

Primer registro de *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* B y *Anopheles (Nys.) albitarsis* F en la cuenca del río Caura, Estado Bolívar, Venezuela

First record of Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi B y *Anopheles (Nys.) albitarsis* F from the Caura river basin, Bolívar State, Venezuela

Yasmin Rubio-Palis^{1,2*}, Freddy Ruiz-Lopez^{3,4}, Hernán Guzmán⁵, Víctor Sánchez⁵, Jorge E. Moreno⁵, Yarys Estrada⁵, Mariapia Bevilacqua⁶, Lya Cárdenas⁶ & Ángela Martínez⁷

RESUMEN

Se registran por primera vez *Anopheles albitarsis* F y *Anopheles oswaldoi* B recolectadas en localidades de los Municipios Sucre y Cedeño del estado Bolívar. Los análisis morfométricos de hembras adultas mostraron que los caracteres analizados en las manchas claras y oscuras de la vena Costa del ala y los tarsómeros de las patas posteriores para *An. albitarsis* F caen dentro de los rangos reportados para *An. marajoara sensu lato*, mientras que para *An. oswaldoi* B los rangos de variación de los caracteres medidos están dentro del rango reportado para *An. oswaldoi* s.l., *An. oswaldoi sensu stricto* de Brasil y *An. konderi*. Sin embargo, el análisis de ADN mitocondrial (región código de barras, 658 pb) mostró una divergencia genética entre *An. oswaldoi* B y *An. oswaldoi* s.s. de 3,2%, mientras entre *An. albitarsis* F y *An. marajoara* s.s. esta fue de 5,2%, valores que están por encima de los límites propuestos para delimitación de especies.

Palabras clave: *Anopheles oswaldoi* B, *Anopheles albitarsis* F, complejos de especies, malaria, Venezuela

Hasta el presente se han reportado para Venezuela 42 especies de anofelinos (Rubio-Palis, 2005. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 1-10), de las cuales 11 han sido incriminadas en la transmisión de malaria (Moreno *et al.*, 2005. *Med. Vet. Entomol.* **19**: 329-332; Rubio-Palis, 2000. *Anopheles (Nyssorhynchus)* de Venezuela: taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Publicación de la Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental “Dr. Arnoldo

SUMMARY

Anopheles albitarsis F and *Anopheles oswaldoi* B were first recorded from collections in Sucre and Cedeño Municipalities, Bolívar State. Morphometric analysis of dark and pale spots on wing Costa and hind tarsomeres of adult females, showed that the range of variation for *An. albitarsis* F are within the reported ranges for *An. marajoara sensu lato* For *An. oswaldoi* B the range of variation are within the ranges reported for *An. oswaldoi* s.l., *An. oswaldoi sensu stricto* from Brazil and *An. konderi*. DNA mitochondrial analysis (Barcode region 658 bp) showed 3.2% of genetic divergence between *An. oswaldoi* B and *An. oswaldoi* s.s., while this divergence was 5.2% between *An. albitarsis* F and *An. marajoara* s.s. Both these values are above the proposed limits for species delimitation.

Key words: *Anopheles oswaldoi* B, *Anopheles albitarsis* F, species complex, malaria, Venezuela

Gabaldon”. Maracay-Venezuela). El mayor número de especies vectoras en Venezuela se encuentra dentro del subgénero *Nyssorhynchus* (n = 8), el cual ha sido considerado complicado desde el punto de vista taxonómico debido a la gran variabilidad morfológica intraespecífica y la presencia de especies isomórficas [Faran, 1980. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **15**: 1-215; Harbach, 1994. *Bull. Ent. Res.* **84**: 331-342; Knight & Stone, 1977. A catalog of the mosquitoes of the

¹ Dirección de Control de Vectores, Dirección de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud. Maracay, Venezuela.

² BIOMED, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela.

³ Division of Entomology, Walter Reed Army Institute of Research, 503 Robert Grant Avenue, Silver Spring, MD 20910.

⁴ Department of Entomology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. Museum Support Center, Suitland, MD 20746.

⁵ Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon” (MPPS), Centro de Investigaciones de Campo “Dr. Francesco Vitanza”, Tumeremo, estado Bolívar, Venezuela.

⁶ Asociación Venezolana para la Conservación de Áreas Naturales (ACOANA), Caracas, Venezuela

⁷ Instituto de Salud Pública del estado Bolívar, Ciudad Bolívar, Venezuela

*Autor de correspondencia: rubiopalis@gmail.com

world (Diptera: Culicidae). Ed. 2, *Entomol. Soc. Am.* (Thomas Say Foundation vol. 6). College Park; Linthicum, 1988. *Mosq. Syst.* **20**: 98-271; Peyton *et al.*, 1992. *Mosq. Syst.* **24**: 51-69].

