



**Estudio de la comunidad de mosquitos *Culex (Culex)* y
de su estado gonotrófico durante el otoño-invierno en
la ciudad de Córdoba, Argentina**

Tesinista: María Florencia, Branda

Firma:.....

Directora: Dra. Magdalena Laurito

Firma:.....

Codirector: Dr. Andrés M. Visintin

Firma:.....

**Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (UNC - CONICET)
Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba (CIEC)**

**Estudio de la comunidad de mosquitos *Culex* (*Culex*) y
de su estado gonotrófico durante el otoño-invierno en
la ciudad de Córdoba, Argentina**

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: Dr. Walter R. Almirón

Firma:

Nombre y Apellido: Dra. Marina B. Chiappero

Firma:

Nombre y Apellido: Dra. Claudia S. Rodríguez

Firma:

Calificación:

Fecha:

Índice

Introducción	3
Objetivos específicos	8
Materiales y métodos	9
Área de estudio	9
Colecta de individuos	9
Análisis de la comunidad	10
Composición y abundancia de especies de la comunidad	10
Disecciones y determinación de los estados de desarrollo de los folículos ováricos	12
Procedimientos moleculares	12
Identificación molecular	14
Resultados	15
Análisis de la comunidad	15
Composición y abundancia de especies de la comunidad	15
Disecciones y determinación de los estados de desarrollo de los folículos ováricos	22
Identificación molecular	22
Discusión	27

Resumen

La comunidad de mosquitos *Culex* de Córdoba incluye especies involucradas en la transmisión de los virus *Saint Louis Encephalitis* (VSLE) y *West Nile* (VWN). Restan por conocer aspectos de la biología invernal de este grupo de mosquitos en la ciudad. El objetivo de este trabajo fue estudiar la comunidad de mosquitos *Culex* (*Culex*) y determinar el estado de desarrollo de los folículos ováricos de las hembras durante la temporada otoño-invierno. Se colectaron individuos adultos mensualmente, con trampas de luz tipo CDC, en dos sitios entre mayo y septiembre de 2016. De las 13 especies registradas para la ciudad, se colectaron ocho. *Culex dolosus*, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor* fueron eudominantes y constantes en el periodo de muestreo. La primera, mostró el mayor valor de índice de abundancia de especies, seguida por *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor*; las tres totalizaron el 77,35% de los individuos colectados. El mayor valor de diversidad y riqueza de especies fue en mayo. Se estudió la relación entre la abundancia de mosquitos y las variables ambientales mediante un análisis de correspondencias canónicas y fue explicada en un 68% por la humedad y la velocidad del viento (Eje 1) y por la temperatura máxima (Eje 2). Para estudiar el desarrollo ovárico se diseccionaron 184 hembras, de las cuales 58 mostraron un estado folicular avanzado. Debido a la dificultad para identificar morfológicamente las hembras de *Culex*, se utilizó un fragmento del gen citocromo *c* oxidasa subunidad I y el segundo intrón del gen acetilcolinesterasa 2 para el complejo *Cx. pipiens*. Aún durante la época desfavorable del año, el 61,5% de las especies registradas para la ciudad fue colectado con un estado folicular avanzado, dando indicios de homodinamia. La presencia de *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor*, incriminadas como vectores de VSLE en Córdoba, soportaría al *overwintering* del virus en hembras no diapausantes infectadas como estrategia para pasar la temporada desfavorable. Cabe destacar la colecta de un espécimen híbrido del complejo *Cx. pipiens*. Dada la sobresaliente representatividad de *Cx. dolosus*, es necesario estudiar su rol en el mantenimiento y transmisión del VSLE. Del mismo modo, la posible homodinamia de *Cx. pipiens* híbrido debe ser estudiada en profundidad ya que podría actuar como vector puente. La importancia epidemiológica de las especies de este subgénero y la capacidad de sobrevivir y reproducirse en condiciones ambientales desfavorables, lo hace objeto de futuros estudios para profundizar en el conocimiento de su biología invernal y determinar su potencial rol en el mantenimiento de virus a lo largo del año.

Palabras clave: hibernación, diapausa, arbovirus, *overwintering*, folículos ováricos.

Introducción

Los mosquitos pertenecen a la familia Culicidae (Diptera), la cual es una de las más estudiadas entre las de insectos dada su importancia médico-veterinaria. El género *Culex*, de distribución mundial, agrupa 769 especies en 26 subgéneros (Harbach 2017) y es bien conocido por su interés sanitario. El subgénero *Culex* incluye 200 especies (Harbach 2017), muchas de las cuales son reconocidas como vectores de nemátodos (Fontes *et al.* 1998) y numerosos arbovirus (del anagrama del inglés *arthropod-borne viruses*) (Hubálek 2000). Para la Argentina, se han registrado 29 especies de *Culex* (*Culex*) y 17 para la provincia de Córdoba (Rossi 2015), mientras que para la ciudad de Córdoba, el subgénero está representado por 13 especies (Almirón *et al.* 2006). Desde hace casi dos décadas se realizan estudios periódicos y sostenidos de la comunidad de mosquitos de la ciudad de Córdoba. Una característica fundamental que describe a una comunidad biológica es la diversidad de sus componentes, o biodiversidad, representada por las diferentes especies que la componen. El estudio de la estructura de las comunidades puede ser abordada a partir de diferentes aspectos: la diversidad de especies, las interacciones entre las mismas y la organización funcional (Schowalter 2000). La diversidad de especies no debería medirse únicamente por el número de especies registradas, sobre todo si las muestras son parciales como frecuentemente ocurre en los estudios entomológicos (Gotelli & Colwell 2001). Para ello, se han desarrollado índices y estimadores que complementan la información acerca de la diversidad y abundancia de las especies en las comunidades (Morin 1999, Magurran 2004). La principal ventaja de los índices es que resumen mucha información estadística en un solo valor y nos permiten hacer comparaciones rápidas y sujetas a comprobación estadística entre la diversidad de distintos hábitats o a través del tiempo (Magurran 1988). Entre las especies de relevancia sanitaria de la ciudad de Córdoba, *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* y *Cx.* (*Cux.*) *interfor* se consideran vector principal y secundario, respectivamente, del virus VSLE (Díaz *et al.* 2006). Si bien solo las dos especies mencionadas de *Culex* (*Culex*) han sido incriminadas directamente como de importancia médica para la ciudad, otras también registradas en Córdoba muestran relevancia epidemiológica en otras provincias. Se asume que *Cx.* (*Cux.*) *bidens* fue el vector del virus *Venezuelan Equine Encephalitis* (VEEV) durante una epizootia en la provincia de Chaco en 1988 (Sabattini *et al.* 1998). El virus *Río Negro*, del complejo VEEV, se ha detectado en *pools* de mosquitos de las especies *Cx.* (*Cux.*) *coronator* y *Cx.* (*Cux.*) *maxi*

en la provincia de Chaco en el año 2004 (Pisano *et al.* 2010a) y en especímenes de *Cx. (Cux.) mollis* en San Miguel de Tucumán durante 2005 (Pisano *et al.* 2010b).

El VSLE se aisló por primera vez en el año 1933 de un paciente durante un brote de encefalitis en la ciudad de Saint Louis, Estados Unidos de América (EEUU) (Lumsden 1958). Este virus es endémico en Argentina y posee una amplia distribución, detectándose actividad tanto en regiones subtropicales como templadas del país (Sabattini *et al.* 1998). En el año 2005 se produjo un brote por VSLE en la ciudad de Córdoba; de los 47 casos confirmados, 9 resultaron fatales (Spinsanti *et al.* 2009). Durante el brote, especímenes de *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor* se encontraron naturalmente infectados con el virus y se logró el aislamiento a partir de individuos de *Cx. quinquefasciatus* (Díaz *et al.* 2006).

El VWN es el arbovirus de mayor distribución en el mundo, fue aislado por primera vez en 1937 de la sangre de una mujer febril en el departamento de West Nile, Uganda (Smithburn *et al.* 1940). Su introducción en el continente americano tuvo lugar en la ciudad de Nueva York en 1999 (Lanciotti *et al.* 1999), alcanzando luego un amplio rango de distribución (EEUU, Canadá, México, Caribe y algunas regiones de Centro y Sudamérica) con mosquitos del género *Culex* como vectores involucrados en su transmisión (Kramer *et al.* 2008). Si bien habría ingresado a la Argentina antes de 2005 (Díaz *et al.* 2008), se desconocen las especies involucradas en su transmisión en el país. Cabe destacar que algunos mosquitos *Culex* son vectores de este virus en otras regiones del mundo (Kramer *et al.* 2008) como por ejemplo *Cx. quinquefasciatus* (Molaei *et al.* 2007) y *Cx. (Cux.) pipiens* (Savage *et al.* 1999) en los EEUU y *Cx. pipiens* en Rusia (Fyodorova *et al.* 2006). En la ciudad de Córdoba la actividad del VWN se ha registrado en aves desde 2005 (Díaz *et al.* 2008).

Los arbovirus se mantienen en la naturaleza principalmente por la transmisión vectorial entre huéspedes vertebrados y sus vectores hematófagos. Este ciclo es constante durante todo el año en zonas tropicales y subtropicales, donde las poblaciones de los vectores son estables durante el año. En zonas templadas las abundancias de los vectores disminuyen drásticamente en la época invernal, la cual para la ciudad de Córdoba se extiende entre junio y septiembre y se caracteriza por bajas temperaturas y escasas precipitaciones. Este escenario pondría en peligro la supervivencia de los arbovirus (Contigiani *et al.* 2016). Sin embargo, se ha observado en ciertas zonas templadas la permanencia de determinados arbovirus durante todo el año, como la endemidad del VSLE en la ciudad de Córdoba (Díaz *et al.* 2012). Se han planteado

diversas estrategias para explicar la manera en la que los arbovirus persisten durante la estación desfavorable hasta la primavera siguiente (*overwintering*). Éstas son (Monath 1980): 1, transmisión transovárica; 2, transmisión venérea; 3, transmisión vectorial por vectores alternativos (como garrapatas con estabilidad poblacional en el invierno); 4, reintroducción anual mediante aves y/o murciélagos y 5, permanencia viral en mosquitos hembras no diapausantes infectadas. El término *overwintering* también se utiliza para definir los mecanismos que las especies de mosquitos utilizan para pasar la temporada desfavorable en regiones templadas y que sus poblaciones lleguen a la primavera. Para el género *Culex* estas estrategias difieren con la especie, la latitud, y por lo tanto con la temperatura y el fotoperiodo (Reisen 1995). Se ha observado que poblaciones de *Cx. (Cux.) tarsalis* de EEUU pueden adoptar distintas estrategias: hibernar (diapausa reproductiva) como hembras inseminadas o bien alimentarse de sangre y oviponer durante el invierno (Nelms *et al.* 2013). *Culex pipiens* ha desarrollado una estrategia que consiste en la hibernación de hembras anautogénicas inseminadas (Spielman & Wong 1973), lo cual se determinó en base a observaciones a campo y en laboratorio en poblaciones de mosquitos de Boston, EEUU. Estas hembras, no se alimentan ni oviponen durante el invierno y son lo suficientemente longevas para sobrevivir durante toda la época desfavorable (Vinogradova 2000). Las hembras de *Cx. quinquefasciatus*, por el contrario, son no-diapausantes y el ciclo de vida continúa a pesar del frío (Hayes 1975, Hayes & Hsi 1975). Esta estrategia, conocida como homodinamia, ha sido reportada también para *Cx. (Cux.) fatigans* en Brasil (Rachou 1957) y Venezuela (Scorza 1972). En el caso de poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de la ciudad de Córdoba, a partir de experimentos a campo se ha observado que posterior a la ingesta de sangre, las hembras oviponen, los huevos eclosionan, las larvas se desarrollan y pupan y los adultos emergen a pesar de las bajas temperaturas, aunque el tiempo de desarrollo es mayor que en condiciones más cálidas (Almirón & Brewer 1996). Es decir, que al menos dos generaciones de *Cx. quinquefasciatus* deben ocurrir durante la temporada fría y seca en la ciudad de Córdoba (Almirón & Brewer 1996). Además se confirmó experimentalmente el mecanismo de transmisión vertical del VSLE en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de la ciudad de Córdoba (Flores *et al.* 2010). Es por esto que los mecanismos adoptados por las diferentes especies deben ser estudiados localmente tendiendo al conocimiento de la biología invernal de las especies de real o potencial interés sanitario.

