G.L., Kelly, P.H., Focks, D.A., Goldberb, T.L., y E.D, Walker2011. *Evaluation of a Novel Emergence Trap to Study Culex Mosquitoes in Urban Catch Basins*. moco 27: 142–147.

Harrington,L.C., Scott, T.W., Lerdthusnee, K., Coleman, R.C., Costero, A. Clark, G.G., Jones, J.J., Kitthawee, S. Kittayapong, P., Sithiprasasna, R. y J.D. Edman. 2005. *Dispersal of the dengue vector Aedes aegypti within and between rural communities*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72: 209–220.

Hendricks, D. 1971. *Oil-Soluble Blue Dye in Larval Diet Marks Adults, Eggs, and First-Stage F1 Larvae of the Pink Bollworm* | Journal of Economic Entomology | Oxford Academic. Journal of Economic Entomology 64: 2.

Hood-Nowotny, R. y B.G.J Knols. 2007. *Stable isotope methods in biological and ecological studies of arthropods*. Entomol Exper Applic 124: 3–16.

Horvath, T.D., Dagan, S., Lorenzi, P.L., Hawke, D.H y P.Y Scaraffia. 2018. *Positional stable isotope tracer analysis reveals carbon routes during ammonia metabolism of Aedes aegypti mosquitoes*. FASEB J. 32: 466–477.

Hyodo, F. 2015. *Use of stable carbon and nitrogen isotopes in insect trophic ecology*. Entomological Science 18: 295–312.

IAEA. 2009. *Manual fo the Use of Stable Isotopes in Entomology*.

Imam, H., Zaknigar, G.S y A. Seikh. 2014. *The basic rules and methods of mosquito rearing (Aedes aegypti)*. Trop Parasitol 4: 53–55.

Kamal, M., Kenawy, M.A., Rady, M.H., Khaled, A.S., y A.M, Samy 2018. *Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus under changing climate*. PLOS ONE 13: e0210122.

Katzenberg, M.A., y A.L Waters-Rist. 2018. *Stable Isotope Analysis. In Biological Anthropology of the Human Skeleton*. pp. 467–504, John Wiley & Sons, Ltd. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119151647.ch14> [Visitado: Julio 1, 2019].

Kaunang, W.P., Pelealu, J. Tulung, M., y C. Salaki. 2014. *Phenotypical Morphometry Variation of Aedes Aegyti in Manado*. 8.

Kelly, J. 2000. *Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology* - Canadian Journal of Zoology. Canadian Journal of Zoology 78: 1–27.

Klassen, W. y C.F. Curtis. 2005. *History of the Sterile Insect Technique*. en V. A. Dyck, J. Hendrichs, and A. S. Robinson (Eds.) *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. pp. 3–36, Springer Netherlands, Dordrecht. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_1) [Visitado: Julio 1, 2019].

Lapointe, D. 2008. *Dispersal of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) in a Hawaiian Rain Forest*. J Med Entomol 45: 600–609.

Lazcano, B., Rodríguez, J.A., Martín, S. Romero, J.L., y R. Montoya J2009. *Evaluación de la resistencia a insecticidas de una cepa de Aedes aegypti de El Salvador*. Rev Panam Salud Publica, Rev. panam. salud pública 26: 229–234.

Lindquist, D.A. 1987. *Los insectos, los isótopos y la radiación*. Boletín OIEA 2: 4.

Marini, F., Caputo, B. Pombi, M., Tarsitani, G., y A.D. Torre. 2010. *Study of Aedes albopictus dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark–release–recapture experiments*. Medical and Veterinary Entomology 24: 361–368.

Marquetti, F. M. del C., y J.A. Bisset-Lazcano. 2008. *Aspectos bioecológicos de importancia para el control de Aedes aegypti y otros culicidos en el ecosistema urbano*. Editorial Universitaria, Ciudad de la Habana. Disponible en: <http://site.ebrary.com/id/10239014> [Visitado: Septiembre 15, 2018].

Mastrangelo, T. y J. Walder. 2011. *Use of Radiation and Isotopes in Insects*.

Nelson, M.J. 1986. *Aedes aegypti: biología y ecología*. Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC.

Munro, A. R., Guilanders, B.M., Thurstan, S. Crook, A., y A. C. Sanger. 2009. *Transgenerational marking of freshwater fishes with enriched stable isotopes: a tool for fisheries management and research*. Journal of Fish Biology 75: 668–684.

Nasci, R. S. 1986. *The size of emerging and host-seeking Aedes aegypti and the relation of size to blood-feeding success in the field*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 2: 61–62.