Estudios moleculares, citogenéticos y morfológicos han revelado la presencia de complejos de especies dentro de este subgénero. Así tenemos el Complejo Oswaldoi (Marrelli *et al.*, 1999. *J. Med. Entomol.* **36**: 679-684; Ruiz *et al.*, 2005. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**: 155-160; Sallum *et al.*, 2008. *J. Med. Entomol.* **45**: 970-9819; Scarpassa & Conn, 2006. *Genet. Mol. Res.* **5**: 493-502), el Complejo Albitarsis (Krzywinski *et al.*, 2011. *Mol. Phylogenet. Evol.* **58**: 469-477; Lehr *et al.*, 2005. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **98**: 908-9178; Merrit *et al.*, 2005. *Mol. Phyl. Evol.* **35**: 719-724; Motoki *et al.*, 2009. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**: 823-850; Ruiz *et al.*, 2012. *Parasit. Vectors.* **5**: 44; Wilkerson *et al.*, 1995. *J. Med. Entomol.* **32**: 697-704), el Complejo Strodei (Sallum *et al.*, 2010. *J. Med. Entomol.* **47**: 504-526) y el Complejo Nuneztovari (Calado *et al.*, 2008. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103**: 791-799; Conn *et al.*, 1993. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **9**: 294-301; Foster *et al.*, 2013, PLoS ONE **8**: e54063. doi:10.1371).

El Complejo Albitarsis incluye cinco especies formalmente descritas: *An. albitarsis* Lynch-Arribáizaga, *An. deaneorum* Rosa-Freitas, *An. marajoara* Galvão & Damasceno, *An. oryzalimnetes* Wilkerson & Motoki y *An. janconnae* Wilkerson & Sallum; tres especies recientemente postuladas, basadas en estudios moleculares (ADNm y ADNr): *An. albitarsis* F (Brochero *et al.*, 2007. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 1113-1117), *An. albitarsis* G (Krzywinski *et al.*, 2011. *Op. cit.*; Ruiz *et al.*, 2012. *Op. cit.*) y *An. albitarsis* I (Gutiérrez *et al.*, 2010. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105**: 1019-25; Ruiz *et al.*, 2012. *Op. cit.*), además de un linaje mitocondrial, *An. albitarsis* H (Ruiz *et al.*, 2012. *Op. cit.*). Rubio-Palis *et al.* (2003. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* **19**: 107-114) basados en estudios morfométricos y moleculares (RAPD-PCR), habían señalado para entonces que *An. marajoara* era la única especie del Complejo presente en Venezuela; cabe destacar que los estudios morfométricos no reportaron diferencias significativas entre las 12 poblaciones analizadas y los estudios moleculares confirmaron la presencia de *An. marajoara* con base al análisis de especímenes de la población de Calabozo, estado Guárico.

En cuanto al Complejo Oswaldoi, Marrelli *et al.* (1999. *Op. cit.*), usando secuencias de ITS2 (ADNr), sugirieron que *An. oswaldoi* estaba formado por al menos cuatro especies: *An. oswaldoi sensu stricto*, *An. konderi* Galvão & Damasceno, y otras dos especies aun no descritas. Sin embargo, Ruiz *et al.* (2005. *Op. cit.*) utilizando secuencias del ITS2, confirmó que dos de los cuatro grupos reportados por Marrelli *et al.* (1999, *Op. cit.*) fueron errores taxonómicos y que en realidad se trataba de especies isomórficas (*An. benarrochi* B, reportado como *An. oswaldoi sensu lato* en Perú (GB: AF055071) y *An. evansae*, reportado como *An. oswaldoi s.s.* (GB: AF055072) en Espirito Santo, Brasil). Los especímenes de *An. oswaldoi* B secuenciados por Ruiz *et al.* (2005. *Op. cit.*) de Putumayo (Colombia), mostraron alta similitud con las secuencias previamente reportadas por Marrelli *et al.* (1999. *Op. cit.*) para Amapá en Brasil (GB: AF056318) y Ocamo, en el estado Amazonas de Venezuela (GB: AF055070). Posteriormente, Motoki *et al.* (2007, *Zootaxa.* **1588**: 31-51) re-describieron el lectotipo de *An. oswaldoi s.s.* y confirmaron los resultados previamente publicados por Ruiz *et al.* (2005. *Op. cit.*), los cuales sugieren *An. oswaldoi* B de Putumayo (Colombia) (Ruiz *et al.*, 2010. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105**: 899-903) como una especie diferente de *An. oswaldoi s.s.*

