



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología Genética y Evolución

Ecología invernal de diferentes poblaciones de *Aedes aegypti*: límite térmico
para el desarrollo y la persistencia interanual

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Gabriela Alejandra Zanotti

Directores de tesis: Dr. Raúl Ernesto Campos
Dra. Sylvia Fischer

Consejero de estudios: Dr. Nicolás Schweigmann

Lugar de trabajo: Grupo de Estudio de Mosquitos, Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales, IEGEBA-CONICET
Buenos Aires, 29 de abril de 2019

Ecología invernal de diferentes poblaciones de *Aedes aegypti*: límite térmico para el desarrollo y la persistencia interanual

Resumen

En Argentina, la distribución geográfica de *Aedes aegypti* se extiende desde el norte hasta Buenos Aires, La Pampa y Neuquén. El objetivo general en el cual se enmarca la tesis es estudiar los mecanismos que favorecen y/o impiden la expansión del rango de distribución y el incremento de las abundancias de *Aedes aegypti* en la región templada de Argentina. En el trabajo de tesis se actualizó su distribución en la provincia de Buenos Aires, y se estudió el efecto de las bajas temperaturas (entre 7,6 y 24°C), en poblaciones de Resistencia (Chaco), Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y San Bernardo (Buenos Aires). Se evaluaron: la respuesta de eclosión a temperaturas constantes; el tiempo de desarrollo hasta pupa, supervivencia y tamaño corporal del adulto, a temperaturas constantes y variables. Se halló *Ae. aegypti* en 11 nuevas localidades, siendo Villa Gesell el registro más austral en la provincia. La respuesta de eclosión, supervivencia y tiempos de desarrollo en general fueron similares entre las poblaciones estudiadas. Los resultados experimentales no reúnen suficientes evidencias para sustentar que la expansión de la distribución de *Ae. aegypti* sea consecuencia de una adaptación de las poblaciones de la región templada a temperaturas más frescas.

Palabras clave: supervivencia, tiempos de desarrollo, región templada, régimen térmico constante y variable, Buenos Aires.

Winter ecology of different populations of *Aedes aegypti*: thermal limit for development and interannual persistence

Abstract

In Argentina, the geographic distribution of *Aedes aegypti* extends from the north of the country to Buenos Aires, La Pampa and Neuquén provinces. The general objective of this thesis is to study the mechanisms that favor and / or prevent the expansion of the range of distribution and the increase of the abundances of *Aedes aegypti* in the temperate region of Argentina. In this thesis, the distribution of this species in Buenos Aires province was updated, and the effect of low temperatures (between 7.6 and 24 °C) was studied in populations of Resistencia (Chaco), Autonomous City of Buenos Aires (CABA) and San Bernardo (Buenos Aires). The hatching response at constant temperatures; the development time to pupa, survival and adult body size, at constant and variable temperatures were compared among populations. *Aedes aegypti* was detected in 11 new locations, with Villa Gesell being the southernmost record in the province. The hatching response, survival and development times in general were similar among the populations studied. The experimental results do not provide enough evidence to support that the expansion of *Ae. aegypti* is a consequence of an adaptation of the temperate region populations to cooler temperatures.

Keywords: survival, development times, temperate region, constant and variable thermal regime, Buenos Aires.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
ÁREA DE ESTUDIO.....	6
Provincia de Buenos Aires.....	7
Localidades de origen de las poblaciones de <i>Aedes aegypti</i> estudiadas.....	8
Ciudad Autónoma de Buenos Aires.....	9
San Bernardo.....	9
Resistencia.....	10
Capítulo I.....	11
Introducción.....	11
Materiales y métodos.....	14
Colecta de mosquitos inmaduros	14
Análisis de datos.....	15
Resultados.....	16
Discusión.....	22
Capítulo II.....	24
Introducción.....	24
Materiales y métodos	27
Colecta de huevos de <i>Aedes aegypti</i>	27
Experimento 1: Temperaturas constantes.....	28
Experimento 2: Temperaturas variables.....	29
Metodología común a ambos experimentos.....	29
Análisis de datos.....	31
Tiempo de desarrollo desde LI hasta pupa.....	31
Supervivencia hasta adulto.....	32
Resultados.....	32
Experimento 1: Temperaturas constantes.....	32
Tiempo de desarrollo desde Larva I hasta pupa.....	32
Supervivencia	35
Longitud de alas.....	37
Experimento 2: Temperaturas variables.....	40
Tiempo de desarrollo desde larva I hasta pupa.....	40
Supervivencia	43
Longitud de las alas.....	43
Discusión.....	44
Capítulo III.....	50

Introducción.....	50
Materiales y Métodos.....	52
Diseño experimental	54
Aclimatación a dos temperaturas constantes.....	54
Inmersión de los huevos a bajas temperaturas constantes.....	55
Análisis de datos.....	57
Discusión.....	62
DISCUSIÓN GENERAL Y PROYECCIONES FUTURAS.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los mosquitos son insectos del orden Diptera, suborden Nematocera, pertenecientes a la familia Culicidae. Se caracterizan por tener parte de su ciclo de vida en el medio acuático durante sus estados inmaduros (charcos efímeros, temporarios y permanentes, recipientes artificiales y fitotelmata) mientras que los adultos son de vida aérea. Las larvas presentan cuatro estadios larvales, son ápodas y eucéfalas, tienen piezas bucales desarrolladas, sus segmentos torácicos están fusionados y su abdomen tiene 10 segmentos; 9 visibles (el noveno fusionado al octavo) y el sifón respiratorio, excepto en anofelinos que poseen una placa espiracular. Pueden ser filtradoras, ramoneadoras o depredadoras (de otros insectos, incluyendo larvas de mosquitos). El estado de pupa tiene el cuerpo conformado por un cefalotórax globoso y un abdomen móvil provisto de paletas natatorias. A partir de las pupas emerge el adulto alado. Los adultos tienen cabeza pequeña con ojos compuestos, probóscide proyectada anteriormente, y las antenas son verticiladas en las hembras y plumosas en los machos. Tienen un protórax reducido a un par de lóbulos, mesotórax con escuto desarrollado y metatórax (muy reducido). Su abdomen está compuesto de 10 segmentos y los últimos dos presentan las estructuras genitales. Sus patas son largas y delgadas con cinco tarsómeros. Sus alas tienen escamas en ambas superficies. Además presentan dimorfismo sexual claramente notable en su tamaño corporal, antenas y en las estructuras genitales en los últimos segmentos del abdomen (Campos y Maciá, 1998). El aparato bucal de los adultos es sucto-picador, si bien ambos sexos se alimentan de jugos vegetales (Campos y Maciá, 1998; Gordon, 1922), las hembras de muchas especies (excepto la subfamilia Toxorhynchitinae), además consumen sangre, mediante la cual se inicia una cascada endócrina que conduce a la maduración de los huevos y a la oviposición (Horsfall, 1955; Klowden, 1997). Según la especie de mosquito la ingesta de sangre puede ser preferentemente de aves, mamíferos o bien de ambos (Almirón y Brewer, 1995), aunque también hay especies que se alimentan sobre anfibios y reptiles (Christophers, 1960; Cupp 2004).

La importancia epidemiológica radica en que muchas especies de mosquitos son vectores de nematodos, protozoos, virus, hongos, bacterias. La hembra puede transmitir alguno de estos parásitos o patógenos durante la picadura, ya que previamente a ingerir sangre, inocular saliva que puede estar infectada.

Las especies de mosquitos registradas en el mundo son aproximadamente 3.500 (Campos y Maciá, 1998). En la Argentina hay registradas 246 especies de mosquitos (Stein *et al.*, 2018), de las cuales dos son invasoras: *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti*.

Aedes aegypti tiene una distribución cosmopolita y si bien su origen es tropical o subtropical, hace décadas se estableció en algunos sitios de zonas templadas. Según la literatura clásica, los límites norte y sur de la distribución en el continente americano son aproximadamente hasta los paralelos 45° N y 35° S respectivamente (Christophers, 1960).

Los individuos de esta especie se dispersan activamente a muy cortas distancias (Bergero *et al.*, 2013). De modo que su principal forma de colonizar y ampliar su distribución geográfica es mediante la dispersión pasiva, lo que requiere de la intervención humana. Un medio de dispersión común de los huevos de *Ae. aegypti*, y en menor medida los demás estados inmaduros (así como también de otras especies de mosquitos), son los neumáticos con motivos de reparación y venta en distintas escalas geográficas (Reiter y Sprenger 1987, Jupp y Kemp 1992, Lounibos, 2002; Becker *et al.*, 2012). Este tipo de recipientes resulta particularmente favorable ya que además de acumular volúmenes de agua suficientes, están conformados de un material (caucho) que genera un aislamiento térmico de temperaturas extremas propiciando la postura de huevos y la posterior cría de los estados inmaduros (Ousset *et al.*, 1967). Un factor que favorece la dispersión es que los huevos son resistentes y pueden soportar largos periodos de sequía (Farnesi *et al.*, 2009), por lo que el recipiente (neumático o cualquier otro que pueda funcionar como potencial criadero) puede permanecer sin agua durante un tiempo sin afectar demasiado su supervivencia.

Existen múltiples evidencias (tanto de la genómica como de la historia epidemiológica) que concluyen que el origen de *Ae. aegypti* es africano (Powell, 2018). Ancestralmente las poblaciones de *Ae. aegypti* eran silvestres y sus hábitats larvales eran los huecos de los árboles, esta subespecie es llamada *formosus* (Lounibos, 1981). La domesticación de *Ae. aegypti* implicó el acercamiento al ser humano, al comenzar a utilizar recipientes artificiales como nuevos hábitats larvales y junto a ello la preferencia alimentaria. Se desconoce exactamente si su expansión a nivel global fue consecuencia de su domesticación o su causa (Powell y Tabachnick, 2013; Powell 2018).

La hipótesis más aceptada sobre la introducción de *Ae. aegypti* y de la fiebre amarilla, desde África hacia América, es que la misma se produjo como consecuencia de la comercialización y trata de esclavos (Bryant *et al.*, 2007), y se supone que el mosquito fue transportado en los barriles con agua para consumo durante los viajes (Powell, 2018).

En América, a inicios del siglo XX y como consecuencia de una gran epidemia de fiebre amarilla, se iniciaron programas para la erradicación de *Ae. aegypti* en diferentes países. Sin embargo la discontinuación de esos programas fue lo que probablemente favoreció su reinfestación (Camargo, 1967; Monath, 1994). Aproximadamente en 1950 ocurrió un nuevo brote de fiebre amarilla en Panamá, lo que llevó a reiniciar programas de erradicación tanto en Centro como en Sudamérica, en este caso, mediante el uso del insecticida DDT (Pinto Severo, 1955).

La erradicación de *Ae. aegypti* en Argentina fue certificada durante 1963 y su reintroducción fue registrada tan solo 20 años más tarde. Durante los siguientes años se fue reportando la presencia de esta especie en diferentes provincias hasta el centro del país. En 1997 se registró el primer caso de dengue en Salta y durante los siguientes años se registraron brotes anuales en el norte del país (Masuh, 2008). En 2007 se detectó el primer caso de dengue autóctono en la provincia de Buenos Aires (Natiello *et al.*, 2008). Durante el 2008-2009 se produjo una epidemia que según las cifras oficiales tuvo aproximadamente 26.923 casos autóctonos (Ministerio de Salud de Argentina, 2010). En 2016 se produjo una nueva epidemia de gran magnitud en la cual se reportaron más de 40.000 casos confirmados o probables autóctonos distribuidos en 15 provincias del país (Ministerio de Salud de Argentina, 2016).

Además de ser vector de dengue y fiebre amarilla, *Ae. aegypti* es también vector de otros virus de gran interés epidemiológico como chikungunya y Zika (Powell *et al.*, 2018). Su alta eficiencia como vector se debe a que, como puede picar varias veces antes de completar un ciclo gonadotrófico, las posibilidades de que una hembra se infecte (picando a un humano enfermo) y pueda transmitir el patógeno a un humano sano en el siguiente ciclo gonadotrófico, son mayores (Scott *et al.*, 1997). Otro factor relevante es que algunos patógenos pueden ser transmitidos a la progenie (transmisión vertical), cuando la hembra se infecta (Clements, 2012).

En el caso de los virus, desde que el mosquito pica a una persona enferma hasta el momento de la transmisión del patógeno, existe un tiempo llamado periodo extrínseco de incubación.

Durante este tiempo el virus, mediante diferentes mecanismos de evasión del sistema inmune del mosquito, logra replicarse y llega a las glándulas salivales. Una vez que se ha cumplido este período de incubación, cuando la hembra del mosquito vuelve a picar a otra persona, el virus puede ser inoculado. Ese período de incubación extrínseca no es fijo, sino que varía con la temperatura ambiental (Lambrechts *et al.*, 2011). En zonas templadas la interacción vector-virus

puede ser diferente a la de zonas tropicales, por esta razón, son importantes los estudios epidemiológicos en cada localidad.

