

Respuesta de *Anopheles albimanus* a compuestos volátiles de casas del sur de Chiapas, México

Silvany Mayoly Ríos-Delgado, MC,⁽¹⁾ Américo David Rodríguez-Ramírez, MC, D en F,⁽²⁾
Leopoldo Cruz-López, MC, D en F,⁽³⁾ Luis Alonso Escobar-Pérez, QFB,⁽²⁾
Ma de Lourdes Aburto-Juárez, QFB,⁽⁴⁾ José Luis Torres-Estrada, MC, D en C.⁽²⁾

Ríos-Delgado SM, Rodríguez-Ramírez AD, Cruz-López L,
Escobar-Pérez LA, Aburto-Juárez ML, Torres-Estrada JL.
Respuesta de *Anopheles albimanus* a compuestos volátiles
de casas del sur de Chiapas, México.
Salud Publica Mex 2008;50:367-374.

Ríos-Delgado SM, Rodríguez-Ramírez AD, Cruz-López L,
Escobar-Pérez LA, Aburto-Juárez ML, Torres-Estrada JL.
Behavioral response of *Anopheles albimanus* to volatile compounds
collected inside houses from the south of Chiapas, Mexico.
Salud Publica Mex 2008;50:367-374.

Resumen

Objetivo. Determinar el efecto de los compuestos volátiles en las casas sobre la respuesta conductual del vector del paludismo *Anopheles albimanus*. **Material y métodos.** El estudio se realizó en enero de 2006 en el ejido Nueva Independencia, municipio de Suchiate, Chiapas. Se colectaron compuestos volátiles dentro de casas y los extractos se probaron sobre hembras sin alimentar en un olfatómetro en "Y". Los extractos se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). **Resultados.** Se obtuvieron 28 extractos, 12 presentaron respuesta de atracción y dos de repelencia. Los análisis por CG-EM indicaron variación en la presencia de compuestos volátiles y no se vincularon con compuestos específicos indicativos de algún efecto. **Conclusiones.** Los volátiles en casas presentaron efecto de atracción y repelencia para *An. albimanus*. No se reconoció un patrón definido en cuanto a la presencia de compuestos químicos característicos y la respuesta obtenida.

Palabras clave: *Anopheles albimanus*; mosquitos; comportamiento; atrayentes; paludismo; México

Abstract

Objective. To determine effects of volatile compounds in homes on the behavioral response of *Anopheles albimanus*. **Material and Methods.** The study was conducted in January 2006, in the village of Nueva Independencia village, Suchiate, Chiapas. Volatile compounds were collected inside homes and the extracts were tested on unfed females in a Y-olfactometer. Extracts were analyzed in a gas chromatography-mass spectrometry system (GC-MS). **Results.** Twenty eight extracts were obtained, twelve presented attraction and two repellency responses. GC-MS analyses of the extracts indicated variation in the volatile compound present in the extracts, but could not associated specific compounds with any particular effect. **Conclusions.** Within homes, volatiles presented attraction and repellency responses to *An. albimanus*. A definite pattern concerning the presence of a characteristic chemical compound and the observed response was not found.

Key words: *Anopheles albimanus*; mosquitoes; behavioral attractants; malaria; Mexico

- (1) Escuela de Salud Pública de México. Cuernavaca, Morelos, México.
- (2) Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Tapachula, Chiapas, México.
- (3) El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México.
- (4) Centro Educacional Analítica. Distrito Federal, México.

Fecha de recibido: 16 de octubre de 2007 • **Fecha de aprobado:** 4 de abril de 2008
Solicitud de sobretiros: Dr. José Luis Torres Estrada. Centro Regional de Investigación en Salud Pública.
4a. Avenida Norte y 19 calle poniente, col. Centro. 30700 Tapachula, Chiapas.
Correo electrónico: jltorres@insp.mx

El paludismo es todavía un problema de salud pública que provoca graves repercusiones en el mundo.¹ Tan sólo en África se concentra 90% de los casos y acaba con la vida de más de un millón de personas, en particular niños menores de cinco años.² En México, el paludismo, si bien focalizado, posee todavía importancia en el esquema de salud pública y Chiapas es el estado que ha registrado hasta 50% de los casos en los últimos seis años.³⁻⁵

Para que la transmisión ocurra, la hembra del mosquito debe tener dos contactos con el ser humano, el primero para infectarse (adquiere el parásito de una persona infectada) y el segundo para transmitirlo. El contacto vector-ser humano depende de la genética del mosquito y se modifica por aspectos físicos y químicos. Desde el punto de vista químico, el proceso de búsqueda inicia cuando la hembra capta el CO₂ y el 1-octen-3-ol (octenol), que son compuestos exhalados en la respiración de los mamíferos y causantes de la activación y orientación del vuelo de los mosquitos hacia el hospedador a largas distancias.⁶⁻⁹ Una vez que se orienta hacia el individuo, la hembra detecta otros compuestos propios de éste que estimulan y llevan a la picadura; estos atraerentes/estimulantes a cortas distancias (dado que son poco volátiles) son casi siempre productos originados en el sudor, como los ácidos grasos.