El ciclo ovárico de los culícidos comprende una serie de pasos que van desde la formación de una tanda de folículos hermanos hasta que los mismos llegan a oocitos maduros, y consta de periodos de crecimiento alternados con periodos de interrupción. Clements (1992) definió cuatro fases de desarrollo, en base a eventos fisiológicos de la ovogénesis, que coinciden con los cinco estados de Christophers (1911), definidos en base a la apariencia de los folículos bajo el microscopio. En la fase pre-vitelogénica los folículos se vuelven competentes; en la fase de iniciación, el crecimiento folicular continúa después de la ingesta de sangre; en la fase trófica, ocurre el principal periodo de síntesis de vitelo y en la post-trófica, el oocito toma su forma madura y se cubre de corion (Clements 1992). Entre estas fases existen puntos de pausa potenciales de los que se puede salir si se dan las condiciones fisiológicas adecuadas, las cuales permiten el desarrollo de conjuntos de folículos coordinados con los ciclos de alimentación y oviposición de las hembras. Dichos puntos o barreras pueden salvarse hormonalmente o por la ingesta de sangre, siendo esta última indispensable para el paso de la fase pre-vitelogénica a la de iniciación (barrera pre-vitelogénica), etapa que se corresponde con el estado IIIa de Christophers. Se infiere que, una vez alcanzada esta fase, se garantizaría la finalización del ciclo gonotrófico. El llamado ciclo gonotrófico hace referencia al periodo desde la búsqueda de huésped para ingerir sangre hasta la oviposición (Clements 1992). El número de ingestas necesarias para completar este ciclo depende del estado nutricional de la hembra al momento de emerger (Clements 1992) por lo que pueden encontrarse casos en los que se produce una discordancia gonotrófica (Swellengrebel 1929), esto es, la necesidad de más de una alimentación sanguínea para completar un ciclo gonotrófico.

La identificación morfológica de las especies de *Culex* (*Culex*) es dificultosa, principalmente en larvas y hembras, ya que los caracteres anatómicos resultan polimórficos y se superponen entre especies (Laurito & Almirón 2013), limitándose la correcta identificación a unos pocos caracteres de la genitalia masculina. Además, el subgénero incluye complejos de especies, definidos como grupos de especies que no son distinguibles por caracteres morfológicos o solo por un número muy reducido. El complejo *Cx. pipiens* en Argentina incluye dos especies: *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* y sus híbridos en la región templada y particularmente en la Ciudad de Córdoba (Brewer *et al.* 1987). Para lograr la correcta identificación de las especies del subgénero, se requieren herramientas alternativas como lo son los caracteres moleculares. Un marcador molecular considerado efectivo, debe demostrar diferencias

consistentes entre especies cercanamente emparentadas (McDowell & Graves 2002). Los genes mitocondriales son considerados buenos marcadores debido a su abundancia, pérdida de intrones, limitada recombinación y su modo haploide de herencia (Saccone *et al.* 1999). Entre los mitocondriales, un fragmento del gen citocromo *c* oxidasa subunidad I (*COI*) ha sido ampliamente utilizado como código de barras genético (CBG) (Hebert *et al.* 2003) en el reino animal. En particular para mosquitos, secuencias de *COI* han sido usadas exitosamente para identificar especies (Cywinska *et al.* 2006, Kumar *et al.* 2007, Laurito *et al.* 2017). Sin embargo, puede ocurrir que dos linajes (especies) se separen de manera incompleta en base a un/os gen/es, que la tasa de evolución de los genes difiera entre linajes (especies) o que ocurran diferentes fenómenos de recombinación genómica interespecífica como la hibridación. Esto resultaría en un conflicto entre el árbol de genes y el de las especies haciendo que ese gen (marcador molecular) resultara ineficaz para la diferenciación entre esos linajes (especies). Esto sucede dentro del complejo *Cx. pipiens*, donde además la problemática para la identificación específica responde a lo descrito para el subgénero *Culex*. Smith & Fonseca (2004) han desarrollado un método sencillo para identificar a los miembros del complejo *Cx. pipiens* y sus híbridos mediante el uso de polimorfismos del segundo intrón del gen nuclear acetilcolinesterasa-2 (*ace-2*). Debido a las diferencias ecofisiológicas y de capacidad vectorial entre *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens*, su identificación es importante para el entendimiento de los patrones de transmisión de enfermedades (Cardo *et al.* 2016). Para caracterizar la distribución espacial de dichas especies y sus híbridos, Cardo *et al.* (2018) utilizaron exitosamente la metodología propuesta por Smith & Fonseca (2004) en la región templada de Argentina.

Dada la endemidad del VSLE, la evidencia de circulación del VWN y la importancia epidemiológica de la comunidad de *Culex* (*Culex*) de la ciudad de Córdoba, se desprende la necesidad de estudiar la estructura de dicha comunidad durante la temporada otoño-invierno, además de determinar el estado de desarrollo de los folículos ováricos de las hembras que la componen, contribuyendo así al conocimiento de la biología en la época desfavorable del año de estos insectos.

Objetivo general

Estudiar las comunidades de mosquitos *Culex* (*Culex*) de dos sitios de la ciudad de Córdoba y conocer aspectos de su biología invernal.

Objetivos específicos

1- Analizar las comunidades de Culicidae determinando su composición (diversidad y abundancia), su distribución temporal y su relación con variables ambientales, en dos sitios de la ciudad de Córdoba.

2-Determinar los estados de desarrollo de los folículos ováricos de hembras de *Culex* (*Culex*) colectadas en la temporada otoño-invierno en la ciudad de Córdoba.

Materiales y métodos

Área de estudio

Los sitios de colecta fueron el Jardín Zoológico ($31^{\circ}25'36,56''\text{S} - 64^{\circ}10'32''\text{O}$) y la planta depuradora de líquidos cloacales de Bajo Grande ($31^{\circ}24'12,99''\text{S} - 64^{\circ}06'20,29''\text{O}$), dentro de la Ciudad de Córdoba y en la periferia, respectivamente, permitiendo así la colecta de especies de distribución urbana y periurbana (Fig. 1). El área pertenece a la provincia fitogeográfica del Espinal, Dominio Chaqueño (Cabrera 1971). Los sitios se seleccionaron porque poseen abundante vegetación, proveyendo un entorno propicio para el resguardo de los individuos durante la época desfavorable.

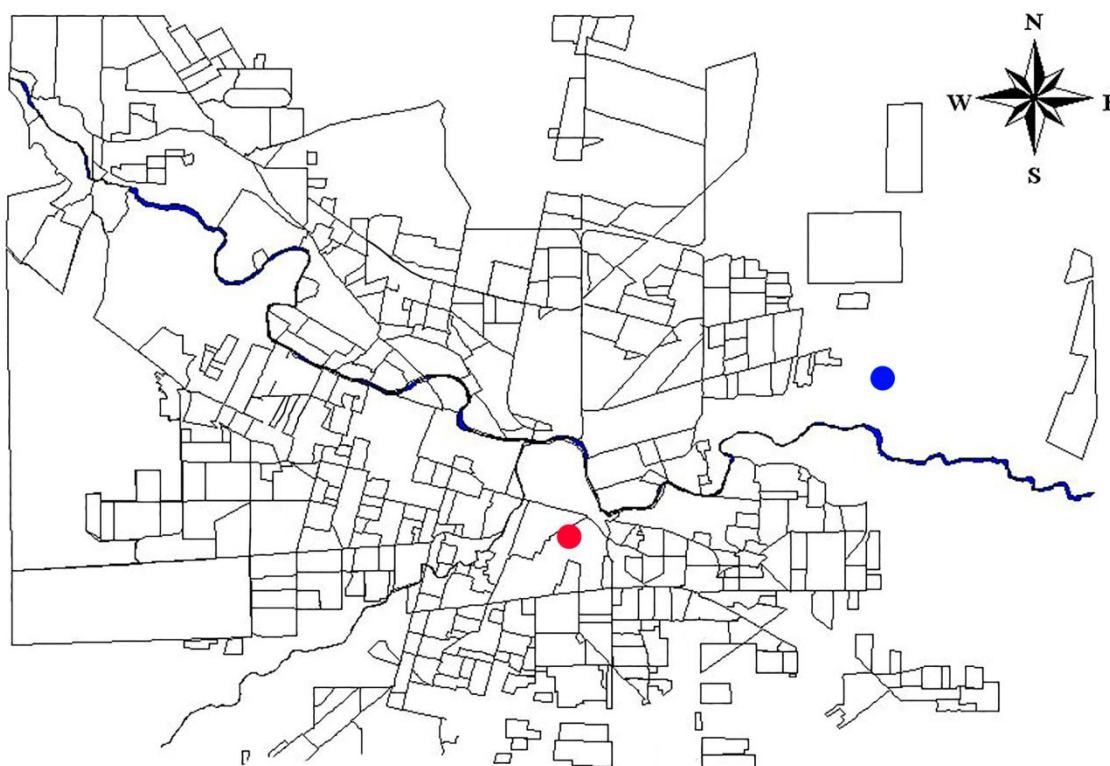


Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en el plano de la ciudad de Córdoba, Argentina. Azul: planta depuradora de líquidos cloacales de Bajo Grande; Rojo: Jardín Zoológico.

Colecta de individuos

Se colectaron mosquitos hembras mensualmente, desde mayo hasta septiembre de 2016, meses correspondientes a la temporada fría y seca en la ciudad de Córdoba. En cada muestreo se utilizaron tres trampas de luz tipo CDC (Silver 2008) (Fig. 2) por sitio, complementadas con dióxido de carbono, las mismas permanecieron activas por 24 horas para colectar especies de actividad diurna, crepuscular y nocturna. Los especímenes se transportaron al laboratorio dentro de las bolsas de captura y se sacrificaron con frío. Se realizó la identificación morfológica de todos los individuos colectados utilizando las claves dicotómicas de Darsie (1985) y Forattini (2002).



Figura 2. Trampa de luz tipo CDC complementada con CO₂ para la colecta de mosquitos adultos.

Análisis de la comunidad

Composición y abundancia de especies de la comunidad

Una vez identificadas y contabilizadas las hembras, se obtuvo la categoría de dominancia (CD) para cada especie de acuerdo a la abundancia relativa del total de especies identificadas en el área de estudio: eudominante ($CD > 10\%$), dominante ($5\% < CD \leq 10\%$), subdominante ($2\% < CD \leq 5\%$), eventual ($1\% < CD \leq 2\%$) o rara ($CD \leq 1\%$) (Cardoso *et al.* 2011). Posteriormente se las agrupó en categorías de constancia (C) según la proporción de aparición de cada especie en los meses de muestreo: constante ($C > 50\%$), accesoria ($25\% < C < 50\%$) y accidental ($C < 25\%$) (Ott & Carvalho 2001). Para comparar la abundancia de especies a lo largo del tiempo se calculó el Índice de Abundancia de Especies ($IAE = (a + R_j) / k$) donde $a = N^\circ$ de celdas vacías * C, C= mayor rango asignado + 1, $R_j = \Sigma$ rangos de todos los sitios por especie, $K = n^\circ$ de meses (Roberts & Hsi 1979). Se elaboró una tabla de doble entrada asentando en las filas a las especies y en las columnas los meses, conteniendo cada celda el número de individuos de la especie correspondiente colectada por mes. Se estableció luego un rango de abundancia para cada especie en cada mes, dando valor de rango 1 a la más abundante, 2 a la siguiente en abundancia y así sucesivamente. Las especies que tenían igual número de individuos tuvieron por rango el promedio de rangos correspondientes. También se calculó el IAE estandarizado ($IAE^* = (C - IAE) / (C - 1)$) el cual toma valores entre 0 y 1, correspondiendo 1 a la especie más abundante.

Diversidad y fluctuación temporal

El análisis temporal de la comunidad se llevó a cabo mediante índices referidos a la riqueza y la estructura de la misma, utilizando el programa PAST v. 2.17c (Hammer *et al.* 2001). Para cada mes de muestreo se calculó el índice de riqueza de especies (S), el índice de dominancia (D), el de equidad de Pielou (J') y el índice de diversidad de Shannon-Wiener (H'). Este último expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Asume que los individuos son seleccionados al azar y que todas las especies están representadas en la muestra. Adquiere valores entre 0, cuando hay una sola especie, y el logaritmo del número de especies, cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Magurran 1988, Moreno 2001). El índice de Pielou mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada, y toma valores de 0 a 1, de manera que 1 corresponde a casos donde todas las especies son igualmente abundantes (Magurran 1988, Moreno 2001). La riqueza de especies expresa el total de especies obtenido por un censo de la comunidad, mientras que la dominancia manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie (Moreno 2001).

S= Número total de especies obtenido por un censo de la comunidad.

D= $1 - \lambda$

Donde: λ es el índice de Simpson.

H'= $-\sum p_i * \ln p_i$

Donde: p_i = proporción de la especie i en el total de la muestra.

J'= H' / H'_{\max}

Donde $H'_{\max} = \ln(S)$

Para los análisis estadísticos se trabajó con el paquete INFOSTAT-UNC (2013) (Di Rienzo *et al.* 2013). Se comparó la riqueza específica, la abundancia de las especies y la diversidad entre los sitios de muestreo a través de análisis de la varianza (ANAVA). Los datos fueron transformados para que se cumplan los supuestos de distribución normal, homogeneidad de varianza e independencia de los errores, los cuales se probaron mediante el test de Shapiro-Wilks, de Levene y gráficos de dispersión de residuos vs. variables, respectivamente. Para analizar la relación entre la abundancia de mosquitos y las variables ambientales (temperatura, precipitación, humedad relativa,

velocidad del viento y presión atmosférica) registradas en la ciudad de Córdoba durante el período que duró este trabajo se realizó un análisis de correspondencias canónicas (ACC), para lo cual se utilizó el programa estadístico MVSP v. 3.22. Se descartaron aquellas variables en las que se detectó multicolinealidad, la cual fue medida por medio del factor de inflación de la varianza. Los datos de abundancia de mosquitos adultos fueron transformados a $\text{Log}(X+1)$, ya que este artificio matemático permite reducir la influencia de los valores extremos y elimina las distintas escalas de medidas (Greenacre 2008). Los datos meteorológicos fueron obtenidos del recurso www.tutiempo.net.

