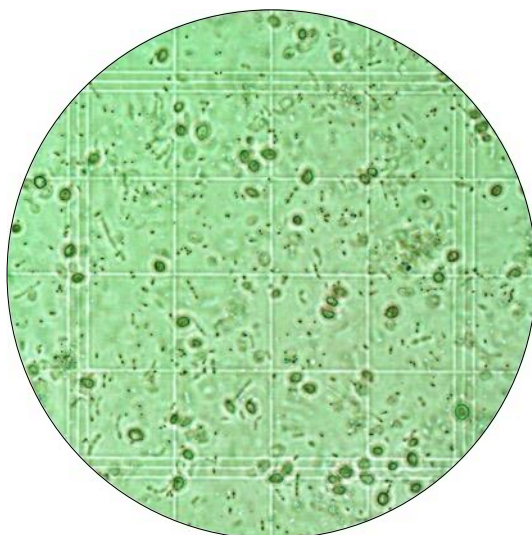


# **Levadura torula como dieta para larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae): influencia sobre el desarrollo morfológico y funcional de los adultos**



Autor: Lic. Ilario Fuentes López  
Tutores: María Magdalena Rodríguez Coto. PhD  
René Gato Armas. MSc

Trabajo para optar por el título de Máster en Entomología Médica y  
Control de Vectores

**La Habana  
2020**

## RESUMEN

Las investigaciones de entomología y control de vectores requieren material biológico de alta calidad para garantizar resultados confiables y reproducibles. La dieta de los estadios larvarios es un factor clave para la cría de *Ae. aegypti* porque tiene repercusión durante el resto de la vida del insecto. Ello motivó a comparar la eficacia y eficiencia de dos dietas para la cría a pequeña escala de larvas de *Ae. aegypti*. Se suministró levadura torula o harina de pescado a estadios inmaduros de *Ae. aegypti* y se comparó su eficacia sobre la supervivencia, largo del ala, fecundidad y fertilidad de los adultos. Se evaluó además la eficiencia, considerando la relación entre el precio de los sustratos y su eficacia como dieta. Los adultos de *Ae. aegypti* alimentados en su fase larvaria con levadura torula sobrevivieron más que los que recibieron harina de pescado, como promedio las hembras fueron 4,7 y los machos 5,1 días más longevos. La fecundidad y la fertilidad fue similar en todos los mosquitos, independientemente de la dieta suministrada. El largo del ala de los adultos que recibieron como dieta la levadura torula en su fase larvaria, resultó mayor que el de aquellos criados con harina de pescado, independientemente del sexo. El análisis en su conjunto de las cuatro variables exploradas, sugiere que la levadura torula tiene mayor eficacia que la harina de pescado como dieta de estadios larvarios de *Ae. aegypti*. La relación precio – eficacia hace más eficiente la dieta con levadura torula con respecto a la harina de pescado. Estos resultados estimulan la realización de estudios de optimización de la dieta para *Ae. aegypti* en el insectario del IPK, que incluya la levadura torula en combinación con otros sustratos, para mejorar el material biológico destinado a investigaciones científicas.

**En memoria de María Magdalena Rodríguez Coto y  
Omayda Pérez Insueta**

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	2
OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
<i>Aedes aegypti</i> .....	4
Oviposición, huevos y eclosión .....	9
Larvas .....	13
Pupas.....	18
Emergencia.....	19
Alimentación de estadios inmaduros de <i>Aedes aegypti</i> para su cría a pequeña escala	21
Levadura torula.....	24
Los conceptos de eficacia y eficiencia .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Diseño del estudio .....	30
Condiciones ambientales del laboratorio.....	30
Cepas de mosquitos .....	30
Dietas .....	30
Preparación del material biológico .....	31
Conformación de los grupos .....	32
Cría de adultos .....	32
Procesamiento y análisis estadístico de los datos.....	35
Procedimientos Éticos.....	35
RESULTADOS .....	37
DISCUSION.....	41
CONCLUSIONES .....	51
RECOMENDACIONES .....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) constituye una amenaza para la salud de millones de personas en todo el mundo, por su capacidad para transmitir virus de diferentes familias [1]. Es considerado el vector primario de dengue, chikungunya y Zika en las Américas [2]. Existen evidencias de su origen africano, pero ha colonizado exitosamente la mayor parte de las regiones tropicales y sub-tropicales en todo el mundo [3].

*Aedes aegypti* es un insecto holometábolo, con fases juveniles acuáticas que se alimentan de detritus orgánicos, procariontes, levaduras, microalgas y pequeños invertebrados [4]. Es una de las especies de mosquito más ampliamente estudiada, en primer lugar por su importancia médica, pero además por su fácil cría en laboratorio, especialmente porque sus huevos se pueden conservar viables por períodos prolongados [5].

Las investigaciones entomológicas de laboratorio requieren de material biológico de alta calidad para la realización de bioensayos y otros procedimientos, que garanticen resultados confiables, reproducibles y comparables. Como en todo proceso, una deficiencia inicial repercutirá negativamente sobre todas las fases subsiguientes [6].

La dieta de las fases acuáticas incipientes de los mosquitos es un factor clave, debe cubrir un amplio y complejo rango de nutrientes, esenciales para el adecuado desarrollo morfológico y funcional, que tendrá repercusión durante el resto de la vida, incluyendo la adultez. Las deficiencias nutricionales afectan la productividad en términos cuantitativos de un laboratorio, pero de manera especial comprometen la calidad de los mosquitos resultantes [7].

Comúnmente se reportan dietas para estadios inmaduros compuestas por varios sustratos. El objetivo fundamental en la elección de los mismos es la cobertura de todos los elementos nutricionales que deben ser suministrados al mosquito, pero debe garantizarse además la sostenibilidad, considerando que sean asequibles y eficientes desde el punto de vista económico [8-11].

En el insectario del Instituto de medicina tropical Pedro Kourí (IPK) se utiliza desde hace años la harina de pescado como sustrato único para alimentar las larvas de *Ae. aegypti* [12]. Si bien muchas de dietas reportadas internacionalmente contienen pescado, no lo tienen como sustrato único, incluso se prefiere el atún, por su menor proporción de grasa [6, 8, 9, 13-16].

La levadura torula es el producto final de un proceso fermentativo de *Candida utilis* (*C. utilis*), generalmente sobre sustratos azucarados. Es un producto rico en aminoácidos, hidratos de carbono y sales inorgánicas, con bajo contenido de grasas [12]. En Cuba se obtenía tradicionalmente a partir de la melaza, que es un subproducto de la producción de azúcar [17]. La reducción de los centrales azucareros en el país llevó a destinar el 100% de la melaza a la producción de alcohol mediante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Después de la destilación del alcohol queda la vinaza, que constituye un residual abundante y agresivo; que suele contaminar las aguas superficiales y subterráneas, con un deterioro significativo del medio ambiente donde están ubicadas las destilerías [17].

La vinaza es, básicamente, restos de *S. cerevisiae* y por ello tiene alto contenido de nutrientes. Sin embargo, su elevada acidez y presencia de residuos tóxicos limitan su uso directo para la alimentación animal. Especialistas del Instituto de Ciencia Animal de Cuba diseñaron un proceso fermentativo secundario con *C. utilis* sobre la vinaza, que permite obtener levadura torula y a la vez elimina el problema de la contaminación ambiental por los desechos de la producción de alcohol [17].

Las propiedades nutricionales, características físicas y asequibilidad de la levadura torula sugieren su factibilidad para la alimentación de mosquitos en fase larvaria, lo cual motivó la presente investigación.

## **HIPÓTESIS**

La utilización de levadura torula como dieta de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* permite la obtención de adultos de alta calidad y de manera eficiente desde el punto de vista económico

## **OBJETIVO GENERAL**

Comparar la eficacia y eficiencia de la levadura torula y la harina de pescado como dietas para la cría a pequeña escala de larvas de *Ae. aegypti*

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Estimar la supervivencia de adultos de *Ae. aegypti* alimentados con levadura torula o harina de pescado durante sus estadios larvarios
2. Comparar la fecundidad y la fertilidad de adultos de *Ae. aegypti* que recibieron levadura torula o harina de pescado como dieta durante sus fases acuáticas
3. Comparar el tamaño de los adultos de *Ae. aegypti* alimentados en la fase larvaria con levadura torula o harina de pescado
4. Analizar la relación entre el costo económico y la eficacia de la levadura torula y la harina de pescado como dietas de larvas de *Ae. aegypti*



## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### *Aedes aegypti*

*Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) es un insecto que al parecer es de origen africano y se piensa que fue introducido en Las Américas con la trata de esclavos [18]. En la actualidad está distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Con hábitos netamente antropofílicos, la ubicación de sus criaderos es muy frecuente en las viviendas o sus alrededores [19].

*Aedes aegypti* es un insecto holometábolo, con fases inmaduras que incluyen tres formas bien diferenciadas: huevo, larva y pupa; y una fase madura también llamada aérea o adulta [20]. El tiempo de vida medio del adulto es variable, depende de las condiciones ambientales. Habitualmente oscila entre dos semanas y dos meses, incluso un poco más. Las hembras suelen ser más longevas que los machos [19].

El ciclo de vida de las etapas inmaduras puede ser muy variable, influenciado por tres factores básicos: temperatura, densidad poblacional y nutrición (figura 1) [21]. Estos factores están tan inter-relacionados entre sí, que resulta extremadamente difícil distinguir la influencia de cada uno de ellos en los hallazgos de experimentos de laboratorio [21, 22].

La mayoría de los estudios indican que la temperatura óptima del agua para la cría de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* es 28°C. A temperaturas superiores se incrementa la velocidad de crecimiento, pero existe un impacto negativo sobre la talla del adulto y la mortalidad suele ser mayor en todas los estadios [23]. Las

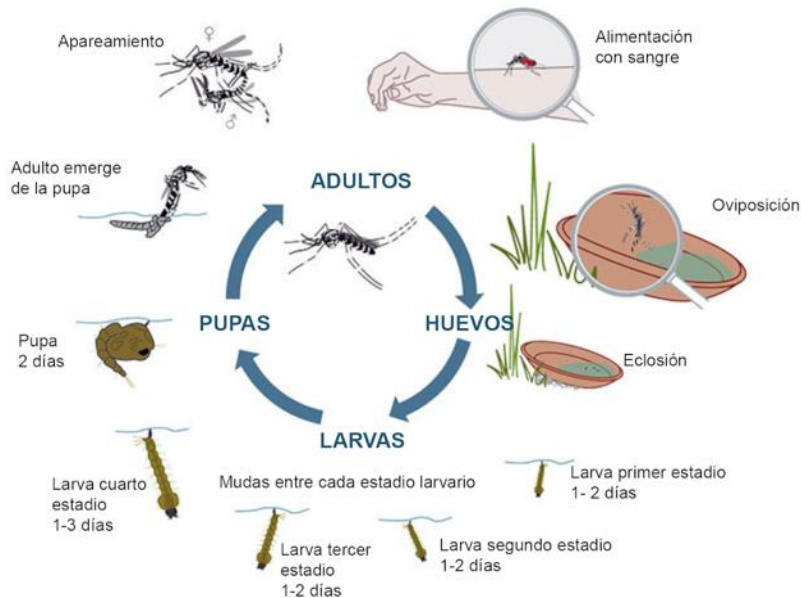


Figura 1. Ciclo de vida de *Ae. aegypti*

temperaturas por debajo de 25°C retardan significativamente el ciclo de vida y el desarrollo de los individuos suele ser más heterogéneo [23].

La influencia de la densidad de los insectos en un sitio de cría sobre su desarrollo y velocidad de crecimiento puede deberse a interferencia táctil, acúmulo de sustancias de desecho y competencia por el alimento. Aun disponiendo de suficiente cantidad de alimento per cápita, las larvas en mayor densidad en un sitio cría se desarrollarán más lentamente [21].

La nutrición deficiente en los estadios larvarios dilata el tiempo necesario para el desarrollo del insecto [24], y está estrechamente relacionada con una disminución en el tamaño final del adulto [23].

De cualquier manera, está demostrado que *Ae. aegypti* tiene una levada plasticidad a cambios en el ambiente de los sitios de cría, que le permiten adaptarse y sobrevivir a condiciones muy variadas en los ecosistemas [21].

## Adultos

El mosquito adulto de *Ae. aegypti* tiene una apariencia elegante, es de color negro, de mediano tamaño, alcanza entre 4 y 7 mm de longitud y un peso promedio de 1 mg en laboratorio (figura 2) [19]. En la superficie dorsal del tórax, sobre el fondo negro, tiene escamas blanco-plateadas que se disponen de una manera curva peculiar, descrita como una lira, en referencia al instrumento musical. El abdomen es entre castaño y negro, también con algunas escamas blancas. Los segmentos tarsales y femorales de las patas presentan anillos blancos característicos, que constituyen, junto a la lira y las manchas blancas de los clípeos, los elementos primarios para su identificación común en los laboratorios en Cuba, que siguen usualmente las claves taxonómicas desarrolladas por González Broche [25].

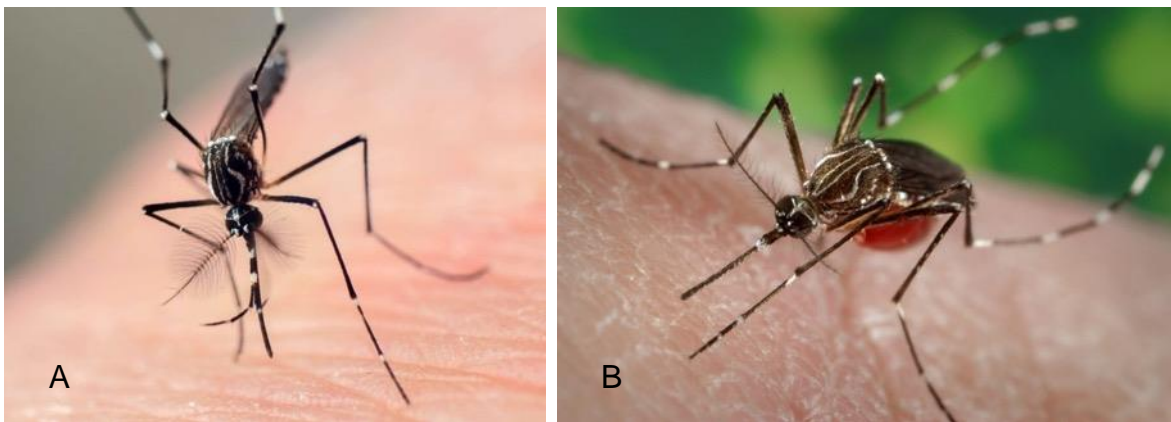


Figura 2. Adultos de *Ae. aegypti*, A: macho, B: hembra. Las diferencias en la proboscis y las antenas entre ambos sexos son los principales caracteres para su diferenciación

*Aedes aegypti* no suele alejarse mucho de sus criaderos, la distancia máxima de alcance descrita en la bibliografía es muy variable, desde 150 hasta alrededor de 1200 metros. Las largas distancias son, probablemente, resultado de la influencia del aire o de los medios de transporte del hombre [26]. Sin embargo, la distancia de dispersión más comúnmente aceptada es de menos de 150 metros [27]. En un

reciente estudio realizado en Cuba, se estimó mediante marcaje-liberación-recaptura, un rango de vuelo de machos de *Ae. aegypti* estériles entre 43,2 y 110,5 metros, con una dispersión promedio de 77,3 metros [28].