Los resultados anteriores muestran una situación epidemiológica compleja en Venezuela, puesto que *An. albitarsis s.l.* y *An. oswaldoi s.l.* han sido incriminados como vectores de malaria en el occidente de Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 1992, *Acta Tropica.* **52**: 167-174), mientras que *An. marajoara* se ha señalado como vector principal de malaria en algunas localidades mineras del municipio Sifontes del estado Bolívar junto con *An. darlingi* (Moreno *et al.*, 2005. *Op. cit.*; 2009, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**: 764-768).

Las recolectas de anofelinos se realizaron entre Marzo de 2008 y Julio de 2009 en tres localidades del Bajo río Caura, estado Bolívar: comunidad criolla Jabillal (07°03'N, 64° 58'W) (municipio Sucre) y comunidades indígenas El Palmar (06° 34' 53.35"N, 064° 49' 35.25"W) y Boca de Nichare (06° 36'N, 64° 49'W) (municipio Cedeño). La descripción eco-epidemiológica y demográfica del área de estudio ha sido previamente publicada (Bevilacqua *et al.*, 2009. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49(1)**: 53-71; Medina *et al.*, 2011. *Bol. Mal. Salud Amb.* **51**: 129-144;

Rubio-Palis *et al.*, 2010. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50**: 95-107). Para las capturas de hembras adultas se utilizaron trampas Mosquito Magnet Liberty Plus® y en la localidad de Jabillal se realizaron capturas con cebos humanos, actuando los autores como cebos, práctica usual por parte del personal del MPPSalud. La metodología de captura ha sido descrita en detalle por Rubio-Palis *et al.* (2012, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **107**: 545-549). Además se realizaron capturas en criaderos previamente caracterizados (Rubio-Palis *et al.*, 2010. *Op. cit.*) con el propósito de obtener estadios inmaduros y desarrollar crías asociadas para estudios morfométricos. Para dicho estudio se incluyeron tanto las hembras silvestres y madres con su prole asociada de las hembras adultas de *An. oswaldoi* s.l. (n=10) colectadas en cada localidad. Para *An. albitarsis* s.l. (n=4), solo se contó con hembras adultas colectadas en Jabillal. Se siguió la metodología descrita por Rubio-Palis (1998, *Bol. Entomol. Vzlna.* **13**: 141-172), la cual consiste en realizar mediciones de caracteres del ala derecha, patas anteriores y patas posteriores. La morfometría se realizó con un microscopio estereoscópico marca Leica modelo MS5 ocular 10x con micrómetro (50 div = 5 mm) y zoom 4x. La nomenclatura y abreviaciones utilizada es la de Harbach & Knight (1980, *Taxonomists' glossary of mosquito anatomy*. Plexus Publishing, Inc.) y Wilkerson & Peyton (1990, *J. Med. Entomol.* **27**: 207-224).

Un total de 19 especímenes, 10 *An. oswaldoi* s.l. y nueve *An. marajoara* s.l. previamente identificados por morfología empleando las claves de Rubio-Palis (2000. *Op. cit.*) fueron secuenciados para la región código de barras, el cual es un fragmento del gen mitocondrial, Citocromo c Oxidasa subunidad 1 - COI (Hebert *et al.*, 2003. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **270**: 313-321). Se utilizaron los cebadores diseñados por Folmer *et al.* (1994. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 294-299), para amplificar una región de 710 pares de bases (658 pb sin cebadores) y el ADN fue extraído usando el kit diseñado por QIAgen® (DNeasy Blood & Tissue Kit, MD, USA). Para la amplificación y secuenciación del ADN, se utilizaron los protocolos previamente publicados por Ruiz *et al.* (2010. *Op. cit.*). Datos de las secuencias (cromatogramas, secuencias y número de acceso al GenBank) están disponibles en <http://boldsystems.org> (Barcode of Life Data Base – BOLD), proyecto Mosquito Barcode Initiative – MBI. Las secuencias fueron generadas en ambas direcciones usando el kit de Big

Dye y un secuenciador 3730, ambos de PE Applied Biosystems (Warrington, UK). Las secuencias fueron editadas usando Sequencher™ v.4.10.8 (Genes Codes Corporation, MI, USA) y posteriormente analizadas en MacClade v.4.06 (Maddison & Madson, 2003, *Analysis of phylogeny and character evolution*. Sunderland: Sinauer Associates).