Se ha observado que en las áreas de transmisión del paludismo en México ocurre una focalización de los casos dentro de las localidades, consecutiva a algunos factores de riesgo como el número de individuos que habitan en una casa, la limpieza dentro y fuera de ella, la higiene personal, la abundancia de vegetación peridoméstica y la falta de manipulación en la vegetación de los criaderos.¹⁰ La integración de señales físicas, químicas y ecológicas, así como la diversidad de éstas en los ambientes domésticos, producen un ecosistema de olores dentro de la vivienda¹¹ que propician los hábitos humanos, como ya se reportó para el género *Anopheles gambiae* s.l.^{12,13}

Con la finalidad de aportar elementos que contribuyan a la explicación de la focalización de casos de paludismo observada en otras áreas, en este estudio se determinó el efecto de los compuestos volátiles presentes dentro de las casas sobre el comportamiento de alimentación de *Anopheles albimanus*; asimismo, se estudió la variación de los compuestos volátiles capturados en las casas del sur de Chiapas, México.

Material y métodos

Área de estudio

Los compuestos volátiles se recolectaron en casas del ejido Nueva Independencia (16 msnm, 14°37'30" LN,

92°16'14" LO), municipio de Suchiate, en la costa de Chiapas, México. Esta localidad se seleccionó porque presentaba densidades elevadas de *An. albimanus* dentro de las casas.¹⁴

Captura de volátiles

Los compuestos volátiles se recogieron en 28 casas con bombas portátiles de extracción de aire acopladas con tubos de 10 cm de largo y 0.5 cm (DI), empacados con 100 mg de Super Q malla 80/100 (Alltech, México DF). Las bombas se colocaron en el centro de cada casa con un flujo de aire de 1.6 L/min. Se tomó una muestra por casa de 18 a 22 h, periodo dentro del cual se informa la máxima actividad de picadura de *An. albimanus*.¹⁵ Después de la captura, los tubos adsorbentes se transportaron en hieleras al laboratorio del Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) y los volátiles se desorbieron mediante 1.4 ml de diclorometano grado HPLC (Fermont, Monterrey, México). El producto desorbido se concentró a 0.25 ml con una corriente de nitrógeno para realizar estudios conductuales y cromatográficos.

Estudios conductuales

Se utilizaron 100 hembras recién emergidas (20 hembras por cada una de las cinco repeticiones realizadas) sin alimentar (8-10 h de edad) de *An. albimanus* (cepa Panamá) criadas desde 1999 en el insectario del CRISP. Las hembras se colocaron dentro de un olfatómetro de vidrio de dos puertos en forma de "Y"¹⁶ con una longitud total de 123 cm y un diámetro interno de 10 cm. La velocidad de aire fue de 0.2 m/s suministrada por una bomba eléctrica de aire para pecera marca Aquarium modelo P315. El aire se purificó mediante un cartucho con carbón activado y humedecido al pasarlo por un matraz de 1 L con agua destilada. Se impregnaron 20 µl del extracto en un papel filtro Whatman No. 1 (2X1 cm), que se colocó en un puerto del olfatómetro. Un papel filtro impregnado con 20 µl del solvente (diclorometano) fue colocado en el puerto de control. El olfatómetro se mantuvo dentro de una jaula cubierta por plástico negro para evitar el paso de la luz. La temperatura y la humedad relativa interna fueron de 27 ± 2°C y 75 ± 5%, respectivamente. Los experimentos se realizaron de 10 a 14 h (con anterioridad se realizó un experimento para determinar la hora en que se manifestaba el inicio del comportamiento de picadura; datos no publicados).

Se colocaron 20 hembras colectadas al azar de un lote de mosquitos de la misma edad en el puerto de liberación durante 5 min para su aclimatación antes de la colocación de los tratamientos (extractos). Luego de la

aclimatación y una vez colocados los extractos, las hembras se liberaron. El tiempo del experimento fue de 5 min y se contabilizó el número de hembras que se dirigieron hacia cada puerto. Las hembras se sustituyeron en cada repetición y se alternaron la posición del tratamiento y el control en ambos puertos. El olfatómetro se lavó con etanol y se esperó por un lapso de 20 min para la evaporación del solvente entre cada repetición.

Análisis cromatográfico

El extracto se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies modelo 5973N. La separación se realizó con una columna capilar HP-5ms (5% fenil metil siloxano) de 30 m X 250 μ m X 0.25 μ m. El gas acarreador fue helio con un flujo constante de 1 ml/min. Se inyectó 1 μ l de muestra en modo *split* 15:1 a 200°C. El horno inició a 50°C durante 3 min. Posteriormente se incrementó a 10°C/min hasta 300°C y permaneció a esa temperatura por 2 min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C. La ionización utilizó 70 EV en modo "scan" (m/z 50-400).¹⁷ La identificación de los compuestos se realizó tras comparar los espectros de masas de cada compuesto con los registrados en la biblioteca espectral NIST 2002.