Disecciones y determinación de los estados de desarrollo de los folículos ováricos

Una vez identificadas morfológicamente las hembras, se procedió a la disección de las ovarias bajo estereomicroscopio en el laboratorio. Las ovarias se extirparon sobre un portaobjetos utilizando pinzas y microestiletos, se les agregó una gota de agua destilada y colocó un cubre-objetos. Utilizando un microscopio óptico de contraste de fases se determinó el grado de desarrollo de los folículos ováricos en base a los estados de desarrollo de Christophers (1911) (Fig. 3).

Procedimientos moleculares

La extracción del ADN genómico de cada espécimen que se encontraba en estado de desarrollo folicular III o superior, fue obtenido de dos o tres patas conservadas en alcohol absoluto. Primero se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las indicaciones del comerciante. Al no disponer de la cantidad suficiente de elementos del kit, se siguió la metodología propuesta por Sañudo-Restrepo *et al.* (2013). Se colocaron las patas a incubar en 100 μl de Chelex-100 10% (p/v) y 5 μl de Proteinasa K 20 mg/ml a 55°C durante toda la noche, luego se las incubó a 100°C por 15 minutos y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. En ambas metodologías se recuperó el sobrenadante y se conservó una alícuota de 15 μl a -20°C para su posterior amplificación por PCR y el resto fue conservado a -80°C en la colección del Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba. La amplificación del fragmento CBG, de ~658 pb, se llevó a cabo según el protocolo de Folmer *et al.* (1994). Cada reacción se realizó en un volumen final de 25 μl , conteniendo 10x de buffer de PCR, MgCl 50mM, mix dNTP 10mM, cada cebador a 10 μM y 5U de Taq polimerasa (Genbiotech). Los

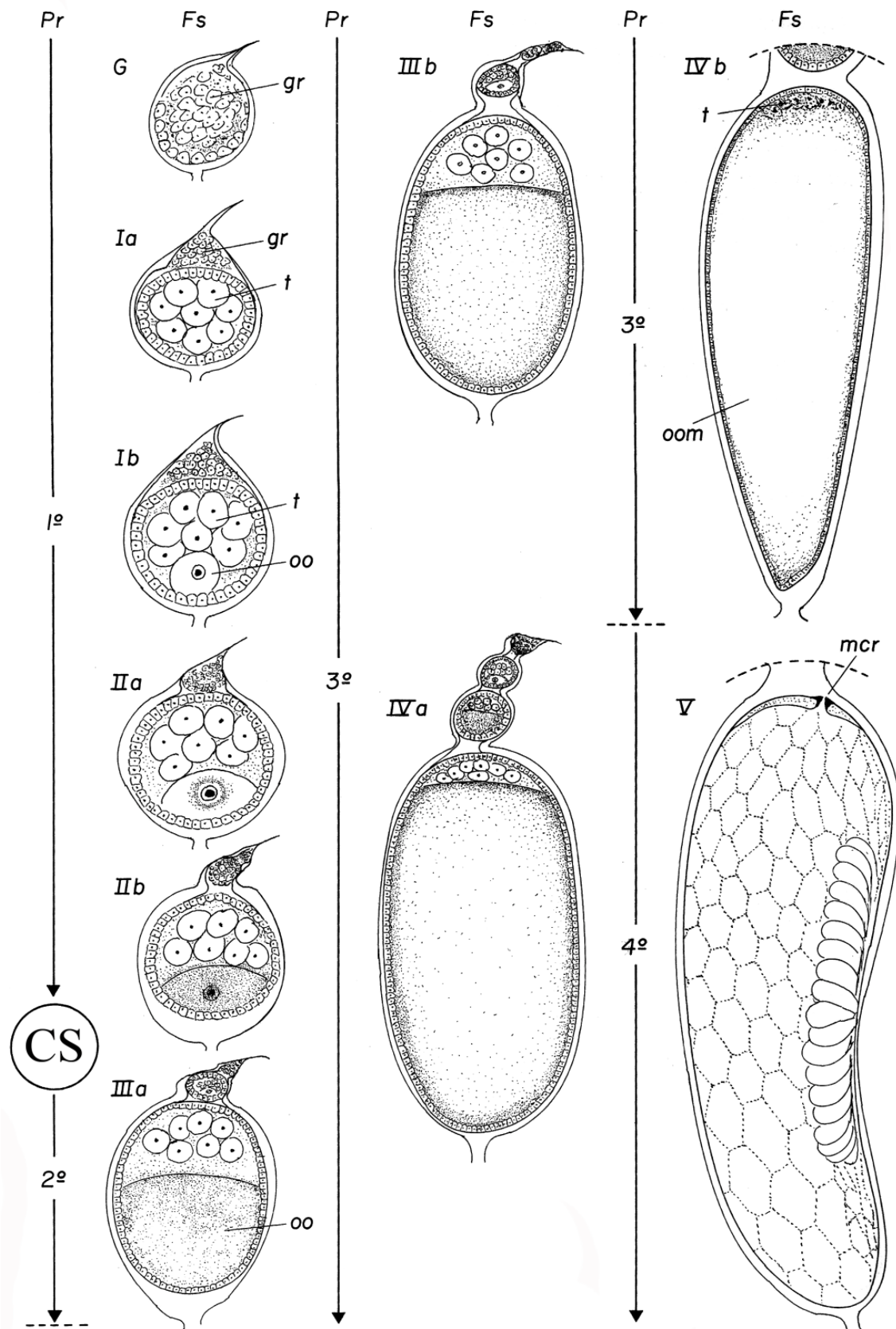


Figura 3. Diagrama del ciclo ovárico de culicidos, con los estados de Christophers (Fs) y las fases de Clements (Pr), tomado de Forattini (2002). CS: comida sanguínea. gr: germario, mcr: micrópilo, oo: oocito, oom: oocito maduro, t: trofocito.

volúmenes de ADN requeridos variaron desde diluciones hasta 8µl, siendo 2 y 3µl los más usuales. El régimen de temperaturas de la PCR consistió en 2 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 52°C y 1 min 30 seg a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C. Las reacciones de secuenciación del fragmento CBG se hicieron en ambas direcciones a través de un secuenciador automático ABI3730XL (Macrogen Inc., Corea) con los mismos cebadores utilizados en las reacciones de PCR. La amplificación del segundo intrón del gen *ace-2*, para los especímenes identificados morfológicamente como *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*, del complejo *Cx. pipiens*, se utilizó la metodología propuesta por Smith & Fonseca (2004) pero en dos reacciones de PCR separadas en lugar de la *multiplex* propuesta por las autoras. Los productos de amplificación de los dos fragmentos génicos de interés fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa y TAE (1%), teñidos con GelRed.

Identificación molecular

Las secuencias del fragmento CBG fueron editadas a través del programa BioEdit v. 7.2 (Hall 1999) a partir de los cromatogramas obtenidos y se removieron los cebadores. Las secuencias se alinearon por nucleótidos utilizando el algoritmo *Muscle* (Edgar 2004) en MEGA v. 7 (Kumar *et al.* 2016). Se utilizó la base de datos *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST - blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para comparar la homología de las secuencias e identificar las especies. El algoritmo *best close match* (BCM), desarrollado por Meier *et al.* (2006) e incluido en TaxonDNA (taxondna.sf.net/), fue utilizado para probar la utilidad del fragmento *COI* como CBG. El algoritmo identifica la mejor pareja que puede establecerse entre la secuencia consultada con el CBG más similar de una librería (otorgada por el operador a TaxonDNA), para lo cual se requiere un valor umbral de similitud que defina cuan similares necesitan ser ambas secuencias. Dicho valor se estima para un set de datos, obteniendo la distribución de frecuencias de todas las distancias intraespecíficas de a pares y calculando la distancia umbral bajo la cual se encuentra el 95% de todas las distancias intraespecíficas (Meier *et al.* 2006). Éste valor umbral fue del 2%, utilizado como corte para la identificación de las especies. La identificación se consideró correcta si ambos nombres fueron idénticos, fue ambigua si al menos dos parejas fueron igualmente buenas y se consideró errónea si los nombres no coincidieron. Las secuencias obtenidas estarán disponibles en Genbank cuando el estudio sea publicado. La genotipificación del fragmento del gen *ace-2* basada en la metodología de Smith &

Fonseca (2004), permitió la identificación de las especies del complejo *Cx. pipiens*. Debido a su polimorfismo fue posible obtener bandas de diferente peso molecular, 610 pb para *Cx. pipiens* y 274 pb para *Cx. quinquefasciatus*. Los híbridos de estas especies se evidencian por la amplificación de ambas bandas, ya que el fragmento del gen segrega como codominante.

Resultados

Análisis de la comunidad

Composición y abundancia de especies de la comunidad

De acuerdo a la categoría de dominancia y teniendo en cuenta las comunidades de los dos sitios de estudio por separado y en conjunto, se encontraron especies eudominantes, dominantes, subdominantes y raras; mientras que no se encontraron especies de categoría eventual (Tabla 1). *Culex quinquefasciatus*, *Cx. dolosus* y *Cx. interfor* resultaron eudominantes, sumando el 77,35% del total. Respecto a la constancia, las que resultaron constantes fueron las especies eudominantes, las accesorias fueron las especies subdominantes y las accidentales fueron tanto especies subdominantes como raras (Tabla 1).

Tabla 1. Categoría de dominancia y constancia para las especies de mosquitos *Culex* colectadas en el periodo mayo-septiembre de 2016 en la Ciudad de Córdoba.

Especie	n	Categoría de dominancia	Constancia
<i>Cx. apicinus</i>	1	R	Ac
<i>Cx. bidens</i>	1	R	Ac
<i>Cx. dolosus</i>	84	EU	C
<i>Cx. interfor</i>	25	EU	C
<i>Cx. maxi</i>	6	SD	Ac
<i>Cx. mollis</i>	9	SD	A
<i>Cx. pipiens</i> híbrido	1	R	Ac
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	29	EU	C
<i>Cx. saltanensis</i>	8	SD	A
Complejo <i>Cx. pipiens</i>	7	SD	A
<i>Cx. sp</i>	10	D	C
Total	181		

A: accesoria, Ac: accidental, C: constante, D: dominante, Eu: eudominante, SD: subdominante, R: rara.

Considerando las comunidades de los dos sitios por separado, se encontraron especies eudominantes, dominantes, subdominantes y eventuales (Tablas 2 y 3). Las eudominantes: *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. dolosus* y *Cx. interfor* fueron las mismas en

ambos sitios. *Culex mollis* y *Cx. maxi* resultaron especies subdominantes en el análisis general de la ciudad, mientras que en Bajo Grande resultaron eventuales. Por el contrario, *Cx. mollis* resultó dominante en el Zoológico. En cuanto a la constancia, en Bajo Grande las especies eudominantes fueron las constantes, las subdominantes las accesorias y las especies eventuales fueron accidentales. En el Zoológico las especies eudominantes y la dominante, *Cx. mollis*, fueron constantes. Las especies subdominantes, *Cx. saltanensis* y *Cx. maxi*, resultaron accesorias y accidental, respectivamente. Por último, *Cx. bidens* resultó eventual y accidental.

Tabla 2. Categoría de dominancia y constancia de las especies de mosquitos *Culex* colectadas en el periodo mayo-septiembre de 2016 en la planta depuradora Bajo Grande de la Ciudad de Córdoba.

Especie	N	Categoría de dominancia	Constancia
<i>Cx. apicinus</i>	1	E	Ac
<i>Cx. bidens</i>	0	-	-
<i>Cx. dolosus</i>	42	EU	C
<i>Cx. interfor</i>	14	EU	C
<i>Cx. maxi</i>	1	E	Ac
<i>Cx. mollis</i>	1	E	Ac
<i>Cx. pipiens</i> híbrido	1	E	Ac
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	12	EU	C
<i>Cx. saltanensis</i>	4	SD	A
Complejo <i>Cx. pipiens</i>	3	SD	A
<i>Cx. sp</i>	6	D	C
Total	85		

A: accesorias, Ac: accidental, C: constante, D: dominante, EU: eudominante, E: eventual, SD: subdominante.

Tabla 3. Categoría de dominancia y constancia de las especies de mosquitos *Culex* colectadas en el periodo mayo-septiembre de 2016 en el Zoológico de la Ciudad de Córdoba.