Opiyo, M.A., Hamer, G.L., Lwetoijera, D.W., Auckland, S. Majambere, S., y F. O. Okumu. 2016. *Using Stable Isotopes of Carbon and Nitrogen to Mark Wild Populations of Anopheles and Aedes Mosquitoes in South-Eastern Tanzania*. PLOS ONE 11: e0159067.

Ote, M. y H. Kanuka. 2018. *A highly secure method for rearing Aedes aegypti mosquitoes*. Trop Med Health 46. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5966851/> [Visitado: Mayo 24, 2019].

Pepers, S.T., Wilson-Fallon, A., Haydett, K., Greenberg, H., Presley, S.M. 2017. *First record of Aedes aegypti and Aedes albopictus in thirteen Panhandle region counties of Texas, U.S.A.* Journal of Vector Ecology 42: 352–354.

Reisen, W.K., Lothrop, H.D y B. Lothrop. 2003. *Factors Influencing the Outcome of Mark-Release-Recapture Studies with Culex tarsalis (Diptera: Culicidae)*. J Med Entomol 40: 820–829.

Reiter, P. 2003. *Texas Lifestyle Limits Transmission of Dengue Virus*. Emerg Infect Dis 9: 86–89.

Rey, J.R., y P. Lounibos. 2015. *Ecología de Aedes aegypti y Aedes albopictus en América y transmisión de enfermedades*. Biomédica 35: 177–85.

Rodríguez, M.M., Bisset, J.A., Ricardo, Y., Pérez, O., Montada, D., Figueroa, e I. Fuentes. 2010. *Resistencia a insecticidas organofosforados en Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) de Santiago de Cuba, 1997-2009*. Revista Cubana de Medicina Tropical 62: 217–223.

Sanches, D. 2015. *Estructura ecológica de los hábitats larvarios de Aedes aegypti en reservorios artificiales de agua*. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Schroeder, W.J., y W.C MITchell. 1981. *Marking Tephritidae Fruit Fly Adults in Hawaii for Release-Recovery Studies* 1234. 4.

Silver, J.B. 2008. *Mosquito Ecology: Field Sampling Methods 3rd ed. Springer Netherlands*  
Disponible en: <https://www.springer.com/gp/book/9781402066658> [Visitado Julio 8, 2019].

Slosek, J. 1986. *Aedes aegypti mosquitoes in the Americas: A review of their interactions with the human population*. Social Science & Medicine 23: 249–257.

Souza, R.S., Virginio., F., Riback, T.I.S., Suesdek, L., Barufi, J.B., y F.A. Genta. 2019. *Microorganism-Based Larval Diets Affect Mosquito Development, Size and Nutritional Reserves in the Yellow Fever Mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Front Physiol 10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6465640/> [Visistado: Mayo 25, 2019].

Tieszen, L., Boutton, T. Tesdahl, K.G., y N. Slade. 1983. *Oecologia (Berlin) Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for 613C analysis of diet*.

Vander-Zanden, M.J., Clayton, M.K., Moody, E.K., Solomon, C.T., y B.C. Weidel. 2015. *Stable Isotope Turnover and Half-Life in Animal Tissues: A Literature Synthesis*. PLoS One 10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4321325/> [Visitado: Junio 4, 2019].

Verhulst, N.O., Loonen, J.A., y W. Takken. 2013. *Advances in methods for colour marking of mosquitoes*. Parasit Vectors 6: 200.

Wanner, H., Gu, H., Gunther, D., Hein, S., y S. Dorn. 2006. *Tracing spatial distribution of parasitism in fields with flowering plant strips using stable isotope marking*. Biological Control 39: 240–247.