Los hábitats larvales artificiales se encuentran mayoritariamente en las viviendas o depósitos (Tun Lin *et al.*, 2000; 2009) por lo que la abundancia de este mosquito suele ser mayor en zonas urbanas (Zahouli *et al.*, 2017). Si bien las hembras de *Ae. aegypti* se alimentan preferentemente de sangre humana, también se alimentan de otros mamíferos así como también de aves (Christophers, 1960).

Las hembras colocan sus huevos individualmente sobre las paredes del recipiente por encima de la superficie del agua utilizando una sustancia adhesiva (que ellas mismas liberan durante la postura) que los mantiene adheridos a las paredes internas de los recipientes (Christophers, 1960). De este modo ante un eventual aumento del volumen de agua en los recipientes, ya sea por precipitaciones o por riego, los huevos pueden quedar sumergidos completamente, lo que puede inducir su eclosión. Si bien la inmersión de los huevos podría ser suficiente para que se produzca la eclosión de una gran cantidad de ellos, también es posible que algunos eclosionen en inmersiones posteriores.

Los huevos de *Ae. aegypti* tienen características que los hace resistentes a la sequía. A medida que el embrión se va desarrollando se forma también una cutícula serosa que lo va rodeando y disminuye el flujo de agua entre el medio interno y externo al huevo (Rezende *et al.*, 2008; Vargas *et al.*, 2014). Esto facilita que los huevos puedan permanecer largos periodos en condiciones adversas tales como sequías o de bajas temperaturas (Horsfall, 1955) como ocurre en las zonas templadas durante la época invernal. Por otra parte, se sabe que en los embriones se produce una modulación metabólica de la glucosa, lo que resulta en la disminución de glucógeno y proteínas, lo que les permitirá permanecer viables hasta el momento de la eclosión (Silva *et al.*, 2018).

Existe una gran cantidad de estudios sobre *Ae. aegypti* que centran su atención en el efecto de las variables tanto abióticas como bióticas sobre el desarrollo y la supervivencia, siendo la temperatura uno de los factores más importantes.

En las zonas templadas, la actividad de oviposición de *Ae. aegypti* se detecta generalmente desde la primavera hasta finales de otoño (Eisen *et al.*, 2014), y durante este tiempo se pueden observar inmaduros y adultos. Sin embargo este periodo de actividad varía según la latitud, por ejemplo en La Plata, la actividad de oviposición se registró desde diciembre-enero hasta mayo

(Micieli *et al.*, 2006) en tanto que en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), la actividad inicia en octubre y finaliza a mediados de junio (Carbajo *et al.*, 2004).

Durante el invierno, en cambio, si bien puede haber eclosiones y eventual desarrollo hasta el estado adulto (De Majo, 2017), se asume que aquellos huevos depositados a mediados-finales del otoño permanecen en dormancia entre 3-6 meses, hasta el inicio de la primavera, cuando las temperaturas más elevadas y eventuales precipitaciones pueden inducir su eclosión.

En estudios en CABA, donde se llevaron a cabo actividades de monitoreo de *Ae. aegypti* durante 14 años, se detectó que la actividad de oviposición aumentó, lo cual sugiere la hipótesis de que luego de varios años de persistencia, esta población se adaptó a temperaturas frescas (Fischer *et al.*, 2017). Por esta razón se esperaría una continuidad en el avance de *Ae. aegypti* hacia zonas templadas situadas más al sur de la distribución conocida hasta el momento.

Teniendo en cuenta que a mayores latitudes la temporada cálida perdura menos tiempo y que las temperaturas invernales son más frescas (respecto a CABA) se esperarían dos posibles situaciones; que los huevos tuvieran una mayor inhibición de la eclosión a bajas temperaturas para evitar el desarrollo durante el período desfavorable; o bien que los estadios inmaduros tengan una mayor tolerancia a las bajas temperaturas como para poder completar el desarrollo en esas condiciones en caso de que hubieran eclosionado los huevos.

El objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos que favorecen y/o impiden la expansión del rango de distribución y el incremento de las abundancias de *Aedes aegypti* en la zona templada de Argentina. En el marco de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: actualizar la distribución geográfica de *Ae. aegypti* en el centro y en el sur de la provincia de Buenos Aires, y analizar las principales variables climáticas asociadas con dicha distribución.

Objetivo 2: estudiar en forma comparativa el éxito durante el desarrollo a bajas temperaturas entre poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de localidades ubicadas a lo largo de un gradiente de temperatura.

Objetivo 3: evaluar en forma comparativa, la respuesta a la eclosión a bajas temperaturas entre poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de localidades ubicadas a lo largo de un gradiente de temperatura.

ÁREA DE ESTUDIO

Para abordar los objetivos de esta tesis se realizaron relevamientos en la provincia de Buenos Aires, registrando la presencia/ausencia de *Aedes aegypti*, y se realizaron estudios en laboratorio con tres poblaciones de *Ae. aegypti*, una de ellas proveniente de una zona subtropical (Resistencia en la provincia de Chaco), y las otras de dos zonas templadas (San Bernardo en la provincia de Buenos Aires, y Ciudad Autónoma de Buenos Aires), (Figura 1).

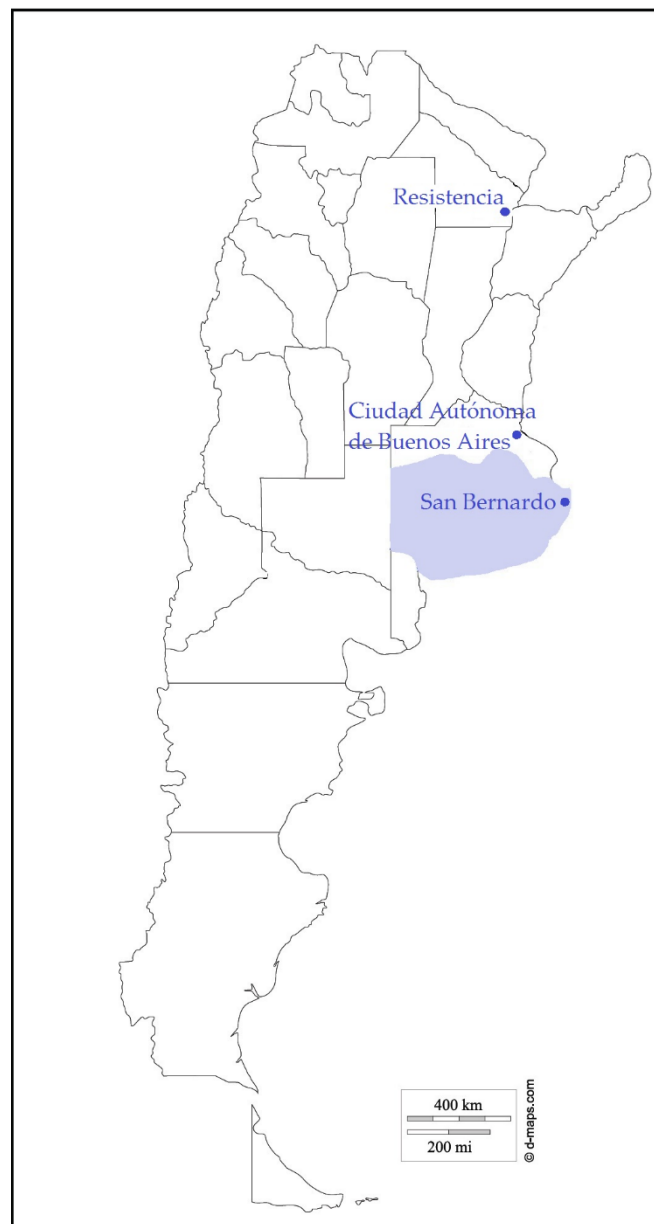


Figura 1. Mapa de la República Argentina señalando la región donde se realizaron los relevamientos en las localidades de la provincia de Buenos Aires (fondo lavanda) y las tres localidades donde se realizaron las colectas de huevos de *Aedes aegypti* (círculo azul).

A continuación se describen las características climáticas de la provincia de Buenos Aires, donde se hicieron los relevamientos correspondientes al capítulo I, y de las tres localidades donde se realizaron las colectas de ejemplares para los capítulos II y III.

Provincia de Buenos Aires

Según el censo del 2010 (INDEC 2010) , la provincia de Buenos Aires tiene un total de 15.625.084 habitantes, de los cuales 9.916.715 viven en el Gran Buenos Aires (que incluye la Ciudad Autónoma de Buenos Aires bordeada por 24 partidos) y 5.708.369 se distribuyen en el interior de la provincia.

La provincia de Buenos Aires se encuentra dentro de la región pampeana, Aliaga *et al.* (2017) se basaron en variables climáticas y topográficas; (temperatura media anual, precipitación acumulada anual, humedad relativa, velocidad del viento y altitud) para determinar el clima de la región, en particular la provincia de Buenos Aires presenta cinco subtipos climáticos (Figura 2).

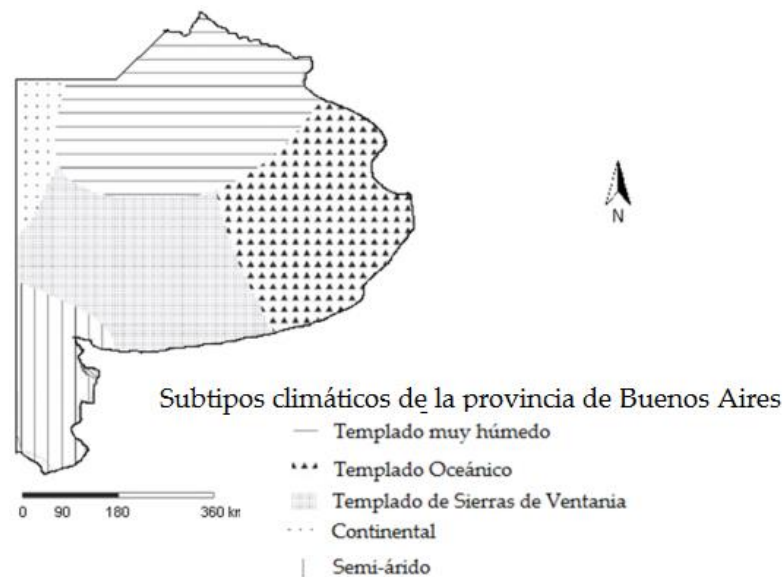


Figura 2. Caracterización de subtipos climáticos en la provincia de Buenos Aires. Mapa adaptado de Aliaga *et al.* (2017).

Templado muy húmedo: Situado en el norte-centro de la provincia. La temperatura media anual es de 17°C, la precipitación acumulada anual de 819 mm, la humedad relativa es de 69% y la velocidad del viento es de 11 km/h.

Templado oceánico: Situado en el este de la provincia. La temperatura media anual es de 17°C, la precipitación acumulada anual de 1043 mm, la humedad relativa es de 79% y la velocidad del viento es de 15 km/h.

Templado de Sierras de Ventania: Situado en el centro-suroeste de la provincia. La temperatura media anual es de 14°C, la precipitación acumulada anual de 512 mm, la humedad relativa es de 65% y la velocidad del viento es de 21 km/h.

Continental: Situado en el noroeste de la provincia. La temperatura media anual es de 15°C, la precipitación acumulada anual de 957 mm, la humedad relativa es de 79% y la velocidad del viento es de 15 km/h.

Templado semi-árido: Situado en el extremo sur de la provincia. La temperatura media anual es de 16°C, la precipitación acumulada anual de 814 mm, la humedad relativa es de 69% y la velocidad del viento es de 12 km/h.

Las localidades relevadas en la provincia de Buenos Aires se encuentran distribuidas entre los cinco subtipos climáticos. En ellas la temperatura media anual va desde los 13,4 hasta los 16,2°C y el rango de precipitación acumulada anual va desde 580 hasta 1.000 mm. Durante los meses más frescos (mayo a septiembre) el rango de temperatura media promedio es de 8,3 a 11°C, la amplitud térmica se encuentra entre 7,2 y 12,8°C y las precipitaciones acumuladas están entre los 165 y 426 mm. Durante los meses más cálidos (octubre a abril), el rango de temperatura media promedio va desde los 16,5 hasta 20,1°C, la amplitud térmica desde los 8,4 a los 15,2°C y las precipitaciones acumuladas están entre los 403 y 733 mm.

Localidades de origen de las poblaciones de *Aedes aegypti* estudiadas

Para los experimentos se utilizaron poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de localidades situadas en un gradiente climático que va desde templado oceánico (San Bernardo), pasando por templado muy húmedo (CABA), hasta subtropical (Resistencia). Los datos meteorológicos que se describen a continuación fueron tomados de la página <https://es.climate-data.org/https://es.climate-data.org/>.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires

La Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) ($34^{\circ}36'13,26''S$ y $58^{\circ}22'53,61''O$) tiene una superficie de 203 km² y cuenta con 2.890.151 habitantes (INDEC 2010). El subtipo de clima es templado muy húmedo (Aliaga *et al.*, 2017), con una temperatura media anual de 16,8°C y una precipitación acumulada anual de 1.040 mm. La temperatura media mensual se encuentra entre 10,6°C (julio) y 23,6°C (enero). La amplitud térmica tiene un mínimo de 7,7°C en el mes de junio y un máximo de 11,6°C durante el mes de enero. Durante los meses más frescos (mayo a septiembre) la temperatura media, máxima y mínima promedio es de 12°C; 16,4°C y 7,7°C, respectivamente, las precipitaciones acumuladas durante esos meses son de 331 mm. Durante los meses más cálidos (octubre a abril) la temperatura media, máxima y mínima promedio es 20,2°C; 25,4°C y 15,1°C, respectivamente y las precipitaciones acumuladas durante esos meses son de 709 mm.