Especie	N	Categoría de dominancia	Constancia
<i>Cx. apicinus</i>	0	-	-
<i>Cx. bidens</i>	1	E	Ac
<i>Cx. dolosus</i>	43	EU	C
<i>Cx. interfor</i>	11	EU	C
<i>Cx. maxi</i>	4	SD	Ac
<i>Cx. mollis</i>	8	D	C
<i>Cx. pipiens</i> híbrido	0	-	-
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	17	EU	C
<i>Cx. saltanensis</i>	4	SD	A
Complejo <i>Cx. pipiens</i>	4	SD	C
<i>Cx. sp</i>	4	SD	C

Total	96		
--------------	----	--	--

A: accesoria, Ac: accidental, C: constante, D: dominante, EU: eudominante, E: eventual, SD: subdominant

La especie con mayor IAE (1,00) fue *Cx. dolosus*, que a su vez fue la más abundante en todos los meses de muestreo (Tabla 4). Le siguen en orden decreciente *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor*, ambas eudominantes y constantes en los análisis generales y por sitio de muestreo. Las especies con menor IAE (< 0,1) fueron *Cx. apicinus*, *Cx. bidens*, *Cx. maxi* y *Cx. pipiens* híbrido, que resultaron raras en el análisis general de dominancia y eventuales en el análisis por sitio, excepto *Cx. maxi* que resultó subdominante en el estudio general y en el Zoológico. En relación a la constancia, todas las últimas fueron accidentales (Tabla 1).

Tabla 4. Índice de abundancia específico para las especies de mosquitos *Culex* colectadas en el periodo mayo-septiembre de 2016 en la Ciudad de Córdoba.

Especies	Rj	a	IAE	IAE*
<i>Cx. apicinus</i>	5,5	26	6,30	0,04
<i>Cx. bidens</i>	6,5	30	7,30	0,03
<i>Cx. dolosus</i>	5	0	1,00	1,00
<i>Cx. interfor</i>	14,5	0	2,90	0,58
<i>Cx. maxi</i>	3,5	18	4,30	0,06
<i>Cx. mollis</i>	13	12	5,00	0,20
<i>Cx. pipiens híbrido</i>	7,5	34	8,30	0,03
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	15,5	0	3,10	0,62
<i>Cx. saltanensis</i>	14	14	5,60	0,23
<i>Cx. pipiens-quinquefasciatus</i>	14,5	16	6,10	0,27
<i>Cx. sp</i>	25,5	0	5,10	0,45

a: N° de celdas vacías * C (C = mayor rango asignado + 1), Rj = Σ rangos por especie.

Diversidad y fluctuación temporal

Considerando las comunidades de ambos sitios de estudio, el índice de diversidad de Shannon (H') disminuyó entre los meses de mayo ($H'=1,86$), cuando fue máxima, y julio ($H'=1,4$) (Fig. 4). La riqueza de especies (S) en dicho periodo también disminuyó, siendo máxima en mayo (S=10) y mínima en julio y septiembre (S=5) con un leve ascenso en agosto (S=6) (Tabla 5). La dominancia (D) aumentó entre mayo (D=0,206) y junio (D=0,342) (Fig. 4) mientras que disminuyó entre junio y agosto (D=0,24), y posteriormente alcanzó su valor máximo en septiembre (D=0,462) (Fig. 4), cuando el índice de diversidad fue mínimo ($H'=1,072$). En el mes de agosto se registró un aumento del índice de diversidad ($H'=1,566$), acompañado por un descenso en la

dominancia (Fig. 4). La uniformidad de Pielou (J') tuvo sus valores más altos en julio y agosto, cuando la diversidad aumentó (Fig. 4).

Tabla 5. Variación temporal de la riqueza de especies (S) de mosquitos *Culex* en el periodo mayo-septiembre de 2016, por sitio de muestreo y para la ciudad de Córdoba (General).

	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
BG	8	6	0	6	5
ZOO	8	7	5	4	2
General	10	7	5	6	5

BG: Bajo Grande; ZOO: Zoológico.

Entre las especies que resultaron constantes durante el periodo de muestreo, *Cx. dolosus* y *Cx. interfor* mostraron un pico de abundancia en junio, y posteriormente siguieron la tendencia a disminuir que presentaron todas especies entre junio y julio (Fig. 5). *Culex dolosus* sufrió un incremento en los meses siguientes, siendo éste más evidente entre agosto y septiembre. La abundancia de *Cx. quinquefasciatus* disminuyó entre mayo y agosto y presentó un aumento en septiembre, aunque menor al de *Cx. dolosus* (Fig. 5).

Analizando la comunidad de cada sitio de muestreo, se puede evidenciar que la diversidad (H') fue mayor en Bajo Grande que en el Zoológico en junio, agosto y septiembre; mientras que lo contrario se observa en mayo y julio, en este último porque no se colectaron individuos en Bajo Grande (Fig. 6). En cuanto a la riqueza de especies (S), fue mayor en el Zoológico en junio y julio, mientras que en agosto y septiembre lo fue en Bajo Grande. En el mes de mayo, ambos sitios tuvieron la misma riqueza específica (Tabla 5).

El análisis de la varianza no arrojó diferencias significativas en cuanto a la abundancia ($p=0,85$), riqueza específica ($p=0,91$) y diversidad ($p=0,18$) entre los dos sitios de muestreo.

Para el análisis de correspondencias canónicas se utilizó la temperatura máxima ya que la media y la mínima presentaron multicolinealidad con las demás variables. Las precipitaciones acumuladas tenidas en cuenta fueron del mes anterior a cada muestreo, y la velocidad del viento considerada fue la del día de colecta, así como el promedio de la humedad relativa y de la presión atmosférica. La relación entre la abundancia de mosquitos y las variables ambientales registradas en Córdoba entre mayo y septiembre de 2016 fue explicada por los dos primeros ejes del ACC (Fig. 7) en un 68%. El primer eje explicó el 37,45% de la varianza total y relacionó a los meses de junio y julio con la

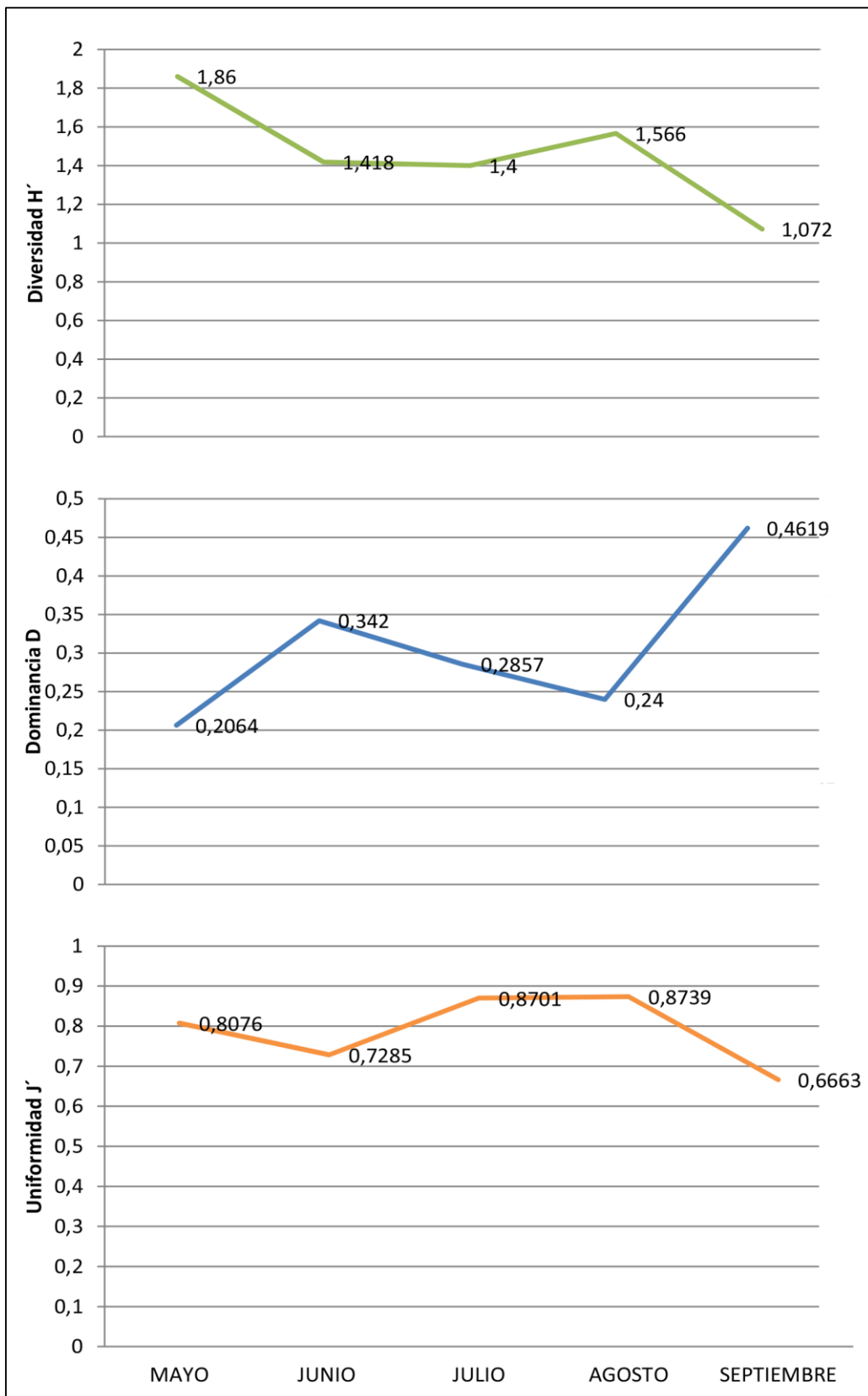


Figura 4. Variación temporal de la diversidad de Shannon (H'), de la dominancia (D) y la uniformidad de Pielou (J') de la comunidad de mosquitos *Culex* en el periodo mayo-septiembre de 2016 en la ciudad de Córdoba.

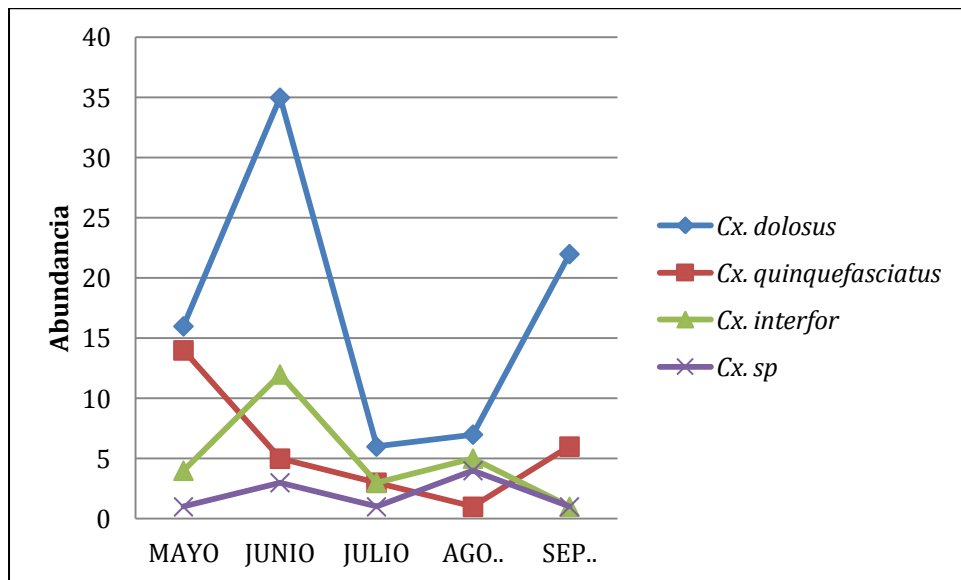


Figura 5. Abundancia (N° de especies) de las especies constantes de mosquitos *Culex* en el periodo mayo-septiembre de 2016 en la ciudad de Córdoba.

humedad ambiental y la velocidad del viento, mientras que los muestreos de mayo, agosto y septiembre se relacionaron de manera negativa al mismo. Se asocian de manera positiva a este eje las especies de *Culex* provenientes del Zoológico (sitio 2), mientras que las especies colectadas en Bajo Grande (sitio 1) se encuentran en la parte negativa del eje. El segundo eje explicó el 30,7% de la varianza total, y se vinculó con la temperatura máxima. Se asocia a este eje principalmente el mes de mayo, y en menor medida y de manera negativa, los muestreos de junio, julio, agosto y septiembre (Fig. 7).