Análisis estadístico

Los resultados en el olfatómetro se analizaron con una prueba *t* de Student no pareada y se comparó el porcentaje de mosquitos colectados en cada puerto ($p < 0.05$). Antes del análisis, la proporción de mosquitos colectados se transformó al coseno de la raíz cuadrada para normalizar los datos.¹⁸

Consideraciones éticas

La Comisión de Ética del INSP revisó, aceptó y aprobó todas las consideraciones éticas.

Resultados

Estudios conductuales

Se obtuvieron 28 extractos de compuestos volátiles que corresponden al total de casas de la localidad. De ellos, 12 fueron atrayentes y dos repelentes, en tanto que 14 no presentaron ninguna respuesta para las hembras sin alimentar de *An. albimanus*.

Las casas cuyos extractos presentaron respuesta de atracción fueron la número 1, con un porcentaje de 63 \pm 0.149% de mosquitos capturados en el puerto del trata-

miento (extracto) contra 35 \pm 0.574% de los mosquitos capturados en el puerto de control ($t=2.91$; $p=0.0196$), la 10 con una respuesta hacia el extracto de 73.3 \pm 0.423% contra 26.70 \pm 0.423% ($t=2.61$; $p=0.0312$), la número 17 con 100 \pm 0% contra 0 \pm 0% ($t=2.449$; $p=0.04$), la 30 con 85.3 \pm 0.287% contra 14.7 \pm 0.287% ($t=5.234$; $p=0.0008$), la 36 con 78 \pm 0.358% contra 22 \pm 0.358% ($t=3.49$; $p=0.008$), la 37 con 69.3 \pm 0.325% contra 30.7 \pm 0.323% ($t=2.53$; $p=0.0352$), la 41 con 94.3 \pm 0.259% contra 5.7 \pm 0.259% ($t=8.258$; $p=0.0001$), la 42 con 80 \pm 0.356% contra 20 \pm 0.356% ($t=3.793$; $p=0.0053$), la 47 con 80 \pm 0.43% contra 20 \pm 0.43% ($t=3.464$; $p=0.0085$), la 58 con 73.3 \pm 0.301% contra 26.7 \pm 0.301% ($t=3.141$; $p=0.0138$), la casa 28-1 con 76.7 \pm 0.374% contra 23.3 \pm 0.374% ($t=3.246$; $p=0.0118$) y la 60 con una respuesta de 90 \pm 0.351% contra 10 \pm 0.351% ($t=5.657$; $p=0.0005$). Las casas repelentes fueron la número 35 con 16.7 \pm 0.388% contra 83.3 \pm 0.388% ($t=4.128$; $p=0.0033$) y la número 12 con 0 \pm 0% contra 100 \pm 0% ($t=4.0$; $p=0.0039$), respectivamente. Por último, la casa vacía que fungió como control (40-1) no presentó ningún efecto (59.3 \pm 0.574% de mosquitos capturados en el tratamiento contra 40.7 \pm 0.574% en el control ($t=0.546$; $p=0.6002$)).

No se observó patrón alguno de distribución de las casas en función de su efecto (atrayente, repelente y sin efecto), ya que se presentaron casas contiguas con efectos diferentes (figura 1), lo cual podría explicar la distribución de los casos de paludismo en las localidades.

Análisis cromatográfico

Los cromatogramas de los extractos se muestran en las figuras 2, 3, 4 y 5. Las casas no presentan un perfil cromatográfico característico por tipo de efecto (atrayente, repelente o casa vacía). Se encontraron cuatro perfiles diferentes. En el perfil 1 se incluyen las casas 28-1, 30, 36, 58, 60, 17, 1, 10, 42, todas atrayentes; la casa 12 (repelente) y la 40-1 (vacía). El perfil 2 correspondió a la casa 35 (repelente), el perfil 3 a la casa 47 (atrayente) y el perfil 4 a las casas 41 y 37 (ambas atrayentes).

Los perfiles cromatográficos que presentaron mayor número de compuestos fueron el perfil 1 y el 3. En el perfil 1 se identificaron 26 compuestos (figura 2) y la abundancia de ellos fue variable entre las casas. En el perfil 2 se identificó sólo un compuesto (figura 3), en el 3 se reconocieron 13 compuestos (figura 4) y en el 4 se hallaron seis compuestos (figura 5).