La divergencia genética entre las especies colectadas y especies topotípicas de *An. marajoara* s.s. y *An. oswaldoi* s.s., fue calculada en MEGA v. 5 (Tamura *et al.*, 2011. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731-2739) usando Kimura 2-parameter distance model (K2P) (Kimura, 1980. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120) y posteriormente un árbol de distancias genéticas, Bootstrap (Felsenstein 1985. *Evolution.* **39**: 783-791) – Neighbor Joining (NJ- K2P) (Saitou & Nei, 1987. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425) fue generado en Paup v. 4 (Swofford, 2003. *Phylogenetic analysis using parsimony*, version 4.0b 10, Sinauer Associates, Sunderland, MA). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en el GenBank, usando BLAST - (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con el objetivo de buscar similitud con secuencias previamente publicadas.

Todas las secuencias generadas en este estudio se encuentran depositadas en el GenBank con los siguientes números de acceso: *An. oswaldoi* B (KC555056, KC555057, KC555058, KC555059, KC555060, KC555061, KC555072, 555073, KC555074), *An. albitarsis* F (KC555063, KC555064, KC555066, KC555067, KC555068, KC555069, KC555070, KC555071), *An. braziliensis* (KC55062) y *An. darlingi* (KC555065).

La Tabla I muestra las proporciones de los caracteres diagnósticos en la vena Costa del ala y en el segundo tarsómero de las patas posteriores de las especies estudiadas. Para *An. albitarsis* F se encontraron variaciones en la coloración de las escamas claras del ala; en algunos especímenes las escamas claras del ala variaron de blancas en las venas Costa y Subcosta, y el resto color crema, mientras otros especímenes poseían todas las escamas claras de color blanco, a diferencia de las demás especies del complejo en donde las escamas por lo general son blancas en la parte anterior de las venas Costa y Subcosta y amarillo pálido en el resto de las venas (Motoki *et al.*, 2009. *Op. cit.*). El rango de variación para las proporciones PHD/HP y SCP/L de 0,22-1,00 y 0,02-0,10 respectivamente

Tabla I. Proporciones (media, desviación estandar y rango) de los caracteres diagnósticos en vena Costa del ala y segundo tarsómero de patas posteriores de *Anopheles oswaldoi* B (n=10) y *Anopheles albitarsis* especie F (n=4) de Venezuela.

Carácter Diagnóstico	<i>An. oswaldoi</i> B	<i>An. albitarsis</i> F
DsTa-III ₂ /Ta-III ₂	0,143±0,03 (0,10-0,20)	0,545±0,048 (0,49-0,59)
PHD/HP	0,405±0,11 (0,30 -0,57)	0,365±0,098 (0,3-0,5)
SCP/L	0,065±0,015 (0,03-0,08)	0,063±0,012 (0,048-0,077)

Ta-III₂: longitud del segundo tarsómero posterior; DsTa-III₂: longitud de la mancha oscura del segundo tarsómero posterior; PHD: longitud de la mancha Prehumeral Oscura de la Costa; HP: longitud de la mancha Humeral Clara de la Costa; SCP: longitud de la mancha SubCosta Clara; L: longitud del ala

(Tabla I), está dentro de los rangos reportados para *An. marajoara* de Venezuela (Rubio-Palis *et al.*, 2003. *Op. cit.*). No fue posible comparar estos valores para otras especies del Complejo Albitarsis, puesto que Motoki *et al.* (2009. *Op. cit.*) solamente midieron el tamaño del ala y el tamaño de las manchas claras y oscuras y no las proporciones, lo cual resulta inadecuado puesto que el tamaño del ala y de las manchas varía en función de variables ambientales y disponibilidad de alimento en los criaderos, entre otros (Rubio-Palis, 1998. *Op. cit.*). En cuanto a la proporción del tamaño de la mancha oscura del segundo tarsómero posterior en relación al tamaño del tarsómero (DsTa-III₂/Ta-III₂) (Tabla I), se observó que la media y rango se solapan con los valores reportados para *An. marajoara* por Motoki *et al.* (2009. *Op. cit.*) y Rubio-Palis *et al.* (2003. *Op. cit.*), por lo tanto no es posible utilizando hembras adultas colectadas en el campo diferenciar morfológicamente *An. albitarsis* F de *An. marajoara*. Dadas las implicaciones epidemiológicas, resulta fundamental realizar estudios morfométricos de crías asociadas que incluyan todos los estadios a fin de determinar caracteres diagnósticos que permitan diferenciar a *An. albitarsis* F de las demás especies del complejo, así como ampliar los estudios moleculares a otras regiones del país, puesto que Lehr *et al.* (2005. *Op. cit.*) y Ruíz *et al.* (2012. *Op. cit.*) confirmaron su presencia al norte del río Orinoco, en los estados Portuguesa, Cojedes y Zulia; más aún, existe la posibilidad que otras especies del complejo además de *An. marajoara* y *An. albitarsis* F estén presentes en Venezuela.