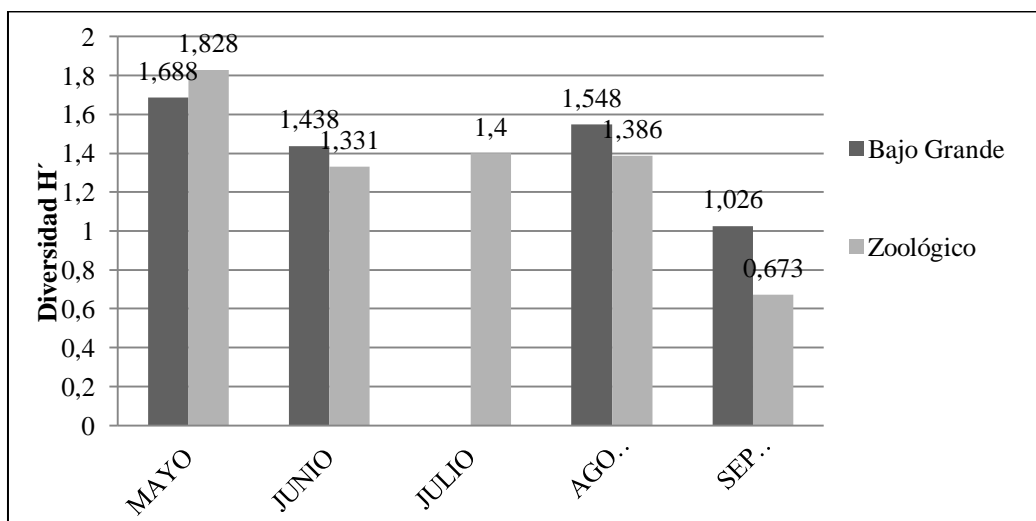


Figura 6. Diversidad de Shannon-Wiener (H') de las especies de mosquitos *Culex* por sitio de muestreo en el periodo mayo-septiembre de 2016 en la ciudad de Córdoba.

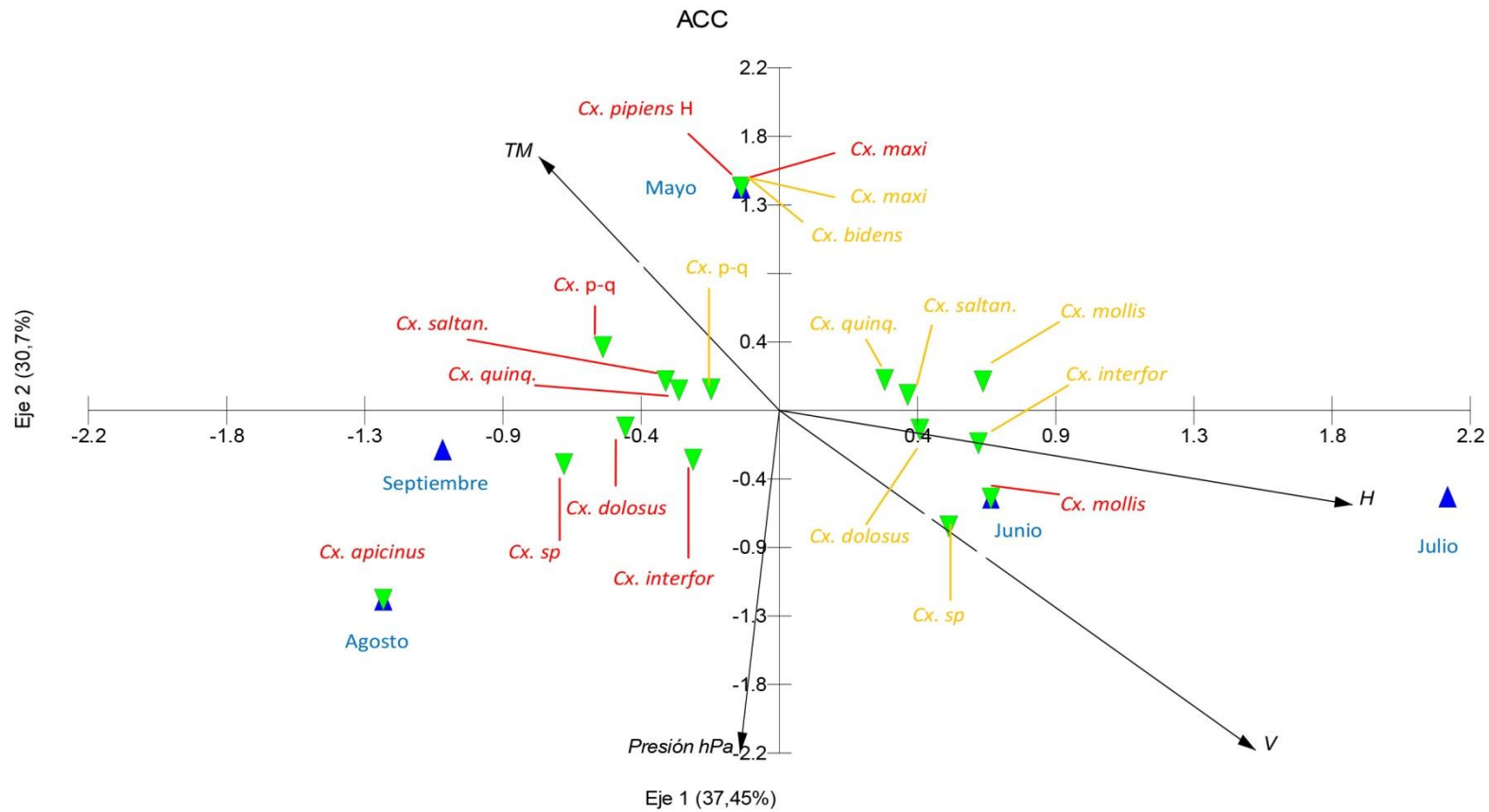


Figura 7. Análisis de correspondencias canónicas de abundancia de especies y datos meteorológicos en el periodo mayo-septiembre de 2016 en la ciudad de Córdoba. Azul: meses; Verde: especies colectadas; Rojo: especies colectadas en Bajo Grande; Naranja: especies colectadas en el Zoológico.

Disecciones y determinación de los estados de desarrollo de los folículos ováricos

Se realizaron las disecciones de 184 hembras *Culex* (*Culex*), de las cuales 58 (Tabla 6) mostraron un desarrollo folicular en estado IIIa o superior (Fig. 8). Se registraron cuatro hembras en estado G, 20 en estado Ia, 26 en estado Ib, 36 en estado IIa, 40 en estado IIb (Fig. 8A), 46 en estado IIIa (Fig. 8B), 4 en estado IIIb (Fig. 8C), ninguna en estado IVa, seis en estado IVb (Fig. 8D) y dos en estado V.

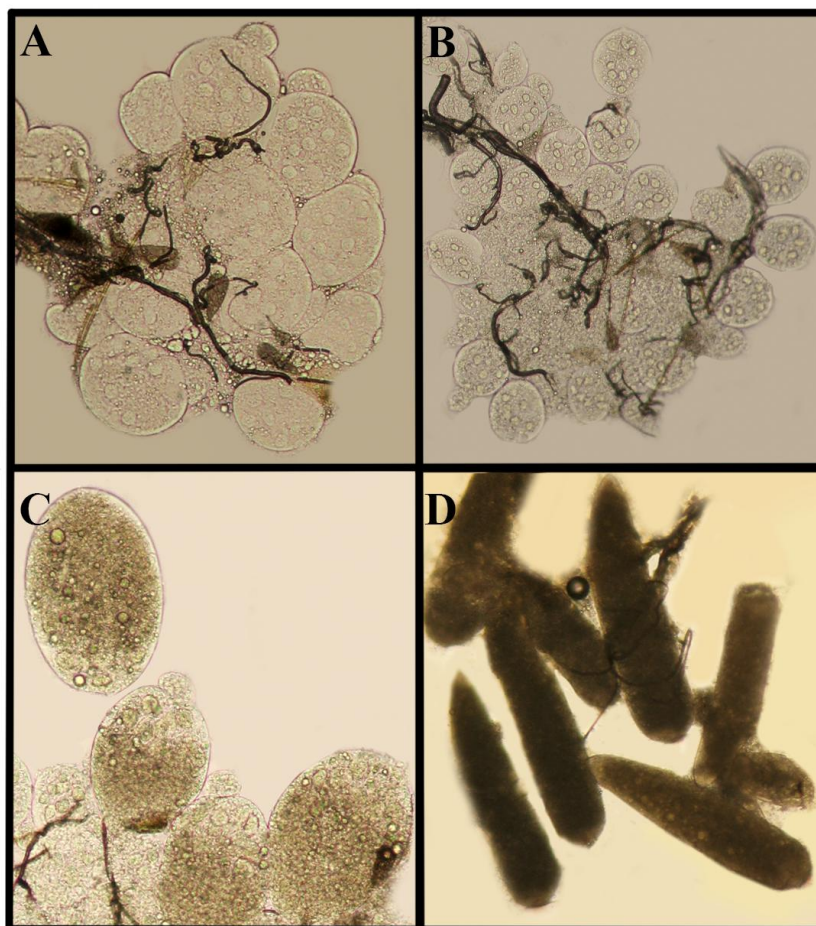


Figura 8. Estados de desarrollo de folículos ováricos, según Christophers (1911), de hembras de mosquitos *Culex* bajo microscopio óptico. A. estado IIb; B. estado IIIa; C. estado IIIb; D. estado IVb.

Identificación molecular

Se realizaron PCR para 49 muestras, 35 siguiendo la metodología de Folmer *et al.* (1994) para el fragmento CBG (Fig. 9) y 14 para el fragmento *ace-2* según Smith & Fonseca (2004) para los individuos del complejo *Cx. pipiens* (Fig. 10).

Se identificaron molecularmente 36 hembras. Se obtuvieron las secuencias *COI* de 29 hembras cuyo estado de desarrollo folicular fue igual o superior a IIIa (Tabla 6). El alineamiento de las secuencias fue trivial ya que no había evidencia de eventos de inserción/delección. Para verificar la homología e identificar las especies, se realizaron

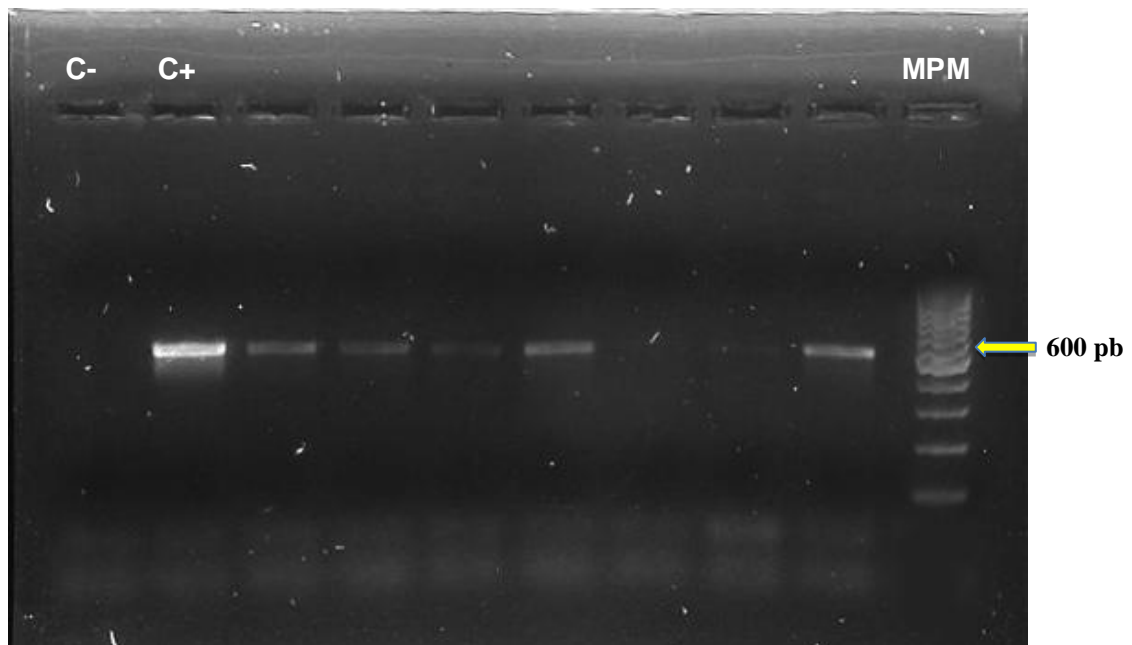


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos amplificados por PCR del fragmento código de barras genético del gen *COI*. Carriles 1-2: control negativo (C-) y positivo (C+), respectivamente; carriles 3-6 y 9: muestras amplificadas; carriles 7-8: muestras no amplificadas; carril 10: marcador de peso molecular (100 pb - MPM).

comparaciones de las secuencias obtenidas con las disponibles en GenBank mediante la herramienta BLAST. De los 29 especímenes secuenciados, el 82,76% (24 individuos) fue identificado exitosamente de acuerdo al BCM (Tabla 7) y el 17,24% (cinco individuos), de manera ambigua (Tabla 7). Los individuos identificados mediante la genotipificación del fragmento del gen *ace-2* fueron siete (Tabla 6), seis *Cx. quinquefasciatus* y un *Cx. pipiens* híbrido. Las otras siete muestras, identificadas morfológicamente como del complejo *Cx. pipiens*, no pudieron ser amplificadas, por lo que permanecieron como tal.

Debido a que la identificación de todas las hembras que morfológicamente resultaron *Cx. dolosus* fueron confirmadas molecularmente, se prescindió de la secuenciación de las últimas nueve (Tabla 6). La mayoría de los individuos sometidos a análisis molecular pudieron ser identificados, a excepción de seis con los que solo se llegó hasta subgénero *Culex* y aparecen como *Cx. sp.* (Tabla 6).

