

## Artículos de investigación original

Hechos Microbiol. 2018;9(1-2):33-42.  
© 2018 por la Universidad de Antioquia  
<http://www.udea.edu.co/hm>



## Diferencias en la forma alar de una población colombiana de *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón, 1940 entre las temporadas seca y lluviosa

Wing form differences of a Colombian population of *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón, 1940 between the dry and rainy seasons

Camilo Orozco-Araque\*, Margarita M. Correa†, Giovan F. Gómez‡

### RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** el éxito de *Anopheles nuneztovari* Gabaldón, 1940 como vector de malaria se relaciona en parte con su adaptación a diferentes condiciones ambientales. En este contexto, la variabilidad de estructuras como las alas, esenciales para el vuelo, podrían variar en respuesta a cambios climáticos en periodos cortos de tiempo.

**MÉTODOS:** se comparó la forma alar (tamaño y conformación) de una población de mosquitos hembras *An. nuneztovari* de Tierralta, Córdoba, en las temporadas climáticas, seca y lluviosa. Se digitalizaron 21 puntos de referencia en el ala izquierda, y se analizó la forma alar mediante morfometría geométrica.

**RESULTADOS:** se encontraron diferencias significativas en el promedio del tamaño alar entre las temporadas climáticas ( $p = 0,007$ ), pero no en su varianza ( $p = 0,85$ ); los mosquitos de temporada lluviosa presentaron tamaños alares más pequeños. Con respecto a la conformación alar, entre ambas temporadas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en sus promedios ( $p < 0,0001$ ), y la asignación correcta de los especímenes por temporada climática fue de 65% para la temporada seca y del 70% para la lluviosa.

**CONCLUSIONES:** los resultados sugieren un posible efecto de los periodos de sequía y lluvia sobre la conformación alar de *An. nuneztovari*. Se recomienda una evaluación más amplia, incluyendo un mayor número de poblaciones para ambas temporadas climáticas.

**PALABRAS CLAVE:** ala; *Anopheles nuneztovari*; morfometría geométrica; fenotipo; temporadas climáticas; Colombia.

\* Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

† Contacto: [margarita.correa@udea.edu.co](mailto:margarita.correa@udea.edu.co)

‡ Facultad de Derecho y Ciencias Forenses, Grupo de Investigación Ciencias Forenses y de la Salud, Tecnológico de Antioquia -Institución Universitaria, Medellín, Colombia.

Recepción:19/06/2018. Aceptación:2011/2018

Cómo citar este artículo: Orozco-Araque C, Correa MM, Gómez GF. Diferencias en la forma alar de una población colombiana de *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón, 1940 entre temporada seca y lluviosa. Hechos Microbiol.2018;9(1-2):33-42

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The role of *Anopheles nuneztovari* Gabaldón 1940 as a malaria vector is partially related to its capacity to adapt to diverse environmental conditions. In this context, the anatomy of some structures such as wings, essential for flying, could vary over a short period, as a response to climatic variations.

**METHODS:** The wing form (size and shape) of an *An. nuneztovari* population of Tierralta, Córdoba was compared during the rainy and dry seasons. Twenty-one landmarks were digitized on the left wing and wing form was analyzed by geometric morphometrics.

**RESULTS:** There was a significant difference on the average wing size between seasons ( $p = 0.007$ ), though not on variance ( $p = 0.85$ ); mosquitoes showed a smaller wing size during the rainy season. Regarding mean wing shape, there was a statistically significant difference between seasons ( $p < 0.0001$ ), and the correct assignment of the specimens by climate season was 65% for the dry season and 70% for the rainy season.

**CONCLUSIONS:** The results suggest a seasonal effect on the wing shape of *An. nuneztovari*. Further evaluation is recommended to include samples of a larger number of populations for both seasons.

**KEYWORDS:** *Anopheles nuneztovari*; geometric morphometrics; wing; phenotype; seasons; Colombia.

## INTRODUCCIÓN

*Anopheles nuneztovari* Gabaldón, 1940 se distribuye desde el este de Panamá hasta la Amazonía Boliviana<sup>1</sup> y en Colombia se ha reportado en 21 departamentos<sup>2</sup>, siendo reconocido como un vector principal de malaria.<sup>3</sup> Esta especie se ha caracterizado por la gran variabilidad en los caracteres morfológicos como los patrones de manchas oscuras y claras exhibidos en patas y alas, que sirven para diagnosticar la especie, y son usados para la identificación de la hembra adulta por claves dicotómicas;<sup>4,5</sup> lo que dificulta su diferenciación de especies de *Anopheles* morfológicamente similares, como las del Grupo Oswaldoi.<sup>4</sup> También presenta diferencias a nivel citogenético,<sup>6,7</sup> ecológico,<sup>8</sup> y en Suramérica, se describieron cinco linajes usando el gen