Discusión

La respuesta conductual de *Anopheles albimanus* a los volátiles colectados dentro de casas de una zona endémica de paludismo del sur de Chiapas, México, varió

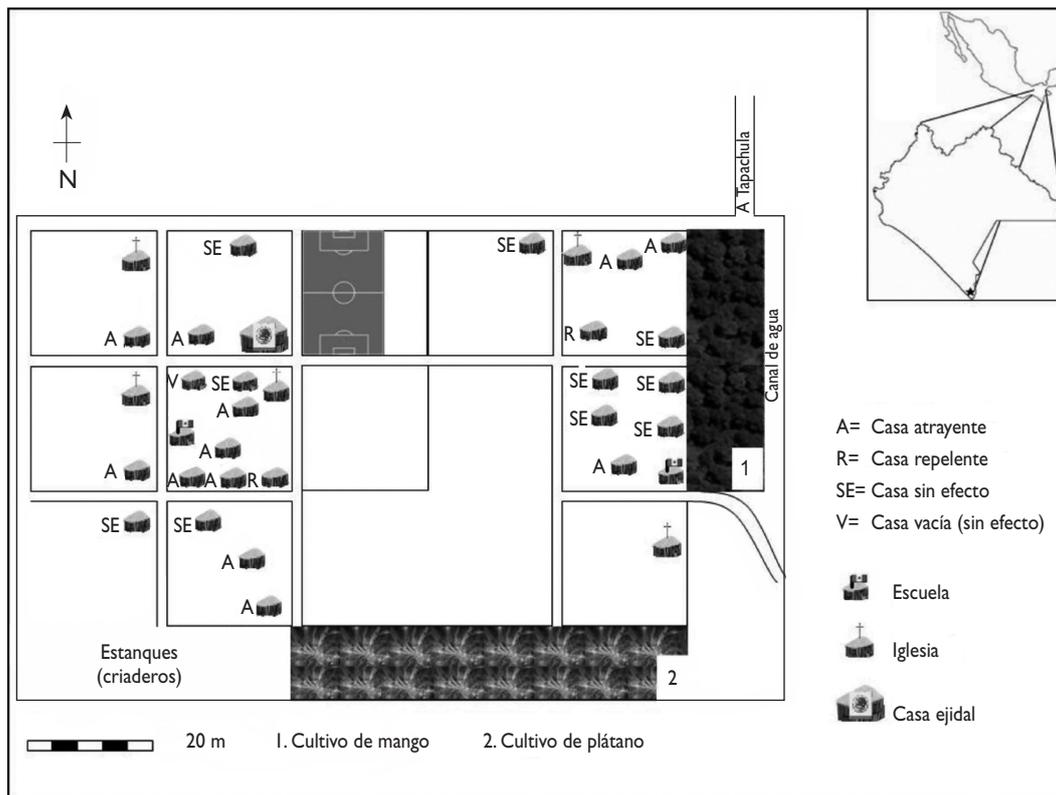


FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DE LAS CASAS MUESTREADAS SOBRE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LA LOCALIDAD NUEVA INDEPENDENCIA DEL MUNICIPIO DE SUCHIATE, CHIAPAS, Y SUS EFECTOS

entre las casas analizadas. En los estudios conductuales se presentaron respuestas de atracción en 12 casas y de repelencia en dos. Estos resultados indican que existen casas con componentes químicos que atraen y que repelen mosquitos, lo que significaría que éstos podrían ser un factor de riesgo más para contraer paludismo, aspecto que ha sido poco explorado en México.

En términos epidemiológicos, el contacto hombre-vector es el suceso más importante en la transmisión y lo determinan en gran medida los estímulos químicos que actúan a diferentes distancias y que permiten al mosquito orientarse y estimularse para que la alimentación con sangre se realice y, en el caso de que el mosquito esté infectado, pueda transmitir la enfermedad.¹¹ Este acercamiento ocurre casi siempre por la noche, cuando los mosquitos acechan a los seres humanos en las casas mientras descansan.¹⁵ Este periodo puede ser el momento crítico y en él puede ser más susceptible la persona a la picadura y por ende a la infección. Para que esto ocurra, los mosquitos deben entrar a las casas

y elegir al huésped, del cual se alimentan.¹⁹ En este estudio se determinó que la composición química de los compuestos dentro de las casas puede variar y que su presencia puede deberse a diversos factores; de éstos depende que existan casas con diferentes cantidades de mosquitos.²⁰ A su vez, esto podría explicar la focalización observada en la transmisión del paludismo en ciertas localidades.²¹

La liberación de CO₂ (un atrayente generalista a largas distancias) en el aliento²² y en el humo de los fogones dentro de las casas, además de otros componentes derivados de la combustión constante de la leña y que en conjunción con los agentes liberados en el sudor, el aliento y la ropa impregnada con sudor pueden incidir en la orientación y preferencias por unas casas que por otras, aumentando con ello los riesgos de contraer la infección.¹² Por otro lado, el CO₂ también puede actuar como repelente a altas concentraciones.²³ Estas diferencias de concentraciones de CO₂ entre las casas, en conjunto con las divergencias en intensidad en los per-