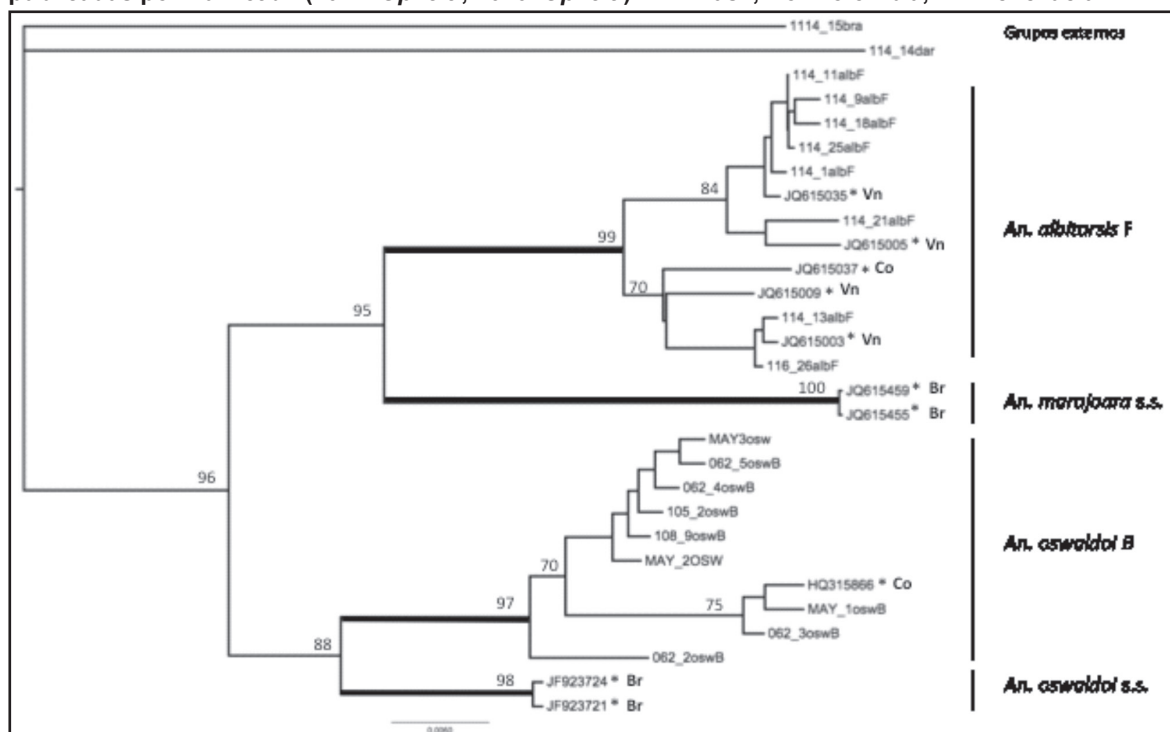
Con respecto a *An. oswaldoi* B, encontramos que los rangos de variación de la longitud de la mancha oscura del segundo tarsómero posterior en relación a la longitud del tarsómero están dentro del rango reportado para *An. oswaldoi* s.l. (Faran, 1980. *Op. cit.*), *An. oswaldoi* s.s. de Brasil (Motoki *et al.*, 2007. *Op. cit.*) y *An. konderi* (Flores-Mendoza *et al.*, 2004, Proc. Entomol. Soc. Wash. 106: 118-132) así como para *An. oswaldoi* s.l. de Venezuela (Rubio-Palis, 2000. *Op. cit.*). Motoki *et al.* (2009. *Op. cit.*) señalan que un carácter diagnóstico confiable para la

determinación taxonómica de las especies del Complejo Oswaldoi es mediante el análisis de la forma del ápice del aedeagus, al menos para diferenciar *An. oswaldoi* s.s. y *An. konderi* de otras especies del complejo. En el presente estudio no se contó con especímenes machos a fin de analizar la morfología del aedeagus. Caracteres diagnósticos que permiten diferenciar *An. oswaldoi* s.l., de las demás especies del Subgrupo Oswaldoi tales como la proporción de la longitud de la mancha SCP en relación a la longitud del ala y la proporción de la longitud de la mancha PHD en relación a la longitud de la mancha HP no han sido consideradas en revisiones recientes en esta especie (Motoki *et al.*, 2007. *Op. cit.*), reportando sólo el tamaño de las manchas, lo cual es muy variable geográficamente y podría depender de variables ambientales (Rubio-Palis, 1998. *Op. cit.*).