En realidad, *Ae. aegypti* no necesita habitualmente dispersarse demasiado, porque encuentra en las comunidades humanas los sitios de cría y sus hospederos preferidos para la alimentación con sangre. La reducción o eliminación de los sitios de cría en un área o el incremento excesivo de las poblaciones del mosquito, puede inducir su propagación hacia otras áreas, incluso más allá de los 150 metros. No es raro el movimiento accidental en los propios los medios de transporte del hombre, que facilita la dispersión a distancias mayores [29].

Tanto machos como hembras adultos se alimentan del néctar de las flores y jugos naturales de las plantas, ricos en elementos que utilizan para obtener energía [23].

Las hembras necesitan adicionalmente sangre para gestar sus huevos, de ahí que su aparato bucal picador-chupador sea una de las diferencias morfológicas más llamativas respecto a los machos [19].

Generalmente, después de cada alimentación sanguínea la hembra desarrolla un lote de huevos. Está comprobado que este mosquito puede alimentarse con sangre más de una vez entre cada puesta, especialmente si es perturbado antes de estar completamente lleno, característica que puede estar relacionada con su alta eficiencia para la transmisión de enfermedades [30].

El comportamiento de apareamiento de *Ae. aegypti* está asociado a la alimentación con sangre. Contrario a lo que se especuló durante algunos años, los machos no

esperan a la hembra cerca del criadero, sino que ambos buscan al huésped, fuente de sangre. Alrededor de éste ocurre el cortejo, la cópula y la hembra realiza la picada. Los enjambres de este mosquito no suelen ser grandes como en otras especies, sino conformados solo por pocos individuos (estenogamia), muchas veces ni siquiera existen enjambres [31, 32].

Durante la cópula el macho transfiere la esperma a la bursa de la hembra. La esperma migra hacia las espermotecas, donde puede permanecer viable durante toda la vida de la hembra [33].

*Aedes aegypti* es una especie polígama, es decir, la hembra puede copular con varios machos, pero se ha sugerido que el primero inyecta una sustancia que previene la inseminación efectiva por los demás [33]. Estudios recientes refuerzan el concepto de la poliandria en *Ae. aegypti*, el primer mosquito en lograr la cópula tendrá descendencia durante todos los ciclos gonadotróficos, pero compartida con otros machos [34]. La fecundación de los huevos ocurre durante el acto de oviposición, la esperma entra a los mismos por el agujero micropilar [35].

Los reportes sobre la duración del ciclo gonadotrófico de *Ae. aegypti* son muy variados y están influenciados por los métodos utilizados para su medición, pero suelen oscilar entre 3 y 7 días [36, 37].

Entre los eventos de ingesta de sangre, la hembra trata de reposar en un sitio seguro, gestando los huevos [38]. Después, busca un lugar apropiado para la oviposición, para más tarde regresar a la búsqueda de la fuente de sangre, generalmente un humano. En total, el intervalo entre las ingestas de sangre es de

alrededor de solo cuatro días, lo que también contribuye a su gran eficiencia vectorial [32].

Las hembras adultas se alimentan de sangre en horario diurno y lugares oscuros, pero el amanecer y el anochecer son los momentos preferidos (hábito crepuscular). Esta especie desarrolló una habilidad peculiar para no ser detectadas y atacan sitios corporales humanos en que matarlas resulta más difícil al huésped [32]. Las hembras suelen producir hasta cinco lotes de huevos durante su vida, cada uno entre 100 y 200 unidades, lo que depende de la cantidad de sangre ingerida [19].

### **Oviposición, huevos y eclosión**

La hembra hace la oviposición en las paredes de los depósitos de agua, sobre la línea de nivel del líquido. Cuando el nivel de agua baja por cualquier causa, los huevos quedan expuestos al aire y pueden persistir viables durante meses hasta que, una vez nuevamente en contacto con agua, eclosionan [20]. Los criaderos preferidos por *Ae. aegypti* son depósitos de agua limpia, generalmente con bajo contenido orgánico y de sales, pero su variedad es casi infinita, en la práctica, casi cualquier acúmulo de agua puede serle útil [39].

Una gran variedad de materiales puede servir de soporte a este mosquito para colocar los huevos, pero la madera parece ser una superficie preferida. No es raro que los mosquitos depositen los huevos directamente en la superficie del agua, especialmente si existe materia orgánica flotando [40].

Entre una y dos horas después de puestos los huevos, el endocorion cambia del suave-blanco al negro-duro y se hace impermeable al agua; tornándose hidrofóbico

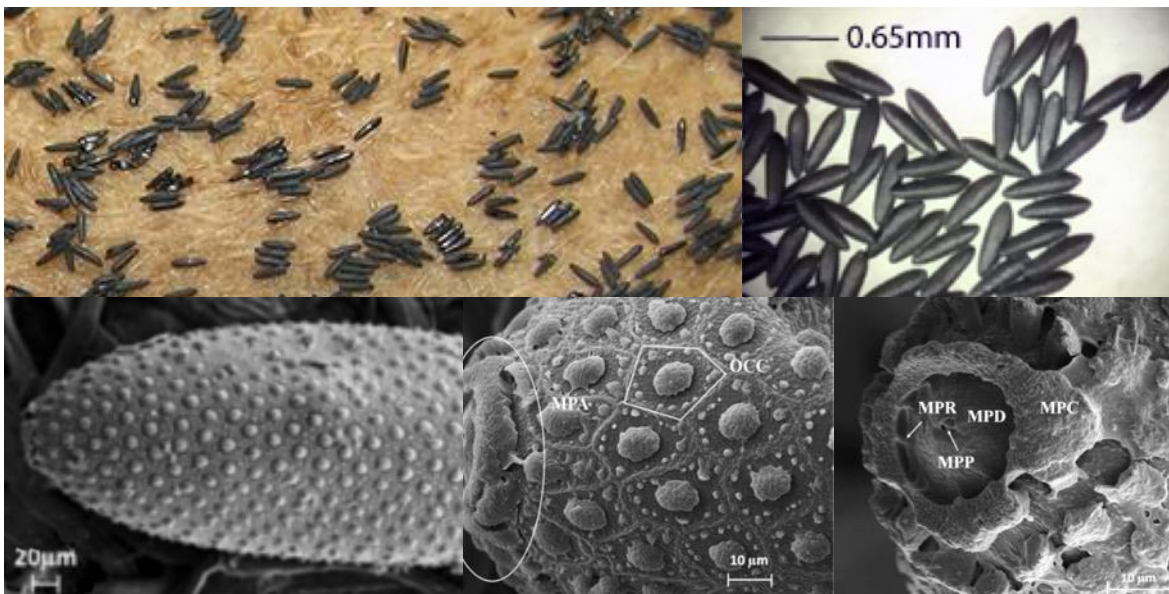


Figura 3. Huevos de *Ae. aegypti*. Arriba, a la izquierda: huevos adheridos a papel. Arriba, derecha: detalles de la forma de los huevos en una imagen ampliada en un estereoscopio. Abajo, detalles ultra-microscópicos del huevo; izquierda: vista panorámica de la mitad anterior de un huevo; centro: imagen del extremo anterior del huevo con el aparato micropilar (MPA) y las células

a las 17 horas. A temperatura entre 25 y 30°C el huevo alcanza la etapa de 4 células en 1,5 horas; los núcleos de blastodermo se encuentran en la periferia en 3 horas; la cutícula serosa se segrega entre 16 y 17 horas; el sistema nervioso se forma en 48 horas y el embrión estará maduro en 72 horas. A temperaturas inferiores a 23°C el embrión necesita aproximadamente de 90 a 100 horas para madurar completamente. A medida que se secreta la cutícula serosa, los huevos se vuelven resistentes a la deshidratación, pero necesitan mantenerse húmedos durante no menos de 24 horas [40].

Los huevos que sufren un período de secado tienden a eclosionar mejor que aquellos que se mantuvieron húmedos siempre. Un huevo maduro seco eclosiona en menos de diez minutos cuando se sumerge totalmente en agua, pero los huevos que flotan pueden requerir entre cinco y diez días para eclosionar [40].



Los mosquitos de los géneros *Aedes* y *Ochlerotatus* desarrollaron mecanismos altamente sofisticados que regulan el proceso de eclosión de los huevos, como adaptación a las fluctuaciones existentes en las condiciones abióticas de sus sitios de cría [32]. Estos mecanismos le han facilitado también la supervivencia a las medidas de control establecidas por el hombre [41].

*Aedes aegypti* suele manifestar estados de latencia en su fase embrionaria del tipo quiescencia, que le permite resistir condiciones adversas y facilita la supervivencia de sus poblaciones a largo plazo. La quiescencia no es estacional, sino una respuesta fisiológica del embrión, con frecuencia a condiciones locales de temperatura y humedad desfavorables. Suele confundirse la resistencia de los huevos a la desecación con la quiescencia y aunque están muy relacionados, sus mecanismos son independientes. La capacidad para resistir la desecación es una propiedad intrínseca del huevo y no del embrión [42].

La cáscara del huevo está formada por tres capas: exocorion, endocorion y cutícula serosa. Todas cumplen importantes funciones para resistir la desecación. Las dos primeras las sintetiza la hembra en los ovarios, pero la cutícula serosa, la más interna, es producida durante la embriogénesis, alrededor de 11 a 13 horas después de la oviposición. La cutícula serosa secreta una sustancia quitinosa bajo el corion que hace impermeable al huevo, conservando la humedad interna para proteger al embrión de la desecación (figura 3) [43].

La quiescencia puede tener cierto costo negativo para la viabilidad de los huevos y la proporción de sexos de los mosquitos resultantes. Sin embargo, los parámetros más importantes de dinámica poblacional y capacidad vectorial no se ven afectados,

como la fecundidad, fertilidad, supervivencia y tamaño de los adultos. No existe diferencia en los tiempos de re-hidratación y eclosión de los huevos, independientemente del tiempo que hayan estado inactivos [41].

## **Eclosión**

El bajo contenido de oxígeno en el agua producto de la presencia de materia orgánica y bacterias, resulta el principal estímulo para la eclosión [40]. Se piensa que esta conducta fue heredada por *Ae. aegypti* de sus ancestros, probablemente relacionados con los mosquitos de aguas de inundación, como los costeros. El oxígeno disuelto será elevado durante el período inmediato a la inundación y la eclosión en ese momento es un alto riesgo. Por un lado, porque las larvas podrían ser arrastradas hasta sitios donde no culminarían su desarrollo y, por el otro, porque los peces suelen invadir las áreas inundadas en busca de alimentos. De manera que la eclosión no ocurre inmediatamente después de la inundación, sino cuando las aguas están estancadas y el oxígeno es consumido por bacterias y otras formas de vida. Por otra parte, las bacterias degradan materia orgánica que le sirve de alimento a los mosquitos [32].

El otro desencadenante de la eclosión parece ser la temperatura, e igualmente se explica como un mecanismo relacionado con los cambios adaptativos de los mosquitos de aguas de inundación. Inmediatamente que un criadero es inundado, por ejemplo, de lluvia, la temperatura será relativamente baja. De eclosionar en ese momento, los mosquitos estarían mucho tiempo expuestos en el criadero, toda vez que a temperaturas frescas el metabolismo se desacelera y el ciclo de vida se alarga. En cambio, una vez pasado el evento que originó la inundación, las aguas

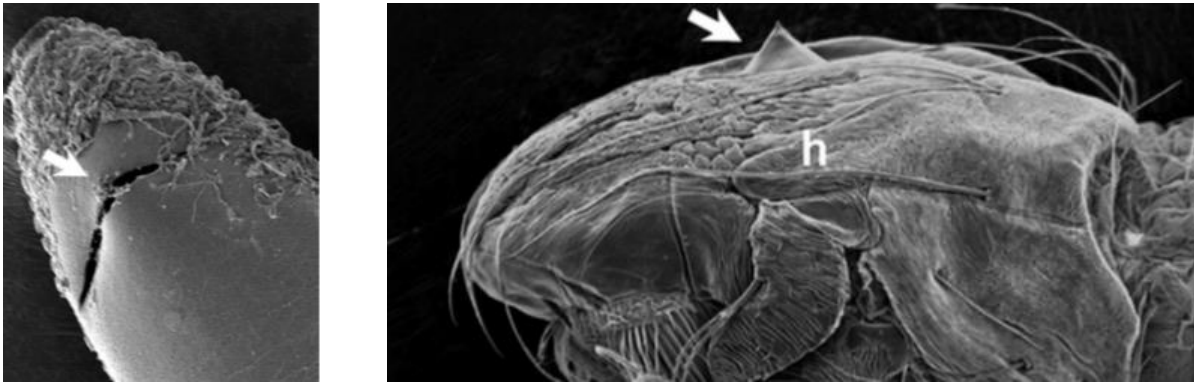


Figura 4. Eclosión de huevos de *Ae. aegypti*. Izquierda: ruptura transversal del huevo. Derecha: detalles de la región dorsal de la cabeza de la larva de primer estadio (h) con el diente de eclosión (flecha)

que quedan estancadas irán adquiriendo temperatura más elevada, propicia para el desarrollo rápido de los mosquitos [32].

Una vez estimulado, el embrión comienza a presionar el extremo del huevo y se auxilia del llamado diente de eclosión hasta que, finalmente, rompe el extremo anterior del huevo, liberando una estructura cónica característica (figura 4). La larva sale activamente, todo el proceso dura unos pocos minutos [32].

## Larvas

Las etapas larvarias de *Ae. aegypti* constituyen el período de mayor ritmo de alimentación y crecimiento de la especie [44]. De cada huevo nace una única larva que inicia un ciclo de cuatro estadios, creciendo mediante mudas del exoesqueleto; desde de 1 mm de largo y 0,01 mg de peso hasta alcanzar 7 mm y 5 mg en su último estadio [23]. Permanecen una parte del tiempo en la superficie para respirar, pero se alimentan preferentemente debajo del agua, moviéndose lentamente (figura 5). Su desarrollo se completa entre cinco a siete días cuando las condiciones son favorables [45-48].