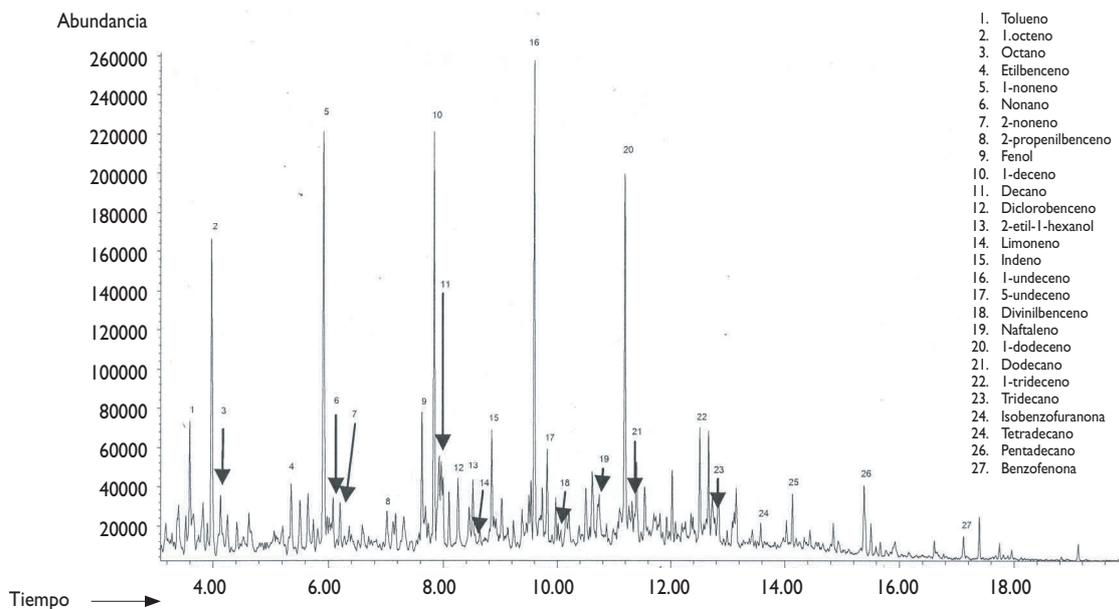


FIGURA 2. PERFIL CROMATOGRÁFICO 1 DE LOS VOLÁTILES RECOLECTADOS EN ENERO DEL 2006 DENTRO DE LAS CASAS DEL EJIDO NUEVA INDEPENDENCIA DEL MUNICIPIO DE SUCHIATE, CHIAPAS, MÉXICO

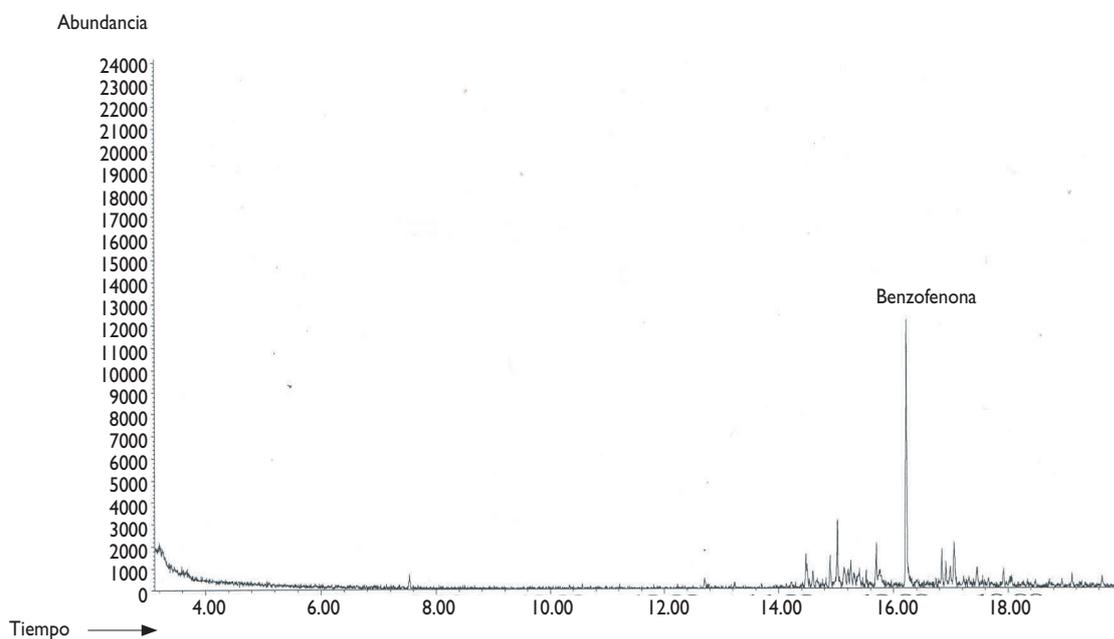


FIGURA 3. PERFIL CROMATOGRÁFICO 2 DE LOS VOLÁTILES RECOLECTADOS EN ENERO DEL 2006 DENTRO DE LAS CASAS DEL EJIDO NUEVA INDEPENDENCIA DEL MUNICIPIO DE SUCHIATE, CHIAPAS, MÉXICO