San Bernardo

Es una localidad del Partido de la Costa ($36^{\circ}41'10,92''S$ y $56^{\circ}40'45,11''O$) que tiene 4,33 km² y cuenta con 8.133 habitantes (INDEC 2010). Tiene un clima del subtipo templado oceánico (Aliaga *et al.*, 2017) con una temperatura media anual de 15,1°C, y una precipitación acumulada anual de 897 mm. La temperatura media mensual se encuentra entre los 9°C (julio) y 21,6°C (enero). La amplitud térmica tiene un mínimo durante el mes de julio de 7,2°C y un máximo de 10,1°C durante el mes de enero. Durante los meses más frescos (mayo a septiembre) la temperatura media, máxima y mínima promedio es de 10,4°C; 14,2°C y 6,6°C, respectivamente, y las precipitaciones acumuladas durante esos meses son de 399 mm. Durante los meses más cálidos (octubre a abril) la temperatura media, máxima y mínima promedio es 18,5°C; 23°C y 14°C, respectivamente, y las precipitaciones acumuladas durante esos meses son de 498 mm.

Resistencia

La localidad de Resistencia ($27^{\circ}27'0.78''S$ - $58^{\circ}59'33.98''O$) tiene una superficie de 562 km² y cuenta con 290.723 habitantes (INDEC 2010). Su clima es subtropical húmedo con temperaturas altas (temperatura media anual de 21,3°C) y precipitaciones abundantes (precipitación acumulada anual de 1.324 mm). La temperatura media mensual se encuentra entre los 15,4°C (julio) y 27°C (enero). La amplitud térmica tiene un valor mínimo de 9,3°C durante el mes de junio y un valor máximo de 12,2°C durante el mes de enero. Durante los meses más frescos (mayo a septiembre) la temperatura media, máxima y mínima promedio es de 17,8°C; 22,5°C y 11,8°C, respectivamente, y las precipitaciones acumuladas durante esos meses son de 291 mm. Durante los meses más cálidos (octubre a abril) la temperatura media, máxima y mínima promedio es 24,3°C; 30°C y 18,7°C, respectivamente, y las precipitaciones acumuladas durante esos meses son de 1033 mm.

Capítulo I: Actualización de la distribución de *Aedes aegypti* en la provincia de Buenos Aires

Introducción

Luego de su erradicación, la reintroducción al país de *Aedes aegypti*, fue detectada en las provincias de Misiones y Formosa en 1986 (O.M.S., 1990). Pocos años más tarde fue hallado en otras provincias: en 1991 en la provincia de Buenos Aires (Campos, 1993); en 1992 en La Pampa (Rossi *et al.*, 2006); en 1994 en Salta, Jujuy y Tucumán (Boffi 1998a en Curto *et al.*, 2002); en 1995, en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Junín *et al.*, 1995) y en las provincias de Córdoba (Avilés *et al.*, 1997), Corrientes, Chaco, Santa Fe y Entre Ríos (Boffi 1998a, b en Curto *et al.*, 2002); en 2000 en Mendoza (Domínguez y Lagos, 2001), y en 2010 en Neuquén (Grech *et al.*, 2012).

La distribución de *Ae. aegypti* en la provincia de Buenos Aires luego de la reintroducción y hasta 1999, abarcaba desde la zona noreste de la provincia de Buenos Aires hasta Carlos Casares, en el centro-oeste de la provincia (Curto *et al.*, 2002). Por otra parte si bien no hay publicaciones científicas, existen informes de la presencia de *Ae. aegypti* en la localidad de Olavarría por parte de las autoridades municipales (Anónimo, 2012). En el año 2012 se encontró *Ae. aegypti* en la ciudad de Dolores en el marco de un relevamiento a lo largo de una transecta que conecta las ciudades de Buenos Aires y Mar del Plata (Díaz-Nieto *et al.*, 2013) (Figura 1).

Entre las variables climáticas que limitan la distribución de *Ae. aegypti*, se encuentran la temperatura y las precipitaciones (Couret y Benedict, 2014).

La temperatura tiene efectos sobre diferentes parámetros biológicos de los insectos así como también sobre factores abióticos del entorno que indirectamente pueden influir en la supervivencia. Por ejemplo, las temperaturas altas acortan la duración del desarrollo y disminuyen el tamaño corporal de *Ae. aegypti* (Mohammed y Chadee, 2011). Asimismo, las altas temperaturas pueden incrementar la velocidad de evaporación del agua de los recipientes donde se desarrollan los mosquitos, de modo que pueden tener efectos perjudiciales sobre la supervivencia de los estados inmaduros.

Si bien en general se toma en cuenta la temperatura media, la amplitud térmica también tiene efectos sobre el desarrollo de *Ae. aegypti*. Por ejemplo, si las temperaturas diarias fluctúan dentro del rango viable, el desarrollo puede verse favorecido (Carrington *et al.*, 2013). Sin embargo si las

temperaturas fluctúan fuera del rango viable, puede haber un impacto negativo sobre la supervivencia. En relación a la expansión de *Ae. aegypti* hacia nuevas regiones, esto podría ser un factor determinante en la colonización y la persistencia interanual.

También las precipitaciones tienen efecto sobre el desarrollo de *Ae. aegypti*, debido a que las hembras colocan los huevos en recipientes que acumulan agua. De este modo las precipitaciones al recargar o llenar aquellos recipientes al aire libre pueden favorecer la eclosión de los huevos y proveer las condiciones apropiadas para el desarrollo larval (Moore *et al.*, 1978, Li *et al.*, 1985).

En la zona templada de Argentina, *Ae. aegypti* presenta una actividad de oviposición activa durante fines de la primavera, verano y principios de otoño (Vezzani y Carbajo, 2008). Por ello es importante considerar las variables ambientales acotadas al periodo cálido durante el cual pueden hallarse tanto los estados inmaduros como los adultos. Así las características térmicas locales permitirían predecir si esas localidades son potencialmente adecuadas para ser colonizadas al menos temporariamente por este mosquito.

En este capítulo se plantea como objetivo actualizar la distribución geográfica de *Ae. aegypti* en el centro y en el sur de la provincia de Buenos Aires, y analizar las principales variables climáticas asociadas con dicha distribución.

Como hipótesis para este capítulo se considera que la distribución de *Ae. aegypti* se ha expandido hacia localidades del sur y centro de la provincia de Buenos Aires donde los regímenes térmicos son más frescos que donde anteriormente se había registrado su presencia.

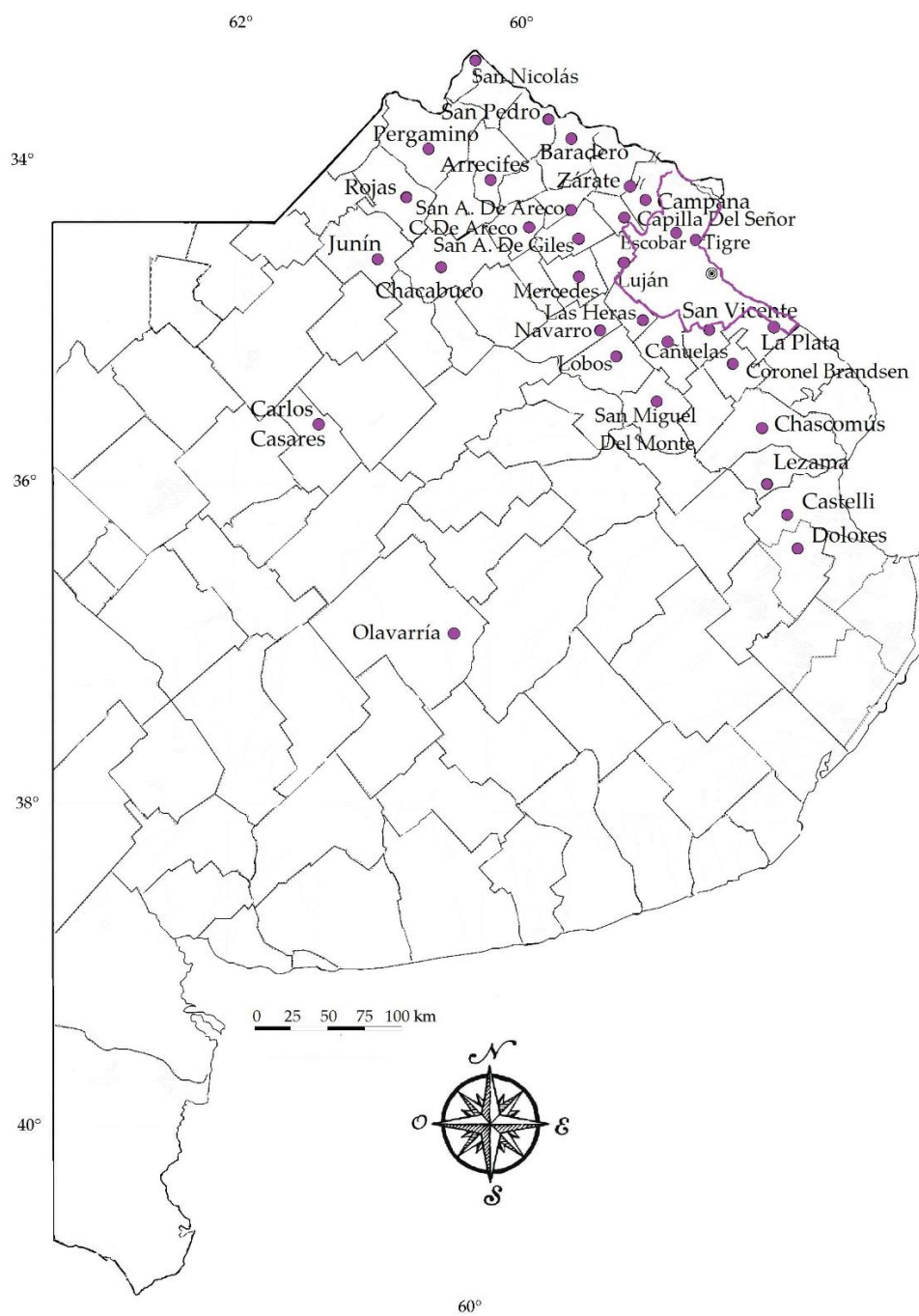


Figura 1. Detalle de la distribución (puntos violeta) de *Aedes aegypti* en la provincia de Buenos Aires hasta el año 2013. Mapa de base tomado de <http://mapoteca.educ.ar>.

Materiales y métodos

Para actualizar la distribución geográfica de *Ae. aegypti* en la provincia de Buenos Aires, se llevaron a cabo relevamientos en distintas localidades para buscar activamente ejemplares de esta especie.

El criterio de selección de las localidades para el presente estudio se basó en las siguientes características:

- 1) Respecto a su ubicación, todas las localidades se encuentran por fuera de la Región Metropolitana, a una latitud mayor de la ciudad de La Plata (excluyendo así a todas las localidades donde se conoce la presencia de *Ae. aegypti* hace más de 15 años), y llegando al sur hasta la localidad de Punta Alta.
- 2) En cuanto a sus características demográficas, todas tuvieron una población urbana mayor a 10.000 habitantes según datos del Censo Nacional de 2010 (INDEC, 2010).

Colecta de mosquitos inmaduros

Entre finales de enero y marzo de los años 2014 y 2015, se llevaron a cabo relevamientos en 34 ciudades ubicadas en el centro y sur de la provincia de Buenos Aires. Las localidades de Balcarce, Daireaux, Olavarría y Rauch fueron visitadas los dos años para maximizar las posibilidades de detección de *Ae. aegypti*.

La metodología aplicada fue la misma durante los dos años en los distintos sitios relevados. En cada localidad se examinaron depósitos de neumáticos, ya fueran gomerías o depósitos con neumáticos almacenados al aire libre (Figura 2), situados dentro de los límites urbanos, para detectar la presencia de estados inmaduros de mosquitos. En las ciudades grandes, cuando las muestras fueron negativas en el primer depósito se procedió a muestrear otros hasta un total de seis, mientras que en las ciudades pequeñas se tomaron muestras de todos los depósitos disponibles.

Se inspeccionó la cantidad máxima posible de neumáticos en cada depósito según la disponibilidad y la accesibilidad, y se tomaron muestras de algunos de ellos priorizando aquellos que a simple vista tenían *Ae. aegypti*. En algunas localidades se buscaron larvas en recipientes hallados en viviendas y estas muestras fueron consideradas en los análisis.