Figura 5. Larvas de *Ae. aegypti* con el sifón en la superficie del agua para respirar

En la larva puede distinguirse una región anterior cefálica, en que destacan un par de ojos, un par de antenas y el aparato bucal. Los ojos tienen una función visual limitada, pero son muy sensibles a la luz intensa y responden a cambios de intensidad de luz. Las antenas perciben la dirección de las corrientes de agua y los cambios en los elementos químicos presentes en el agua del criadero [49].

La región torácica es ovoide y sin apéndices, pero puede distinguirse la presencia de cerdas cuya función probablemente sea táctil. El abdomen consta de ocho segmentos, un sifón ventilador y un segmento anal con las papilas [49].

Cada uno de los tres primeros estadios larvarios requieren cuando menos un día para su desarrollo. El cuarto estadio suele durar un poco más, alrededor de 48 horas [40]. En condiciones rigurosas de baja temperatura o escasez de alimento, el cuarto estadio larvario puede prolongarse por varias semanas antes de transformarse en pupa, si es que logra hacerlo. Las larvas y las pupas de los machos se desarrollan como promedio más rápidamente que las de las hembras [50].



Figura 6. Características de los cuatro estadios larvarios de *Ae. aegypti*

Morfológicamente todos los estadios larvarios son bastante similares, así que en la práctica se diferencian principalmente en base al tamaño, lo que resulta engorroso, especialmente cuando las condiciones de cría no son óptimas y ocurre un crecimiento y desarrollo heterogéneo (figura 6). La longitud del cuerpo de las larvas varía de aproximadamente 1 a 1,5 mm para el primer estadio; 1,5 a 3 mm para el segundo estadio; 3 a 5 mm para el tercer estadio y 3,5 a 7 mm para el cuarto estadio [51]. El tamaño de la cápsula cefálica solo cambia de tamaño en el momento de la muda, a diferencia del resto del cuerpo que continúa creciendo constantemente [7, 32].

El primer estadio larvario puede identificarse por la presencia del vestigio del llamado “diente de eclosión”, ubicado en la parte dorsal de la cabeza, que es blando y transparente, al igual que el sifón [32].

Una larva completamente desarrollada del tercer estadio puede distinguirse de una larva del cuarto estadio, ya que en esta última la cabeza nunca se oscurece por

completo y presenta los rudimentos de lo que será la trompetas ventiladoras de las pupas [32].

Existen diversos comportamientos de alimentación de larvas de mosquitos, los *Aedes* pertenecen al grupo de los filtradores [32]. Poseen unas estructuras parecidas a cepillos en sus piezas bucales, que filtran el agua y atrapan las partículas que utilizan para alimentarse. No tienen la capacidad para discriminar lo que ingieren por su contenido, pero el tamaño usualmente es inferior a 50µm [33]. En condiciones naturales las larvas habitualmente se alimentan de detritus, invertebrados, protozoos, algas, bacterias y levaduras [32].

En laboratorio se utilizan un sinnúmero de sustratos para la alimentación larvaria, ya sea para estudios fisiológicos o para la cría artificial para diversos fines. La complejidad de la nutrición larvaria de *Ae. aegypti* fue ilustrada mediante la conjugación de una suspensión de levaduras autoclaveadas con extracto de hígado de res. Ambos promovieron un crecimiento rápido y vigoroso, pero uno solo de estos sustratos fue insuficiente, a pesar de ser cada uno por sí mismo, rico en nutrientes [40].

Las dietas carentes de aminoácidos o proteínas no permiten a las larvas alcanzar el segundo estadio con facilidad. En ausencia total de alimentos, las larvas de primer a tercer estadio pueden mantenerse vivas por dos semanas. Bajo condiciones de alimentación ínfima se produce algún crecimiento, pero los ciclos se alargan indefinidamente. Shannon y Putman observaron que con muy baja cantidad de alimentos algunas larvas pudieron sobrevivir hasta 114 días, pero murieron si alcanzar la pupación [52].

Las larvas de los mosquitos requieren para su óptimo desarrollo de azúcares, nucleótidos, ácidos grasos, esteroides, vitaminas y catorce aminoácidos esenciales [53, 54]. Con frecuencia se adiciona a las dietas sales de amonio, ácido fólico y vitamina del complejo B, especialmente tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico y ácido pantoténico [40]. Estudios más recientes enfatizan el papel de la microbiota intestinal en la asimilación de esos nutrientes, así como su repercusión en el ulterior desarrollo y conducta del adulto [4].

Las dietas para los estadios larvarios que son ricas en carbohidratos y con baja proporción de proteínas, inducen tiempos de desarrollo más cortos y talla corporal más grandes de los adultos. Se especula que existe un límite inferior de carbohidratos en la dieta de los estadios larvarios que determina el éxito en el desarrollo de *Ae. aegypti*. El impacto negativo de la carencia de carbohidratos sobre el tamaño del mosquito es más notable en las hembras, porque éstas sintetizan grasas a partir de los mismos con mayor eficiencia que los machos [55].

Por otra parte, las dietas muy ricas en proteínas pueden resultar tóxicas para *Ae. aegypti*, un fenómeno relacionado con el acúmulo de amonio en el agua de cría como consecuencia del metabolismo de los aminoácidos. Las proteínas ingeridas por las larvas son degradadas hasta aminoácidos y se absorben en la porción media del intestino [56, 57]. Éstos son entonces transportados a través del sistema hemolinfático y quedan disponibles en el cuerpo graso. El amonio se produce cuando se desaminan los aminoácidos para producir ácidos, al ser excretado comienza a acumularse en el agua, terminando como un factor limitante del desarrollo larvario [56].

Algunos elementos esenciales como el colesterol deben ser adquiridos durante el ciclo larvario [58], toda vez que los insectos no son capaces de realizar su síntesis *de novo* [59]. El colesterol es un integrante esencial de los sistemas de membranas celulares y es el precursor de hormonas que regulan la maduración de los huevos, además de ser en sí, un componente fundamental de los mismos. La hembra adulta chupa sangre para obtener una gran cantidad de nutrientes necesarios para la ovogénesis, pero el colesterol contenido en la misma no es suficiente, por lo que depende de las reservas de la alimentación durante el estadio larvario [60].

### **Pupas**

Las larvas de cuarto estadio mudan para convertirse en pupas, que no se alimentan, porque durante este estadio ocurrirá el proceso de metamorfosis que culminará con la emergencia del mosquito adulto en aproximadamente dos días. En este proceso algunos órganos se lisan y el cuerpo del adulto se conforma a partir del disco imaginal, un grupo de células que se mantuvieron en quiescencia durante el desarrollo larvario. El cuerpo graso es transferido al adulto como una fuente de nutrientes, de especial utilidad para la vitelogénesis y al que se atribuye incluso el fenómeno de producción autógena de huevos [32].

Para la conformación de la pupa, la cabeza y el tórax de las larvas se funden en un cefalotórax prominente, que porta dos trompetas respiratorias, conectadas con los espiráculos mesotorácicos de los adultos en desarrollo para proveerle de oxígeno (figura 7). El abdomen culmina en dos almohadillas y se mantiene flexionado sobre el cefalotórax. Las pupas suelen descansar tranquilamente flotando con la punta de





Figura 7. Pupa de *Ae. aegypti* respirando en la superficie del agua, se aprecian claramente las trompetas respiratorias

las trompetas y el primer segmento abdominal en contacto con la superficie del agua. Un borde hidrofóbico de las trompetas sobresale para captar el aire [32].

A diferencia de otros insectos, las pupas de los mosquitos pueden ser muy móviles, especialmente cuando se les perturba. Aunque son acuáticas por naturaleza, las pupas de *Ae. aegypti* toleran relativamente bien la desecación y los adultos pueden emerger de pupas extraídas del agua [32].

En este estadio pueden reconocerse macroscópicamente los sexos con relativa facilidad, especialmente por su tamaño, considerablemente mayor en la hembra, fenómeno conocido como dimorfismo. El ciclo de *Ae. aegypti*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación entre nueve a diez días [45-48].

## **Emergencia**

La etapa final de la metamorfosis se completa con la inyección de aire entre la pupa y la cutícula del futuro adulto. La pupa endereza el abdomen a una posición horizontal y, al tragar aire, aumenta aún más la presión interna (figura 8). La cutícula cefalo-torácica de la pupa se rompe y el adulto emerge lentamente en la superficie



Figura 8. Emergencia de un macho de *Ae. aegypti*

del agua. El mosquito emergente se mueve con cautela para evitar caer al agua y en este momento es altamente susceptible a las corrientes de aire o agua y a los depredadores [32].

La presión de la hemolinfa aumenta progresivamente y produce el estiramiento de las patas y las alas. Se expulsa el líquido presente en el intestino y en unos minutos el adulto es capaz de volar, una vez que la cutícula se ha esclerotizado. Sin embargo, se requieren de 1 a 1,5 días más para que los machos y las hembras, respectivamente, ajusten su metabolismo y completen la madurez estructural [32].

Los machos de *Ae. aegypti* alcanzan la madurez sexual 24 horas después de la emergencia, cuando su hipopigio termina una rotación de  $180^\circ$  y se hace complementario con la estructura sexual de la hembra. Probablemente ésta sea la causa de que los machos de la población emerjan entre uno y dos días antes que las hembras. El acortamiento en el tiempo de desarrollo de los machos tiene lugar principalmente en la etapa larvaria, porque los procesos de metamorfosis durante el estadio pupal son muy complejos y requieren invariablemente más de un día para su desarrollo [32].

## **Alimentación de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* para su cría a pequeña escala**

La cría artificial de insectos es una actividad fundamental para el desarrollo de investigaciones entomológicas. Carlos J. Finlay logró colonizar al mosquito *Ae. aegypti* en 1881 y aparentemente los descendientes de sus colonias se conservaron hasta nuestros días en la denominada cepa Rockefeller [61]. Para los insectos holometábolos como *Ae. aegypti*, la calidad y cantidad de la dieta durante las etapas inmaduras no solo influyen en la tasa de desarrollo larvario, sino que también tienen efectos irreversibles sobre las características de los adultos [62].

Existen diferencias capitales entre el crecimiento de un organismo en la naturaleza y su cría a nivel de laboratorio. En condiciones naturales, algunos de los factores de crecimiento que necesitan las larvas de mosquitos son sintetizados por otros organismos que viven en el mismo medio, lo cual generalmente no ocurre en condiciones artificiales [63].

Históricamente, los componentes principales de las dietas para la cría de mosquitos se basaron en comidas desarrolladas para otros animales como las mascotas, porque son económicas y accesibles [64]. Por cuestiones intuitivas se ha utilizado hojarasca y otros sustratos de origen vegetal para alimentar larvas de mosquitos, pero los resultados son con frecuencia contraproducentes. Esto se atribuye al contenido de tanino y depende en gran medida del método de secado, la especie de plantas, así como la temporada o clima de la localidad de colecta del material vegetal [7, 65, 66].

Sin embargo, cada vez existe más conciencia de la necesidad de insectos de alta calidad para el desarrollo de investigaciones confiables, lo que llevó a múltiples laboratorios a desarrollar sus propias dietas [6]. Por otra parte, las tecnologías emergentes de control de vectores, en particular aquellas que incluyen la producción masiva, requieren dietas eficientes en el sentido económico, pero a la vez que los insectos sean altamente competitivos para el apareamiento. Para todo ello, es necesario el desarrollo de dietas para los estadios larvarios de los mosquitos de alta efectividad y eficiencia [67].

Existe correlación lineal positiva entre el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos con el tamaño corporal de las larvas de varias especies de mosquito. Curiosamente en *Ae. aegypti* la correlación del contenido de grasas en particular tiene un comportamiento exponencial, como expresión de una acelerada lipogénesis. Las reservas de lípidos permiten a las larvas y al adulto emergente sobrevivir largos períodos sin alimento [7].

Una vez identificados sustratos adecuados, se debe establecer las dosis en función de la cantidad y tamaño de las larvas. Un exceso de alimento puede ocasionar mortalidad larvaria, debido a la formación de una película sobre la superficie que impide la respiración de la larva. La adición excesiva de alimentos provoca también crecimiento descontrolado de microorganismos que excretan desechos tóxicos y descomponen los propios alimentos y, con ello, las propiedades del agua, tornándolas inadecuadas para *Ae. aegypti*. La escasez de alimento ocasiona desnutrición en las larvas y tiempos más prolongados para el desarrollo hasta adultos que, además, serán de menor calidad [33].

En la literatura científica se encuentran numerosos sustratos y dietas que han sido evaluados para la cría de larvas de *Ae. aegypti*, entre los que se encuentran:

1. Infusiones preparadas con hojarasca colectada y secada de diferentes árboles o arbustos, como por ejemplo la planta Haya europea (*Fagus sylvatica*) (Linnaeus, 1753) [6]
2. Alimentos para animales:
  - Peces: TetraMin Plus Flakes [6, 8, 68] y TetraPhyll [6]
  - Ratones: Laboratory Rodent Diet 5001 (PMI Nutrition International LCC, St. Louis, MO) [9]
  - Gatos: Friskies dry adult cat food [8]
3. Polvo de insectos:
  - *Chironomus* sp. (larvas, FD Blood Worms, Tropical, Ruhmannsfelden, Germany) [6, 69]
  - *Hermetia illucens* (larva y prepupas), *Tenebrio molitor* (larvas) y *Musca domestica* (larvas) [16, 70]
4. Levaduras:
  - *Candida utilis*, producto comercial “Levadura torula” [12]
  - *Saccharomyces cerevisiae* [71, 72]
5. Bacterias: *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Ochrobactrum intermedium*, *Bacillus* sp. [72]
6. Mezcla de sustratos
  - Harina de atún, polvo de hígado bovino y extracto de levadura [8, 10, 13, 73]
  - Alimento para conejos y polvo de hígado [44]
  - Harina de arroz y extracto de levadura [55]

La cría exitosa de mosquitos depende del conocimiento profundo de la fisiología de la especie en cuestión, en particular los hábitos de alimentación y la forma de sus aparatos bucales, además de las características de los sustratos, como tamaño de las partículas, capacidad de flotar, etc [10, 71, 73].