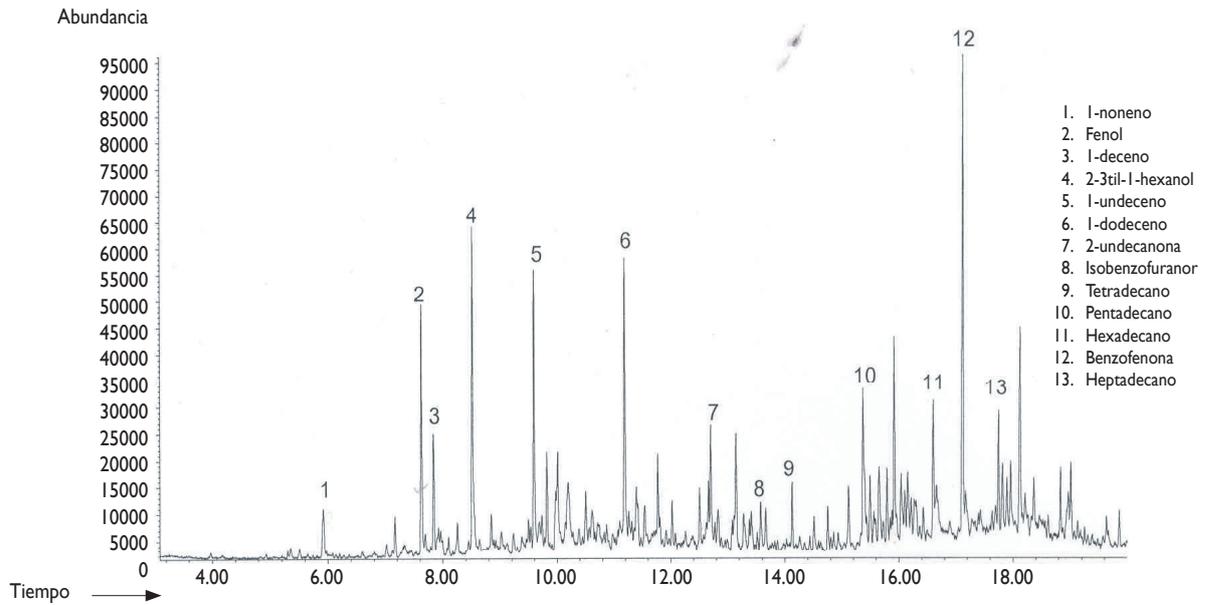


FIGURA 4. PERFIL CROMATOGRÁFICO 3 DE LOS VOLÁTILES RECOLECTADOS EN ENERO DEL 2006 DENTRO DE LAS CASAS DEL EJIDO NUEVA INDEPENDENCIA DEL MUNICIPIO DE SUCHIATE, CHIAPAS, MÉXICO

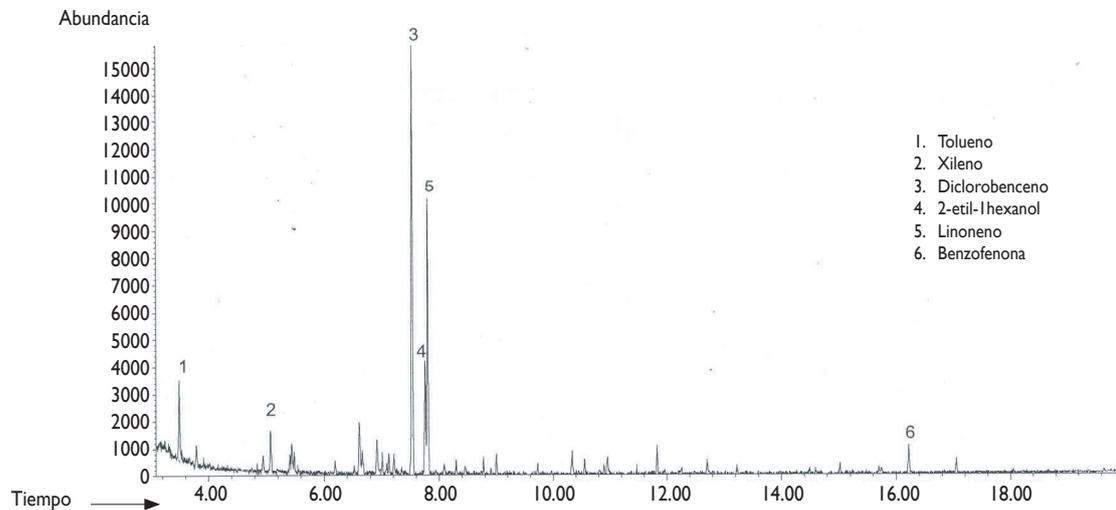


FIGURA 5. PERFIL CROMATOGRÁFICO 4 DE LOS VOLÁTILES RECOLECTADOS EN ENERO DEL 2006 DENTRO DE LAS CASAS DEL EJIDO NUEVA INDEPENDENCIA DEL MUNICIPIO DE SUCHIATE, CHIAPAS, MÉXICO