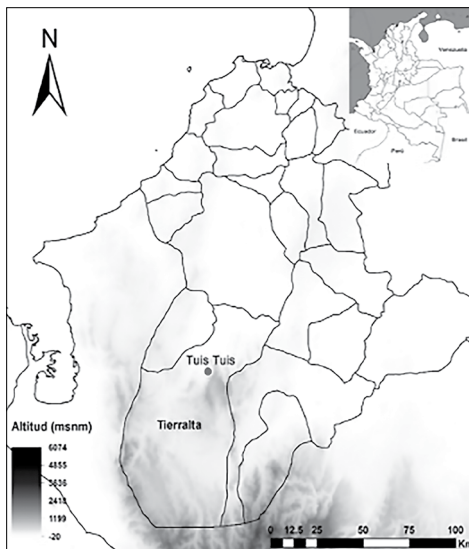
nuclear *white*, con el linaje 3 presente en Colombia.<sup>9</sup> Además, un análisis concatenado con los marcadores *COI*, *ITS2* y el gen *white*, evidenció al menos dos especies crípticas, *An. nuneztovari* s.s. localizado en Colombia y Venezuela, y *An. goeldii* presente en la cuenca del Amazonas.<sup>10</sup> De los dos clados detectados por secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I-*COI*, en el país se presenta el subclado 2C.<sup>3</sup> Por todo lo anterior, se ha sugerido que *An. nuneztovari* comprende un complejo de especies.<sup>1</sup>

*Anopheles nuneztovari* presenta un comportamiento generalmente antropofílico y endofágico en el noreste y noroeste de Colombia;<sup>10</sup> se ha encontrado infectado con *Plasmodium* spp. en la región Pacífica, en la localidad de Zacarías y en la región del Urabá Bajo Cauca y Alto Sinú, en localidades de los municipios de El Bagre, Tierralta y Montelíbano;<sup>11,12</sup> estas han sido históricamente las regiones con más casos de malaria en el país.<sup>3</sup> *Anopheles nuneztovari* posee una gran capacidad de adaptación a ambientes perturbados por el hombre;<sup>13</sup> variables como las precipitaciones y la temperatura se han asociado a cambios morfológicos, tal como se ha reportado para varias especies de *Anopheles*<sup>14,15</sup> y otros artrópodos.<sup>16-18</sup> En la mosca de la fruta *Drosophila* y en *Anopheles*, se ha documentado que, bajo condiciones de laboratorio, características morfométricas como la forma alar, pueden ser afectadas por aspectos climáticos como la temperatura.<sup>19-21</sup> Específicamente, la temperatura es un factor crítico en el desarrollo de los estadios inmaduros de los insectos, afectando su tasa de desarrollo, el crecimiento, la fecundidad, la abundancia y el rango de distribución de las especies.<sup>16,17</sup> Por ejemplo, en miembros del Complejo *An. gambiae*, se demostró que diferencias en temporadas climáticas tienen un gran impacto en su abundancia, distribución temporal y capacidad vectorial.<sup>22-24</sup> Adicionalmente, en estudios previos en *Anopheles*<sup>25</sup> y otros insectos,<sup>26</sup> se reportó el hallazgo de diferencias morfológicas influenciadas por diferentes temporadas climáticas. Sin embargo, pocos estudios<sup>22-26</sup> han evaluado en campo el efecto de las variaciones estacionales sobre la forma alar, tamaño y conformación. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la existencia de diferencias en la forma alar de *An. nuneztovari*, entre la temporada seca y lluviosa.

## MÉTODOS

### SITIO DE ESTUDIO

El estudio fue realizado en la vereda Tuis Tuis, ubicada en el municipio de Tierralta (TA) ( $8^{\circ}3'00,1''N$ ;  $76^{\circ}5'42,8''W$ ), localizado en el Departamento de Córdoba, región Urabá Bajo Cauca y Alto Sinú, al noroccidente de Colombia (Fig. 1). Esta región reportó 12.658 casos de malaria para el año de recolecta de los especímenes 2014.<sup>27</sup> Tuis Tuis tiene alrededor de 300 habitantes, está cercana a la central hidroeléctrica de Urrá y sus principales usos del suelo son la agricultura, especialmente cultivos de papa, yuca y arroz; los estanques piscícolas para la pesca, sirven de criaderos para las larvas de mosquitos anofelinos. Además, la extracción forestal ha generado un gran impacto en el paisaje, con posibles consecuencias en la transmisión de la malaria.<sup>28</sup> Las actividades antrópicas tienen efectos en la bionomía de los mosquitos *Anopheles*, produciendo cambios en su comportamiento y pudiendo impactar la transmisión de la malaria a nivel local.<sup>29</sup> La temporada de lluvias en el municipio de Tierralta comprende los meses de abril a noviembre y la temporada seca, de diciembre a marzo; siendo este último mes el que presenta las precipitaciones más bajas de todo el año en esta localidad. En el periodo 2014-2015, el municipio de Tierralta tuvo un promedio de precipitaciones en temporada lluviosa de 2025,2 mm y en temporada seca 355,7 mm.<sup>30</sup>