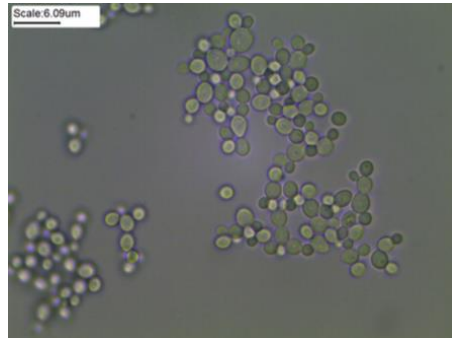


Figura 9. Células de *C. utilis*

Las larvas de *Ae. aegypti* requieren carbohidratos, nucleótidos, ácidos grasos, esteroides, vitaminas y catorce aminoácidos esenciales para su desarrollo [53]. Adicionalmente, la microbiota presente en el intestino de las larvas de los mosquitos juega un importante rol en la asimilación de los nutrientes, lo que se expresa en el desarrollo ulterior de los adultos [74].

### **Levadura torula**

En la industria biotecnológica se conoce como levadura o extracto de levadura, a la biomasa obtenida de la fermentación con microorganismos unicelulares del reino Fungi, de los cuales *S. cerevisiae* es el más conocido, por su aplicación a la producción de cerveza y vino [75]. Los términos torula y levadura torula, se utilizan indistintamente para referirse a *C. utilis* o a la levadura obtenida industrialmente mediante este microorganismo (figura 9) [17, 76-78]. Torula proviene de la antigua clasificación taxonómica del hongo como *Torula utilis* [79].

El género *Candida* incluye actualmente más de 200 especies, que pertenecen al reino Fungi, filo Ascomycota, familia Saccharomycetaceae. *Candida* sp. se caracteriza básicamente por ser un organismo unicelular, con forma redonda, ovoide o elipsoidal y un tamaño en el rango entre 1 a 8  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 6  $\mu\text{m}$  de

ancho [80]. Las especies del género *Candida* se diferencian en base a su morfología, pruebas bioquímicas y características fisiológicas; la mayoría son aerobias, de reproducción asexual y su temperatura y pH óptimos son 25-30°C y 4,0-6,0, respectivamente [75].

*Candida utilis* posee un rico sistema enzimático que le permite asimilar variadas fuentes de carbono y nitrógeno [75]. Esta especie es capaz de degradar la mayoría de los carbohidratos para producir energía en condiciones aerobias, usando la vía más eficiente conocida, la respiración. Otras levaduras, como *S. cerevisiae*, curiosamente desvían su metabolismo hacia una vía más lenta y menos eficiente (fermentación), aún en presencia de oxígeno. Este fenómeno, base de producción de bebidas alcohólicas, se denomina efecto Cabtree y ha sido ampliamente estudiado desde una perspectiva evolucionaria [81].

La ausencia del efecto Cabtree en *C. utilis* permite obtener elevados rendimientos en la producción de biomasa de alto nivel nutritivo, a partir de sustratos simples con hidratos de carbono, sin que se acumule alcohol con su consiguiente efecto inhibitorio [75].

Las proteínas de *C. utilis* poseen alto valor nutricional y representan alrededor del 48% del contenido intracelular de la biomasa. La lisina es el aminoácido más abundante y alcanza el 7,8% [75].

El microorganismo tiene la capacidad de absorber gran cantidad de minerales del medio y unirlos a sus estructuras celulares, en forma de complejos estables denominados bioplexos, que pueden ser asimilados más fácilmente por los organismos superiores que ingieren la levadura [75].

La pared celular de *C. utilis* es una parte significativa del peso seco de la biomasa (20-30 %). Está constituida por varios tipos de polisacáridos combinados con manoproteínas y quitina. Las subunidades de los polisacáridos comprenden un alto porcentaje de manosa, pero además poseen cantidades considerables de glucosa, galactosa y xilosa [82].

El polisacárido glucomanano presente en la pared celular de *C. utilis*, previene la formación de formas reactivas de oxígeno tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* [82].

El glucomanano tiene un efecto protector de los tejidos, presumiblemente relacionado con su capacidad de capturar radicales libres y a la vez interaccionar con receptores del sistema inmune celular [83].

#### Proceso tecnológico para la obtención de levadura torula en Cuba

La industria biotecnológica basada en *C. utilis* se inició en Cuba en 1965, para la producción de alimentos destinados a la ganadería, a partir de subproductos de la producción de azúcar de caña (mieles finales o melaza) [77].

En 1990 la tecnología fue modificada para aprovechar los mostos finales de las destilerías de alcohol (vinaza), con lo cual se alcanzó un doble beneficio, primero, mantener la producción de levadura que había sido desplazada por la necesidad estratégica del país de producir de alcohol y, segundo, la eliminación de residuales ácidos que eran vertidos al ambiente con un fuerte impacto negativo [77].

Ya sea la melaza o la vinaza el sustrato utilizado para la producción de levadura torula, se agrega nitrógeno y fósforo en forma de sales inorgánicas, porque *C. utilis*



tiene la capacidad de asimilarlos para sintetizar aminoácidos y compuestos de alta energía para el metabolismo, respectivamente [77].

La fermentación diseñada en Cuba para *C. utilis* es de flujo continuo, con un proceso aeróbico y exergónico, por lo que requiere el suministro de grandes volúmenes de aire estéril y de un sistema de enfriamiento [77].

En la fase final del proceso tecnológico de la levadura torula en Cuba, se incluye una etapa de lisis de la pared celular de las levaduras, lo cual constituye un elemento importante a considerar para la alimentación de larvas de mosquitos. El rompimiento de la pared celular libera el contenido intracelular que es rico en proteínas y vitaminas, ahora más fácilmente asimilables, pero además mejora la formulación del producto final que es más soluble, digerible y con propiedades físico-químicas más estables y asequibles para la alimentación animal [77].

La terminación del producto consiste en la eliminación de hasta el 92% del agua mediante nebulización y calor. El secado garantiza la estabilidad del formulado y facilita su envase, transportación y almacenaje, aunque incorpora un gasto importante, especialmente de energía [77].

La levadura obtenida de vinazas es un polvo más oscuro que la obtenida de mieles, con la misma estabilidad y con algo menor contenido de proteínas (37 - 45 %), de cenizas (5 - 10 %) y de grasas y lipoides (0.4 - 1.0 %), y algo mayor contenido de humedad (8 - 10 %). El resto de la composición nutricional es similar a la de melaza [77].

La composición de la levadura torula de melaza es la siguiente [77]:

#### Propiedades generales

Humedad:	6 – 8%
Cenizas:	7 – 10%
Fósforo:	3 – 4,4%

#### Macronutrientes fundamentales:

Proteína bruta:	45 – 50%
Grasas y lipoides:	1 – 1,5%
Carbohidratos totales:	20 – 30%

#### Vitaminas (mg/ 100g de masa seca)

Tiamina (vitamina B1):	6,0 – 7,2
Riboflavina (vitamina B2):	3,9 – 4,5
Ácido pantoténico (vitamina B3):	3,0 – 4
Colina (vitamina B4):	30 – 60
Ácido nicotínico (vitamina B5):	40 – 50
Piridoxina (vitamina B6):	3,5 – 4,5
Biotina:	0,1 – 0,2
Ácido fólico:	0,03 – 0,12
Ácido p-amino benzoico:	3,5 – 4,5

#### Aminoácidos (% de masa seca)

Leucina-Isoleucina:	6,08 – 6,13
Ácido glutámico:	3,77 – 3,80
Lisina:	3,68 – 3,69
Histidina-Arginina:	3,46 – 3,48
Ácido aspártico:	3,35 – 3,38
Valina:	2,60 – 2,65
Glicina:	2,60 – 2,65
Alanina:	2,37 – 3,39
Treonina:	2,25 – 2,26
Fenilalanina:	2,12 – 2,20
Serina:	1,86 – 1,88
Tirosina:	1,02 – 1,11
Metionina:	0,50 – 0,93

### **Los conceptos de eficacia y eficiencia**

Los términos eficiencia, eficacia y efectividad son muy recurridos en disímiles campos del saber y en la vida corriente. Con frecuencia se usan de forma indistinta, predominando más una intención cualitativa que un verdadero sustrato conceptual [84]. Los conceptos de eficacia, efectividad y eficiencia son comúnmente utilizados en artículos científicos, la mayoría de las veces de manera vaga e imprecisa, sin definirse con claridad en la metodología [85].

Eficacia se refiere a que el objetivo puede lograrse bajo condiciones ideales, es decir, que favorezcan al máximo su consecución [84]. Burches define eficacia como el cambio beneficioso provocado por una intervención en condiciones ideales o controladas [86]. Las condiciones ideales en el campo de la experimentación, por ejemplo, en los ensayos clínicos de eficacia para evaluar drogas, se refieren al control de los factores que pueden influenciar de manera diferencial la acción de alguno de los productos evaluados [87].

El término eficiencia incorpora el elemento de los recursos, que en su sentido más simple tiene una acepción económica. Así la eficiencia puede definirse como la relación entre los resultados y los recursos utilizados para su consecución [84]. Sin embargo, una definición más completa refiere la eficiencia como la proporción entre las entradas y salidas de un sistema. Las salidas son la consecución de los objetivos y las entradas están constituidas por los recursos humanos, el tiempo y el costo económico. La eficiencia se alcanza con la maximización de resultados por unidad de inversión de recursos [86]

Para que haya eficiencia debe existir en primer término eficacia. El proceso más eficiente es el que mejor relación tiene entre los recursos empleados y los resultados que se obtienen [84].

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño del estudio:

Se realizó un estudio experimental en condiciones de laboratorio. Se comparó el efecto de dos dietas suministradas en estadios larvarios, sobre variables que expresan el desarrollo morfológico y funcional de mosquitos adultos. Las variables fueron: supervivencia, fecundidad, fertilidad y largo del ala, esta última como indicador del tamaño del mosquito adulto. Para cada dieta se conformaron grupos de 120 adultos (60 de cada sexo), cada grupo contó con tres réplicas.

### Condiciones ambientales del laboratorio

El estudio se realizó en el Insectario del Departamento Control de Vectores del IPK, con temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa  $70\% \pm 5\%$  y periodos de 8 h de luz y 16 h de oscuridad.

### Mosquitos

*Aedes aegypti*, cepa Boyeros 2018, colectada en estadio larvario en el municipio del mismo nombre en el año 2018, esta cepa no se colectó para el presente estudio, sino que ya existía en el laboratorio para otros fines. Al momento de los experimentos del presente estudio ya contaba numerosas generaciones de cría de laboratorio, realizada siguiendo los procedimientos establecidos por Pérez y cols [88].

### Dietas

- Levadura torula, es un subproducto de la caña de azúcar, elaborado a partir de la vinaza resultante de la destilación del alcohol. Fue suministrada por Empresa Logística de la Industria Azucarera (AZUMAT) [17].
- Harina de pescado, suministrada por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Alimento de origen animal, importado por Cuba, usado de rutina en el insectario del IPK [88].

La composición nutricional de ambos sustratos fue proporcionada por los laboratorios del Instituto de Medicina Veterinario de Cuba (tabla 1).

Ambos sustratos fueron esterilizados 24h antes de su aplicación para la alimentación de los mosquitos. La esterilización se realizó en autoclave, 121°C durante 15 minutos. Se conservaron en placas de Petri de 9,8 cm de diámetro y 1,4 cm de altura, debidamente rotuladas.

**Tabla 1. Principales componentes nutricionales de las dietas evaluadas**

Descripción	Levadura torula	Harina pescado
Materia seca (%)	95	91,50
Proteína bruta (%)	50,83	50,75
Grasa bruta (%)	1,55	7,22
Carbohidratos totales (%)	20-30%	-
Fibra bruta (%)	2,02	1,57
Energía metabolizable (Kcal/g)	4,10	3,35
Calcio (%)	1,4	0,90
Fósforo (%)	1,7	2,15
Calcio / fósforo (%)	2,24	1,81
Cloruro de sodio (%)	-	1,77
Metionina (%)	1,42	1,00
Lisina (%)	1,55	2,01
Arginina (%)	1,58	1,77
Triptófano (%)	0,40	0,35
Cistina (%)	1,03	0,40
Treonina (%)	1,09	1,06
Tirosina (%)	1,59	0,64
Leucina (%)	1,89	1,80
Metionina + Lisina (%)	3,10	3,01

Fuente: Laboratorio de Bromatología adjunto al Instituto de Medicina Veterinario de Cuba

## Preparación del material biológico:

### Eclosión de los huevos

Se hirvió agua declorinada para reducir el oxígeno disuelto y promover la eclosión simultánea de los huevos. Se dejó reposar hasta alcanzar 37°C en un recipiente con tapa. Una vez alcanzada la temperatura, se adicionaron los papeles con los huevos de *Ae. aegypti* adheridos. Aproximadamente una hora después se vertió el contenido del recipiente en bandejas (25 x 16 cm) y se realizó el conteo de las larvas de primer estadio bajo un microscopio estereoscópico (Olympus X-TR, Japón). Se transfirió 200 larvas de primer estadio a bandejas de 50 x 35 cm para la alimentación con cada dieta.

## Cría de larvas

Las bandejas se mantuvieron en un sitio tranquilo, sin interferencia humana, excepto en el momento de la adición del alimento. Se adicionó la dieta en cantidades ascendientes en función del tiempo, independientemente del estadio larvario (tabla 2).

Tabla 2. Cantidad de alimento (levadura torula o harina de pescado) suministrado a las larvas de *Ae. aegypti* según el tiempo

Tiempo de cría de las larvas	mg/larva
Día de eclosión	0,2 mg
Un día después de la eclosión	0,2 mg
Dos días después de la eclosión	0,3 mg
Tres días después de la eclosión	0,4 mg
Del cuarto al séptimo día después de la eclosión	0,6 mg

Fuente: Consoli y De Oliveira 1994

## Conformación de los grupos de adultos:

Una vez obtenidas las pupas, se aislaron individualmente en tubos de ensayo de 10mL de capacidad máxima y fondo cóncavo. Para ello se adicionó cada pupa con 2mL de agua. El extremo de los tubos se cubrió con un tapón de algodón para permitir la entrada de oxígeno. Se dejaron reposar hasta la emergencia de los adultos y se clasificaron por sexo de acuerdo a sus características fenotípicas. Se liberaron los mosquitos en las jaulas de 30 x 30 x 30 cm (Bioquip, EEUU) en las cantidades correspondientes, según el sexo. Se seleccionaron 30 hembras y 30 machos para cada jaula. El fondo de las jaulas fue cubierto con papel blanco Whatman para mejor visualización de los mosquitos muertos.

## Cría de adultos:

Se mantuvo condiciones de humedad dentro de las jaulas, mediante papel de filtro húmedo. Se ofreció de manera permanente solución acuosa al 10% de azúcar crudo para la alimentación tanto de machos como de hembras.