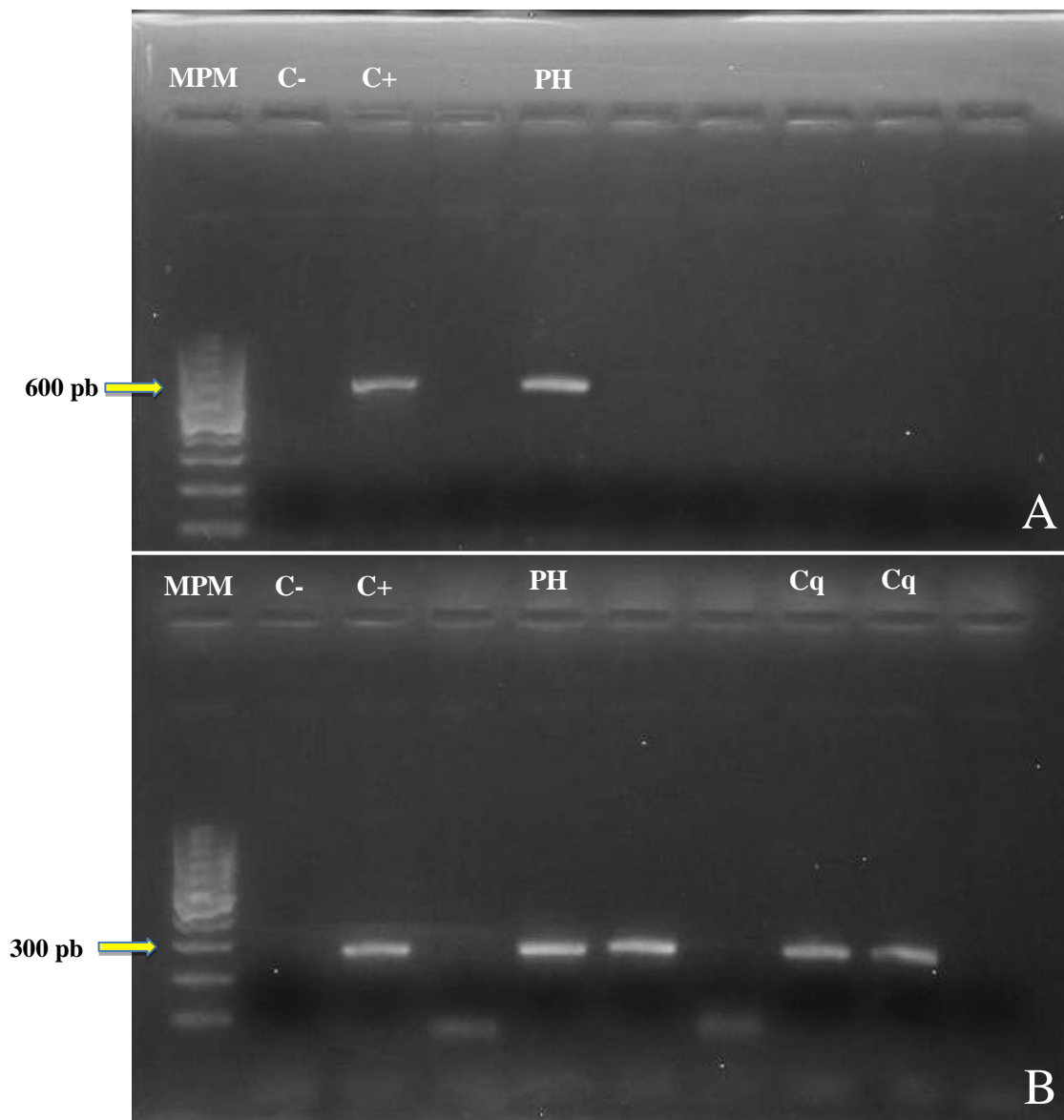


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos amplificados por PCR del segundo intrón del gen *ace-2*. A. Productos de amplificación por PCR utilizando el cebador ACEp. Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb - MPM); carriles 2-3: control negativo (C-) y positivo (C+), respectivamente; carriles 4,6-10: muestras no amplificadas; carril 5: muestra amplificada. B. Productos de amplificación por PCR utilizando el cebador ACEq. Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb - MPM); carriles 2-3: control negativo (C-) y positivo (C+), respectivamente; carriles 4,7,10: muestras no amplificadas; carriles 5-6,8-9: muestras amplificadas. PH: *Cx. pipiens* híbrido, Cq: *Cx. quinquefasciatus*.

Tabla 6. Especies de mosquitos *Culex* con estado de desarrollo folicular de IIIa en adelante, por mes y sitio de colecta y su metodología de identificación, en el periodo mayo-septiembre de 2016, en la ciudad de Córdoba.

Especie	Estado	Mes	Sitio	Identificación
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-04	IIIa	Mayo	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-05	IVb	Mayo	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-06	IIIa	Mayo	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-12	IIIa	Mayo	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-14	V	Mayo	BG	<i>COI</i>

<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-23	IIIa	Mayo	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-27	IIIa	Mayo	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-30	IIIa	Mayo	BG	M
<i>Cx. maxi</i> Cba-16-18	IIIa	Mayo	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. pipiens híbrido</i> Cba-16-01	IVb	Mayo	BG	<i>ace-2</i>
<i>Cx. quinquefasciatus</i> Cba-16-08	IIIa	Mayo	BG	<i>ace-2</i>
Complejo <i>Cx. pipiens</i> Cba-16-22	IIIa	Mayo	BG	M
Complejo <i>Cx. pipiens</i> Cba-16-26	IIIa	Mayo	BG	M
<i>Cx. sp</i> Cba-16-07	IIIa	Mayo	BG	M
<i>Cx. bidens</i> Cba-16-56	IIIa	Mayo	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-51	IIIa	Mayo	Z	M
<i>Cx. interfor</i> Cba-16-59	IIIa	Mayo	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. maxi</i> Cba-16-33	IIIb	Mayo	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. maxi</i> Cba-16-49	IIIb	Mayo	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. maxi</i> Cba-16-52	IIIa	Mayo	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. maxi-coronator</i> Cba-16-41	IIIa	Mayo	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. quinquefasciatus</i> Cba-16-44	IIIa	Mayo	Z	<i>ace-2</i>
<i>Cx. quinquefasciatus</i> Cba-16-54	IIIb	Mayo	Z	<i>ace-2</i>
<i>Cx. saltanensis</i> Cba-16-35	IIIa	Mayo	Z	<i>COI</i>
Complejo <i>Cx. pipiens</i> Cba-16-46	IIIa	Mayo	Z	M
Complejo <i>Cx. pipiens</i> Cba-16-53	IIIa	Mayo	Z	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-64	IIIa	Junio	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-69	IIIa	Junio	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-75	IVb	Junio	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. quinquefasciatus</i> Cba-16-80	V	Junio	BG	<i>ace-2</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-106	IIIa	Junio	Z	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-109	IIIa	Junio	Z	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-115	IIIa	Junio	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-126	IIIa	Junio	Z	<i>COI</i>
Complejo <i>Cx. pipiens</i> Cba-16-123	IIIa	Junio	Z	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-152	IIIa	Julio	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. maxi</i> Cba-16-142	IIIb	Julio	Z	<i>COI</i>
<i>Cx. sp</i> Cba-16-150	IIIa	Julio	Z	M
<i>Cx. apicinus</i> Cba-16-175	IIIa	Agosto	BG	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-164	IIIa	Agosto	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-169	IIIa	Agosto	BG	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-170	IIIa	Agosto	BG	M
Complejo <i>Cx. pipiens</i> Cba-16-163	IIIa	Agosto	BG	M
<i>Cx. sp</i> Cba-16-161	IIIa	Agosto	BG	M
<i>Cx. sp</i> Cba-16-162	IIIa	Agosto	BG	M
<i>Cx. sp</i> Cba-16-166	IVb	Agosto	BG	M
Complejo <i>Cx. pipiens</i> Cba-16-179	IVb	Agosto	Z	M
<i>Cx. sp</i> Cba-16-177	IIIa	Agosto	Z	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-190	IIIa	Septiembre	BG	<i>COI</i>
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-191	IIIa	Septiembre	BG	<i>COI</i>

<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-194	IIIa	Septiembre	BG	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-202	IIIa	Septiembre	BG	COI
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-206	IIIa	Septiembre	BG	COI
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-209	IIIa	Septiembre	BG	COI
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-211	IIIa	Septiembre	BG	M
<i>Cx. dolosus</i> Cba-16-212	IIIa	Septiembre	BG	COI
<i>Cx. quinquefasciatus</i> Cba-16-196	IIIa	Septiembre	BG	ace-2
<i>Cx. quinquefasciatus</i> Cba-16-214	IVb	Septiembre	BG	ace-2

ace-2: segundo intrón del gen acetilcolinesterasa-2; BG: Bajo Grande; COI: cotocromo *c* oxidasa subunidad I; M: identificación morfológica; Z: Zoológico.

Tabla 7. Identificación de especies de mosquitos *Culex* basada en *best close match* utilizando secuencias del gen citocromo *c* oxidasa subunidad I.

Muestra	Identificación	Resultado
<i>Cx. bidens</i> Cba 16-56	<i>Cx. bidens</i> 15-01 XY581211	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-04	<i>Cx. dolosus</i> 16-14 y dos más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-05	<i>Cx. dolosus</i> 16-126 y 15 más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-06	<i>Cx. dolosus</i> 16-212	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-115	<i>Cx. dolosus</i> 16-202	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-12	<i>Cx. dolosus</i> 16-126 y 9 más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-126	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y 11 de otra especie	A
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-14	<i>Cx. dolosus</i> 16-04 y dos más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-152	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y 12 de otra especie	A
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-164	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y dos más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-190	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y 12 de diferente especie	A
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-191	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y 15 más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-202	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y 11 de otra especie	A
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-206	<i>Cx. dolosus</i> 16-16	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-212	<i>Cx. dolosus</i> 16-16	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-23	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y 15 más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-27	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y cinco más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-64	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y 11 más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-69	<i>Cx. dolosus</i> 16-06	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-75	<i>Cx. dolosus</i> 16-05 y 15 más	E
<i>Cx. dolosus</i> Cba 16-209	<i>Cx. dolosus</i> 16-69	E
<i>Cx. maxi</i> Cba 16-142	<i>Cx. maxi</i> 16-33	E
<i>Cx. maxi</i> Cba 16-18	<i>Cx. maxi</i> 16-142	E
<i>Cx. maxi</i> Cba 16-33	<i>Cx. maxi</i> KF919226	E
<i>Cx. maxi</i> Cba 16-41	<i>Cx. maxi</i> KF919226 y <i>Cx. coronator</i> KF919209	A
<i>Cx. maxi</i> Cba 16-49	<i>Cx. maxi</i> Cba 16-33	E
<i>Cx. maxi</i> Cba 16-52	<i>Cx. maxi</i> KF919226	E
<i>Cx. interfor</i> Cba 16-59	<i>Cx. interfor</i> KY581246 y tres más	E
<i>Cx. saltanensis</i> Cba 16-35	<i>Cx. saltanensis</i> KF919232	E

E: identificación exitosa, A: identificación ambigua.

Discusión

El estudio de la composición de la comunidad de mosquitos de la ciudad de Córdoba se ha llevado a cabo desde 2001 y la relación de ésta con la actividad de arbovirus también está bien documentada (Díaz *et al.* 2003, Bornancini 2012, Batallán 2013, Álvarez 2014). Dichos estudios se han concentrado en la época favorable para la proliferación de las especies de la comunidad, es decir, desde la primavera, el verano, hasta principios del otoño. Pero en un área templada como la ciudad de Córdoba, donde la endemicidad de ciertos arbovirus como el VSLE y la circulación de otros como VWN ha sido demostrada, indagar sobre esta comunidad en la época desfavorable es de vital importancia para tomar medidas previamente a que las poblaciones de mosquitos alcancen picos de abundancia y que se sucedan brotes epidémicos. El conocimiento de la biología de las especies de mosquitos es importante a nivel local, ya que pueden adoptar diferentes estrategias para sobrepasar la temporada desfavorable del año (Nelms *et al.* 2013). Es por ello que el presente trabajo busca aportar información referida a la biología invernal de la comunidad de mosquitos del subgénero *Culex* de la ciudad de Córdoba.

De las 20 especies de mosquitos registradas para la ciudad de Córdoba (Pires *et al.* 2009) incluidas en diversos géneros, se colectaron nueve especies y todas del subgénero *Culex*: *Cx. apicinus*, *Cx. bidens*, *Cx. dolosus*, *Cx. interfor*, *Cx. mollis*, *Cx. maxi*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* híbrido y *Cx. saltanensis*, con diferencias importantes en sus abundancias relativas. Esto representa el 61,5% de las especies de la comunidad de *Culex* (*Culex*) registradas históricamente para la ciudad. La ausencia de ciertas especies de la comunidad podría deberse a: 1, que se encontraban en diapausa al momento de los muestreos; 2, que se encontraban en una baja abundancia y no fueron capturadas por azar; o 3, que en la época desfavorable algunas especies sufren extinciones locales, y cuando las condiciones son propicias recolonizan la zona. Respecto a las especies que resultaron raras y eventuales, su baja abundancia podría deberse a las mismas causas que para las especies no registradas, o a que no son miembros permanentes del ensamble y puede que no tengan poblaciones autosustentables en el área (Gaston 1994).