**Figura 1.** Ubicación de la localidad de Tuis Tuis, en el municipio de Tierralta. Departamento de Córdoba, Colombia

### RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MOSQUITOS

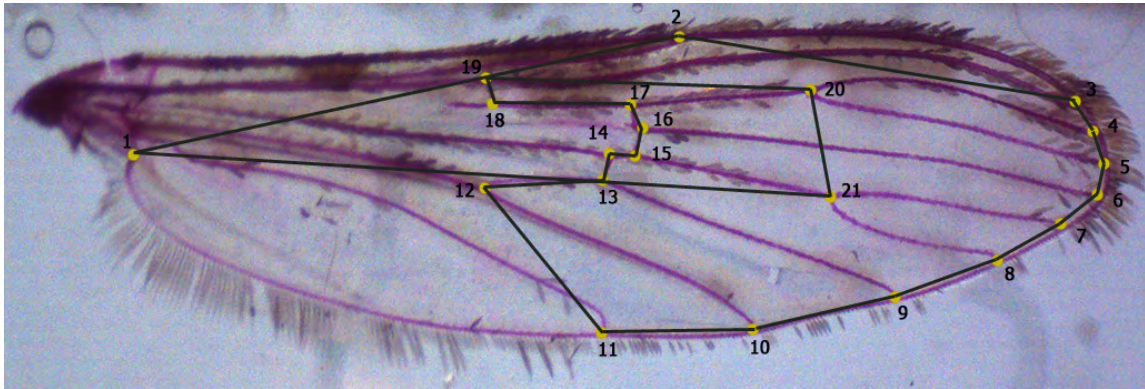
Los mosquitos se recolectaron en la localidad de Tuis Tuis, durante las dos temporadas climáticas; uno en el mes de octubre de 2014 (temporada lluviosa), y el otro en marzo de 2015 (temporada seca). La recolección de mosquitos se realizó en cebo humano y animal usando un aspirador bucal,<sup>31</sup> bajo un protocolo y consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad Nacional de Salud Pública, Acta 063-2012. Las recolecciones se realizaron de las 18:00 h a las 24:00 h, en el peridomicilio y en intradomicilio.

Los especímenes se identificaron con base en caracteres morfológicos, usando una clave taxonómica de *Anopheles* de Colombia.<sup>5</sup> Para la confirmación molecular de los mosquitos *An. nuneztovari*, el ADN se extrajo usando un protocolo de precipitación salina.<sup>32</sup> Más del 70% de los mosquitos identificados por morfología como *An. nuneztovari* se confirmaron molecularmente (resultados no mostrados), usando la región ITS2 con cebadores y condiciones previamente estandarizadas.<sup>33-35</sup>

### ANÁLISIS DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA ALAR

#### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para el análisis de morfometría geométrica se seleccionaron especímenes *An. nuneztovari* que tenían sus alas en estado óptimo. Para la temporada lluviosa se seleccionó el ala izquierda de 55 especímenes y de 60 ejemplares, para la temporada seca. Las alas fueron descamadas mecánicamente con un pincel, se sometieron a un lavado con etanol al 100% y posteriormente, a tinción con fucsina ácida;<sup>36</sup> se montaron en láminas portaobjetos, se sellaron con laminillas usando pegamento (Fig. 2) y se depositaron en la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular, Universidad de Antioquia, Colombia. Las fotografías de las alas fueron capturadas usando una cámara digital (Moticam 2500, Motic China Group Co, Ltd.), acoplada a un estereomicroscopio (Olympus® Trinocular Microscope SZ61).



**Figura 2.** Puntos de referencia del ala izquierda de *An. nuneztovari* usados en el análisis morfométrico

#### DIGITALIZACIÓN DE LOS PUNTOS REFERENCIA Y REPETIBILIDAD

Se seleccionaron 21 puntos de referencia (PR) para cada ala (Fig. 2) (Bookstein, 1991). Las coordenadas resultantes fueron sometidas a un análisis generalizado de Procrustes (AGP), el cual remueve toda la información que no está relacionada a la conformación.<sup>37-40</sup> Con el fin de comprobar la precisión del digitalizador (COA) en la toma de los datos, se probó la repetibilidad del dato generado (medida del punto de referencia), digitalizando dos veces cada una de las alas de 30 especímenes seleccionados aleatoriamente.<sup>40</sup> Los análisis de morfometría geométrica se realizaron con el ala izquierda.<sup>37</sup>

#### TAMAÑO ALAR

La variable tamaño fue medida con el estimador isométrico conocido como tamaño centroide (TC), el centro de gravedad de una configuración, definido como la raíz cuadrada de la suma de las distancias de los cuadrados de los PR.<sup>41</sup> Se probó si los datos se distribuían normalmente mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS). Debido a que los datos cumplieron el supuesto de normalidad, se hicieron comparaciones pareadas de las medias de los tamaños centroides de cada temporada climática con la prueba *t* de Student (*t*) y análisis de sus varianzas con la prueba *F* de Fisher (*f*).

#### ALOMETRÍA Y CONFORMACIÓN ALAR

El efecto alométrico se define como el cambio en la conformación asociado con diferencias en el

tamaño;<sup>42</sup> dicho efecto fue evaluado por medio de una regresión multivariada. Luego, para comparar si existían diferencias en la conformación alar entre los especímenes de las dos temporadas, se realizó un análisis multivariado de la varianza (MANOVA; 1.000 permutaciones).<sup>43</sup> Previo a los análisis de conformación alar, se verificaron los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas, mediante las pruebas de normalidad multivariada y el estadístico *M* de Box, respectivamente. Para explorar diferencias en el promedio de la conformación alar de los especímenes correspondientes a cada temporada climática, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y se calcularon las distancias Euclidianas y su significancia estadística usando 1.000 permutaciones. Se evaluó si la conformación alar de cada espécimen permitía asignarlo con precisión a su temporada climática mediante un análisis discriminante (AD), y los resultados se interpretaron con base en una escala estandarizada.<sup>44</sup> Adicionalmente, se obtuvieron las distancias de Mahalanobis y se compararon los promedios de conformación alar de cada temporada climática mediante un análisis pareado (1.000 permutaciones).