Para la hematofagia se colocó ratones BALB/c dentro de la jaula una vez por semana durante cuatro semanas, comenzando tres días después de la emergencia de los adultos. Los ratones fueron suministrados por el CENPALAB.

Para la oviposición se colocó en el interior de las jaulas un vaso de precipitado con capacidad máxima de 250mL, forrado con una tira de papel en sus paredes internas. Se adicionó 150 mL de agua declorinada al vaso de precipitado, de manera que el nivel del líquido alcanzó la mitad de la tira de papel.

Las jaulas se aislaron de las superficies del laboratorio evitar la acción depredadora de las hormigas.

#### Colecta y manejo de los huevos

El papel con los huevos se retiró al cuarto día después de haber ofrecido la sangre y se agregó al rótulo del mismo el número de hembras presentes en la jaula al momento de la colecta. Se dejaron madurar en ambiente húmedo consistente en bandejas plásticas con algodones humedecidos en agua declorinada. A las 72 horas se dejaron secar los papeles y, una vez secos, se contaron los huevos bajo un microscopio estereoscópico (Olympus, Japón).

Los huevos se colocaron a eclosionar siete días después del secado y se contaron las larvas de primer estadio para determinar la fertilidad.

#### **A. Tiempo de supervivencia de hembras adultas:**

Se registró diariamente el número de mosquitos muertos según el sexo, hasta que se alcanzó el 100% de mortalidad en todos los grupos. Se controló la variable sexo, porque está ampliamente descrita la mayor longevidad de las hembras respecto a los machos [32, 33, 40, 47, 89].

**B. Fecundidad (Fc)**, se calculó según la fórmula [90]:

$$F_c = \frac{h}{F}$$

Donde h es el número de huevos puestos por semana y F es el número de hembras vivas en las jaulas al momento de la colecta de huevos. Se contabilizó los huevos durante cuatro semanas, asumiendo que éstos corresponden con los cuatro eventos de suministro de sangre para la alimentación de las hembras.



**C. Fertilidad (Ft)**, se calculó según la fórmula [90]:

$$Ft = \frac{L}{h} * 100$$

Donde, L es el número de larvas de primer estadio, nacidas de los huevos colocados a eclosionar y h es el número de huevos puestos.

**D. Evaluación del largo del ala:**

Los mosquitos muertos extraídos de las jaulas fueron conservados a -80 °C para la medición de las alas. Se seleccionaron 30 hembras y 30 machos de cada sexo y cada dieta. Se les removió el ala izquierda desde la unión en la porción basal articulada del tórax, y se colocó cuidadosamente en un portaobjeto, se adicionó bálsamo de Canadá y se selló con un cubreobjetos. La medición se realizó desde el álula hasta el margen apical del ala (zona más alejada del surco axilar), sin considerar las vellosidades del borde. En cada ala se marcó el punto de referencia proximal en el inicio de la vena A y el punto distal en la finalización de la vena R2 [91, 92]. Se fotografió digitalmente las alas usando un microscopio con cámara acoplada a la computadora. Se utilizó el programa tpsDig2 (Rohlf J, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY 11794-5245, disponible en <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>) [93].

### **Evaluación de la eficacia y eficiencia de las dietas**

Se tuvo en cuenta las definiciones de eficacia y eficiencia publicadas por Bouza Suárez [84], que coinciden con las enunciadas por otros autores [85-87]. La eficacia es la relación entre la meta y el resultado cuando las condiciones experimentales son controladas, también llamadas condiciones ideales. Se controló las condiciones de los experimentos mediante el seguimiento estricto de las prácticas recomendadas para el insectario del IPK [88]. Considerando que la meta es la misma para las dos dietas estudiadas, entonces, la eficacia se evaluó en función de los resultados de las cuatro variables estimadas. El resultado de la eficacia se expresó de manera cualitativa (igual, mayor o menor eficacia).

La eficiencia es la relación entre los recursos y los resultados. El único costo pertinente fue el precio de las dietas, porque el resto de los recursos utilizados son similares para ambas, incluyendo medios de capital y otros materiales gastables de laboratorio. Se solicitó el precio de cada dieta a sus suministradores, AZUMAT (levadura torula) y CENPALAB (harina de pescado). La eficiencia se analizó igualmente de manera cualitativa, por comparación de los resultados en conjunto de las cuatro variables estimadas en relación al precio de cada dieta.

### **Procesamiento y análisis estadístico de los datos**

Se utilizó el paquete estadístico SPSS, v21 para Macintosh.

Para todas las pruebas el nivel de  $\alpha$  fue establecido en  $p \leq 0,05$ . Se exploró la normalidad en la distribución de los datos de las variables cuantitativas continuas mediante una prueba de Shapiro-Wilk. Se comparó la distribución de las variables fecundidad y fertilidad mediante una prueba de U de Mann-Whitney, considerando la significación exacta (2 x significación asintótica), toda vez que la muestra fue relativamente pequeña. La probabilidad de supervivencia de *Ae. aegypti* fue representada de manera independiente para cada sexo mediante gráficos de Kaplan-Meier. Para comparar las funciones de supervivencia en cuanto a la categoría "dieta" se aplicó el estadígrafo log-rango por el método de Mantel-Cox. El largo del ala no mostró distribución normal al controlar la variable sexo, probablemente como consecuencia del tamaño de la muestra, por lo que se utilizaron estadígrafos no paramétricos con pruebas de significación de Monte Carlo para un nivel de confianza del 99%.

### **Procedimientos Éticos**

Todos los ensayos y procedimientos del presente estudio se realizaron tomando en consideración las normas éticas y científicas para realizar estudios biomédicos a partir de la Declaración de Helsinki y las normas éticas establecidas por la comunidad europea relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 22 de septiembre de 2010).

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

La eficacia de la alimentación con levadura torula de los estadios inmaduros de *Ae. aegypti* se evaluó en la fase adulta del insecto, mediante la comparación de cuatro variables que expresan el desarrollo morfológico y funcional.

Los mosquitos adultos de ambos sexos criados con levadura torula en su fase larvaria mostraron mayor probabilidad de supervivencia que aquellos que fueron alimentados con harina de pescado (tabla 3). Las hembras adultas nacidas de larvas criadas con levadura torula sobrevivieron como promedio 4,7 días más que las que recibieron harina de pescado ( $X^2=8,11$ ;  $p=0,004$ ). En los adultos machos se registró una diferencia de 5,1 días más para aquellos que fueron alimentados en su etapa acuática con levadura torula ( $X^2=9,71$ ;  $p=0,002$ ).

**Tabla 3. Promedio de supervivencia en días de los adultos de *Ae. aegypti* según el sexo y la dieta suministrada**

Sexo	Dieta	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Hembras	Harina de pescado	33.916	1.255	31.456	36.376
	Levadura torula	38.670	1.357	36.011	41.330
Machos	Harina de pescado	23.183	1.125	20.979	25.388
	Levadura torula	28.297	1.310	25.728	30.865

Logaritmo del rango:

Hembras: Chi-cuadrado = 8,11. Grados de libertad = 1. Significación = 0,004

Machos: Chi-cuadrado = 9,71. Grados de libertad = 1. Significación = 0,002

Como era de esperar, las hembras fueron más longevas que los machos. El patrón de probabilidad de supervivencia fue similar en hembras (figura 10) y machos (figura 11), con líneas que se separan significativamente entre el 0,1 y 0,9 de probabilidad, como expresión de mayor supervivencia de los adultos que fueron alimentados con levadura torula durante sus fases acuáticas.

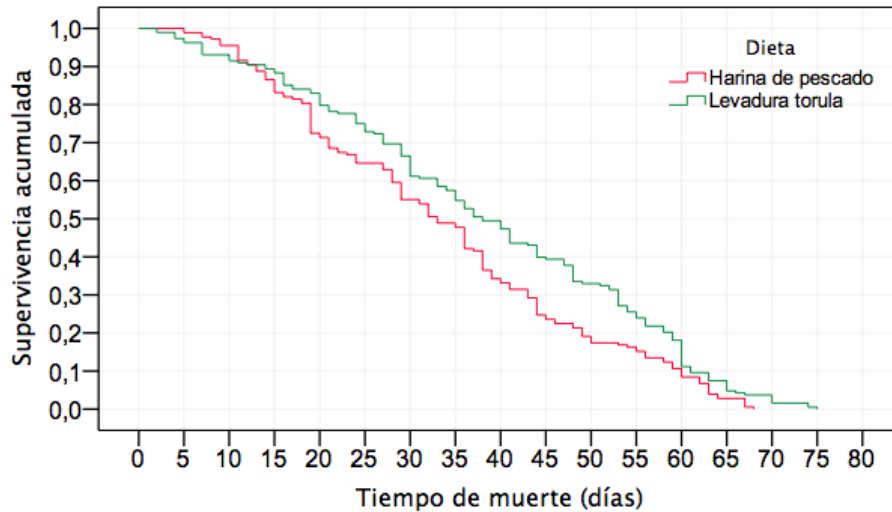


Figura 10. Funciones de supervivencia en hembras adultas de *Ae. aegypti*, según la dieta administrada en sus estadios larvarios.

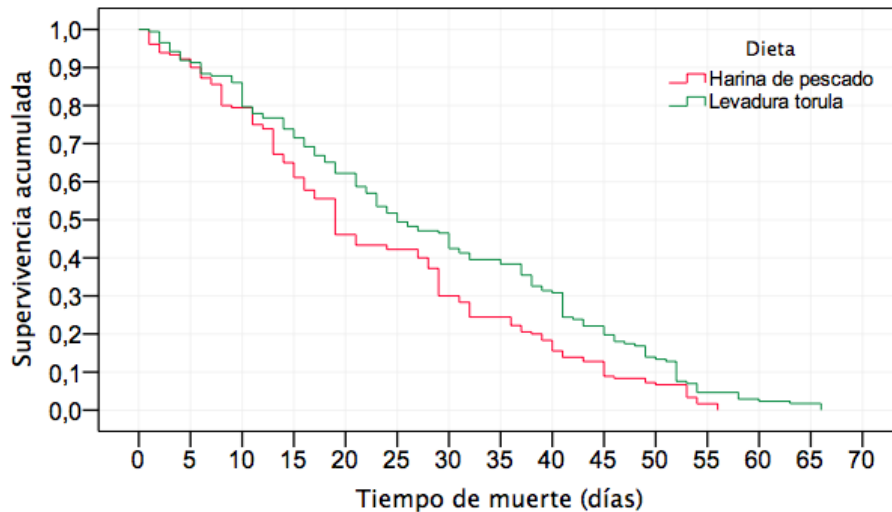


Figura 11. Funciones de supervivencia en machos adultos de *Ae. aegypti*, según la dieta administrada en sus estadios larvarios.

No se observó diferencias en la fecundidad de las hembras de *Ae. aegypti* según el alimento administrado en la fase larvaria, para lo cual se comparó el número de huevos puestos por semana (U de Mann-Whitney;  $p > 0,05$ ). Llama la atención que durante la primera semana los promedios de fecundidad fueron bajos, tanto para los mosquitos que fueron alimentados con levadura torula, como para aquellos que recibieron harina de pescado (figura 12). El promedio de huevos puestos por hembra durante la primera semana fue solo ligeramente superior a 45 para ambas

dietas; en tanto durante las otras tres semanas evaluadas los promedios de fecundidad fueron cercanos a 70 huevos por hembra.

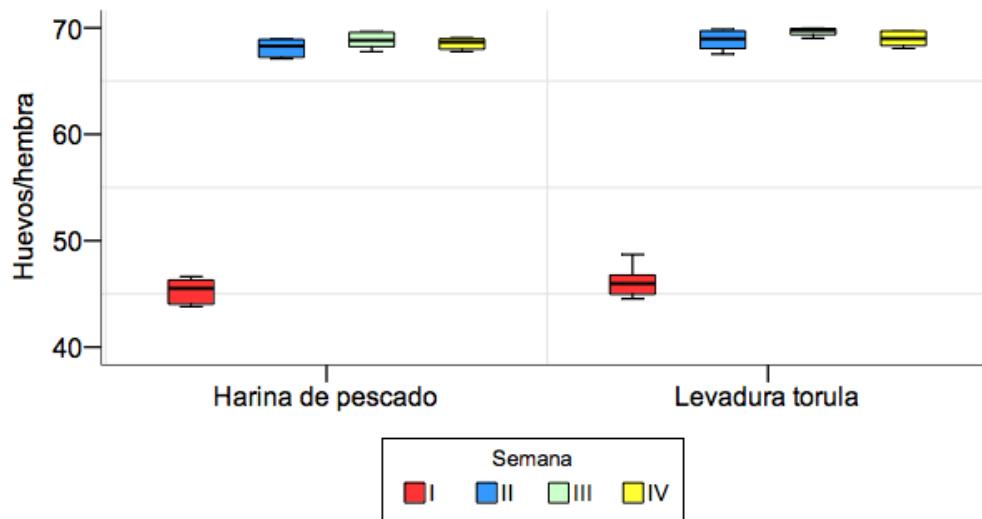


Figura 12. Fecundidad de hembras adultas de *Ae. aegypti* por semana, según la dieta administrada durante los estadios larvarios. La barra negra en las cajas representa la mediana.

La fertilidad resultó similar en mosquitos alimentados con levadura torula respecto a la harina de pescado ( $U$  de Mann-Whitney=273;  $p=0,75$ ), en ambos casos elevada, con medianas superiores al 95% (figura 13).