La supervivencia de las poblaciones que constituyen una comunidad determinada depende de la capacidad de los individuos para sobrevivir en las condiciones ambientales donde se desarrollan. Es relevante conocer estas capacidades ya que los factores climáticos influyen en la ecología, desarrollo, comportamiento y

supervivencia de vectores y huéspedes y en la dinámica de transmisión de enfermedades (Gubler *et al.* 2001). En Brasil, Forattini *et al.* (1968) y Guimarães *et al.* (2000) reportaron que las variaciones de la temperatura y la humedad relativa influenciaban directamente la abundancia de mosquitos, pudiendo desaparecer durante los meses secos. En zonas templadas, los cambios en las variables meteorológicas debido a la estacionalidad tienen efecto en la abundancia y la composición de las comunidades, generando fluctuaciones a lo largo del año, e incluso dentro de las diferentes temporadas.

La riqueza de la comunidad estudiada obtuvo su mayor valor en el mes de mayo, coincidente con lo descrito por Bornancini (2012) para el otoño del año 2012 en la ciudad de Córdoba. Esto fue evidente en el estudio general de la ciudad y en los dos sitios de muestreo por separado. El mes de mayo ha sido relacionado positivamente con la temperatura máxima en el ACC, un factor determinante en actividad de los mosquitos (Clements 1999), y así también en la abundancia y riqueza de especies colectadas. Por el contrario, la riqueza fue mínima en julio y septiembre, lo cual podría explicarse por la correlación negativa de septiembre con la temperatura máxima, y la correlación positiva de julio con la velocidad del viento, siendo éste último un factor determinante en la actividad de los mosquitos y por ende en su colecta (Service 1993). Además, el viento pudo ser decisivo a la hora de la colecta de individuos en julio, cuando se obtuvieron los menores valores de abundancia. Aunque junio y julio se correlacionaron de manera similar a las variables climáticas, junio presentó la mayor abundancia y julio la menor, la causa de este patrón sería el reflejo de las condiciones del mes anterior en la comunidad (mayo se correlacionó positivamente con la temperatura máxima y negativamente con el viento, mientras que junio lo hizo de manera contraria).

La diversidad de Shannon-Wiener presentó el valor más alto en el mes de mayo, hecho que también podría atribuirse a la correlación positiva del mes con la temperatura máxima. Además podría tener relación con la humedad, a pesar de que mayo se correlacionó negativamente con dicho factor. En el mes de mayo también se obtuvo el menor valor de dominancia, índice que se relaciona inversamente con el de diversidad, lo que se puede explicar por la influencia de la temperatura máxima. La diversidad fue mínima en septiembre, mes que presentó una correlación negativa tanto con la humedad como con la temperatura máxima. Por otra parte este mes exhibió el mayor valor de dominancia, lo que podría deberse a los mismos factores determinantes de la baja diversidad.

Si bien las variables ambientales consideradas fueron las registradas para la ciudad de Córdoba, las especies colectadas se agruparon según el sitio de muestreo en el ACC. Esto se explicaría por variables intrínsecas a cada sitio que operarían a menor escala como la vegetación, la heterogeneidad ambiental, la disponibilidad de abrigo, sitios de oviposición, entre otros, determinando el patrón de distribución.

El haber colectado hembras en situación de búsqueda de huésped (ya que el atrayente de la trampa es principalmente el dióxido de carbono) para realizar una alimentación sanguínea con estados foliculares avanzados, se explicaría mediante el fenómeno conocido como discordancia gonotrófica (Swellengrebel 1929). Aunque las mismas se hayan alimentado de sangre para llegar a dichos estados, podrían continuar con el comportamiento de búsqueda de huésped si una sola ingesta no fuera suficiente para el desarrollo completo de una tanda de huevos. Este fenómeno fue documentado por Briegel & Hörler (1993) en especies de *Anopheles* que presentaron ingestas múltiples para desarrollar sus huevos, además de mejorar sus reservas y aumentar su fecundidad. La alimentación múltiple también fue evidenciada para *Cx. tarsalis* en Washington, EEUU, donde el 43% de la población presentaba este patrón de actividad (Bang & Reeves 1942). Otra especie en la que se registró este comportamiento fue *Aedes albifasciatus* en la Laguna Mar Chiquita, Córdoba, Argentina (Visintin *et al.* 2004).

Las especies incriminadas como vectores primario y secundario del VSLE, *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor* (Díaz *et al.* 2006), han sido registradas en todos los meses de muestreo y fueron las de mayor IAE, después de *Cx. dolosus*. Las tres especies resultaron eudominantes, tanto en el análisis general de la comunidad como en los realizados por sitio de muestreo. A pesar de que los individuos *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. interfor* con estados foliculares avanzadas fueron poco abundantes, su presencia soporta la hipótesis de que el virus podría sobrevivir durante la época desfavorable del año en las hembras infectadas que logran atravesarla (Monath 1980) o mediante la transmisión transovárica en el caso de *Cx. quinquefasciatus* (Flores *et al.* 2010). Debido a que *Cx. quinquefasciatus* es vector del VWN en otras regiones del mundo (Molaei *et al.* 2007), es de vital importancia determinar el rol que cumple la especie en el ciclo del virus en nuestro país. La mayor abundancia de *Cx. quinquefasciatus* en el Zoológico y de *Cx. interfor* en Bajo Grande, se corresponde con lo expuesto por Batallán *et al.* (2015) respecto a la asociación de estas especies con ambientes urbanizados y sub-urbanizados, respectivamente. La abundancia decreciente de *Cx. quinquefasciatus* en el

periodo de muestreo continúa con la tendencia hallada por Bornancini (2012) desde marzo a mayo. En cambio *Cx. interfor* no sigue el decrecimiento presentado hasta mayo documentado por Bornancini (2012), sino que presenta dos picos de abundancia, el primero en junio y el segundo en agosto. La constancia de *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. dolosus* y *Cx. interfor* durante la temporada otoño-invierno confirma su categoría de especies homodinámicas, lo cual ya había sido afirmado para las dos primeras especies por Almirón & Brewer (1995).

Las diferencias eco-fisiológicas de las especies del complejo *Cx. pipiens*, como la ornitofilia por parte de *Cx. pipiens* y la preferencia variable entre mamíferos y aves de *Cx. quinquefasciatus*, entre otras, pueden afectar su efectividad en la transmisión de patógenos (Cardo *et al.* 2016). Éstas diferencias a su vez dan importancia epidemiológica a los híbridos de dichas especies, debido a la sospecha de que se alimentan tanto de aves como de mamíferos, pudiendo ser “vectores puente” (*bridge vectors*) (Díaz-Badillo *et al.* 2011) entre aves infectadas y humanos. Entre los individuos hallados en el presente estudio con estados de desarrollo folicular avanzado, se identificó uno como *Cx. pipiens* híbrido quedando otros identificados como del complejo *Cx. pipiens*, es decir que se podría estar subestimando la abundancia de los híbridos. El hallazgo es de todas maneras relevante debido al periodo del año en el que se efectuaron las colectas.

Se ha documentado la actividad de *Cx. dolosus* a lo largo de todo el año en Córdoba (Almirón & Brewer 1995), pero no hay registros de su actividad reproductiva durante el invierno en la ciudad de Córdoba. Esta especie ha sido la más abundante durante el periodo de muestreo, y la que aportó más individuos con estados foliculares avanzados. Presentó un pico en su abundancia en el mes de junio aportando en gran medida al crecimiento de la población, en concordancia con lo registrado entre marzo y julio por Maciá *et al.* (1997) en Buenos Aires, seguido por un descenso y un nuevo aumento en la misma en septiembre. Sería clave llevar a cabo estudios de preferencia de huéspedes y de competencia vectorial para evaluar si esta especie cumpliría algún rol en el mantenimiento y/o transmisión del VSLE en la ciudad de Córdoba. Dado que la mayoría de las especies de *Culex* son ornitófilas y a pesar de que nunca se ha encontrado a *Cx. dolosus* infectada naturalmente con algún arbovirus, esta especie podría “favorecer” el *overwintering* del virus el cual llegaría a sus huéspedes aviares en la primavera y así, a otras especies de mosquitos de reconocida importancia sanitaria cuando sus poblaciones se han recuperado al mejorar las condiciones ambientales.

Las herramientas moleculares han sido de gran utilidad para este trabajo, siendo la metodología que utiliza el CBG del gen *COI* la más efectiva, con un 82,76% de las especies identificadas exitosamente, en comparación a la metodología propuesta por Smith & Fonseca (2004), con la cual sólo se pudo llegar a la identificación específica del 50% de los individuos sometidos a la misma. Los casos en los que la identificación no se pudo llevar a cabo podrían deberse a eventualidades en la etapa de extracción del material genético.

Como se ha evidenciado tanto en este como en otros estudios, los individuos de la comunidad de *Culex* (*Culex*) de la ciudad de Córdoba se mantienen al menos en estado adulto durante la temporada invernal llegando satisfactoriamente a la época favorable. Además, muchas especies de la comunidad mostraron indicios de seguir activas reproductivamente en ese periodo. La importancia epidemiológica de las especies de este subgénero y la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales desfavorables lo hace objeto de futuros estudios para determinar su potencial rol en el mantenimiento de virus a lo largo del año.

Bibliografía

- Almirón WR & Brewer ME. (1995) Distribución estacional de Culicidae (Diptera) en áreas periféricas de Córdoba (Argentina). *Ecología Austral*, 5(1): 81-86.
- Almirón WR & Brewer ME. (1996) Winter biology of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, (Diptera: Culicidae) from Córdoba, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(5): 649-654.
- Almirón WR, Díaz A, Spissanti L, Ré V, Visintin AM, Farías A & Contigiani M. (2006) *Culex pipiens quinquefasciatus* y su relación con la encefalitis de San Luis en Córdoba, Argentina. *Reunión Argentina de Zoonosis III*, 1: 24-27.
- Álvarez CN. (2014) Distribución espacio-temporal de la comunidad de Culicidae (Diptera) en la ciudad de Córdoba y su relación con *Flavivirus* (*Flaviviridae*). Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Bang FB & Reeves WC. (1942) Mosquitoes and encephalitis in the Yakima Valley, Washington. III. Feeding habits of *Culex tarsalis* Coq., a mosquito host of the viruses of Western equine and St. Louis encephalitis. *Journal of Infectious Diseases*, 70: 273-274.

- Batallán GP. (2013). Bionomía de *Culex interfor* (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Córdoba Argentina. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Batallán GP, Estallo EL, Flores FS, Sartor P, Contigiani MS & Almirón WR. (2015) St. Louis Encephalitis virus mosquito vectors dynamics in three different environments in relation to remotely sensed environmental conditions. *Acta Tropica*, 146: 53-59.
- Bornancini VA. (2012) Distribución espacial y temporal de la comunidad de Culicidae (Diptera) en la ciudad de Córdoba y su relación con variables ambientales derivadas de sensores remotos satelitales. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Brewer ME, Buffa L & Almirón WR. (1987) *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina. *Revista Peruana de Entomología*, 29: 69-72.
- Briegel H & Hörler E. (1993) Multiple blood meals as a reproductive strategy in *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 30(6): 975-985.
- Cabrera AJ. (1971). Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 14: 18-19.
- Cardo MV, Rubio A, Junges MT, Vezzani D & Carbajo AE. (2016) Distribution of the members of the Pipiens Assemblage in the sympatric area from Argentina: which is where and when? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(11): 676-685.
- Cardo MV, Rubio A, Junges MT, Vezzani D & Carbajo AE. (2018) Heterogeneous distribution of *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* and their hybrids along the urbanisation gradient. *Acta Tropica*, 178: 229-235.
- Cardoso JC, Bicudo de Paula M, Fernandes A, Dos Santos E, Barreto de Almeida MA, Fernandes da Fonseca D & Mureb Sallum MA. (2011) Ecological aspects of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in an Atlantic forest area on the north coast of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 36 (1): 175-186.
- Christophers SR. (1911) The development of the egg follicle in anophelines. *Paludism*, 2: 73-78.
- Clements AN. (1992) *The biology of mosquitoes, vol. I. Development, nutrition and reproduction*. Chapman & Hall, London, 509 pp.
- Clements AN. (1999) *The biology of mosquitoes, vol. II. Sensory reception and behavior*. CABI publishing, Wallingford, 740 pp.