#### SOFTWARE

El paquete de CLIC<sup>37</sup> y el *software* PAST<sup>45</sup> se usaron para los análisis morfométricos. El sitio de recolección fue graficado de acuerdo con coordenadas geográficas en un mapa usando ESRI ArcGIS® *software* versión 10.

## RESULTADOS

Se recolectaron 162 especímenes en la estación lluviosa; de estos, 84 (51,9%) fueron identificados como *An. nuneztovari*. En temporada seca, de 287 especímenes recolectados, 179 (62,4%) fueron *An. nuneztovari*.

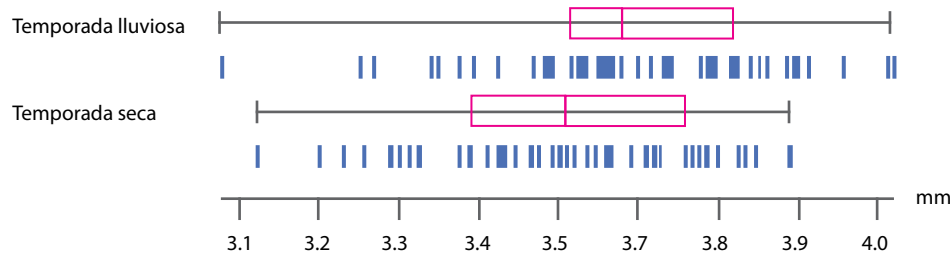
### REPETIBILIDAD

Se evidenciaron altos niveles de repetibilidad que indican precisión en la digitalización de los PR analizados, coordenadas X, Y ( $R \approx 0,96$ ) y tamaño centroide. La repetibilidad para los dos primeros componentes

principales (CP) fue  $R = 0,96$  para el CP1 y  $R = 0,88$  para el CP2.

### TAMAÑO ALAR

La media del TC para las alas de temporada lluviosa y seca fue de 3,56 mm y 3,65 mm, respectivamente. El TC para las dos temporadas climáticas presentó una distribución normal (KS,  $p < 0,01$ ). Se encontró una variación significativa en las comparaciones de las medias del TC entre las temporadas climáticas (prueba  $t$  de Student,  $p = 0,01$ ), pero no en su varianza, (prueba F,  $p = 0,84$ ) (Fig. 3).

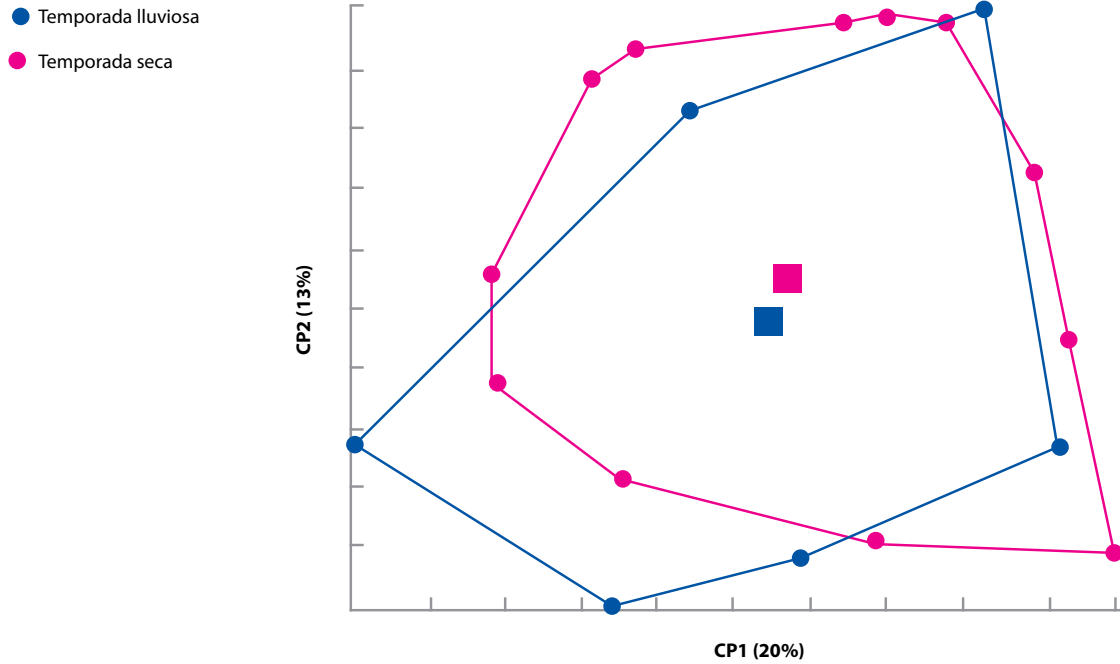


**Figura 3.** Análisis de tamaño centroide alar. Muestra la variación en el tamaño centroide en milímetros (mm) de las alas, en las temporadas seca y lluviosa. Las líneas verticales azules representan especímenes. Las cajas muestran la media como una línea vertical central junto con los percentiles 25 y 75 a ambos lados