Las larvas se fijaron *in situ* con alcohol al 80%, y las pupas se separaron y colocaron individualmente en tubos de vidrio de 3 ml con 0,5 ml de agua, y se criaron hasta que emergieron los adultos. Las larvas y adultos se observaron bajo microscopio estereoscópico y los individuos se identificaron a nivel de género para *Culex* y de especie para *Ae. aegypti* (Darsie, 1985).



Figura 2. Relevamiento de un depósito con neumáticos en desuso y descartados en la vereda.

Análisis de datos

Para cada localidad se registró el número de sitios relevados, el número de neumáticos muestreados en cada depósito y la cantidad de muestras positivas. Además se contabilizaron los ejemplares de mosquitos inmaduros colectados tanto de *Ae. aegypti* como de otro género.

Para cada localidad se calculó la temperatura media anual a partir de las temperaturas medias mensuales, la amplitud térmica del periodo cálido calculada como el promedio de las amplitudes mensuales de los meses entre octubre y abril, la temperatura media del período cálido calculada como el promedio de las temperaturas medias entre octubre y abril, y las precipitaciones anuales acumuladas (mm) a partir de los datos obtenidos de <https://es.climate-data.org/>. El periodo cálido (octubre a abril) se determinó considerando que tanto en octubre como en abril la mayor cantidad de localidades tiene una temperatura media mensual mayor o igual a 14°C.

Se analizó si existen diferencias en la temperatura media anual, precipitación acumulada anual, temperatura media del periodo cálido y amplitud térmica del periodo cálido entre las localidades positivas y las localidades donde no fue hallado el mosquito. Este análisis se realizó por separado para cada variable climática utilizando la prueba de Wilcoxon para muestras independientes (Collings *et al.*, 1988).

Para las localidades relevadas fue graficada la precipitación acumulada en función de la temperatura media para el período anual. Además se graficó la amplitud térmica del periodo cálido en función de la temperatura media del periodo cálido. En cada uno de los gráficos las localidades relevadas fueron coloreadas según la presencia/ausencia de *Ae. aegypti*.

Resultados

En las 34 localidades relevadas, se visitaron un total de 94 sitios y se revisaron 1892 neumáticos, de los cuales 653 tuvieron larvas de mosquitos. Entre los neumáticos con larvas, 75 tuvieron inmaduros de *Ae. aegypti*. En total se colectaron 310 muestras que sumaron un total de 3693 larvas de *Culex* sp. y 626 de *Ae. aegypti* (Tabla 1).

En todas las localidades relevadas se hallaron mosquitos inmaduros del género *Culex*, excepto en las localidades de Punta Alta y Bahía Blanca, en tanto que se hallaron estados inmaduros y/o adultos de *Ae. aegypti* en 13 de las 34 localidades relevadas (Figura 3 y Tabla 1). En Dolores, si bien no se recolectaron inmaduros (debido a la inaccesibilidad de las cubiertas apiladas hasta alturas de tres metros), se hallaron adultos de *Ae. aegypti* volando. En las localidades de Balcarce, Daireaux, Olavarría y Rauch, que fueron muestreadas los dos años, no se halló *Ae. aegypti*.

Tabla 1. Localidades relevadas durante febrero marzo 2014 y enero 2015. * Ejemplar de mosquito adulto.

** Colecta en vivienda.

Ciudad	Fechas de relevamiento	Nº de sitios inspeccionados	Nº de neumáticos muestreados	Nº de neumáticos con larvas de mosquitos	Nº de neumáticos con <i>Aedes aegypti</i>	Nº de muestras colectadas	Total de larvas <i>Culex sp.</i>	Total de larvas <i>Aedes aegypti</i>	
Ayacucho	febrero 2014	3	17	7	---	7	92	---	
Azul		4	52	16	---	8	105	---	
Benito Juarez		3	47	29	---	7	62	---	
Bolivar		2	40	25	12	15	234	101	
Dolores		1	1	1	1*	1	1	1	
General Alvear		2	33	19	11	11	239	50	
General Madariaga		2	63	43	---	9	63	---	
Laprida		3	45	25	---	7	97	---	
Las Flores		2	38	19	7	14	99	33	
Miramar		1	21	14	---	3	22	---	
Necochea		2	65	50	---	7	56	---	
Roque Pérez		2	35	23	10	17	264	55	
Saladillo		2	24	21	13	12	305	282	
San Bernardo		1	15	12	11	11	71	52	
San Clemente		1	4	2	2	1	9	9	
Santa Teresita		2	10	5	2	4	43	9	
Tandil		2	58	47	---	14	127	---	
Tres Arroyos		3	65	12	---	7	49	---	
Villa Gesell		2	73	18	---	7	54	1	
Balcarce		febrero 2014	3	62	18	---	12	148	---
	abril 2014	2	22	17	---	5	41	---	
Carlos Casares	marzo 2014	2	24	9	3	3	24	12	
Pehuajó		1	6	3	2	2	28	14	
Trenque Láuquen		2	14	6	2	6	35	7	
Mar del Plata	abril 2014	1	12	2	---	1	8	---	
Daireaux	febrero 2014 enero 2015	3	27	10	---	7	107	---	
		4	36	20	---	9	107	---	
2		83	43	---	14	133	---		
2		84	17	---	11	170	---		
Olavarria		4	88	14	---	10	95	---	
		5	234	52	---	37	416	---	
Coronel Pringles		enero 2015	2	79	22	---	12	136	---
Bahía Blanca			5	65	0	---	---	---	---
Carhué	4		140	5	---	3	17	---	
Coronel Dorrego	4		43	7	---	4	87	---	
Coronel Suárez	2		63	17	---	10	120	---	
Pigüé	3		69	3	---	2	32	---	
Punta Alta	1		35	0	---	---	---	---	

Entre los nuevos hallazgos, San Bernardo es la localidad más austral en la que se hallaron inmaduros de mosquitos en un depósito. Además en Villa Gesell, pudieron hallarse inmaduros en una vasija de barro de un jardín residencial pese a que el mosquito no se había detectado en los depósitos inspeccionados.

Las ciudades de General Alvear, Las Flores, Pehuajó, Roque Pérez, Saladillo, San Bernardo, San Carlos de Bolívar, San Clemente, Santa Teresita, Trenque Lauquen y Villa Gesell constituyen nuevas localidades en donde se halló *Ae. aegypti*. La presencia de la especie en Villa Gesell, una localidad situada en la costa Atlántica, representa su registro más austral en la provincia de Buenos Aires.

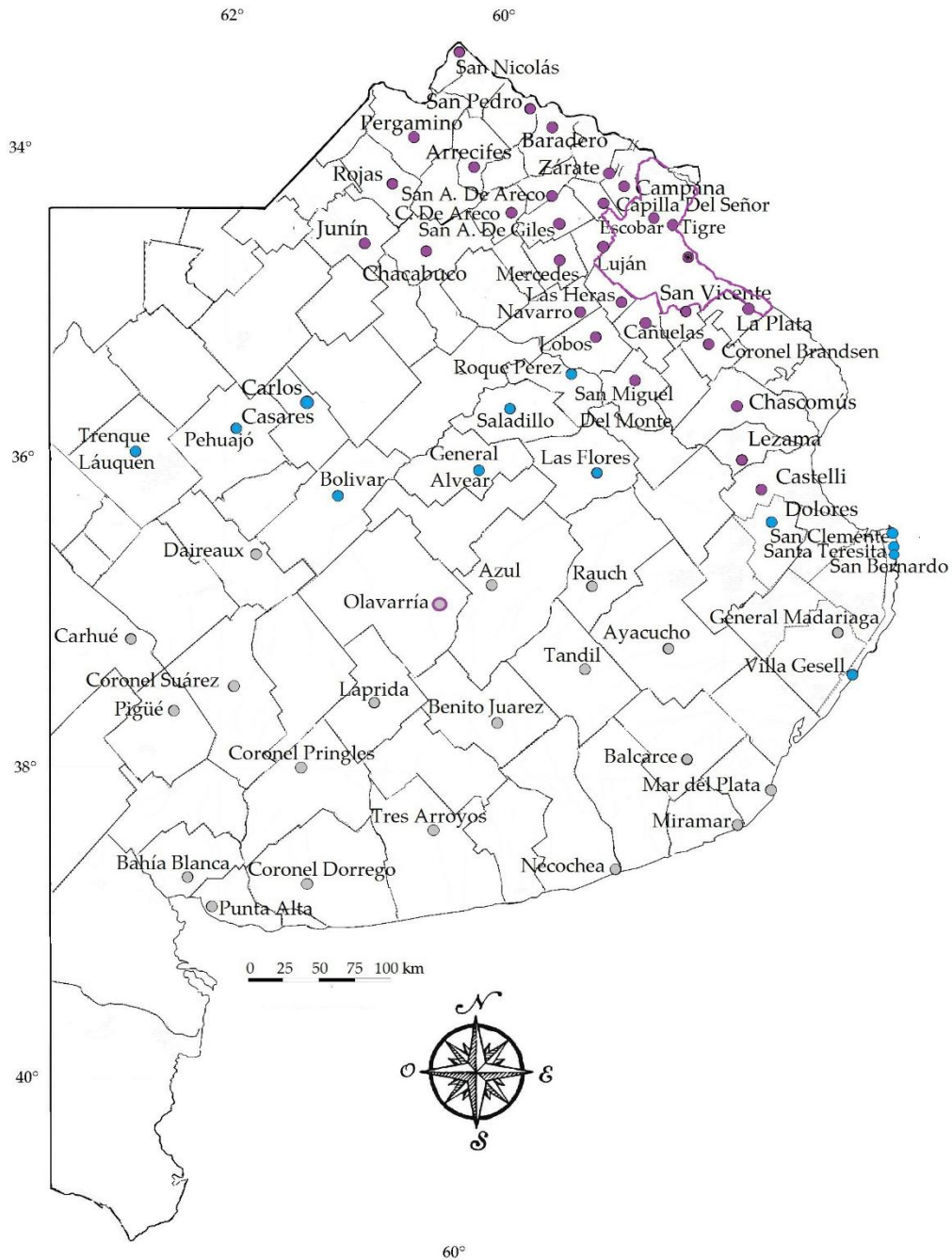


Figura 3. Mapa de la provincia de Buenos Aires. Localidades relevadas en el presente estudio durante los años 2014 y 2015: ● localidades positivas hasta el 2013; ● nuevas localidades positivas y ● negativas; ● localidad positiva hasta 2013 y negativa en 2014/2015.

Para la temperatura media anual se observaron diferencias significativas entre las localidades positivas y negativas ($p < 0,01$). Todas las localidades positivas presentan temperatura media anual superior $14,5^{\circ}\text{C}$, y algunas localidades en las que no se detectó *Ae. aegypti* también presentan temperaturas superiores a ese valor umbral.

En cuanto a las precipitaciones, se observaron diferencias significativas entre las localidades positivas y negativas ($p < 0,01$). Todas las localidades positivas tuvieron precipitaciones anuales

acumuladas por encima de los 700 mm, aunque también algunas localidades negativas mostraron precipitaciones por encima de este umbral.

En el caso de la temperatura media del periodo cálido se observaron diferencias significativas entre las localidades positivas y negativas ($p < 0,01$). Todas las localidades positivas presentan temperatura media del periodo cálido superior a $17,9^{\circ}\text{C}$, aunque también algunas localidades en las que no se detectó *Ae. aegypti* presentan temperaturas superiores a ese valor umbral.

Para la amplitud térmica media del periodo cálido no se observaron diferencias significativas entre las localidades positivas y negativas ($p = 0,8$).

Se observa mayor tendencia de localidades positivas en la combinación de la temperatura media anual y las precipitaciones anuales acumuladas (Figura 4). De las localidades que resultaron positivas, se puede observar que Trenque Lauquen tiene menor precipitación acumulada anual (700 mm) y mayor temperatura media anual ($16,3^{\circ}\text{C}$). En tanto que Villa Gesell (localidad positiva más austral) tiene una precipitación acumulada anual intermedia y menor temperatura media anual. Asimismo se observa mayor tendencia a que las localidades sean positivas al aumentar la temperatura media del periodo cálido independientemente de la amplitud térmica del periodo cálido (Figura 5). De las localidades que resultaron positivas, Villa Gesell es la de menor temperatura media ($17,9^{\circ}\text{C}$) y valores intermedios de la amplitud térmica ($10,4^{\circ}\text{C}$) para el periodo cálido. En tanto que Trenque Lauquen tiene mayor temperatura media ($20,1^{\circ}\text{C}$) y mayor amplitud térmica del periodo cálido ($14,9^{\circ}\text{C}$).