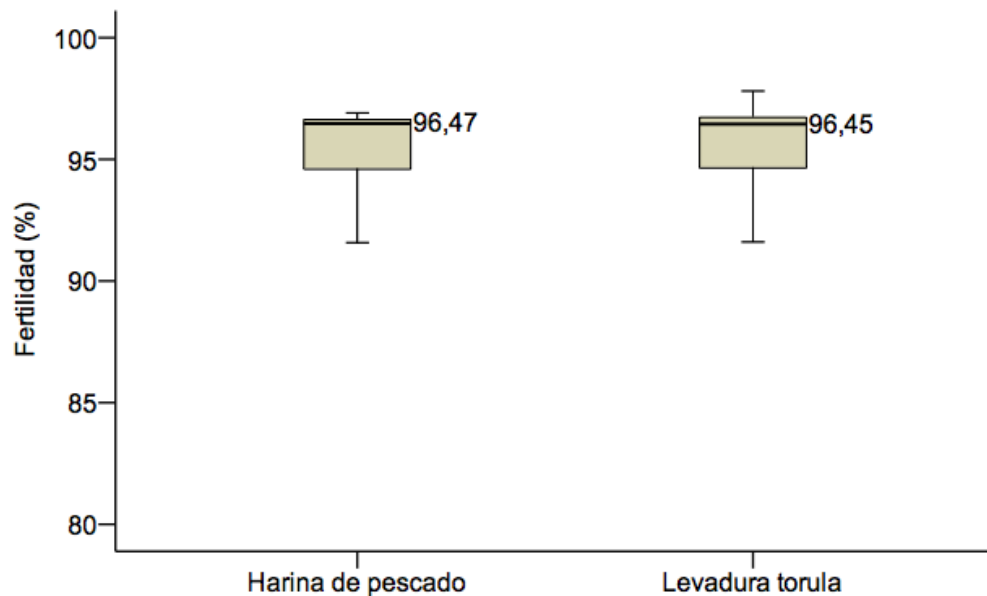


Figura 13. Porcentaje de fertilidad de hembras de *Ae. aegypti* según la dieta administrada durante los estadios larvarios

El largo del ala de los mosquitos adultos que fueron alimentados con levadura torula resultó mayor que el de aquellos criados con harina de pescado, tanto para los machos como para las hembras (figura 14). Esa diferencia resultó significativa desde el punto de vista estadístico para una  $p \leq 0,05$  (U de Mann-Whitney)

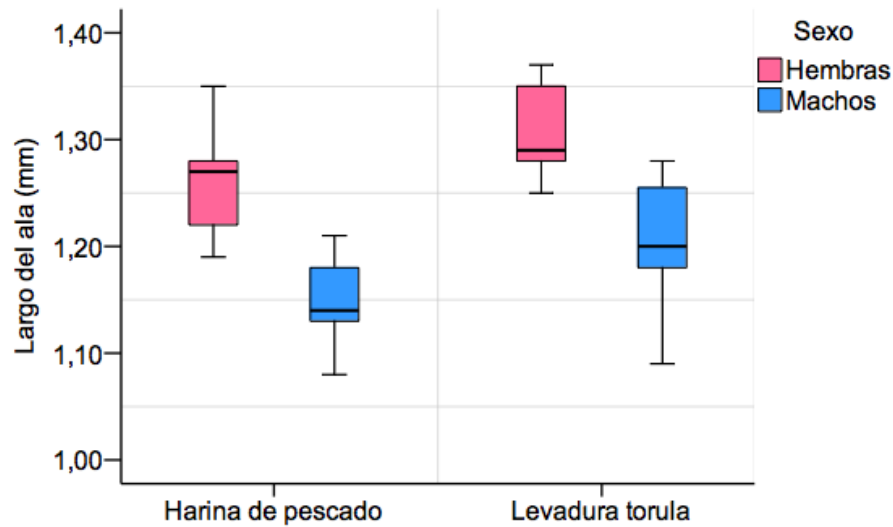


Figura 14. Largo del ala de *Ae. aegypti* (mm) según el sexo y la dieta administrada durante los estadios larvarios

## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

La nutrición durante la etapa larvaria de *Ae. aegypti* tiene marcada influencia en el desarrollo morfológico y las capacidades del mosquito adulto [16]. La insuficiente nutrición de las larvas no se compensa con la ingestión abundante de carbohidratos después de la emergencia del adulto, ni siquiera con la alimentación con sangre de las hembras, y repercute notablemente sobre funciones vitales como el vuelo, el apareamiento y la habilidad para encontrar una fuente de sangre [94]

En el presente estudio se comparó la eficacia y eficiencia de la alimentación de larvas de *Ae. aegypti* con levadura torula o harina de pescado. Se determinó el efecto de ambas dietas sobre la fase adulta del mosquito, toda vez que en un estudio anterior se había hecho sobre los estadios inmaduros [12].

La harina de pescado se utiliza desde hace años como sustrato único para la alimentación de larvas de *Ae. aegypti* en el insectario del IPK [88]. Se decidió evaluar la levadura torula como una dieta alternativa, porque posee varios atributos atractivos: origen vegetal, bajo precio en el mercado, producción nacional, fácil adquisición, formulación liofilizada y propiedades físico-químico-nutricionales adecuadas para larvas de mosquitos.

Entre las diferencias de composición nutricional de las dietas se distingue la alta proporción de grasa bruta en la harina de pescado (7,22%), un elemento que puede inducir cambios en las propiedades organolépticas del agua y la formación de una película lipídica en la superficie que dificulte la respiración de las larvas. Sin embargo, Pérez y cols. reportaron mayor turbidez del agua con la levadura torula que con la harina de pescado, lo cual se atribuyó a su higroscopicidad y se concluyó que tal turbidez podría representar una limitante para la utilización de la levadura torula como dieta de *Ae. aegypti* [12].

Si bien la alta higroscopicidad de la levadura torula es evidente por su tendencia a formar bloques compactos durante su almacenamiento por períodos prolongados, tales masas se disgregan fácilmente en agua y no ocasionan turbidez, al menos de manera primaria.

Es más probable que la causa de la turbidez del agua sea el crecimiento bacteriano secundario, provocado por la administración de la dieta a una dosis que exceda la capacidad de ingestión de las larvas [95].

En nuestro caso no se observó turbidez del agua con el uso de levadura torula, a pesar de aplicarla en iguales dosis que en el estudio de Pérez y cols. Una explicación a esta diferencia de turbidez puede estar en el origen de la levadura torula. La utilizada por Pérez y cols. fue producida a partir de melaza, mientras la de la presente investigación se obtuvo de vinaza.

La melaza es rica en carbohidratos de tipo hexosas: glucosa, galactosa y manosa, además de pentosas: xilosa y arabinosa. En cambio, la vinaza es un residual de la fermentación de la melaza con *S. Cerevisiae*, proceso en el cual la levadura degrada las tres hexosas y solo quedan las pentosas para la fermentación secundaria con *C. Utilis* [96]. Como resultado, la levadura torula de vinaza tiene muy pocos carbohidratos libres y es menos propensa a la contaminación bacteriana.

Una limitación para explicar los resultados del presente estudio es que no se cuenta con la discriminación de los tipos de lípidos en las dietas, sino apenas con el contenido de grasa bruta. *Aedes aegypti* es capaz de sintetizar la mayoría de los lípidos a partir de los carbohidratos de la dieta [97], lo cual unido a los alimentos bajos en lípidos que consume en sus hábitats naturales, apunta a que la harina de pescado contiene una proporción excesiva de grasas.

Un lípido importante en la dieta de *Ae. aegypti* es el colesterol, debido a la incapacidad de esta especie para sintetizarlo [58, 59]. El colesterol es imprescindible para la vitelogénesis y las hembras lo adquieren con frecuencia mediante la ingesta de sangre [98]. Sin embargo, Talyuli y cols. demostraron que la presencia de colesterol en la dieta de estadios inmaduros de *Ae. aegypti*, mejora considerablemente la ulterior producción de huevos [60].

Una limitación para explicar nuestros resultados es que no conocemos la concentración de colesterol en la levadura torula y solo se puede especular que es baja, dada la escasa cantidad de grasa bruta. Si bien *C. Utilis* sintetiza colesterol [99], la baja concentración de grasa bruta en la levadura torula utilizada en el

presente estudio, sugiere que dicha dieta no contiene suficiente colesterol para aportar a las reservas de los adultos recién emergidos de *Ae. aegypti*. En consecuencia, los procesos que requieren de dicho esteroide, como la vitelogénesis, podrían estar afectados con la alimentación exclusiva con levadura torula. Esto podría explicar la similaridad en la fecundidad de los mosquitos alimentados con las dos dietas evaluadas, aun cuando las hembras que recibieron torula fueron más grandes y está reportado que existe correlación positiva entre la fecundidad y el tamaño corporal del mosquito [91, 100].

La energía metabolizable es menor en la harina de pescado que en la levadura torula, un elemento que está determinado por la suma del aporte de los macronutrientes fundamentales: proteínas, lípidos y carbohidratos [101]. Si se toma en cuenta el alto contenido lipídico de la harina de pescado y la similaridad en el contenido proteico de ambas dietas, obviamente la elevada cantidad de energía metabolizable en la levadura torula estará determinada por la presencia de carbohidratos dentro de las células levaduriformes, que tienen el tamaño adecuado para ser ingeridas por las larvas de *Ae. aegypti*.

La mayor supervivencia de los mosquitos alimentados con levadura torula puede estar en relación con ese alto contenido de carbohidratos, que permitió la síntesis de glucógeno durante los estadios larvarios y constituyó una importante reserva de energía para la vida del adulto. La función de supervivencia es una de los estadígrafos más utilizados en entomología para identificar la influencia de alguna condición sobre la capacidad física de los insectos [8, 11, 13, 21, 72, 73, 102, 103] y de esta manera es un indicador útil para evaluar la eficacia de una dieta.

Nuestros resultados concuerdan con los de van Schoor y cols., que observaron adultos más longevos con dietas ricas en carbohidratos y composición media de proteínas [55]. Otros estudios han demostrado la relación entre la acumulación de carbohidratos en forma de glucógeno durante los estadios larvarios y la supervivencia de los adultos [104].

No obstante, la comparación con otras investigaciones debe ser cuidadosamente interpretada, porque existen múltiples factores involucrados en la supervivencia de

un organismo, más allá de la dieta [6]. Se describe longevidad en machos de *Ae. aegypti* tan disímiles como 32 [8], 63 [16] y 87 [72] días, entre otros. La longevidad de los adultos alimentados con levadura torula en el presente estudio se puede catalogar de buena para ambos sexos, porque se encuentra alrededor de la media en reportes de estudios similares [8, 10, 73, 91].

Lang et al. plantean la hipótesis de que las dietas durante estadios inmaduros determinan el tamaño de los machos de *Ae. aegypti* y a su vez, que los machos más grandes tienen mejor rendimiento en la actividad de vuelo en los enjambres. Posiblemente esta ventaja en la habilidad de vuelo le facilite además el apareamiento [15]. Otros autores describen que las hembras cruzadas con machos grandes alcanzan mayor fecundidad [105]. Klowden y cols. demostraron que las hembras de *Ae. aegypti* criadas con dosis sub-óptimas de dieta en la fase larvaria, fueron menos propensas a expresar el comportamiento de apareamiento ligado al huésped descrito para esta especie [94].

La medición del ala es una de las variables más fiables para expresar el tamaño corporal de los mosquitos, porque la estructura del ala es más rígida y estable que el propio cuerpo del insecto, especialmente tras la muerte [64, 73].

Según van Handel y Day, el largo del ala de *Ae. aegypti* está fuertemente correlacionado con el contenido de proteínas en el cuerpo del insecto. Ambos caracteres son expresión de una adecuada nutrición en las fases inmaduras, así como de la emergencia del adulto con reservas suficientes en el cuerpo graso para sobrevivir en el ambiente aun sin alimentarse. La correlación positiva del largo del ala con el contenido proteico del cuerpo del mosquito, valida la utilización de la primera como expresión del tamaño del insecto y su estado de nutrición [106].

En la presente investigación se decidió utilizar el largo del ala porque el procedimiento para su medición es más económico y relativamente más sencillo que la cuantificación del contenido proteico, en especial por la numerosa cantidad de individuos a evaluar.

El tamaño de los mosquitos es considerado por muchos el principal factor de éxito para el apareamiento, tanto de machos como de hembras. Los mosquitos machos

más grandes tienen ventajas en términos de apareamientos eficientes [105, 107] y transfieren mayor cantidad de esperma a las hembras [108, 109].

En la presente investigación, la alimentación de larvas de *Ae. aegypti* con levadura torula produjo adultos significativamente más grandes con respecto a la harina de pescado, lo que representa una fuerte evidencia de su eficacia y potencial para la reproducción de esta especie en laboratorio.

Con frecuencia se utiliza la fecundidad y la fertilidad como indicadores funcionales de la eficacia de la dieta durante los estadios inmaduros. Gunathilaka y cols. observaron marcadas diferencias en la cantidad de huevos puestos y en los índices de eclosión de grupos de hembras alimentadas con cinco niveles diferentes de un mismo sustrato [13].

Sin embargo, en México los mosquitos alimentados con una dieta con aparente menor contenido nutricional, mostraron indicadores de fecundidad y fertilidad relativamente superiores a los que se les suministró la compleja y rica dieta diseñada en los laboratorios del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) [9].

En Italia se utilizó la fecundidad como un parámetro para establecer la eficiencia de tres dietas para estadios inmaduros de *Ae. albopictus*. Existió igual eficacia de las dietas y, en consecuencia, los sustratos con menor costo tendrían mayor eficiencia y potencial para cría extensiva [8]. Los resultados del presente trabajo están en esa misma línea, porque la fecundidad y la fertilidad fueron similares en todos los grupos, independientemente de la dieta suministrada. Los valores de fertilidad fueron elevados, alrededor del 95%, en correspondencia con otros reportes [13].

El mayor tamaño y longevidad de los mosquitos adultos alimentados con levadura torula, unido a la similar fecundidad y fertilidad respecto a los que recibieron harina de pescado, demuestran la eficacia de la levadura torula como dieta para estadios inmaduros de *Ae. aegypti*. Estas evidencias, sin embargo, no deben considerarse concluyentes para establecer un cambio a la levadura torula en el insectario del IPK, porque deben estudiarse la influencia de otros factores y, especialmente, es

recomendable diseñar dietas compuestas por varios sustratos, que aporten de manera equilibrada todos los micronutrientes que requiere esta especie.

Couret y cols. reportan interacciones complejas entre la dieta, la densidad larvaria y la temperatura. La comparación de la eficiencia de las dietas fue diferente cuando se realizaron cambios en la temperatura ambiental y ante el hacinamiento de las larvas en las bandejas de cría [21, 110]. Para progresar a la siguiente etapa de la vida, las larvas de mosquitos requieren una cantidad determinada de elementos nutritivos y existen umbrales para desencadenar cascadas de desarrollo hormonal dependientes de factores como, por ejemplo, la temperatura y la luz. Esto se traduce en limitaciones en el uso de las reservas de energía del cuerpo graso y en el estado de desarrollo ulterior de los adultos [21].

Existen criterios prácticos que suponen ventajas de la levadura torula frente a la alimentación tradicional con harina de pescado. La levadura torula es un producto liofilizado y estable, que se puede conservar a temperatura ambiente por períodos prolongados; su olor es relativamente agradable, especialmente cuando se compara con la harina de pescado.