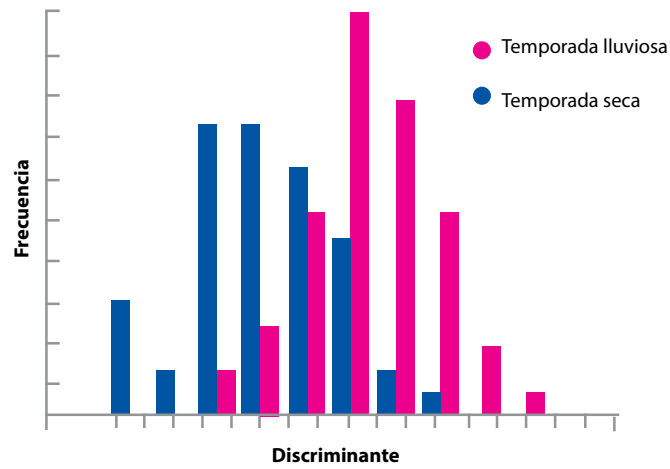
### ALOMETRÍA Y CONFORMACIÓN ALAR

El efecto alométrico no fue significativo entre los especímenes de diferentes temporadas (Wilks lambda,  $p = 0,116$ ). El ACP reveló que los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2), explicaban el 33% de la varianza en la conformación (Fig. 4). El análisis de MANOVA detectó diferencias estadísticamente significativas entre las variables de conformación de los especímenes de las dos temporadas (Wilks Lambda; 0,4515,  $F = 2,43$ ,

$p < 0,05$ ). La distancia de Mahalanobis entre las conformaciones alares de *An. nuneztovari* de las dos temporadas climáticas, lluviosa vs. seca, fue de 2,19 y significativa ( $p < 0,005$ ). Las variables de conformación presentaron una distribución normal ( $p = 0,053$ ), con diferencias en sus varianzas ( $p = 0,02$ ). El AD reveló una asignación sustancial para los especímenes recolectados en las temporadas lluviosa (65%) y seca (70%) (Fig. 5 y Tabla 1).



**Figura 4.** Análisis de componentes principales. Los cuadrados ilustran los promedios de conformación alar. CP1 y CP2: componentes principales 1 y 2, respectivamente



**Figura 5.** Diagrama de los puntajes de análisis discriminante de las conformaciones alares entre especímenes *An. nuneztovari* de temporada seca y lluviosa

**Tabla 1.** Porcentaje de asignación correcta a la temporada climática, con base en la conformación alar. Índice de concordancia propuesto por Landis y Koch et al. 1977

Temporada climática	n de asignados correctamente/n total	%	Interpretación
Lluviosa	36/55	65	Sustancial*
Seca	42/60	70	Sustancial*

\* Es sustancial de 61-80%

## DISCUSIÓN

Los resultados sugieren que existen variaciones en el tamaño y la conformación alar de *An. nuneztovari* entre las dos temporadas climáticas. Los especímenes se diferenciaron en dos grupos de acuerdo con la estación climática, lluviosa vs. seca. Los mosquitos recolectados en la temporada seca fueron más grandes (TC 3,65 mm), que los de la temporada lluviosa (TC 3,56 mm). Estos resultados concuerdan con los de un trabajo en *Anopheles coluzzii*, simulando condiciones climáticas de campo en el laboratorio. De las larvas de *An. coluzzii* criadas con las condiciones de temporada seca, emergieron mosquitos adultos más grandes y con mayor tamaño alar que los de temporada lluviosa.<sup>25</sup> Ello se atribuyó a las temperaturas durante la ontogénesis, que son fundamentales durante el desarrollo de las larvas y su crecimiento. Este fenómeno puede ser explicado por procesos como la diapausa, estado en el que los insectos pueden sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables, como temperaturas extremas, sequía o carencia de alimento; en estas condiciones el metabolismo disminuye y se generan especímenes de mayor tamaño.<sup>46</sup> No obstante, existen varios ejemplos contrastantes en la literatura; se ha documentado sobre insectos que se desarrollan a temperaturas más altas que los especímenes son más pequeños. Sin embargo, los mecanismos fisiológicos para estos cambios, aún no son conocidos.<sup>47,48</sup> En un estudio previo de morfometría geométrica realizado con especímenes *An. nuneztovari* de localidades ubicadas al oeste, noroeste y noreste de Colombia, se encontraron diferencias en el tamaño alar entre las poblaciones.<sup>49</sup> Se sugirió que estas diferencias en tamaño podrían ser atribuidas a condiciones ambientales<sup>15,50</sup> y a otras condiciones heterogéneas de los criaderos como la disponibilidad de alimento y la densidad larvaria,<sup>13,51</sup> que afectan el tamaño del adulto y su capacidad vectorial.<sup>52,53</sup> Sin embargo, en dicho trabajo no se evaluaron diferencias estacionales que pudieron afectar el tamaño de los especímenes, como se detectó en el presente trabajo.