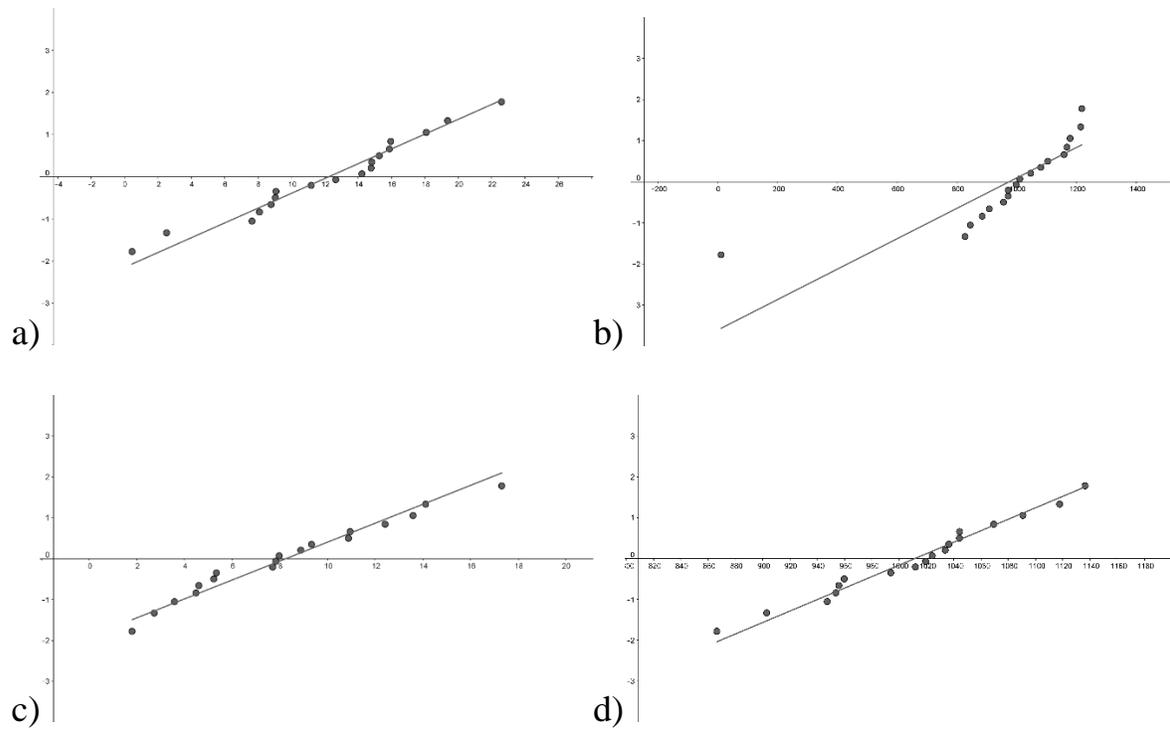
White. T.D. 2009. *Macrovertebrate Paleontology and the Pliocene Habitat of Ardipithecus ramidus*. Science 326: 67–93.

Wilkerson, R. Linton, Y., Fonseca, D.M., Schultz, T., Price, D.C., y D.A. Strickman. 2015. *Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships*. PLOS ONE 10: e0133602.

Yeap, H.L., Endersby, P., Johnson., P.H. Ritchie, S.A y A.A Hoffmann. 2013. *Body Size and Wing Shape Measurements as Quality Indicators of Aedes aegypti Mosquitoes Destined for Field Release*. Am J Trop Med Hyg 89: 78–92.

## VII. ANEXOS

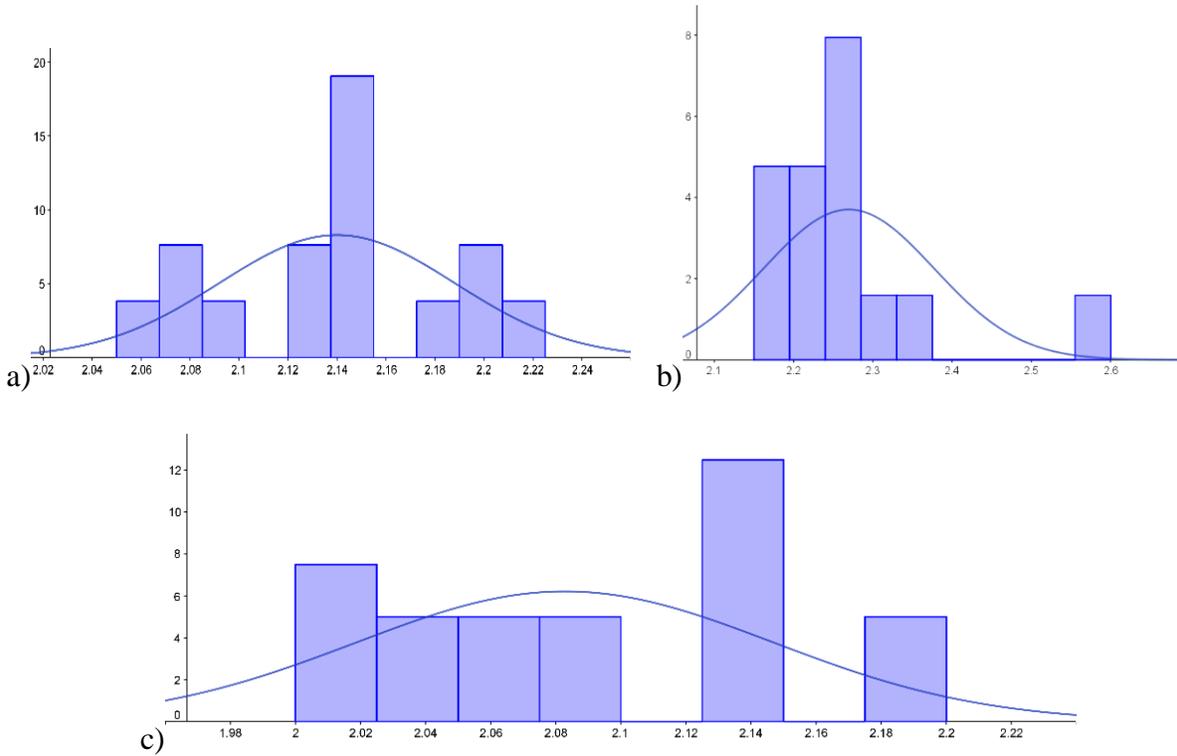
**Anexo 1:** Gráficas Q-Q para análisis de distribución normal de los residuos de las cantidades de isótopos estables encontrados en 18 mosquitos enriquecidos con tres tratamientos: a) cantidades de isótopo  $C^{13}$  del enriquecimiento individual b) cantidades de isótopo  $N^{15}$  del enriquecimiento individual c) cantidades de los isótopos  $C^{13}$  para el enriquecimiento dual d) cantidades de los isótopos  $N^{15}$  para el enriquecimiento dual.