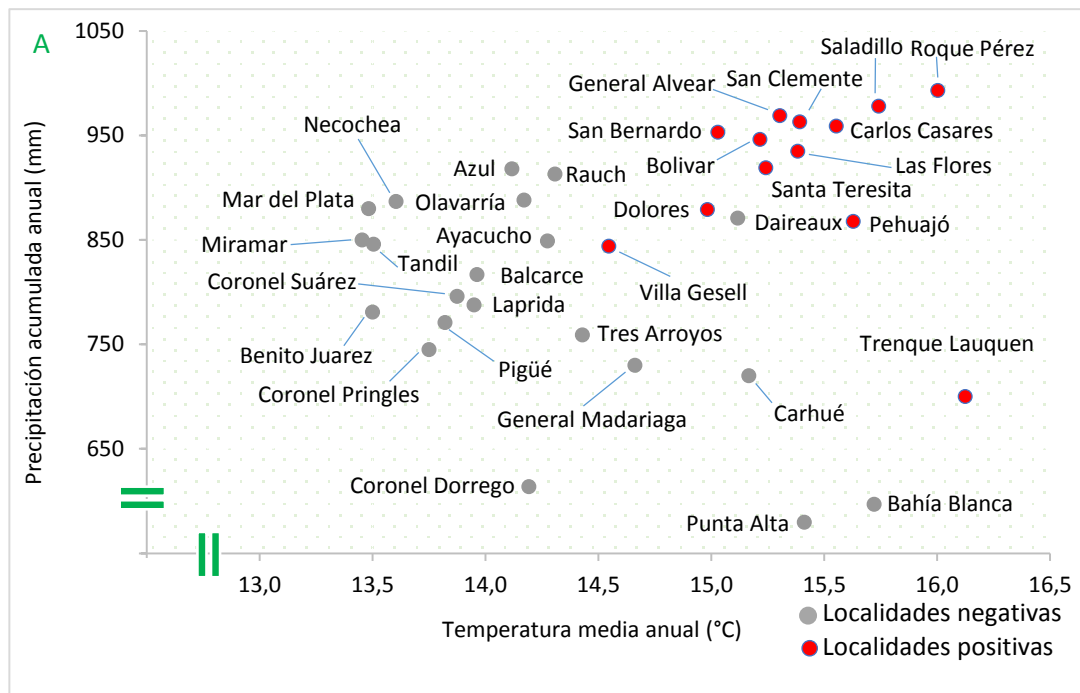


Figura 4. Precipitación acumulada anual en función de la temperatura media anual.

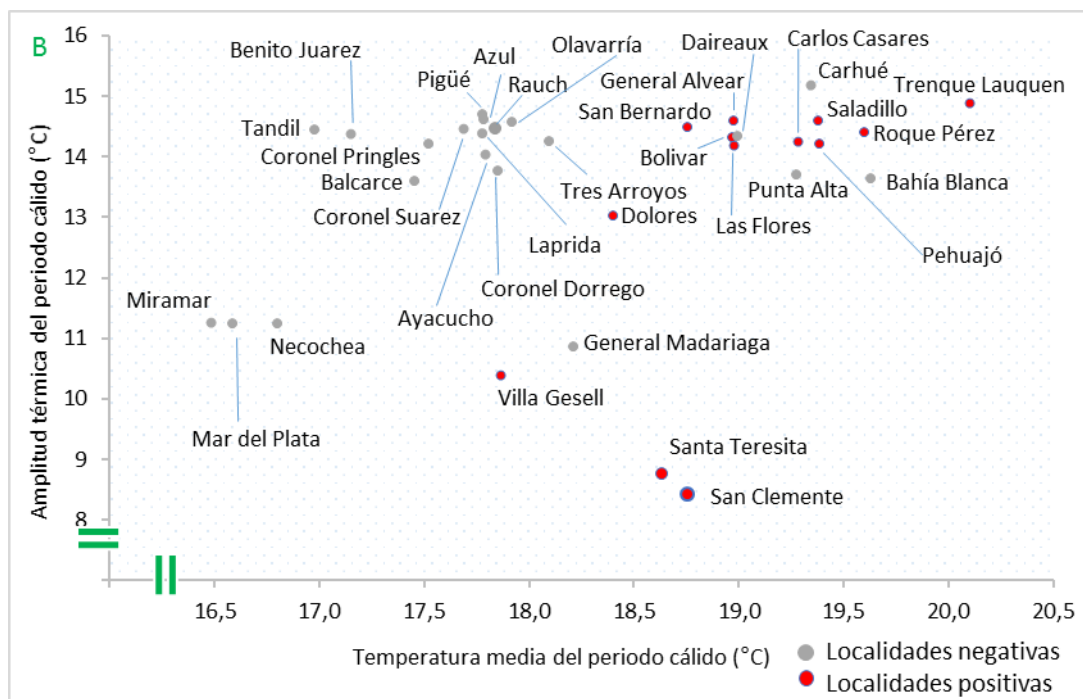


Figura 5. Amplitud térmica del periodo cálido en función de la temperatura media del periodo cálido.

Discusión

Estudios previos en los que se evaluó la presencia de criaderos en neumáticos en la provincia de Buenos Aires (Rubio *et al.*, 2011) sugieren que estos hábitats son adecuados para el desarrollo. Teniendo en cuenta que las hembras colocan los huevos en los hábitats larvales, y que los huevos pueden sobrevivir por períodos prolongados fuera del agua, el transporte de neumáticos, previamente almacenados al aire libre en una localidad donde está presente este mosquito, podría constituir un medio para la dispersión hacia nuevas localidades. Ello explicaría la presencia de *Ae. aegypti* en algunas localidades del partido de la costa que reciben neumáticos de la localidad de Dolores (comunicación personal del propietario de un depósito en Dolores).

Aedes aegypti fue detectado por primera vez durante los relevamientos en 2014 y 2015 en localidades situadas hacia el centro y suroeste de la provincia de Buenos Aires. Posteriormente en marzo del 2017 se detectó su presencia en el cementerio de Azul (Carbajo *et al.*, 2019).

Si bien la detección de *Ae. aegypti* en una localidad puede ser un indicador de su colonización temporal, ello no asegura su persistencia interanual. Las localidades de Villa Gesell y Olavarría podrían ser ejemplos de ello. En el primer caso, si bien *Ae. aegypti* no se halló en los depósitos relevados en Villa Gesell, sí se hallaron inmaduros en una vivienda. Por otra parte, en Olavarría hay reportes periodísticos que en diferentes años datan la presencia del mosquito, sin embargo, pese a que en los relevamientos se realizó una búsqueda exhaustiva durante dos años consecutivos, los resultados fueron negativos. Ello sustenta que el hallazgo eventual del mosquito puede ser consecuencia de una colonización temporal. Para confirmar que el mosquito está instalado en una localidad, sería necesario hacer un seguimiento interanual.

Teniendo en cuenta la temperatura media anual, Villa Gesell puede ser considerada como el límite inferior en el cual se esperaría la colonización de *Ae. aegypti*. Según estas condiciones térmicas Bahía Blanca, Carhué, Daireaux, General Madariaga, Punta Alta y Tres Arroyos serían potenciales localidades para ser colonizadas por esta especie. Si además se considera la presencia de *Ae. aegypti* en Azul (Carbajo *et al.*, 2019) podrían incluirse también Ayacucho, Coronel Dorrego, Olavarría, Rauch y Tres Arroyos.

Con la temperatura media del periodo cálido las localidades que son potenciales de ser colonizados por *Ae. aegypti* son las mismas que las que se consideraron con la temperatura media anual.

Cabe señalar que durante el relevamiento del 2015 en algunas de las localidades visitadas había una gran sequía, lo cual se hizo evidente en varios sitios inspeccionados en los que los neumáticos expuestos al aire libre contenían muy poca cantidad de agua o estaban secos. Estos resultados sugieren la importancia de las precipitaciones sobre la acumulación de agua en potenciales criaderos como los neumáticos acumulados en depósitos.

Con estos hallazgos queda registrada la presencia de esta especie por debajo del límite de temperatura media anual de 15°C que ha sido predicho según los resultados obtenidos con un modelo de dinámica poblacional que incorpora la dependencia de la temperatura (Otero *et al.* 2006). Por otra parte, si bien los resultados del relevamiento no mostraron la presencia de *Ae. aegypti* en las cercanías de Bahía Blanca, existe bibliografía histórica que describe la presencia de esta especie en dicha zona antes de la erradicación (Bejarano *et al.*, 1959; Christophers, 1960), y recientemente, durante el año 2016, las autoridades municipales de Bahía Blanca hallaron larvas de *Ae. aegypti* en esa localidad (Rossi, comunicación personal).

Asimismo queda confirmada la hipótesis planteada en el presente capítulo, demostrándose la expansión de *Ae. aegypti* en localidades más frescas dentro de la zona templada de la provincia de Buenos Aires.

Capítulo II: Estudio del desarrollo y supervivencia de *Aedes aegypti* a diferentes regímenes de temperaturas

Introducción

El desarrollo de los insectos varía en respuesta a gradientes de factores bióticos y abióticos. Algunos ejemplos de factores que afectan a *Aedes aegypti* son la densidad larval, el tipo de alimento disponible, los predadores, la temperatura, la humedad, fotoperíodo, etc. (Couret y Benedict, 2014).

Para este mosquito, la temperatura se considera el factor de mayor importancia sobre la eficacia biológica o aptitud, ya que las bajas temperaturas de zonas templadas limitan la distribución de la especie (Mohammed y Chadee, 2011).

Algunos de los aspectos que se modifican en función de la temperatura son la supervivencia de los estados inmaduros, el tiempo de desarrollo y el tamaño corporal de los adultos. Para *Ae. aegypti* se han realizado diversos estudios sobre el efecto de las temperaturas durante el desarrollo. Se ha demostrado que existe un límite térmico inferior para el desarrollo, y que la supervivencia a partir de ese valor comienza a incrementarse al aumentar las temperaturas, hasta llegar a un rango óptimo (Rueda *et al.*, 1990). Sin embargo, los resultados obtenidos sobre diferentes poblaciones muestran que el límite varía (así como los valores de supervivencia para un mismo valor térmico) dependiendo del origen subtropical o templado de las poblaciones. En poblaciones de clima subtropical la temperatura más baja a la cual los individuos pudieron completar el desarrollo fue de 15°C, con una supervivencia del 3% (Rueda *et al.*, 1990) o del 23,5% (Tun Lin *et al.*, 2000). En cambio en una población de clima templado la temperatura más baja para completar el desarrollo fue de 14°C con una supervivencia del 24% (Bar Zeev, 1958). A temperaturas más bajas, por ejemplo de 10°C o 12°C, no se registró supervivencia de las larvas en ninguno de los estudios realizados previamente, independientemente del origen de la población (Tun Lin *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2011; Carrington *et al.*, 2013).

A temperaturas que se encuentran entre el límite inferior y el rango óptimo, el tiempo de desarrollo se incrementa al disminuir las temperaturas (Bar Zeev, 1958; Rueda *et al.*, 1990;

Richardson *et al.*, 2011; Carrington *et al.*, 2013). En estudios hechos a temperaturas constantes los tiempos de desarrollo se extendieron desde 11,4 días a 24°C a 60 días a 14°C con valores intermedios de 31-34 días a temperaturas intermedias de 16°C (Bar Zeev, 1958; Richardson *et al.*, 2011; Carrington *et al.*, 2013).

Asimismo, la extensión del tiempo de desarrollo (como consecuencia de menores temperaturas) implica permanecer más días como larva, estado durante el cual se ingieren alimentos, y como consecuencia se espera observar mayor tamaño corporal en los individuos (Rueda *et al.*, 1990; Mohammed y Chadee, 2011). El tamaño corporal tiene efectos sobre la capacidad reproductiva tanto en la hembra (Briegel, 1990) como en los machos (Ponlawat *et al.*, 2007) por lo cual se utiliza como indicador de la fecundidad en la población estudiada.

Si bien la mayor parte de los estudios fueron realizados a temperaturas constantes, en la naturaleza las temperaturas tienen fluctuaciones diarias. Las temperaturas fluctuantes, cuando permanecen dentro de los rangos de temperatura viables, generalmente mejoran la eficacia biológica (supervivencia, velocidad de desarrollo, tamaño corporal de los adultos), en cambio aquellos rangos que incluyen temperaturas extremas pueden permitir la reparación del daño acumulado, durante la exposición a extremos térmicos, o bien tener impactos negativos de daño acumulativo, durante exposiciones sucesivas dependiendo de la frecuencia y duración de estas temperaturas (Colinet *et al.*, 2015). Por ejemplo en un estudio realizado en un rango de temperaturas medias entre 18 y 30°C, a temperaturas variables la supervivencia resultó mayor que a temperaturas constantes. Además a 18°C de temperatura constante los tiempos de desarrollo fueron mayores que a temperatura variable, sin embargo se registró un patrón inverso (a temperaturas variables, tiempos mayores) para temperaturas más altas (Headlee, 1940). Otro aspecto que puede influir sobre la eficacia biológica es la amplitud térmica. Para *Ae. aegypti* se observó que a temperaturas de 16°C constante y variables con diferente amplitud térmica hay menor supervivencia a menor amplitud térmica y a temperatura constante (Carrington *et al.*, 2013). Sin embargo, a diferencia de Headlee (1940) los tiempos de desarrollo resultaron similares tanto a temperaturas constantes como a temperaturas variables con diferentes amplitudes térmicas (Carrington *et al.*, 2013).