Además de las diferencias detectadas en el tamaño alar en este estudio, se encontraron diferencias significativas en el promedio de la conformación alar de *An. nuneztovari* entre la temporada seca y lluviosa. Dada la alta heredabilidad descrita para la conformación alar<sup>54</sup>

y que los especímenes se recolectaron en la misma localidad, y en un periodo relativamente corto de tiempo, nuestra hipótesis es que las diferencias se deben a la existencia de plasticidad fenotípica en estos caracteres, más que al efecto de la deriva genética.<sup>55</sup> Estos resultados son relevantes dado que las diferencias en conformación alar afectan la aerodinámica del vuelo de *Anopheles* e indirectamente otros aspectos biológicos como la dispersión, el apareamiento y la búsqueda de alimento,<sup>56-59</sup> aspectos relevantes en la dinámica de transmisión de la malaria.

La localidad de Tuis Tuis donde se recolectaron los especímenes para este estudio, está ubicada en el municipio de Tierralta; en esta región Urabá Bajo Cauca y Alto Sinú, para la época de colecta de los especímenes, reportaba el mayor número de casos de malaria del país.<sup>27</sup> En trabajos previos, *An. nuneztovari* se encontró infectado con *Plasmodium* spp. en Tierralta y en otras localidades de esta región.<sup>3,11</sup> Es poco lo que se conoce sobre la influencia de la temperatura en la capacidad vectorial y la transmisión del parásito, y los trabajos publicados no presentan resultados concluyentes. En Brasil, usando microsátélites, se encontraron subpoblaciones del vector neotropical *An. darlingi* relacionadas con las estaciones climáticas; sin embargo, las tasas de infección por *Plasmodium* spp. eran similares entre estas.<sup>60</sup> Por el contrario, en el vector de malaria asiático, *An. stephensi*, se encontró que las fluctuaciones diarias de temperatura afectaban la infección por el parásito y su tasa de desarrollo en el mosquito; a temperaturas más altas su desarrollo en el mosquito era más lento.<sup>61</sup> En especies anofelinas de África como *An. arabiensis* y *An. funestus*, los cambios en la temperatura afectan su desarrollo y supervivencia, lo que influye en su distribución regional y preferencias locales de hábitats.<sup>23</sup> Todo esto tiene consecuencias en la transmisión local o regional de la malaria. En los trabajos realizados en Colombia, en los que se ha encontrado *An. nuneztovari* naturalmente infectado, no se especifica la temporada climática en la que se recolectaron los especímenes; por lo que sería importante realizar estudios para determinar si existe una relación entre las temporadas climáticas, e infección natural por *Plasmodium* en este vector de malaria en Colombia. Esto podría constituir un nuevo indicador de transmisión de malaria en el país.

## CONCLUSIONES

Los resultados sugieren un posible efecto de las temporadas seca y lluviosa sobre la conformación alar de *An. nuneztovari* en el periodo evaluado; sin embargo, se recomienda evaluar un mayor número de poblaciones recolectadas en ambas temporadas climáticas. Además, trabajos futuros podrían evaluar el efecto de variables como la densidad larvaria, la diversidad de especies y la dieta en *An. nuneztovari* sobre cambios morfométricos, la historia de vida de *An. nuneztovari* y capacidad vectorial para transmitir *Plasmodium*.

## AGRADECIMIENTOS

A los integrantes del Grupo de Investigación de Microbiología Molecular, Universidad de Antioquia por su contribución para la ejecución de este trabajo. Adicionalmente, a miembros de la Secretaría de Salud de Tierralta, Córdoba por su apoyo logístico.

## FUENTE DE FINANCIACIÓN

Este trabajo recibió apoyo de la Estrategia para la Sostenibilidad de Grupos de Investigación de la Universidad de Antioquia 2016-2017, Código N° ES84160123. A Joven Investigador Colciencias mediante convenio Beca-Pasantía N° JIC 161.2014.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran la ausencia de conflictos de intereses en esta publicación.