La levadura torula tiene un alto contenido soluble y no es necesario tamizarla, porque no contiene partículas grandes, lo que simplifica la manipulación. Las partículas de la levadura torula consisten en conglomerados de células levaduriformes, que se disgregan al ser suspendidas en agua y pueden ser ingeridas con facilidad por las larvas de *Ae. aegypti*. En cambio, la harina de pescado posee partículas macroscópicas de variado tamaño que incluyen residuos de vértebras, escamas y espinas que no aportan valor nutricional. El material inerte altera significativamente el peso efectivo de la harina de pescado y hace complejo la normalización de la dosis.

El análisis en su conjunto de las cuatro variables exploradas en la presente investigación, permite afirmar que la administración de levadura torula como dieta para las larvas de *Ae. aegypti* cumplió su objetivo de nutrición, al alcanzar los adultos del insecto mejor condición física o funcional según dos de ellas

(supervivencia y tamaño del ala), mientras las otras dos (fecundidad y fertilidad) se comportaron de manera similar a la harina de pescado como dieta de referencia.

El término de eficacia ha sido ampliamente revisado en los últimos años para el análisis de variadas intervenciones en salud pública. Existe consenso en que eficacia se refiere, en su sentido práctico, a la consecución de un objetivo bajo condiciones ideales [84-87, 111]. Desde este punto de vista, la levadura torula mostró mayor eficacia que la harina de pescado para la alimentación de larvas de *Ae. aegypti*.

La eficiencia en su abordaje más simple resulta de la eficacia en relación a los costos económicos [84]. Los conceptos actuales brindan un enfoque sistémico; la eficiencia será la razón entre las entradas y las salidas del sistema [86]. Zidane y Olsson refuerzan el aspecto cualitativo del producto final y definen la eficiencia será como la producción de una salida de alta calidad de manera competente, es decir, en función de la utilización de recursos humanos, materiales y el tiempo [85].

En nuestra investigación, el tiempo y los recursos humanos empleados para la alimentación de los mosquitos es similar para ambas dietas, de manera que la eficiencia puede ser analizada básicamente en la relación entre la eficacia y el costo económico.

El precio de las dietas internacionalmente utilizadas para obtener insectos de alta calidad puede ser elevado. En Italia se diseñó una dieta en base a alimentos comerciales para gatos (80%) y peces (6%) y extracto de levadura (14%), que tiene un costo: 33 USD/ kg [112]. Las dos dietas recomendadas por los laboratorios de control de plagas del OIEA cuestan 32 y 18 USD/ kg. La primera (OIEA-1) está constituida por extracto de hígado de res (50%) y harina de atún (50%) suplementado con multivitaminas. La segunda (OIEA-2) contiene extracto de hígado de res (25%), harina de atún (50%), extracto de levadura (12,5%) y extracto de calamar (12,5%), también suplementada con vitaminas [8].

La dieta usada en Tapachula, México tiene variados constituyentes: maíz, soya, remolacha, harina de pescado, avena, extracto de levadura, melaza de caña, suero, trigo, extracto de carne de cerdo, sal y vitaminas. A pesar del número de sustratos,

las proporciones de la mayoría de ellos son realmente bajas y el precio es de apenas 2 USD/ kg. Esta dieta también mostró ser altamente efectiva [9].

La levadura torula es de producción nacional y tiene un precio local de 3,28 pesos por kilogramo<sup>a</sup>, mientras la harina de pescado es importada a costo promedio de 45 pesos por kilogramo<sup>b</sup>. De esta manera, la levadura torula resulta alrededor de diez veces más barata que la harina de pescado, lo que, unido a su mayor eficacia, permite señalar que la alimentación con este sustrato tiene una alta eficiencia para la alimentación de larvas de *Ae. aegypti*.

Vista la eficiencia en términos económicos netos, parece no tener gran impacto para la cría de laboratorio a pequeña escala, porque las pocas cantidades necesarias para el funcionamiento de un laboratorio común no representan un costo elevado. Sin embargo, con la visión de la eficiencia en el sentido amplio de la calidad del material biológico resultante, alcanza una importancia fundamental incluso para la cría a pequeña escala.

Pero es, ciertamente, en la cría masiva de insectos donde la eficiencia es un principio elemental. La implementación de las tecnologías emergentes de control de *Ae. aegypti* que implican la liberación de millones de insectos, requieren de sustratos de alta eficiencia, porque los costos económicos de una bioplanta siempre son elevados [113].

Existen otros reportes de dietas simples y bajo costo económico que pueden permitir altos rendimientos en la cría de *Ae. aegypti*. Una dieta en base a cereales y leguminosas inicialmente diseñada para *Anopheles* [14], fue probada con éxito en Taiwán para la cría de larvas de *Ae. aegypti*, mostrando rendimientos superiores a sustratos ricos en proteínas de origen animal [114]. Bond y cols. en México sustituyeron la dieta de OIEA por pellets para la alimentación de roedores que tiene un bajo costo económico [9].

#### Fuente

<sup>a</sup> Departamento comercial, AZUMAT

<sup>b</sup> Departamento comercial, CENPALAB



Los estudios internacionales que comparan diferentes dietas para estadios inmaduros de mosquitos, coinciden en que se requieren un número considerable de elementos nutricionales, para cubrir las necesidades que garanticen la mejor calidad del material biológico. Difícilmente todos pueden ser encontrados en un solo sustrato, por lo cual las fórmulas comprenden mezclas complejas [4, 6, 8-10, 12, 13, 15, 16, 21, 70, 91, 115].

Se pueden experimentar sesgos considerables en investigaciones científicas, cuando para éstas se utilizan mosquitos criados con dietas deficientes de nutrientes, de ahí la importancia de desarrollar este tema en el departamento de control de vectores del IPK. La levadura torula tiene alto potencial para incluirla en la dieta para estadios inmaduros de *Ae. aegypti*, idealmente combinada con otros sustratos que aporten elementos deficientes en la misma como podría ser el colesterol.

Se requieren además estudios más detallados para determinar la factibilidad de la levadura torula como uno de los sustratos para dietas en cría masiva de *Ae. aegypti*. Para ello corresponde evaluar mayor cantidad de variables como la supervivencia para cada estadio de desarrollo, tiempo de pupación, tiempo de emergencia, dimorfismo, habilidad de vuelo, proporción de sexos, etc., pero en especial las interacciones entre ellas y con otros factores como las condiciones ambientales [16, 95, 114]. El método de respuesta de superficie podría simplificar significativamente el proceso de diseño de mezclas compuestas y ahorrar tiempo, espacio y recursos [64].

Está demostrado que los estadios inmaduros de *Ae. aegypti* pueden alcanzar excelente desarrollo con sustratos de origen vegetal [114] y con levaduras vivas o muertas [71, 72], lo cual tiene impacto sobre la forma física y las funciones vitales de la fase adulta. Las levaduras son fácilmente ingeridas por las larvas e hidrolizadas rápidamente en el intestino, de manera que el contenido citoplasmático de las células fúngicas es asimilado [71].

Valzania y cols. observaron que la ingestión de levaduras y bacterias vivas estimula significativamente el crecimiento de *Ae. aegypti* [4]. Souza comparó el impacto sobre la nutrición de larvas de la misma especie, de dietas basadas en bacterias,

algas y levaduras vivas y éstas últimas resultaron la mejor opción, promoviendo la metamorfosis, pupación precoz, mayor tamaño del ala de los adultos y tiempo de vida prolongado [71, 72]. Ello sugiere que podría también diseñarse dietas basadas en combinaciones de levadura torula industrial (levaduras muertas) que aporten carbohidratos y proteínas, con cultivos de levaduras vivas que estimulen a las larvas a la ingestión y digestión.

La levadura torula mostró alta eficacia y eficiencia para la cría de estadios inmaduros de *Ae. aegypti* en comparación con la harina de pescado. En consecuencia, es un excelente candidato para continuar los estudios que permitan su inclusión de manera rutinaria en el insectario y en la bioplanta de técnica del insecto estéril del IPK.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Los adultos de *Ae. aegypti* que fueron alimentados con levadura torula durante sus estadios larvarios, mostraron mayor probabilidad de supervivencia que aquellos alimentados con harina de pescado, lo que expresa un mejor balance nutricional de la levadura torula, que posibilitó la emergencia de mosquitos con mayores reservas de energía
2. No se observó influencia de la dieta administrada durante los estadios inmaduros sobre la fecundidad y fertilidad de *Ae. aegypti*
3. El tamaño corporal de los adultos de *Ae. aegypti* resultó superior en aquellos alimentados en la fase larvaria con levadura torula respecto a los que recibieron la harina de pescado, lo que representa una ventaja para su aplicación a la experimentación rutinaria de laboratorio
4. La levadura torula tuvo mayor eficacia que la harina de pescado como dieta de estadios inmaduros de *Ae. aegypti*, al obtenerse adultos más grandes y longevos con igual fecundidad y fertilidad
5. La relación precio – eficacia de levadura torula es superior a la harina de pescado, lo que la cataloga como una dieta eficiente para estadios inmaduros de *Ae. aegypti*

## **RECOMENDACIONES**

## RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de diseño y optimización de dietas para la cría eficiente de *Ae. aegypti* en el insectario del IPK, que incluya la levadura torula en combinación con otros sustratos, para cubrir todos los requerimientos del mosquito y obtener material biológico de alta calidad.
2. Evaluar levaduras y otros organismos vivos como dietas para los estadios inmaduros de *Ae. aegypti*

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benelli G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. *Parasitol Res.* 2015;114(8):2801-05.
2. Levy S, Del Valle J. Zika virus is arriving at the American continent. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9:1019-21.
3. Lounibos L. Invasion by insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 2002;47(1):233-66.
4. Valzania L, Martinson VG, Harrison RE, Boyd BM, Coon KL, Brown MR, et al. Both living bacteria and eukaryotes in the mosquito gut promote growth of larvae. *PLoS neg trop dis.* 2018;12(7):e0006638.
5. Diane D Lovin D, Washington K, deBruyn B, Hemme R, Mori A, Epstein S, et al. Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. *BMC Genomics.* 2009;10(590):1-9.
6. Müller R, Knautz T, Völker J, Kress A, Kuch U, Oehlmann J. Appropriate larval food quality and quantity for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2013;50(3):668-73.
7. Timmermann SE, Briegel H. Larval growth and biosynthesis of reserves in mosquitoes *J Insect Physiol.* 1999;45:461-70.
8. Puggioli A, Balestrino F, Damians D, Lees RS, Soliban SM, Madakacherry O, et al. Efficiency of three diets for larval development in mass rearing *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2013;50(4):819-25.
9. Bond JG, Ramírez-Osorio A, Marina CF, Fernández-Salas I, Liedo P, Dor A, et al. Efficiency of two larval diets for mass-rearing of the mosquito *Aedes aegypti*. *PloS one.* 2017;12(11):e0187420.
10. Benedict MQ, Hunt CM, Vella MG, Gonzalez KM, Dotson EM, Collins CM. Pragmatic selection of larval mosquito diets for insectary rearing of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *PloS one.* 2020;15(3):e0221838.
11. Canyon DV, Hii JL, Muller R. Effect of diet on biting, oviposition, and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1999;36(3):301-8.
12. Perez O, Forte C, Sarracent J, Hernández HM, Rodriguez J, Diaz M, et al. Evaluación de tres dietas alimentarias para el período larval de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. *Rev Cub Med Trop.* 2013;65(1):107-18.
13. Gunathilaka P, Uduwawala U, Udayanga N, Ranathunge R, Amarasinghe LD, Abeyewickreme W. Determination of the efficiency of diets for larval development in mass rearing *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Bull entomol res.* 2018;108(5):583-92.
14. Khan I, Farid A, Zeb A. Development of inexpensive and globally available larval diet for rearing *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Parasit Vectors.* 2013;6:90-94.
15. Lang BJ, Idugboe S, McManus K, Drury F, Qureshi A, Cator LJ. The Effect of Larval Diet on Adult Survival, Swarming Activity and Copulation Success in Male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2018;55(1):29-35.
16. Mamai W, Bimbilé Somda NS, Maiga H, Konczal A, Wallner T, Bakhoun MT, et al. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae powder as a larval diet



- ingredient for mass-rearing *Aedes* mosquitoes. Parasite (Paris, France). 2019;26:57.
17. Lezcano P. Desarrollo de una fuente proteica en Cuba. Levadura torula (*Candida utilis*). Rev Cub Ciencia Agrícola. 2005;39(Especial):459-63.
  18. Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, et al. Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and Yellow Fever mosquito. Evolution. 2014;68(2):514-25.
  19. Clemons A, Haugen M, Flannery E, Tomchaney M, Kast K, Jacowski C, et al. *Aedes aegypti*: an emerging model for vector mosquito development. Cold Spring Harbor protocols. 2010;2010(10):pdb emo141.
  20. Gadelha DP, Toda AT. [Biology and behavior of *Aedes aegypti*]. Rev Bras Malariol Doencas Trop. 1985;37:29-36.
  21. 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):e87468.
  22. Mitchell-Foster K, Ma B, Warsame-Ali S, Logan C, Rau M, Lowenberger C. The influence of larval density, food stress, and parasitism on the bionomics of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): implications for integrated vector management. J Vector Ecol. 2012;37(1):221-9.
  23. Christophers R. *Aedes aegypti* (L.). The Yellow Fever Mosquito. London: Cambridge University Press; 1960.
  24. Briegel H. Physiological bases of mosquito ecology. J Vector Ecol. 2003;28(1):1-11.
  25. González R. Culícidos de Cuba. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 2006. 184 p.
  26. Harrington LC, Scott TW, Lerdthusnee K, Coleman RC, Costero A, Clark GG, et al. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. Am J Trop Med Hyg. 2005;72(2):209-20.
  27. Gubler D. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler D, Kuno G, editors. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: CAB International; 1997. p. 1-22.
  28. Gato R, Menéndez Z, Prieto E, Argilés R, Rodríguez M, Baldoquín W, et al. Sterile Insect Technique: Successful Suppression of an *Aedes aegypti* Field Population in Cuba. Insects. 2021;12(5):469.
  29. Edman JD, Scott TW, Costero A, Morrison AC, Harrington LC, Clark GG. *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. J Med Entomol. 1998;35(4):578-83.
  30. Chadee DD, Beier JC, Mohammed RT. Fast and slow blood-feeding durations of *Aedes aegypti* mosquitoes in Trinidad. J Vector Ecol. 2002;27(2):172-7.
  31. Day JF. Host-seeking strategies of mosquito disease vectors. J Am Mosq Control Assoc. 2005;21(4 Suppl):17-22.
  32. Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Dahl C, Madon M, et al. Mosquitoes and Their Control. Second Edition ed. London: Springer; 2010.
  33. Marquardt WH. Biology of disease vectors: Elsevier; 2004.
  34. Carvalho DO, Chuffi S, Ioshino RS, Marques IC, Fini R, Costa MK, et al. Mosquito pornoscopy: Observation and interruption of *Aedes aegypti*