El tiempo de desarrollo, la supervivencia y el tamaño corporal de poblaciones provenientes de diferentes regiones geográficas, pueden tener patrones de respuesta acordes a condiciones térmicas locales. Este fenómeno fue observado para varias especies de mosquitos. Por ejemplo

para *Aedes albifasciatus*, a bajas temperaturas se observó una mayor supervivencia y menor tiempo de desarrollo en una población de clima más frío en la provincia de Chubut, que en una población de clima menos frío en la provincia de Buenos Aires, una respuesta para favorecer el desarrollo de mayor cantidad de cohortes a temperaturas relativamente bajas en la población patagónica (Garzón y Schweigmann, 2015). Para *Ae. aegypti* se han realizado estudios similares comparando entre tres poblaciones: Ciudad de Córdoba (Córdoba), de clima templado; Orán (Salta) y San Javier (Misiones), ambas de clima subtropical. A temperaturas variables con valor medio de 21,9°C en la población de Orán se observó menor supervivencia respecto a San Javier y Ciudad de Córdoba. Dado que tanto Orán como San Javier son de clima subtropical se sugirió que estas diferencias podían radicar en diferencias genéticas entre estas poblaciones (Grech *et al.*, 2010).

Si bien en Argentina no existen estudios previos entre poblaciones a bajas temperaturas, pueden surgir algunas evidencias comparando entre diferentes regiones del mundo. Por ejemplo estudios de supervivencia y desarrollo realizados en condiciones naturales durante la etapa invernal en una población de Taiwán, se observó que a temperaturas medias de 14-15°C hubo un 37% de supervivencia (Chang *et al.*, 2007), en cambio en estudios realizados también en condiciones naturales, a esas mismas temperaturas medias, en una población proveniente de CABA se observó entre 40 y 80% de supervivencia (De Majo *et al.*, 2017). La respuesta diferencial de la supervivencia y el tiempo de desarrollo podrían indicar una adaptación local.

En los límites de la distribución geográfica de *Ae. aegypti* en la zona templada de Argentina las condiciones ambientales podrían, por presión selectiva, favorecer al cabo de varias generaciones, la presencia de individuos más tolerantes a temperaturas extremas aún más bajas, pudiendo progresivamente expandir su distribución.

El objetivo de este capítulo fue estudiar en forma comparativa el éxito durante el desarrollo a bajas temperaturas entre poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de localidades ubicadas a lo largo de un gradiente de temperatura.

La hipótesis que se plantea es que la expansión de *Ae. aegypti* hacia zonas templadas más frescas, está asociada con la adaptación de las poblaciones para completar el desarrollo a temperaturas bajas, por lo cual las poblaciones templadas tendrán una mayor eficacia biológica a bajas temperaturas que las poblaciones de zonas más cálidas.

La predicción asociada con esta hipótesis es que los individuos de las poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de localidades frescas, presenten una mayor eficacia biológica (menor tiempo de desarrollo, mayor supervivencia de los estados inmaduros, y mayor tamaño corporal de los adultos) que los individuos de poblaciones de localidades más cálidas.

Materiales y métodos

Colecta de huevos de *Aedes aegypti*

La colecta de huevos se realizó con ovitrampas en las tres localidades de estudio (San Bernardo, CABA y Resistencia) desde fines de febrero hasta fines de abril. La ovitrampa (Figura 2) es un recipiente pintado de negro que contiene agua (aproximadamente 1/3 de su volumen) y un sustrato poroso sobre el cual las hembras de *Ae. aegypti* pueden depositar sus huevos. En las colectas se utilizaron dos tipos de recipientes: de vidrio de 360 ml o de plástico de 280 ml, y dos sustratos de oviposición: bajalenguas de madera o papel madera. Semanalmente se colocó un nuevo sustrato y se recambió el agua, retirando el sustrato con huevos de la semana previa, que fue almacenado en laboratorio hasta iniciar el experimento.



Figura 2. Ovitrapa; contiene un sustrato poroso con 1/3 del volumen con agua para que la hembra de *Aedes aegypti* pueda colocar sus huevos.

Para cada una de las poblaciones se estudió el desarrollo desde el primer estadio larval (L1) hasta la emergencia del adulto, a temperaturas bajas e intermedias. Se llevaron a cabo dos experimentos, el primero a temperaturas constantes y el segundo a temperaturas variables.

Para la regulación de la temperatura del agua se utilizaron baños térmicos que contenían una serpentina de cobre conectada a una manguera a través de la cual circulaba agua fría regulada mediante un termostato (Figura 3). Las temperaturas se monitorearon mediante sensores (HOBO® Pendant Temperature Data Logger) sumergidos en los mismos.



Figura 3. Baños térmicos utilizados para la cría de *Aedes aegypti* a diferentes temperaturas. Cada bandeja corresponde a una temperatura y dentro de cada bandeja se pueden observar tubos de cría individual (réplicas).

Experimento 1: Temperaturas constantes

Se estudió el tiempo de desarrollo y la supervivencia de *Ae. aegypti* a cinco temperaturas constantes: 12; 14; 16; 18,5 y 24°C, representativas de las temperaturas medias de invierno, verano, e intermedias para la Ciudad de Buenos Aires. Para la población de Resistencia se excluyeron las temperaturas de 12 y 16°C debido a la poca disponibilidad de ejemplares.

Experimento 2: Temperaturas variables

Se utilizaron dos baños de agua regulados para generar temperaturas variables que simulan las condiciones térmicas de un mes invernal de CABA, y de un mes invernal en Resistencia. La temperatura media promedio del mes de julio y amplitud para las localidades de CABA y Resistencia, fueron calculadas en base a los datos horarios de temperatura, proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional correspondientes al periodo 2011-2016. La amplitud térmica de cada localidad se determinó utilizando los promedios de las temperaturas horarias del mes de julio y calculando, a partir de ellos, la diferencia entre la temperatura máxima y mínima. Se trabajó con dos perfiles de temperatura, uno cuya media fue de $11,5^{\circ}\text{C}$ (temperatura variable “muy baja”) con una amplitud térmica de 6°C y otro de $15,7^{\circ}\text{C}$ (temperatura variable “baja”) con una amplitud térmica de $6,4^{\circ}\text{C}$ (Figura 4).

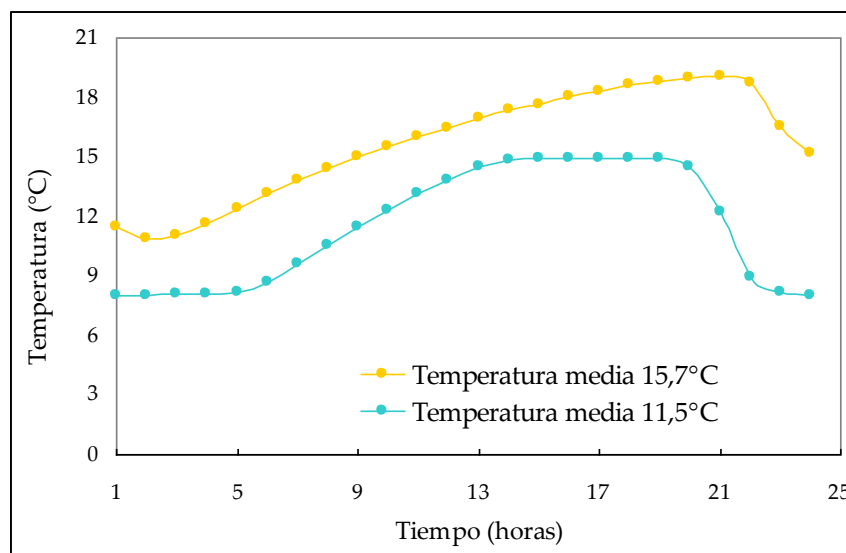


Figura 4. Perfil de temperaturas horarias obtenido mediante el monitoreo de HOBOS en los baños utilizados para la cría de *Aedes aegypti* a temperatura variable. Color celeste: $11,5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Color amarillo $15,7 \pm 3,2^{\circ}\text{C}$.

Metodología común a ambos experimentos

El día de inicio, se sumergieron los sustratos conteniendo los huevos de cada localidad, en una bandeja con una solución nutritiva de $0,047\text{mg}$ levadura/ml de agua (que además actuó como estímulo de eclosión), a temperatura ambiente. Se separaron las larvas recién nacidas y se asignaron en forma aleatoria a cada tratamiento. La cría de los inmaduros se realizó de forma individual dentro de tubos conteniendo 10 ml de solución y expuestas a un fotoperíodo de $12 : 12$

(Luz : Oscuridad). La reposición de alimento se hizo a través de un recambio de solución nutritiva. El primer recambio de solución se realizó a los tres días de iniciado el ensayo para evitar la manipulación de las larvas muy pequeñas. Luego, cada dos días cada larva fue transferida a un tubo con solución nutritiva previamente aclimatada por 24 hs. Diariamente se tomó registro del estado de cada larva (viva/muerta) y de su estadio. A partir del momento en que se registraron las pupas, se suspendió el recambio de solución y se le agregó al tubo de cría un recipiente transparente invertido en la parte superior, sujetado por una base hermética, para permitir que los adultos recién emergidos pudieran volar. Aquellos individuos que murieron en pupa fueron fijados con una solución de alcohol al 80%, y se les identificó el sexo (Harbach y Knight, 1980).

Los adultos emergidos fueron sacrificados por congelamiento, luego se registró el sexo y se les removieron ambas alas para medir su longitud (Figura 5), como una estimación del tamaño corporal del adulto (Van Handel y Day, 1989). Para la medición se utilizó un microscopio estereoscópico (Leica® S8 APO) equipado con una cámara digital (Leica®). Ambas alas fueron colocadas entre dos portaobjetos y fotografiadas utilizando un aumento 40x. La longitud del ala se midió desde el nudo apical hasta el margen axilar, excluyendo las escamas de la periferia (Schneider *et al.*, 2011), utilizando la aplicación Leica Suite V 4.0.0. Se excluyeron de los análisis aquellos ejemplares adultos a los que no se les pudo remover correctamente las alas.

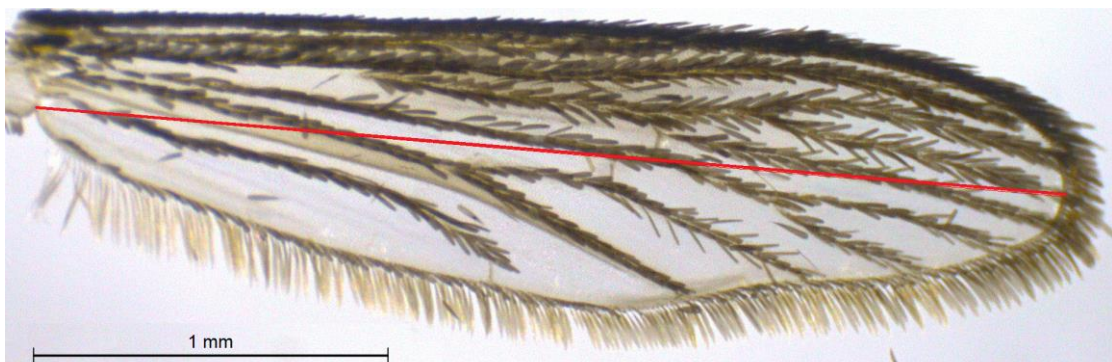


Figura 5. Fotografía de un ala derecha de *Aedes aegypti* (♀) donde se indica con línea roja la distancia desde el nudo apical hasta el margen axilar para medir la longitud.

Análisis de datos

Durante el año 2015 se llevó a cabo una colecta de huevos de *Aedes aegypti* para el experimento 1 y durante el año 2017 para el experimento 2. Si bien la metodología fue similar, el almacenamiento de los sustratos con huevos fue diferente. Durante los ensayos del 2015 se observó que el material orgánico que conforma los sustratos (bajalenguas de madera) pudieron haber influido en el colapsamiento, deshidratación y enmohecimiento de una cierta cantidad de huevos. En función de esta experiencia, durante el 2017, se procedió a modificar la forma de almacenamiento de los huevos. Para ello al día posterior de cada colecta, los huevos colectados fueron trasvasados a una placa de petri con paño absorbente humedecido. De este modo se mejoró en un gran porcentaje la condición del material hasta el momento de iniciar los experimentos. Por estas razones los experimentos fueron analizados de forma independiente.

Para cada experimento se analizó el efecto del tratamiento sobre los tiempos de desarrollo, supervivencia y longitud del ala. Los baños de temperaturas constantes 12 y 16°C no fueron incluidos en los análisis estadísticos porque no se contó con datos de la población de Resistencia. Para todos los análisis estadísticos se usó el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2018), y para los modelos lineales generalizados se utilizó se utilizó R software, Versión 3.4.4 (R Core Team 2018), a través de una interfaz amigable en el software Infostat versión 1.2 (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Tiempo de desarrollo desde LI hasta pupa

El número de réplicas considerado en este análisis involucra tanto a los individuos que sobrevivieron hasta pupa como aquellos que completaron su desarrollo hasta adulto. La razón por la cual se compararon los tiempos de desarrollo hasta pupa y no hasta adulto fue porque, en algunos tratamientos, hubo muy baja cantidad que completó su desarrollo. Se analizó el efecto de la temperatura, localidad y sexo, y sus interacciones sobre el tiempo de desarrollo, mediante Modelos Lineales Generalizados, considerando el tiempo como una variable de distribución gamma (variable continua) y función de enlace logarítmica. Se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Fisher LSD de rangos ajustando la corrección de Benjamini y Hochberg (1995).