El análisis de ADN mitocondrial (región código de barras, 658 pb) confirma la presencia por primera vez en Venezuela de *An. oswaldoi* B, así como de *An. albitarsis* F para el estado Bolívar. Dadas las implicaciones potenciales de las especies de los Complejos Oswaldoi y Albitarsis en la transmisión de los parásitos maláricos, es fundamental en estudios futuros realizar simultáneamente estudios morfométricos de isofamilias y estudios moleculares que permitan la descripción de estas especies.

El análisis de la región código de barras mostró una divergencia genética mayor del 3,2% entre todas las taxas. *Anopheles oswaldoi* B y *An. oswaldoi* s.s. presentaron una divergencia de 3,2%, mientras que en *An. albitarsis* F and *An. marajoara* s.s. esta fue de 5,2%; valores que se encuentran por encima del rango utilizado para delimitación de especies (Hebert *et al.*, 2003. *Op. cit.*; Ruíz *et al.*, 2010. *Op. cit.*, 2012. *Op. cit.*). No se detectaron codones de parada a lo largo de las 658 bp analizadas (n = 19 secuencias), descartando la presencia pseudogenes. Cuando se sometieron nuestras secuencias consensos de *An. oswaldoi* B and *An. albitarsis* F a las registradas en el GenBank para estas especies, estas

Fig. 1. Árbol filogenético basado en distancias genéticas (NJ/K2P) de *An. oswaldoi* B, *An. albitarsis* F (Bolívar, Venezuela) y secuencias previamente publicadas en el GenBank para la región código de barras: *An. albitarsis* F (JQ615035, JQ615005, JQ615037, JQ615009, JQ615003), *An. marajoara* s.s. (JQ615455, JQ615459), *An. oswaldoi* B (HQ315866) y *An. oswaldoi* s.s. (JF923721, JF923724). Grupos externos: *An. (Nys) braziliensis* y *An. (Nys.) darlingi* (Bolívar, Venezuela). *Secuencias previamente publicadas por Ruiz *et al.* (2012. *Op. cit.*; 2010. *Op. cit.*). Br: Brasil, Co: Colombia, Vn: Venezuela.



mostraron una alta homología (98% - 99%) con *An. oswaldoi* B de Putumayo, Colombia (HQ315866 de Ruiz *et al.*, 2010. *Op. cit.*) y *An. albitarsis* F de Venezuela y Colombia (JQ15035, JQ615005, JQ615037, JQ5009 y JQ515003; Ruiz *et al.* 2012. *Op. cit.*), confirmando la presencia de estas dos nuevas especies para el estado de Bolívar, Venezuela. Los valores de Bootstrap confirman claramente que *An. albitarsis* F y *An. oswaldoi* B son diferentes a las topotípicas especies *An. marajoara* s.s. y *An. oswaldoi* s.s. (Fig. 1).

Conflicto de intereses

Ninguno a declarar.

AGRADECIMIENTOS

A todos los habitantes de El Palmar, Boca de Nichare (especialmente Aurora Rodríguez y Simón Caura), y Jabillal (especialmente Ana María Ibañez y Horacio Vargas) por permitirnos realizar el estudio en

sus comunidades y, conjuntamente con la Dirección de Salud Ambiental del Estado Bolívar, por facilitar el apoyo logístico. A los vigilantes entomológicos comunitarios entrenados, por su acompañamiento de campo: Héctor Domínguez y Bonifacio. Este estudio fue posible gracias al financiamiento del International Development Research Centre (IDRC-Canadá) (Proyecto 103696-006), Delegación de la Unión Europea en Venezuela (DCI-NSAPVD/2008/166-318), Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT-Contrato Número 200800777, Sub-proyecto Malaria-Componente Caura), National Institute of Health, USA (2R01AI054139 to JEC), Smithsonian Institution, y Walter Reed Army Institute of Research.

Recibido el 13/11/2012
Aceptado el 10/03/2013