## REFERENCIAS

1. **Mirabello L, Conn JE.** Population analysis using the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. *Med Vet Entomol.* 2008;22(2):109-19.
2. **Montoya-Lerma J, Solarte YA, Giraldo-Calderón GI, Quiñones ML, Ruiz-López F, Wilkerson RC, et al.** Malaria vector species in Colombia: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(Suppl. I):223-38.
3. **Gutiérrez LA, Gonzalez JJ, Gomez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S, et al.** Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(8):1117-24.
4. **Fajardo Ramos M, González Obando R, Fidel Suárez M, López D, Wilkerson R, Sallum MAM.** Morphological analysis of three populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103:85-92.
5. **González R, Carrejo N.** Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: claves y notas de distribución. 2a ed. Cali: Universidad del Valle; 2009. 260 p.
6. **Conn JE, Puertas YR, Seawright JA.** A new cytotype of *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela and Colombia. *J Am Mosq Control Assoc.* 1993;9:294-301.
7. **Conn JE.** A genetic study of the malaria vector *Anopheles nuneztovari* from western Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc.* 1990;6(3):400-5.
8. **Elliott R.** The influence of vector behavior on malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 1972;21(5):755-63.
9. **Calado DC, Foster PG, Bergo ES, Santos CLS Dos, Galardo AKR, Sallum MAM.** Resurrection of *Anopheles goeldii* from synonymy with *Anopheles nuneztovari* (Diptera, Culicidae) and a new record for *Anopheles dunhami* in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(8):791-9.
10. **Scarpassa VM, Conn JE.** Mitochondrial DNA detects a complex evolutionary history with pleistocene epoch divergence for the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* sensu lato. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85(5):857-67.
11. **Naranjo-Díaz N, Rosero DA, Rua-Urbe G, Luckhart S, Correa MM.** Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasites & Vectors.* 2013;6:61.
12. **Naranjo-Díaz N, Altamiranda M, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific region. *PLoS One.* 2014;9(8):1-9.
13. **Olano VA, Brochero HL, Sáenz R, Quiñones ML, Molina JA.** Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica.* 2001;21:402-8.
14. **Ayala D, Caro-Riaño H, Dujardin JP, Rahola N, Simard F, Fontenille D.** Chromosomal and environmental determinants of morphometric variation in natural populations of the malaria vector *Anopheles funestus* in Cameroon. *Infect Genet Evol.* 2011;11:940-7.



15. **Gómez GF, Márquez EJ, Gutiérrez LA, Conn JE, Correa MM.** Geometric morphometric analysis of Colombian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) reveals significant effect of environmental factors on wing traits and presence of a metapopulation. *Acta Trop.* 2014;135:75-85.
16. **Couret J, Dotson E, Benedict MQ.** Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One.* 2014;9(2).
17. **Damos P, Savopoulou-Soultani M.** Temperature-driven models for insect development and vital thermal requirements. *Psyche (Stuttg).* 2012;123405:1-13.
18. **Louise C, Vidal PO, Suesdek L.** Microevolution of *Aedes aegypti*. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137851.
19. **Aytekin S, Aytekin AM, Alten B.** Effect of different larval rearing temperatures on the productivity (Ro) and morphology of the malaria vector *Anopheles superpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) using geometric morphometrics. *J Vector Ecol.* 2009;34:32-42.
20. **Czarnoleski M, Cooper BS, Kierat J, Angilletta, Jr. MJ.** Flies developed small bodies and small cells in warm and in thermally fluctuating environments. *J Exp Biol.* 2013;216:2896-901.
21. **Petavy G, David JR, Debat V, Gibert P, Moreteau B.** Specific effects-of cycling stressful temperatures upon phenotypic and genetic variability of size traits in *Drosophila melanogaster*. *Evol Ecol Res.* 2004;6(6):873-90.
22. **Aboagye-Antwi F, Tripet F.** Effects of larval growth condition and water availability on desiccation resistance and its physiological basis in adult *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Malar J.* 2010;9:225.
23. **Lyons CL, Coetzee M, Chown SL.** Stable and fluctuating temperature effects on the development rate and survival of two malaria vectors, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *Parasites & Vectors.* 2013;6:104.
24. **Mouline K, Manai W, Agnew P, Tchonfenet M, Brengues C, Dabire R, et al.** Physiology and development of the M and S molecular forms of *Anopheles gambiae* in Burkina Faso (West Africa). *Med Vet Entomol.* 2012;26(4):447-54.
25. **Hidalgo K, Dujardin JP, Mouline K, Dabiré RK, Renault D, Simard F.** Seasonal variation in wing size and shape between geographic populations of the malaria vector, *Anopheles coluzzii* in Burkina Faso (West Africa). *Acta Trop.* 2015;143:79-88.
26. **Galesi MM, Mobili S, Cigognini R, Hardersen S, Sacchi R.** Season matters: differential variation of wing shape between sexes of *Calopteryx splendens* (Odonata: Calopterygidae). *Zoomorphology.* 2016;1-10.
27. **INS.** Boletín Epidemiológico Semanal. Estadísticas del Sistema de Vigilancia en Salud Pública —SIVIGILA, Casos Totales en la Semana Epidemiológica 52 y Acumulados del Año. Bogotá: Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública; 2014.
28. **Conn JE, Vineis JH, Bollback JP, Onyabe DY, Wilkerson RC, Povoas MM.** Population structure of the malaria vector *Anopheles darlingi* in a malaria-endemic region of eastern Amazonian Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(5):798-806.
29. **Kamdem C, Tene Fossog B, Simard F, Etoua J, Ndo C, Kengne P, et al.** Anthropogenic habitat disturbance and ecological divergence between incipient species of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLOS ONE.* 2012;7(6).
30. **IDEAM.** Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Medioambientales. [Internet]. 2015. [Consultado 2015 Oct 1]. Datos suministrados por el IDEAM, estación meteorológica, N:13015; represa Urrao. Disponible en: <http://www.ideam.gov.co>
31. **WHO.** Malaria entomology and vector control. In: Learner's guide. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000. p. 107.
32. **Rosero DA, Gutiérrez LA, Cienfuegos AV, Jaramillo LM, Correa MM.** Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. *Rev Colomb Entomol.* 2010;36:260-3.
33. **Cienfuegos AV, Córdoba L, Gómez GF, Luckhart S, Conn JE, Correa MM.** Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Rev Biomédica.* 2008;19(1):35-44.
34. **Gómez GF, Bickersmith SA, González R, Conn JE, Correa MM.** Molecular taxonomy provides new insights into *Anopheles* species of the neotropical Arribalzagia Series. *PLOS ONE.* 2015;10(3):1-17.
35. **Zapata MA, Cienfuegos AV, Quirós OI, Quiñones ML, Luckhart S, Correa MM.** Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Uraba, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of ITS sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(1):67-72.
36. **Lorenz C, Suesdek L.** Short report: Evaluation of chemical preparation on insect wing shape for geometric morphometrics. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89(5):928-31.
37. **Dujardin JP.** Morphometrics applied to medical entomology. *Infect Genet Evol.* 2008;8:875-90.
38. **Rohlf F, Slice D.** Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst Biol.* 1990;39(1):40-59.
39. **Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL.** Geometric morphometrics for biologists: a primer. Second edition. San Diego, California: Elsevier Academic Press; 2004. 443 p.
40. **Arnqvist G, Mårtensson T.** Measurement error in geometric morphometrics: Empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. *Acta Zool Acad Sci Hungaricae.* 1998;44:73-96.