Supervivencia hasta adulto

La proporción de supervivencia en cada tratamiento (conformado por la combinación de las variables localidad y temperatura) se calculó a partir del total de adultos emergidos dividido el número inicial de larvas. Para aquella temperatura en la que al menos una localidad obtuvo el 100% de supervivencia, las comparaciones entre poblaciones se realizaron con el test exacto de Fisher. Para las demás temperaturas (con supervivencia menor al 100%) se comparó el efecto de la temperatura, localidad y la interacción entre ellas, mediante Modelos Lineales Generalizados con distribución binaria (Bernoulli) y función de enlace logística. Se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Fisher LSD de rangos ajustando la corrección de Benjamini-Hochberg.

Longitud de las alas

Se utilizó el promedio de la longitud del ala izquierda y derecha, excepto en los casos que solo se pudo medir un ala, en los que se consideró este dato como único valor. Se analizaron los efectos de las variables temperatura, localidad, sexo, las dobles interacciones y la triple interacción de las mismas, mediante Modelos Lineales Generalizados con variable con distribución normal y función identidad. En el tratamiento donde solo se obtuvieron individuos adultos de uno de los sexos, se realizó el mismo análisis estadístico eliminando la triple interacción. Se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Fisher LSD de rangos ajustando la corrección de Benjamini-Hochberg.

Resultados

Experimento 1: Temperaturas constantes

Tiempo de desarrollo desde Larva I hasta pupa

A temperaturas crecientes (entre 12 y 24°C) disminuyeron los tiempos de desarrollo promedio, desde 39,5 días a 12°C hasta 9,1 días a 24°C. Dentro de cada temperatura y localidad las hembras presentaron mayor tiempo de desarrollo que los machos. A 12°C la mayoría de los individuos murieron en el estadio IV y pupa, y se observó que algunos individuos luego de mudar a pupa permanecieron en el fondo del recipiente y murieron. A algunas pupas no se les pudo determinar el sexo, debido a que la genitalia no estaba bien formada y por lo tanto no fueron consideradas en el análisis estadístico.

Tabla 1. Tiempos de desarrollo desde larva I hasta pupa para ejemplares de *Aedes aegypti* de las localidades de San Bernardo, CABA y Resistencia a temperaturas constantes. n: número de individuos que alcanzaron el estado de pupa, DE: desvío estándar.

Temperatura (°C)	Localidad	Sexo	n	Media ± DE
12	San Bernardo	♀	7	41,50 ± 3,21
		♂	11	37,59 ± 2,84
	CABA	♀	9	40,17 ± 5
		♂	14	39,43 ± 5,80
	Resistencia			s/d
	14	San Bernardo	♀	13
♂			11	22,41 ± 2,51
CABA		♀	13	25,04 ± 1,94
		♂	17	23,74 ± 3,15
Resistencia		♀	10	26,30 ± 2,86
		♂	8	22,00 ± 1,85
16	San Bernardo	♀	11	18,77 ± 1,49
		♂	14	16,21 ± 2,05
	CABA	♀	14	19,29 ± 1,42
		♂	14	16,79 ± 1,14
	Resistencia			s/d
	18,5	San Bernardo	♀	13
♂			15	12,03 ± 1,36
CABA		♀	12	14,75 ± 1,66
		♂	5	13,30 ± 1,47
Resistencia		♀	8	14,88 ± 2,33
		♂	17	12,91 ± 1,77
24	San Bernardo	♀	17	10,24 ± 1,64
		♂	12	8,13 ± 0,88
	CABA	♀	14	9,82 ± 1,51
		♂	15	7,97 ± 0,64
	Resistencia	♀	13	9,96 ± 1,46
		♂	9	8,39 ± 1,08

Se hallaron efectos de la interacción entre las variables temperatura y sexo sobre los tiempos de desarrollo. A temperaturas crecientes ambos sexos presentaron una disminución significativa de los tiempos de desarrollo (Tabla 2 y Figura 6). En cambio no se hallaron efectos significativos de la variable localidad sobre los tiempos de desarrollo.

Tabla 2. Resultados del análisis de Modelos Lineales Generalizados del tiempo de desarrollo desde larva I hasta pupa en función de las variables temperatura, localidad y sexo, y sus interacciones.

Factor	GL	F	p
temperatura	2	1218,18	<0,0001
localidad	2	0,86	0,425
sexo	1	84,76	<0,0001
temperatura*localidad	4	0,91	0,457
temperatura*sexo	2	3,34	0,037
localidad*sexo	2	1,02	0,363
temperatura*localidad*sexo	4	0,53	0,713

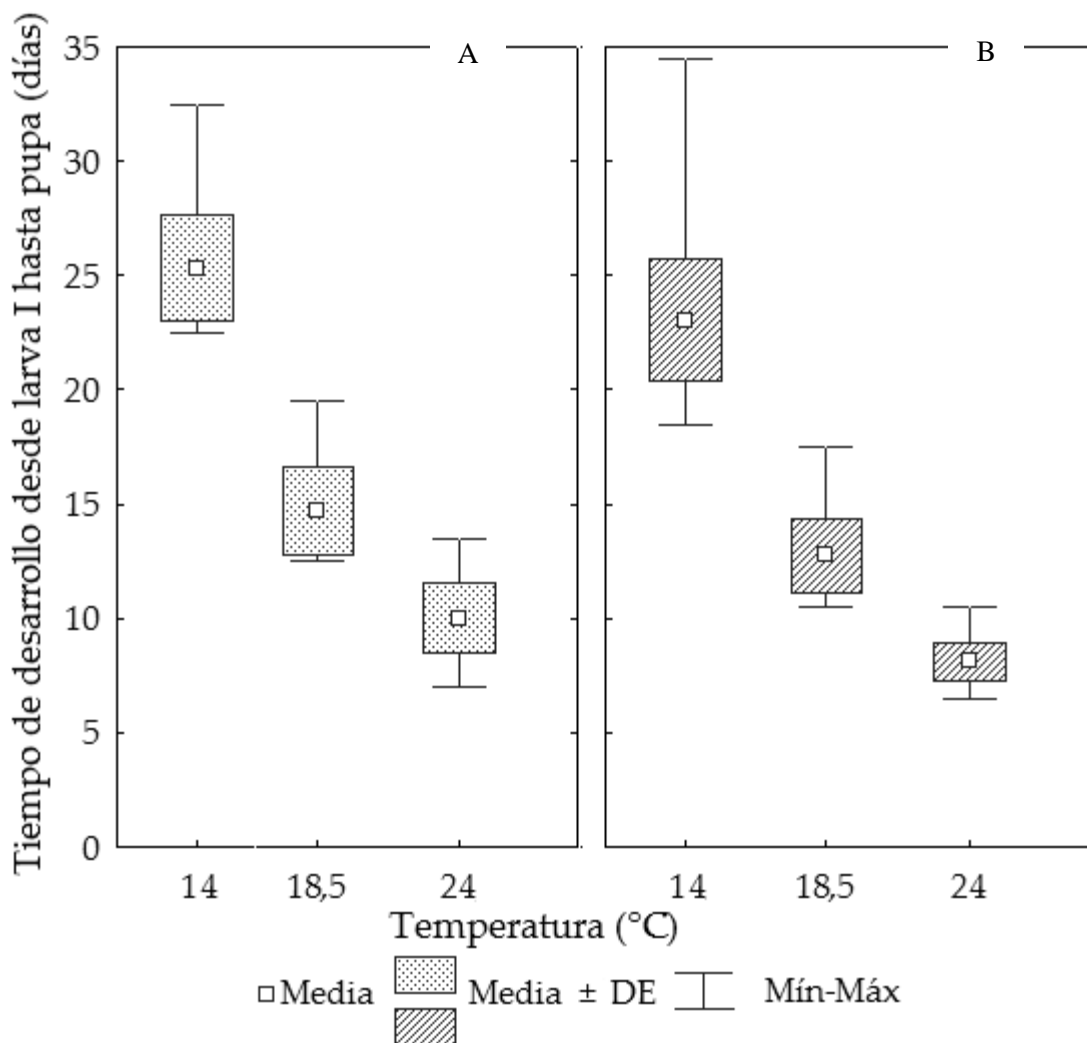


Figura 6. Tiempos de desarrollo a temperaturas constantes para: A) Hembras, B) Machos. Todos los tratamientos fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Supervivencia

A temperaturas crecientes (12 a 24°C) la supervivencia aumentó en las tres localidades (Tabla 3), y a partir de los 14°C fue mayor al 69%. Un resultado destacable es la supervivencia a 12°C de algunos ejemplares de ambos sexos hasta adultos de San Bernardo y CABA (Tabla 3). A esta temperatura se produjo la mayor mortalidad en el estadio IV y pupas.

Tabla 3. Supervivencia de las cohortes de San Bernardo, CABA y Resistencia criadas a temperaturas constantes. ♀: hembras, ♂: machos.

Temperatura (°C)	Localidad	Nº inicial de individuos	Sexo	n	% Supervivencia
12	San Bernardo	30	♀	1	13,3
			♂	3	
	CABA	30	♀	3	23,3
			♂	4	
	Resistencia			s/d	
	14	San Bernardo	30	♀	13
♂				11	
CABA		30	♀	12	86,7
			♂	14	
Resistencia		26	♀	10	69,2
			♂	8	
16	San Bernardo	30	♀	10	80
			♂	14	
	CABA	30	♀	14	93,3
			♂	14	
	Resistencia			s/d	
	18,5	San Bernardo	29	♀	13
♂				15	
CABA		28	♀	12	96,4
			♂	15	
Resistencia		27	♀	8	92,6
			♂	17	
24	San Bernardo	29	♀	17	100
			♂	12	
	CABA	30	♀	14	96,6
			♂	15	
	Resistencia	25	♀	13	88
			♂	9	

Los resultados del MLG mostraron un efecto significativo de la temperatura ($F = 7,86$; $GL = 1$; $p < 0,01$) con una supervivencia menor a 14°C que a $18,5^{\circ}\text{C}$, pero no de la localidad ($F = 0,98$; $GL=2$; $p = 0,378$) ni de la interacción ($F = 0,05$; $GL = 2$; $p = 0,948$). A 24°C el test exacto de Fisher no detectó diferencias significativas entre las tres localidades.

Longitud de alas

A temperaturas crecientes (12 a 24°C) la longitud de alas disminuyó, además, dentro de cada temperatura de cría, la longitud de alas fue mayor en hembras que en machos, independientemente de la localidad de origen (Tabla 4).

Tabla 4. Longitud de las alas para ejemplares de *Aedes aegypti* de las localidades de San Bernardo, CABA y Resistencia criados a temperaturas constantes. n: número de individuos que alcanzaron el estado adulto; DE: desvío estándar.

Temperatura (°C)	Localidad	Sexo	n	Media ± DE	
12	San Bernardo	♀	1	2,87 ± 0	
		♂	3	2,39 ± 0,05	
	CABA	♀	2	2,94 ± 0,05	
		♂	3	2,46 ± 0,14	
	Resistencia			s/d	
	14	San Bernardo	♀	12	3,00 ± 0,12
♂			6	2,50 ± 0,06	
CABA		♀	10	2,91 ± 0,08	
		♂	14	2,74 ± 0,24	
Resistencia		♀	10	3,06 ± 0,17	
		♂	3	2,52 ± 0,06	
16	San Bernardo	♀	5	2,88 ± 0,13	
		♂	9	2,32 ± 0,06	
	CABA	♀	4	2,75 ± 0,33	
		♂	9	2,40 ± 0,16	
	Resistencia			s/d	
	18,5	San Bernardo	♀	12	2,69 ± 0,09
♂			13	2,22 ± 0,18	
CABA		♀	9	2,67 ± 0,10	
		♂	11	2,20 ± 0,05	
Resistencia		♀	7	2,79 ± 0,07	
		♂	15	2,25 ± 0,07	
24	San Bernardo	♀	16	2,24 ± 0,09	
		♂	10	1,95 ± 0,10	
	CABA	♀	10	2,30 ± 0,07	
		♂	15	1,93 ± 0,30	
	Resistencia	♀	13	2,31 ± 0,07	
		♂	9	1,95 ± 0,10	

Se hallaron efectos significativos de la interacción de las variables temperatura, localidad y sexo sobre la longitud de las alas (Tabla 5). A 14°C, las hembras de CABA tuvieron menor longitud de alas que las de Resistencia, mientras que los machos de CABA tuvieron mayor longitud de alas que los de Resistencia y San Bernardo. En las temperaturas 18,5°C y 24°C, la longitud de las alas fue similar entre los individuos de las tres localidades tanto para hembras como para machos (Figura 7).

Tabla 5. Resultados del análisis de Modelos Lineales Generalizados de la longitud de las alas en función de las variables temperatura, localidad y sexo y sus interacciones.