**Anexo 2:** Resultados de las pruebas de Shapiro-Wilks

Tratamiento	W	Valor <p
$C^{13}$	0.97042	0.80550
$N^{15}$	0.68976	0.00006
$^{13}C+^{15}N$ (delta $C^{13}$ )	0.96666	0.7330
$^{13}C+^{15}N$ (delta $N^{15}$ )	0.97839	0.9318

**Anexo 3:** Histogramas de las longitudes de las alas de los mosquitos enriquecidos con los tres tratamientos para comprobación de la normalidad para la prueba experimental 3: efecto de los isótopos estables en la morfología de las alas a) medidas de alas de mosquitos enriquecidos con  $C^{13}$  b) medidas de alas de mosquitos enriquecidos con  $N^{15}$  c) medidas de alas de mosquitos enriquecidos con los dos isótopos



**Anexo No. 4:** Medidas de las alas izquierdas en mm de 15 machos por cada dieta enriquecida

Isotopo	mm	Isotopo	Mm	Isotopo	mm	Isotopo	mm
13C+15N	2.025	13C	2.05	15N	2.325	Control	2.36
13C+15N	2.05	13C	2.175	15N	2.175	Control	2.3
13C+15N	2.125	13C	2.075	15N	2.175	Control	2.29
13C+15N	2	13C	2.125	15N	2.2	Control	2.03
13C+15N	2.125	13C	2.2	15N	2.15	Control	2.34
13C+15N	2.075	13C	2.2	15N	2.275	Control	2.22
13C+15N	2.2	13C	2.15	15N	2.225	Control	2.48
13C+15N	2.2	13C	2.15	15N	2.6	Control	2.35
13C+15N	2.075	13C	2.15	15N	2.275	Control	2.15
13C+15N	2.05	13C	2.15	15N	2.275	Control	2.06
13C+15N	2.125	13C	2.125	15N	2.35	Control	2.31
13C+15N	2.125	13C	2.225	15N	2.575	Control	2.02
13C+15N	2	13C	2.1	15N	2.275	Control	2.13
13C+15N	2.025	13C	2.075	15N	2.2	Control	2.36
13C+15N	2	13C	2.15	15N	2.275	Control	2.03

**Anexo 5:** Valores del isótopo estable  $\delta C^{13}$  encontrado en los mosquitos de la prueba experimental 1: dosis de diferentes concentraciones

Concentraciones en gr/L	$\delta C^{13}$ vs. VPDB
0.00035	21.77
0.00035	12.25
0.00035	1.94
0.0005	57.58
0.0005	110.41
0.0005	75.73
0.00075	43.67
0.00075	40.35
0.00075	34.79
0.001	60.64
0.001	43.22
0.001	65.81

**Anexo 6:** Diagrama de flujo de la metodología: se presenta un resumen de las tres pruebas experimentales.