- Contigiani MS, Díaz LA & Spinsanti LI. (2016) Arbovirus. *En*: Berón CM, Campos RE, Gleiser RM, Díaz-Nieto LM, Salomón OD, Schweigmann N, editores. *Investigaciones sobre Mosquitos de Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, pp. 157-178.
- Cywinska A, Hunter FF & Hebert PDN. (2006) Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 413-424.
- Darsie RF Jr. (1985) The mosquitoes of Argentina: part I. Keys for identification of adult females and fourth stage larvae in English and Spanish (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 17: 153-253.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M & Robledo WC. (2013) InfoStat. Version 2013. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Díaz LA, Almirón WR, Ludueña-Almeida FF, Spinsanti LI & Contigiani MS. (2003) Vigilancia del virus encefalitis de San Luis y mosquitos (Diptera: Culicidae) en la provincia de Córdoba, Argentina. *Entomología y Vectores*, 10: 551-566.
- Díaz LA, Almirón WR, Ré V, Farías A, Vázquez A, Sánchez-Seco MP, Aguilar J, Spisanti LI, Königheim B, Visintin A, García J, Morales MA, Tenorio A & Contigiani MS. (2006) Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 1752-1754.
- Díaz LA, Komar N, Visintin AM, Dantur Juri MJ, Stein M, Lobo Allende R, Spinsanti LI, Königheim B, Aguilar J, Laurito M, Almirón WR & Contigiani MS. (2008) West Nile Virus in birds Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 689-691.
- Díaz LA, Albrieu Llinás G, Vázquez A, Tenorio A & Contigiani MS. (2012) Silent circulation of St. Louis Encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Córdoba, Argentina (2005). *Plos Neglected Tropical Diseases*, 6(1): e1489.
- Díaz-Badillo A, Bolling BG, Pérez-Ramírez G, Moore CG, Martínez-Muñoz JP, Padilla-Viveros AA, Camacho-Nuez M, Díaz-Pérez A, Beaty BJ & Munoz ML. (2011) The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasit Vectors*, 4: 70.
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
- Flores FS, Díaz LA, Batallán GP, Almirón WR & Contigiani MS. (2010) Vertical Transmission of St. Louis Encephalitis Virus in *Culex quinquefasciatus* (Diptera:

Culicidae) in Córdoba, Argentina. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(10): 999-1002.

●Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.

●Fontes G, Rocha EMM, Brito AC & Antunes CMF. (1998) Lymphatic filariasis in Brazilian urban area (Maceió, Alagoas). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93: 705-710.

●Forattini OP, Lopes OS & Rabello EX. (1968) Investigações sobre o comportamento de formas adultas de mosquitos silvestres no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 2: 111-173.

●Forattini OP. (2002) *Culicidologia Médica, vol. II*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 860 pp.

●Fyodorova MV, Savage HM, Lopatina JV, Bulgakova TA, Ivanitsky AV, Platonova OV & Platonov AE. (2006) Evaluation of Potential West Nile Virus Vectors in Volgograd Region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): Species Composition, Bloodmeal Host Utilization, and Virus Infection Rates of Mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 43(3): 552-563.

●Gaston KJ. (1994) *Rarity*. Chapman & Hall, London, 204 pp.

●Gotelli NJ & Colwell RK. (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology letters*, 4: 379-391.

●Greenacre M. (2008) Análisis de Correspondencias Canónico. En: La práctica del análisis de correspondencias. Edición en español, Fundación Banco Bilbao Vizcaya Argentaria, 157 pp.

●Gubler DJ, Reiter P, Ebi KL, Yap W, Nasci R & Patz JA. (2001) Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector and rodent-borne diseases. *Environmental Health Perspectives*, 109(2): 223-233.

●Guimarães AE, Pinto de Mello R, Macedo Lopes C & Gentile C. (2000) Ecology of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in areas of Serra do Mar State Park, State of São Paulo, Brazil. I- Monthly frequency and climatic factors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(1): 1-16.

●Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

- Hammer Q, Harper DAT & Ryan PD. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Versión 2.17c. Paleontología Electrónica. Disponible en: <http://folk.uio.no/ohammer/past/> (22/02/2018).
- Harbach RH. (2017) Mosquito taxonomy inventory. Disponible en: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/> (Septiembre, 2017)
- Hayes J. (1975) Seasonal changes in population structure of *Culex Papiens Quinquesciatus* Say (Diptera: Culicidae): study of an isolated population. *Journal of Medical Entomology*, 12(2): 167-178.
- Hayes J & Hsi BP. (1975) Interrelationships between selected meteorologic phenomena and immature stages of *Culex Papiens Quinquesciatus* Say: study of an isolated population. *Journal of Medical Entomology*, 12 (3): 299-308.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL & de Waard JR. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 270: 313-321.
- Hubálek Z. (2000) European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: could it be relevant for the New World? *Viral Immunology*, 13: 415-426.
- Kramer LD, Styer LM & Ebel GD. (2008) A global perspective on the epidemiology of West Nile Virus. *Annual Review of Entomology*, 53: 61-81.
- Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R & Jambulingam P. (2007) DNA Barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44: 1-7.
- Kumar S, Stecher G & Tamura K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7) 1870-1874.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, Crise B, Volpe KE, Crabtree MB, Scherret JH, Hall RA, Mackenzie JS, Cropp CB, Panigrahy B, Ostlund E, Schmitt B, Malkinson M, Banet C, Weissman J, Komar N, Savage HM, Stone W, Mcnamara TY & Gubler DJ. (1999) Origin of the West Nile Virus responsible for an outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science*, 286: 2333-2337.
- Laurito M & Almirón WR. (2013) Phylogenetic relationships of *Culex (Culex)* species (Diptera, Culicidae) from Argentina based on morphological characters. *Zootaxa*, 3652(1): 117-155.

- Laurito M, Ayala AM, Almirón WR & Gardenal CN. (2017) Molecular identification of two *Culex* (*Culex*) species of the neotropical region (Diptera: Culicidae). *Plos One*, 12(2): e0173052.
- Lumsden LL. (1958) St. Louis encephalitis in 1933. Observations on epidemiological features. *Public Health Reports*, 73(4): 340-354.
- Maciá A, García JJ & Campos RE. (1997) Variación estacional de tres especies de *Culex* (Diptera: Culicidae) y sus parásitos y patógenos en Punta Lara, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 44 (3)/45 (1): 267-275.
- Magurran AE. (1988) *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 134 pp.
- Magurran AE. (2004) *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Malden, USA, 23 pp.
- McDowell JR & Graves JE. (2002) Nuclear and mitochondrial DNA markers for specific identification of istiophorid and xiphiid billfishes. *Fishery Bulletin*, 100: 537-544.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G & Ng PK. (2006) DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55: 715-728.
- Molaei G, Andreadis TG, Armstrong PM, Bueno R Jr., Dennett JA, Real SV, Sargent C, Bala A, Randle Y, Guzman H, Travassos da Rosa A, Wuithiranyagool T & Tesh RB. (2007) Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile Virus in Harris County, Texas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(1): 73-81.
- Monath TP. (1980) Epidemiology. En: Monath TP, editor. St. Louis encephalitis. *American Public Health Association*, 239-311 pp.
- Moreno CE. (2001) *Métodos para medir la biodiversidad*. Vol I. Cytel, Orcyt UNESCO & Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA), Zaragoza.
- Morin PJ. (1999) *Community Ecology*. Blackwell Science, Inc. United Kingdom, 424 pp.
- MVSP. (2013) Multivariate Statistical Package for Windows. Version 3.22. Kovach Computing Services, Anglesey, Wales, UK.
- Nelms BM, Macedo PA, Kothera L, Savage HM & Reisen WK. (2013) Overwintering biology of *Culex* (Diptera: Culicidae) mosquitoes in the Sacramento valley of California. *Journal of Medical Entomology*, 50(4): 773-790.

- Ott AP & Carvalho GS. (2001) Comunidade de cigarrinhas (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de uma área de campo do município de Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Neotropical Entomology*, 30: 233-243.
- Pires DA, Laurito M, Almirón WR & Gleiser RM. (2009) First record of *Culex (Melanoconion) pilosus* from Córdoba city, Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25(2), 206-207.
- Pisano MB, Ré VE & Díaz LA. (2010a) Enzootic activity of Pixuna and Rio Negro Viruses (Venezuelan equine encephalitis complex) in a neotropical region of Argentina. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 10: 199-201.
- Pisano MB, Dantur MJ, Ré VE, Díaz LA, Farías F, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Almirón WR & Contigiani MS. (2010b) Cocirculation of Rio Negro Virus (RNV) and Pixuna Virus (PIXV) in Tucumán Province, Argentina. *Tropical Medicine and International Health*, 15: 865-868.
- Rachou RG. (1957) Distribuição geográfica das filariosis humanas no Brasil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, 9: 79.
- Reisen WK. (1995) Effect of temperature on *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) from the Coachella and San Joaquin valleys of California. *Journal of Medical Entomology*, 32: 636-645.
- Roberts DR & Hsi BP. (1979) An index of species abundance for use with mosquito surveillance data. *Environment Entomology* 8: 1007-1013.
- Rossi GC. (2015) Annotated checklist, distribution, and taxonomic bibliography of the mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) of Argentina. *Check List*, 11(4): 1712.
- Sabattini MS, Avilés G & Monath TP. (1998) Historical, epidemiological and ecological aspects of arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae. En: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC, Travassos da Rosa JFS, editores. *An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries*. Instituto Evandro Chagas, pp. 113-134.
- Saccone C, De Giorgi C, Gissi C, Pesole G & Reyes A. (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238: 195-209.
- Sañudo-Restrepo CP, Dincă V, Talavera G & Vila R. (2013) Biogeography and systematics of *Aricia* butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(1): 369-379.
- Savage HM, Nasci RS, White DJ, Stirling H, Oliver JA, Daniels TJ, Falco RC, Campbell S, Crans WJ, Lanciotti RS, Moore CG, Godsey MS, Gottfried KL & Mitchell

- CJ. (2000) West Nile virus isolates from mosquitoes in New York and New Jersey, 1999. *Emerging Infectious Diseases*, 7(4): 626-630.
- Schowalter TD. (2000) *Insect Ecology*. Academic Press, San Diego, California, USA.
 - Scorza JV. (1972) Observaciones bionómicas sobre *Culex pipiens fatigans* Wied, 1829 de Venezuela. Universidad De Los Andes, Mérida, 198 pp.
 - Service MW. (1993) *Ecology field sampling methods*. Chapman & Hall, London, 988 pp.
 - Silver JB. (2008) *Mosquito Ecology: Field Sampling Techniques*. 3rd Ed. Springer, Dordrecht.
 - Smith JL & Fonseca DM. (2004) Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(4): 339-345.
 - Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW & Paul JH. (1940) A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 20: 471-492.
 - Spielman A & Wong J. (1973). Studies on autogeny in natural populations of *Culex pipiens*. III. Midsummer preparation for hibernation in anautogenous populations. *Journal of Medical Entomology*, 10: 319-24.
 - Spinsanti LI, Díaz LA & Contigiani MS. (2009) Eco-epidemiología del virus encefalitis St. Louis en Córdoba. Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 66: 52-59.
 - Swellengrebel NH. (1929) La dissociation des fonctions sexuelles et nutritive (dissociation gonotrophique) d' *Anopheles maculipennis* comme cause du paludisme dans les pays-bas et ses rapports avec "l'infection domiciliaire". *Annales De l'Institut Pasteur*, 43: 1370-1389.
 - Tutiempo Network SL. (2018) Disponible en: <https://www.tutiempo.net>. (Marzo, 2018).
 - Vinogradova EB. (2000) *Culex pipiens pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control*, Pensoft, Bulgaria, 82 pp.
 - Visintin AM, Almirón WR & Ludueña-Almeida FF. (2004) Fecundity of *Ochlerotatus albifasciatus* from Córdoba, Argentina. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20(4): 357-364.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Córdoba, libre y gratuita, que me abrió las puertas para estudiar una carrera de grado y ser profesional. Al IIByT, por haberme brindado un lugar donde realizar la tesina, y FONCyT y CONICET por los subsidios que se utilizaron para llevarla a cabo.

A Magdalena Laurito y Andrés Visintin, quienes me acompañaron en cada paso de la tesina enseñándome y guiándome con mucha pasión y paciencia. Hicieron de la tesina un viaje lindo de recorrer.

A Luciana Caeiro por la ayuda brindada en el laboratorio, y a Diego Arias por sus indicaciones y proporcionarnos los kits.

A los miembros del tribunal evaluador por sus comentarios y correcciones, con los que se mejoró este trabajo.

A mi familia, incondicional y siempre a mi lado dándome amor y fuerzas para seguir adelante. A mi hermano Agustín, por incontables bancadas y la indispensable compañía de todos los días. A mis padres, por visitarnos cada vez que podían y hacer que el hogar no se sienta lejos.

A mis amigas, las de siempre con quienes comparto mis raíces, y a las que fui “colectando” en la carrera, sin ellas nada hubiera sido tan hermoso ni simple. También a todos los compañeros con los que me crucé, me llevo de ellos recuerdos de risas, muchos mates y apuntes compartidos.

A Andrés, que estuvo en cada alegría de este trayecto para festejar, y en cada tristeza para prestarme el hombro.

Florencia.