41. **Bookstein FL.** Morphometric tools for landmark data: geometry and biology Cambridge University Press. New York: Cambridge University Press; 1991. 456 p.
42. **Klingenberg CP.** Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biol Rev.* 1998;73(1):79-123.
43. **Good P.** Permutation Tests: A Practical Guide to Resampling Methods for Testing Hypotheses. New York: Springer; 1994. 228 p.
44. **Landis JR, Koch GG.** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159-74.
45. **Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD.** Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron.* 2001;4:9-18.
46. **Huestis DL, Yaro AS, Traore AI, Dieter KL, Nwagbara JI, Bowie AC, et al.** Seasonal variation in metabolic rate, flight activity and body size of *Anopheles gambiae* in the Sahel. *J Exp Biol.* 2012;215(Pt 12):2013-21.
47. **Colinet H, Sinclair BJ, Vernon P, Renault D.** Insects in fluctuating thermal environments. *Annu Rev Entomol.* 2015;60:123-40.
48. **Reiskind MH, Zarrabi AA.** Is bigger really bigger? Differential responses to temperature in measures of body size of the mosquito, *Aedes albopictus*. *J Insect Physiol.* 2012;58(7):911-7.
49. **Orozco-Araque C, Bedoya YA, Gómez GF.** Morfometría geométrica alar de poblaciones de *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) de Colombia [Tesis de grado en Microbiología y Bioanálisis]. Medellín: Universidad de Antioquia; 2014.
50. **Araújo M da S, Gil LHS, de Almeida e Silva A.** Larval food quantity affects development time, survival and adult biological traits that influence the vectorial capacity of *Anopheles darlingi* under laboratory conditions. *Malaria J.* 2012;11:261.
51. **Brochero H, Pareja PX, Ortiz G, Olano VA.** Breeding places and biting activity of *Anopheles* species in the municipality of Cimitarra, Santander, Colombia. *Bio-médica.* 2006;26:269-77.
52. **Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Thongrunskiat S, Apiwathnasorn C, Singhaniyom S, Bellec C, et al.** Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Trop Med Int Heal.* 2007;12(11):1354-60.
53. **Takken W, Smallegange RC, Vigneau AJ, Johnston V, Brown M, Mordue-Luntz AJ, et al.** Larval nutrition differentially affects adult fitness and Plasmodium development in the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Parasit Vectors.* 2013;6:345.
54. **Bitner-Mathé BC, Klaczko LB.** Size and shape heritability in natural populations of *Drosophila mediopunctata*: Temporal and microgeographical variation. *Genetica.* 1999;105(1):35-42.
55. **Jirakanjanakit N, Leemingsawat S, Dujardin JP.** The geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti* in isofemale lines through successive generations. *Infect Genet Evol.* 2008;8(4):414-21.
56. **Sanford MR, Demirci B, Marsden CD, Lee Y, Cornel AJ, Lanzaro GC.** Morphological differentiation may mediate mate-choice between incipient species of *Anopheles gambiae* s.s. *PLoS One.* 2011;6.
57. **Debat V, Cornette R, Korol A, Nevo E, Soulet D, David J.** Multidimensional analysis of *Drosophila* wing variation in Evolution Canyon. *J Genet.* 2008;87(4):407-19.
58. **Gilchrist AS, Azevedo RBR, Partridge L, O'Higgins P.** Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster* wing shape. *Evol Dev.* 2000;2:114-24.
59. **Bos FM, Lentink D, Oudheusden BW Van, Bijl H.** Influence of wing kinematics on performance in hovering insect flight. *J Biomech.* 2006;39:S358.
60. **Angélla AF, Salgueiro P, Gil LHS, Vicente JL, Pinto J, Ribolla PEM.** Seasonal genetic partitioning in the neotropical malaria vector, *Anopheles darlingi*. *Malaria J.* 2014;13:203.
61. **Paaajmans KP, Blanford S, Bell AS, Blanford JI, Read AF, Thomas MB.** Influence of climate on malaria transmission depends on daily temperature variation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(34):15135-9.