files de compuestos volátiles detectados en este estudio, pueden determinar las diferencias en las cantidades de mosquitos registradas en las casas de esta localidad.^{10,20} Existen diversos estudios que han demostrado que la atracción de mosquitos depende de la detección de los olores que emanan de los huéspedes y que éstos son parte importante de la variación de la atracción.²⁴⁻²⁷ Al sumar todas las fuentes posibles de liberación de compuestos químicos se conforma un ecosistema de olores que, en virtud de la diversidad de compuestos emitidos entre los hospedadores, difiere de una casa a otra, según se ha observado en este estudio. El análisis químico reveló que el perfil de compuestos en las casas es diferente y que no hay compuestos específicos que diluciden la atracción o repelencia de *An. albimanus*. Aunque en algunas casas los perfiles sean parecidos, las abundancias de cada compuesto hallado son diferentes, lo que sugiere que la atracción depende no sólo de la presencia o ausencia de compuestos volátiles sino también de su abundancia.^{17,28}

Los compuestos identificados corresponden a hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), cetonas y terpenos. De estos últimos se encontró en especial limoneno y 3-careno. Éste se ha encontrado en una mezcla que atrajo a hembras grávidas de *Ae. aegypti* hacia sitios que contenían copépodos.²⁹ Una medida factible para resolver el efecto atrayente del CO₂, los HAP y demás compuestos liberados por la combustión en ciertas casas con abundancia de mosquitos, así como la exposición al humo de leña, es una intervención integral con la utilización de estufas Patsari (tipo "Lorena"), además del fortalecimiento de la campaña comunitaria de higiene familiar y mejoramiento de la vivienda. El Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades aplica ahora esta última acción en comunidades rurales donde persiste la transmisión del paludismo.^{30,31}

Por último, dentro de los factores de riesgo para contraer el paludismo, se ha señalado que la distribución de las viviendas juega un papel importante para el contagio. Esta distribución de las viviendas se ha vinculado con su posición en relación con los criaderos y la dirección del viento.³² En este estudio, la distribución de las casas atrayentes o repelentes no presentó un patrón definido respecto de los criaderos ni la dirección del viento, lo cual puede indicar que cada casa tiene características propias que las hacen atractivas para los mosquitos, tal y como se informó para las viviendas donde la abundancia de mosquitos se correlacionó con el número de habitantes.³³

Los resultados de esta investigación podrían contribuir a explicar que ciertas casas tienen mayor densidad

que otras y que el uso constante de fogones, la combustión de basura y la acumulación de ropa impregnada con sudor son las posibles fuentes de atracción.

El efecto potencial de estos estudios en el control del paludismo en el mundo depende de la dirección hacia donde se enfoquen estos conocimientos. Por un lado, como parte de las medidas de control genético, diversos estudios se han enfocado en las bases moleculares de la atracción. Como resultado, ya se ha identificado el gen causante de la olfacción en *An. gambiae*.³⁴ De igual modo, se han propuesto iniciativas vinculadas con el conocimiento de la atracción de los vectores; por ejemplo, se han ideado trampas para la vigilancia y control o el desarrollo de productos "modificadores" del comportamiento para evitar el contacto vector-ser humano.

Agradecimientos

Este trabajo recibió financiamiento del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social y de Investigación Inmujeres. Conacyt. Proyecto 6545/A-1 "Patrones químico ecológicos determinantes en la transmisión de paludismo en México". Se agradece la intervención de Miguel Muñoz Reyes y Rafael Robledo Díaz por su apoyo técnico durante la realización de este trabajo.

Referencias

1. Organización Panamericana de la Salud. Bol Epidemiol 1999;20:1-16.
2. Outchkourov NS, Roeffen W, Kaan A, Jansen J, Luty A, Schuffel D, et al. Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. Proc Natl Acad Sci 2008;105:4301-4305.
3. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Bol Epidemiol Mex 2003;20(52):14.
4. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Bol Epidemiol Mex 2005;22(52):15.
5. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Bol Epidemiol Mex 2007;24(52):15.
6. Gillies MT. The role of carbon dioxide in host-finding by mosquitoes (Diptera: Culicidae): a review. Bull Entomol Res 1980;70:525-532.
7. Healy TP, Copland MJ. Activation of *Anopheles gambiae* mosquitoes by carbon dioxide and human breath. Med Vet Entomol 1995;9:331-336.
8. Dekker T, Takken W. Differential response of mosquito sibling species *Anopheles arabiensis* and *An. quadriannulatus* to carbon dioxide, a man or a calf. Med Vet Entomol 1998;12:136-140.
9. Smallegange RC, Qiu YT, Van Loon JJ, Takken W. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). Chem Senses 2005;2:145-152.
10. Chanon KE, Méndez-Galván JF, Galindo-Jaramillo JM, Olguín-Bernal H, Borja-Aburto VH. Cooperative actions to achieve malaria control without the use of DDT. Int J Hyg Environ Health 2003;206:387-394.
11. Torres-Estrada JL, Rodríguez MH. Señales físico químicas involucradas