- copulation to determine female polyandric event and mixed progeny. PloS one. 2018;13(3):e0193164.
35. Gullan PJ, Cranston PS. The insects: an outline of entomology: John Wiley & Sons; 2014.
  36. Morrison A, Costero A, Edman J, Clark G, Scott T. Increased fecundity of *Aedes aegypti* fed human blood before release in a mark-recapture study in Puerto Rico. J Am Mosq Control Assoc. 1999;15(2):98-104.
  37. Garcia-Rejon JE, Ulloa-Garcia A, Cigarroa-Toledo N, Pech-May A, Machain-Williams C, Cetina-Trejo RC, et al. Study of *Aedes aegypti* population with emphasis on the gonotrophic cycle length and identification of arboviruses: implications for vector management in cemeteries. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2018;60.
  38. Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. Ann rev entomol. 2008;53:273-91.
  39. Carrada T, Vazquez L, Lopez I. Ecology of dengue and *Aedes aegypti*. Salud publica de Mexico. 1984;26(1):63-76.
  40. Fay RW. The biology and bionomics of *Aedes aegypti* in the laboratory. Mosq News. 1964;24(3):300-8.
  41. Oliveira L, La Corte R, Santana MO, Ribeiro CM. Quiescence in *Aedes aegypti*: Interpopulation Differences Contribute to Population Dynamics and Vectorial Capacity. Insects. 2018;9:111; doi:10.3390/insects9030111.
  42. Araujo DF, Ribeiro CM, Oliveira L, Varjal MA, Junqueira CF. Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. Parasit Vectors. 2017;10:310.
  43. Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: connection with distinct levels of resistance to desiccation. J Insect Physiol. 2015;83:43–52.
  44. Tun-Lin W, Burkot T, Kay B. Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. Med vet entomol. 2000;14(1):31-7.
  45. Fouque F, Carinci R. *Aedes aegypti* in French Guiana. Some aspects of history, general ecology and vertical transmission of the dengue virus. Bull Societe de pathologie exotique. 1996;89(2):115-9.
  46. Hayden MH, Uejio CK, Walker K, Ramberg F, Moreno R, Rosales C, et al. Microclimate and human factors in the divergent ecology of *Aedes aegypti* along the Arizona, U.S./Sonora, MX border. EcoHealth. 2010;7(1):64-77.
  47. Nelson MJ. *Aedes aegypti*: Biology and ecology. Washington PAHO. COLL/PNSP/86-64; 1986.
  48. Service MW. Importance of ecology in *Aedes aegypti* control. The Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1992;23(4):681-90.
  49. Vinogradova EB. *Culex pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control: Pensoft Publishers; 2000.

50. Crovello TJ, Hacker CS. Evolutionary Strategies in Life Table Characteristics Among Feral and Urban Strains of *Aedes aegypti* (L.). *Evolution*. 1972;26(2):185-96.
51. Kauffman E, Payne A, Franke MA, Schmid MA, Harris E, Kramer LD. Rearing of *Culex* spp. and *Aedes* spp. Mosquitoes. *Bio Protoc*. 2017;7(17):e2542.
52. Shannon RC, Putman P. The biology of *Stegomyia* under laboratory conditions. I. The analysis of factors which influence larval development. *Proc Ent Soc Wash* 1934;36:185-206.
53. Singh KRP, Brown AWA. Nutritional requirements of *Aedes aegypti* L. . *J Insect Physiol*. 1957;1:199–220.
54. Akov S. A qualitative and quantitative study of the nutritional requirements of *Aedes aegypti* L. larvae. . *J Insect Physiol* 1962;8:319–35.
55. van Schoor T, Taylor E, Tam N, Attardo GM. Impacts of Dietary Nutritional Composition on Larval Development and Adult Body Composition in the Yellow Fever Mosquito (*Aedes aegypti*). *Insects*. 2020;11(535):doi:10.3390/insects11080535.
56. Scaraffia PY, Tan G, Isoe J, Wysocki VH, Wells MA, Miesfeld RL. Discovery of an alternate metabolic pathway for urea synthesis in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:518–23.
57. Dias ACA, Rodrigues MMS, Silva AA. Effect of acute and chronic exposure to ammonia on different larval instars of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol*. 2019;44:112–8.
58. Golberg L, De Meillon B. The nutrition of the larva of *Aedes aegypti* Linnaeus. 3. Lipid requirements. *Biochem J*. 1948;43(3):372.
59. Clark AJ, Block K. The absence of sterol synthesis in insects. *J Biol Chem* 1959;234:2578–82.
60. Talyuli OA, Bottino-Rojas V, Taracena ML, Soares ALM, Oliveira JHM, Oliveira PL. The use of a chemically defined artificial diet as a tool to study *Aedes aegypti* physiology. *J Insect Physiol*. 2015;83:1-7.
61. Kuno G. Early History of Laboratory Breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Focusing on the Origins and use of Selected Strains. *J Med Entomol*. 2010;47(6):957-71.
62. Vrzal EM, Allan SA, Hahn DA. Amino acids in nectar enhance longevity of female *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *J Insect Physiol*. 2010;56(11):1659-64.
63. De Meillon B, Golberg L, Lavoipierre M. The nutrition of the larva of *Aedes aegypti*. *J Exp Biol*. 1945;21(3-4):84-9.
64. Damiens D, Benedict MQ, Wille M, Gilles JR. An inexpensive and effective larval diet for *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae): eat like a horse, a bird, or a fish? *J Med Entomol*. 2012;49(5):1001-11.
65. Acero A, Muir JP, Wolfe RM. Nutritional composition and condensed tannin concentration changes as browse leaves become litter. *J Sci Food Agric*. 2010; 90: 2582-5.
66. Coq S, Souquet J, Meudec E, Cheynier V, Hattenschwiler S. Interspecific variation in leaf litter tannins drives decomposition in a tropical rain forest of French Guyana. *Ecology*. 2010;91:2080-91.

67. Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, et al. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector borne Zoonotic dis* (Larchmont, NY). 2010;10(3):295-311.
68. Zeller M, Koella JC. Effects of food variability on growth and reproduction of *Aedes aegypti*. *Ecol Evol*. 2016;6(2):552–9.
69. Timmermann SE, Briegel H. Effect of plant, fungal and animal diets on mosquito development. *Entomol Exp Appl*. 1996;80:173-6.
70. Bimbilé Somda NS, Maïga H, Mamai W, Yamada H, Ali A, Konczal A, et al. Insects to feed insects - feeding *Aedes* mosquitoes with flies for laboratory rearing. *Scientific reports*. 2019;9(1):11403.
71. Souza RS, Diaz-Albiter HM, Dillon VM, Dillon RJ, Genta FA. Digestion of Yeasts and Beta-1,3-Glucanases in Mosquito Larvae: Physiol Biochem Consider. *PloS one*. 2016;11(3):e0151403.
72. Souza RS, Virginio F, Riback TIS, Suesdek L, Barufi JB, Genta FA. Microorganism-Based Larval Diets Affect Mosquito Development, Size and Nutritional Reserves in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Front physiol*. 2019;10:152.
73. Gunathilaka N, Upulika H, Udayanga L, Amarasinghe D. Effect of Larval Nutritional Regimes on Morphometry and Vectorial Capacity of *Aedes aegypti* for Dengue Transmission. *BioMed Res Int*. 2019;2019:3607342.
74. Coon KL, Valzania L, McKinney DA, Vogel KJ, Brown MR. Bacteria-mediated hypoxia functions as a signal for mosquito development. *Proc Natl Acad Sci*. 2017;114:E5362–E9.
75. Kieliszek M, Kot AM, Bzducha-Wróbel A, Błazejak S, Gientka I, Kurcz A. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: a review. *Fung Biol Rev*. 2017;31(4):185-98.
76. Lezcano P, Herrera M. Evaluation of torula yeast (*Candida utilis*) grown on distillery vinasse for broilers. *Cuban J Agricult Sc*. 2013;47(2).
77. Díaz M, Saura G, Pérez I. La producción de levadura *Candida utilis* (levadura Torula). Resultados de los institutos cubanos de investigación, desarrollo e innovación en las tecnologías sobre azúcar y derivados. La Habana: ICIDCA; 2019. 574 p.
78. Rodríguez B, Valdivié M, Lezcano P. Utilization of torula yeast grown on distillery's vinasse in starter and growth diets in White Leghorn L-33 replacement layers. *Cuban J Agricult Sc*. 2014;48(2):129.
79. de Becze GI. Yeasts: I. Morphology. *App Microbiol*. 1956;4(1):1-12.
80. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. *The yeasts: a taxonomic study*: Elsevier; 2011.
81. Pfeiffer T, Morley A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers Mol Biosc*. 2014;1(17).
82. Křižková Lv, Ďuračková Z, Šandula J, Sasinková V, Krajčovič J. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutation Res Gen Toxicol Environment Mutagenesis*. 2001;497(1-2):213-22.
83. Miadoková E, Svidová S, Vlčková V, Dúhová V, Nad'ová S, Rauko P, et al. Diverse biomodulatory effects of glucomannan from *Candida utilis*. *Toxicol in vitro*. 2006;20(5):649-57.

84. Bouza Suárez A. Reflexiones acerca del uso de los conceptos de eficiencia, eficacia y efectividad en el sector salud. *Rev Cub Salud Pública*. 2000;26:50-6.
85. Zidane YJ-T, Olsson NO. Defining project efficiency, effectiveness and efficacy. *Int J Manag Proj Business*. 2017.
86. Burches E, Burches M. Efficacy, Effectiveness and Efficiency in the Health Care: The Need for an Agreement to Clarify its Meaning. *Int Arch Public Health Community Med*2020. 2020.
87. Marley JE. Efficacy, effectiveness, efficiency. *Australian Prescriber*. 2000;23(6):114-8.
88. Pérez O, Rodríguez J, Bisset JA, Leyva M, Díaz M, Fuentes O, et al. Manual de Indicaciones Técnicas para Insectarios. In: Médicas EC, editor. 2004.
89. Clements AN. The Physiology of Mosquitoes: International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Zoology, Vol. 17: Elsevier; 2013.
90. Vreysen MJ, Seck BS, Mbaye AG, Bassene M, Fall AG, Lo M, et al. Area-Wide Integrated Management of a *Glossina palpalis* gambiensis population in the Niayes area of Senegal: a review of operational research in support of an operational phased conditional approach. In: Hendrichs J, Pereira R, Vreysen MJ, editors. Area-Wide Integrated Pest Management: Development and Field Application. Vienna: CRC Press; 2021. p. 275-303.
91. Yamany AS, Adham FK. The effect of larval and adult nutrition on survival and fecundity of dengue vector *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *J Egypt Soc Parasitol*. 2014;44(2):447-54.
92. Harbach RE, Knight KL. Taxonomists' glossary of mosquito anatomy: Plexus Publishing Inc.; 1980.
93. Rohlf F. Tpsdig, version 2.12; tpsrelw, version 1.46. Stony Brook, NY: State University of New York at Stony Brook. 2008.
94. Klowden MJ, Blackmer JL, Chambers GM. Effects of larval nutrition on the host-seeking behavior of adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*. 1988;4(1):73-5.
95. Medici A, Carrieri M, Scholte EJ, Maccagnani B, Dindo ML, Bellini R. Studies on *Aedes albopictus* larval mass-rearing optimization. *J Econom Entomol*. 2011;104(1):266-73.
96. Kurth E. Yeasts from Wood Sugar Stillage. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1946;38(2):204-7.
97. Ziegler R, Ibrahim MM. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 2001;47(6):623-7.
98. Rivera-Pérez C, Clifton ME, Noriega FG. How micronutrients influence the physiology of mosquitoes. *Current Opinion in Insect Science*. 2017;23:112-7.
99. Dawson P, Craig B. Lipids of *Candida utilis*: changes with growth. *Can J Microbiol*. 1966;12(4):775-85.
100. Yan J, Kibech R, Stone CM. Differential Effects of Larval and Adult Nutrition on Survival, Fecundity, and Size of the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. 2020.
101. Thayer DW. Effect of dietary amino acid on the amino acid pool of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol*. 1972;18(3):521-6.

102. Balestrino F, Puggioli A, Gilles JR, Bellini R. Validation of a new larval rearing unit for *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) mass rearing. PloS one. 2014;9(3):e91914.
103. Focks DA, Haile DG, Daniels E, Mount GA. Dynamic life table model for *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae): simulation results and validation. J Med Entomol. 1993;30(6):1018-28.
104. Van Handel E. Nutrient accumulation in three mosquitoes during larval development and its effect on young adults. J Am Mosq Control Assoc. 1988;4(3):374-6.
105. Helinski ME, Harrington LC. Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. J Med Entomol. 2011;48(2):202-11.
106. Van Handel E, Day JF. Correlation between wing length and protein content of mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc. 1989;5:180-2.
107. Yuval B, Wekesa J, Washino R. Effect of body size on swarming behavior and mating success of male *Anopheles freeborni* (Diptera: Culicidae). J Insect Behav. 1993;6(3):333-42.
108. Ponlawat A, Harrington LC. Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). J Medical Entomol. 2007;44(3):422-6.
109. Ponlawat A, Harrington LC. Factors associated with male mating success of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 2009;80(3):395-400.
110. Farjana T, Tuno N, Higa Y. Effects of temperature and diet on development and interspecies competition in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 2012;26(2):210-7.
111. Byron Cisneros EE, Chávez Rivera ME, Herrera Cabrera DF, Torres Fernández JP, Gallo Mendoza JG, Armijos Robles LA. Cómo medir la eficacia de la gestión en instituciones de salud. Revi Cub Investigaciones Biomédicas. 2017;36(3): 16-19.
112. Bellini R, Calvitti M, Medici A, Carrieri M, Celli G, Maini S. Use of the sterile insect technique against *Aedes albopictus* in Italy: first results of a pilot trial. In: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J, editors. Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2007. p. 505-15.
113. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. Sterile Insect Technique: Principles And Practice In Area-Wide Integrated Pest Management: Taylor & Francis; 2021.
114. Sasmita HI, Tu WC, Bong LJ, Neoh KB. Effects of larval diets and temperature regimes on life history traits, energy reserves and temperature tolerance of male *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): optimizing rearing techniques for the sterile insect programmes. Parasit Vectors. 2019;12(1):578.
115. Puggioli A, Carrieri M, Dindo ML, Medici A, Lees RS, Gilles JR, et al. Development of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Larvae Under Different Laboratory Conditions. J Med Entomol. 2017;54(1):142-9.