- en la búsqueda de hospederos y en la inducción de picadura por mosquitos. *Salud Publica Mex* 2003;45:497-505.
12. Lindsay SW, Adimah JH, Miller JE, Pleass RJ, Armstrong JR. Variation in attractiveness of human subjects to malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Gambia. *J Med Entomol* 1993;30:368-373.
 13. Knols BGJ, de Jong R, Takken W. Differential attractiveness of isolated humans to mosquitoes in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:604-606.
 14. Diaz-López C. Efecto de la zooprofilaxis activa sobre la abundancia intradomiciliar y la estructura de edad de *Anopheles albimanus* (Wiedemann 1820) vector del agente causal del paludismo en el sur de Chiapas, México (Tesis). Villahermosa, Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, 2003.
 15. Panamerican Health Organization. Evaluation of chlorphoxim used against *Anopheles albimanus* on the south coast of Mexico: I. Results of indoor chlorphoxim applications and assessment of the methodology employed. *PAHO Bull* 1984;18:379-388.
 16. Schreck CE, Gouck HK, Smith N. An improved olfactometer for use in studying mosquito attractants and repellents. *J Econ Entomol* 1967;6:355-358.
 17. Meijerink J, Braks MAH, Brack AA, Adam W, Dekker T, Posthumus MA, et al. Identification of olfactory stimulants for *Anopheles gambiae* from human sweat samples. *J Chem Ecol* 2000;26:1367-1382.
 18. Zar JH. Biostatistical analysis. 4th edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 1999.
 19. Adugna N, Petros B. Determination of the human blood index of some anopheline mosquitoes by using Elisa. *Ethiop Med J* 1996;34:1-10.
 20. Cancino-Armas F. Respuesta electrofisiológica y conductual de *Anopheles albimanus* al sudor de diferentes partes del cuerpo de habitantes del sur de Chiapas, México (Tesis). Tapachula, Chiapas: Universidad Autónoma de Chiapas, 2007.
 21. Rodríguez MH, Loyola EG, Betanzos AF, Villarreal C, Bown DN. Control focal del paludismo. Tratamiento focal usando quimioprofilaxis y rociado intradomiciliar con insecticida para el control del paludismo en el sur de México. *Gac Med Mex* 1994;130:313-319.
 22. Cork A. Olfactory basis of host location by mosquitoes and other haematophagous Diptera. En: Bock GR, Cardew G, eds. Olfaction in mosquitoes-host interactions. Ciba Foundation Symposium 200. Chichester: John Wiley & Sons, 1996:71-88.
 23. Torres-Estrada JL, Ríos-Delgado S, Rodríguez-Ramírez AD. CO₂ y abundancia de mosquitos anofelinos en casas del sur de Chiapas México. Congreso de Entomología mexicana; 2005 29 de mayo al 01 de junio; Tapachula (Chiapas), México.
 24. Rudolfs W. Chemotropism in mosquitoes. *Bull NJ Agr Exp Stn* 1922;367:4-23.
 25. Knols BGJ, de Jong R, Takken W. Differential attractiveness of isolated humans to mosquitoes in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:604-606.
 26. Mukabana WR, Takken W, Coe R, Knols BGJ. Host-specific cues cause differential attractiveness of Kenyan men to the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malar J* 2002;1:17.
 27. Qui YT, Smallegange RC, Hoppe S, Van-Loon JJA, Bakker EJ, Takken W. Behavioural and electrophysiological responses of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* Giles sensu stricto (Diptera: Culicidae) to human skin emanations. *Med Vet Entomol* 2004;18:429-438.
 28. Bernier UR, Kline DL, Schreck CE, Yost RA, Barnard DR. Chemical analysis of human skin emanations: comparison of volatiles from human that differ in attractions of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc* 2002;18:186-195.
 29. Torres-Estrada JL, Arredondo-Jimenez JI, Cruz-Lopez L, Rodriguez MH. Selective oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in response to *Mesocyclops longisetus* (Copepoda: Cyclopoidea) under laboratory and field conditions. *J Med Entomol* 2001;38:188-192.
 30. GIRA (Grupo Interdisciplinario de Tecnología Rural Apropiada) AC. El uso de biomasa como fuente de energía en los hogares, efectos en el ambiente y la salud, y posibles soluciones. Informe final. Morelia: GIRA, 2005.
 31. Caceres R. Stoves for people: Proceedings of the Second International Workshop on Stoves. Second International Workshop on Stoves. Intermediate Technology Publications. Londres: FWD, CEMAT y AT, 1989:161.
 32. Danis-Lozano R, Rodríguez MH, Betanzos-Reyes AF, Hernández-Avilá JE, González-Ceron L, Méndez-Galván JF, et al. Individual risk factors for *Plasmodium vivax* infections in the residual malaria transmission focus of Oaxaca, Mexico. *Salud Publica Mex* 2007;49:199-209.
 33. Haddow AJ. The mosquito fauna and climate of native huts at Kisumu, Kenya. *Bull Entomol Res* 1942;33:91-142.
 34. Hill CA, Fox AN, Pitts RJ, Kent LB, Tan PL, Chrystal MA, et al. G-protein coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* 2002;298:176-178.