Factor	GL	F	p
temperatura	2	310,38	<0,001
localidad	2	1,45	0,238
sexo	1	354,77	<0,001
temperatura *localidad	4	0,86	0,491
temperatura*sexo	2	4,61	0,011
localidad*sexo	2	3,72	0,026
temperatura*localidad*sexo	4	3,59	0,008

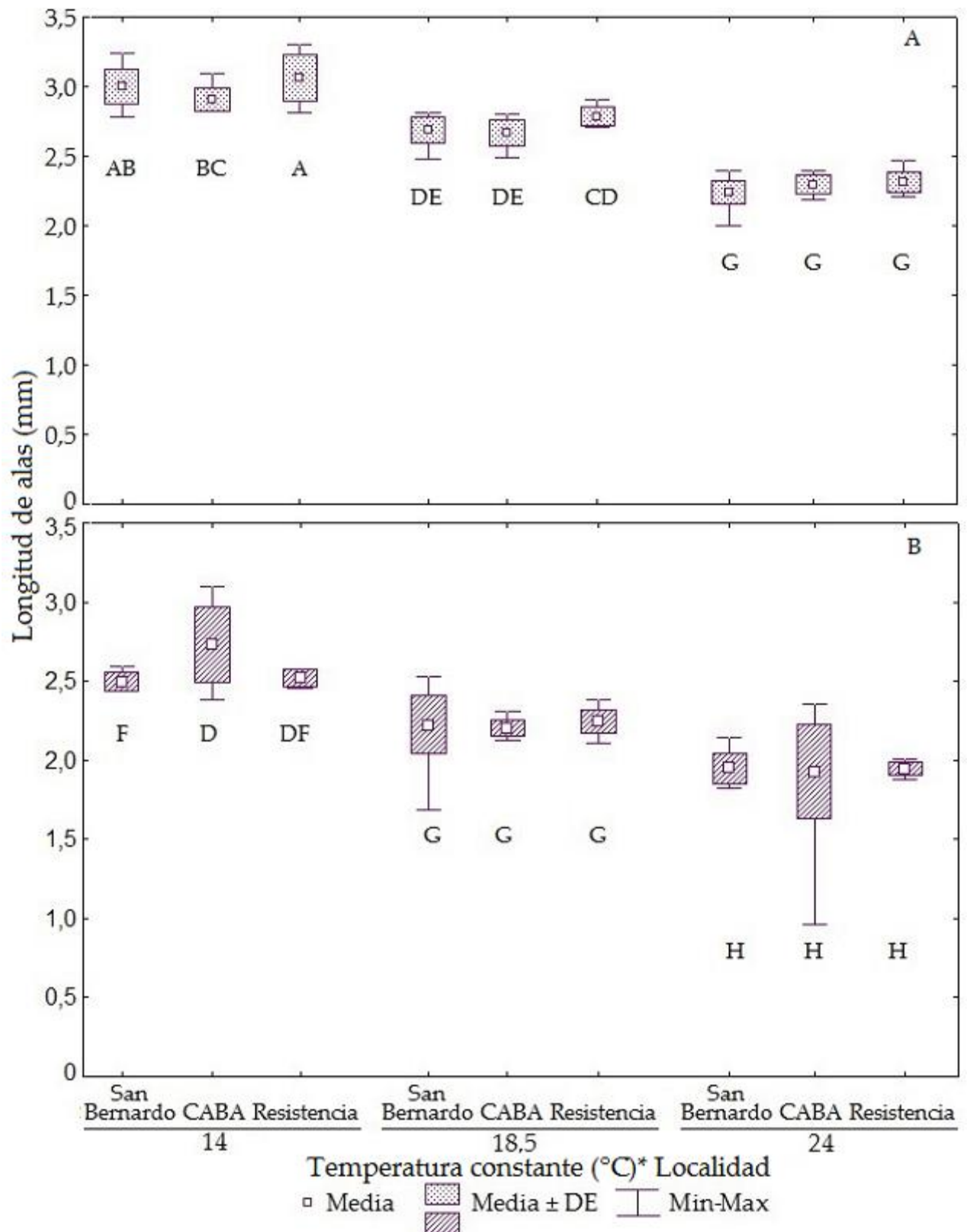


Figura 7. Longitud de las alas en función de la temperatura y localidad para: A) Hembras y B) Machos. Letras iguales indican resultados sin diferencias significativas ($p < 0,05$).

Experimento 2: Temperaturas variables

Tiempo de desarrollo desde larva I hasta pupa

A $11,5 \pm 3$ °C se observó un tiempo de desarrollo más extendido (media de 37,6 días) que a $15,7 \pm 3,2$ °C (media de 17,9 días). Dentro de cada temperatura y localidad las hembras presentaron mayor tiempo de desarrollo que los machos, excepto para Resistencia a la temperatura más baja. A $11,5 \pm 3$ °C la mayoría de los individuos murieron en el estadio IV y pupa, y se observó que algunos individuos luego de mudar a pupa permanecieron en el fondo del recipiente y murieron. A algunas pupas no se les pudo determinar el sexo, debido a que la genitalia no estaba bien formada y por lo tanto no fueron consideradas en el análisis estadístico (Tabla 6).

Tabla 6. Tiempos de desarrollo desde larva I hasta pupa para ejemplares de *Aedes aegypti* de las localidades de San Bernardo, CABA y Resistencia a temperaturas variables. n: número de individuos que alcanzaron el estado de pupa, DE: desvío estándar.

Temperatura (°C)	Localidad	Sexo	n	Media \pm DE
$11,5 \pm 3$	San Bernardo	♀	6	51,17 \pm 10,51
		♂	8	44,00 \pm 5,40
	CABA	♀	6	55,83 \pm 6,83
		♂	6	44,33 \pm 2,48
	Resistencia	♀	4	46,75 \pm 4,50
		♂	13	47,96 \pm 6,75
$15,7 \pm 3,2$	San Bernardo	♀	10	20,10 \pm 1,43
		♂	17	17,68 \pm 1,91
	CABA	♀	11	21,41 \pm 1,92
		♂	13	20,04 \pm 1,56
	Resistencia	♀	16	21,56 \pm 2,29
		♂	13	19,19 \pm 1,70

Se halló un efecto significativo de la interacción de las variables temperatura, localidad y sexo sobre los tiempos de desarrollo (Tabla 7). A $11,5 \pm 3$ °C las hembras de CABA tuvieron mayor tiempo de desarrollo que las hembras de Resistencia. En cambio, a $15,7 \pm 3,2$ °C las hembras de las tres localidades tuvieron similares tiempos de desarrollo. Por otra parte, los machos a $11,5 \pm 3$ °C presentaron similares tiempos de desarrollo entre las tres localidades. En tanto que a $15,7 \pm 3,2$ °C los machos de San Bernardo presentaron menor tiempo de desarrollo que los de CABA y Resistencia (Figura 8). Por último, a $11,5 \pm 3$ °C, hembras y machos de Resistencia presentaron tiempos de desarrollo similares. Del mismo modo a $15,7 \pm 3,2$ °C hembras y machos de CABA presentaron similares tiempos de desarrollo.

Tabla 7. Resultados del análisis de Modelos Lineales Generalizados del tiempo de desarrollo en función de las variables temperatura, localidad y sexo y sus interacciones.

Factor	GL	F	p
temperatura	1	1655,55	<0,0001
localidad	2	3,55	0,032
sexo	1	26,34	<0,0001
temperatura*localidad	2	1,14	0,324
temperatura*sexo	1	0,12	0,731
localidad*sexo	2	2,32	0,103
temperatura*localidad*sexo	2	4,09	0,019

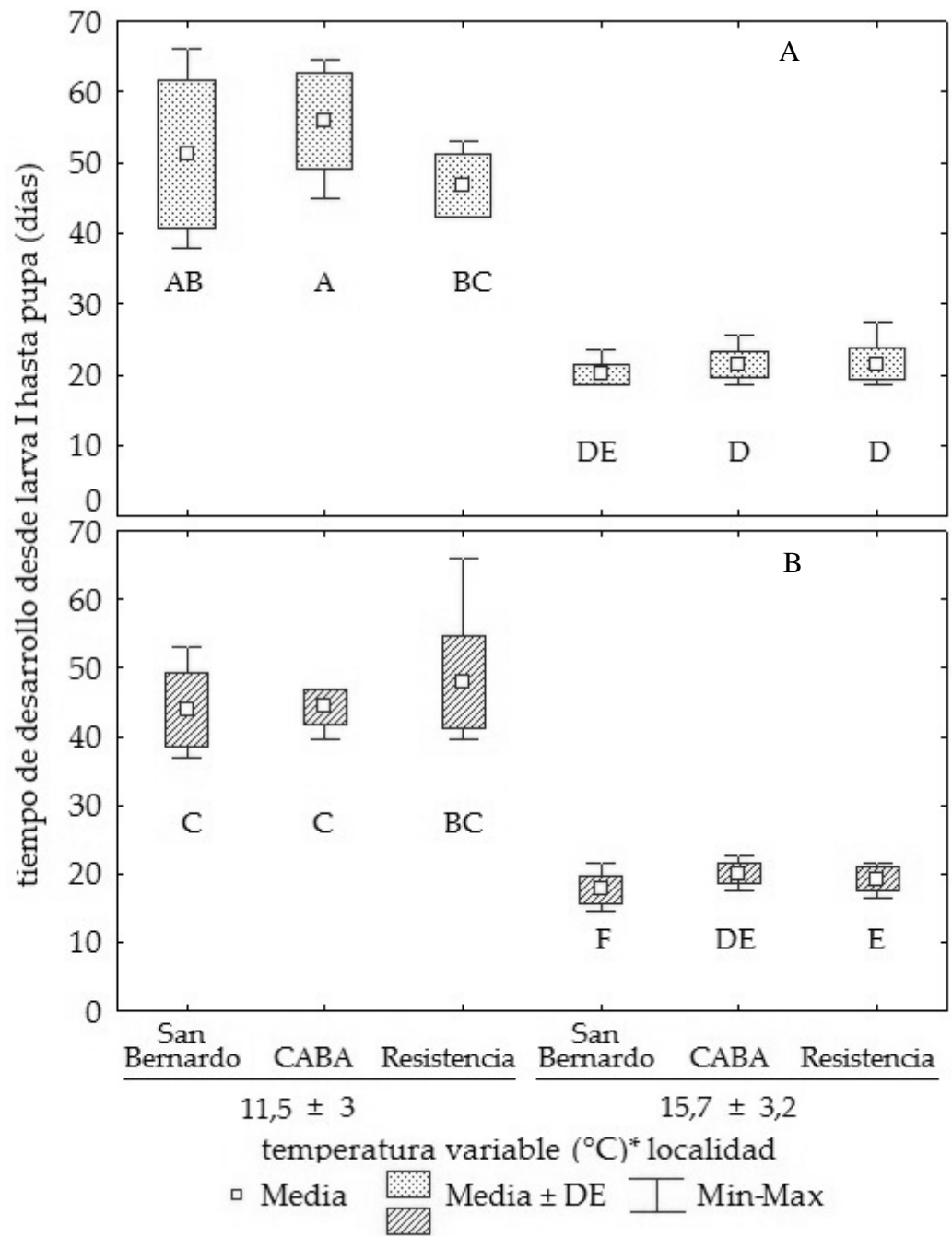


Figura 8. Tiempo de desarrollo para cada combinación de temperatura y localidad para: A) Hembras, B) Machos.

Supervivencia

A $11,5 \pm 3^\circ\text{C}$ no emergieron hembras de la localidad de Resistencia. Por otra parte emergieron adultos de ambos sexos de San Bernardo y de CABA, aunque en muy baja cantidad (Tabla 8). En cambio, a $15,7 \pm 3,2^\circ\text{C}$ la supervivencia fue mayor al 80% y con ejemplares de ambos sexos, en todas las localidades.

Tabla 8. Supervivencia de las cohortes de *Aedes aegypti* de CABA, San Bernardo y Resistencia criadas a temperatura variables. ♀: hembras, ♂: machos.

Temperatura (°C)	Localidad	n° inicial de individuos	Sexo	n	% Supervivencia
$11,5 \pm 3$	San Bernardo	27	♀	2	22
			♂	4	
	CABA	32	♀	2	9
			♂	1	
	Resistencia	35	♀	0	14
			♂	5	
$15,7 \pm 3,2$	San Bernardo	33	♀	10	82
			♂	17	
	CABA	29	♀	11	83
			♂	13	
	Resistencia	30	♀	13	97
			♂	16	

Se hallaron efectos significativos de la variable temperatura sobre la supervivencia ($F= 54,52$; $GL = 1$; $p < 0,001$), pero no de la variable localidad ($F= 1,72$; $GL = 2$; $p = 0,182$) ni de la interacción ($F = 1,85$; $GL = 2$; $p = 0,160$).

Longitud de las alas

Las hembras mostraron mayor longitud alar que los machos (Tabla 9), tanto para las diferentes temperaturas como para las localidades.

Se hallaron efectos significativos de la variable Sexo sobre la longitud alar pero no de las variables temperatura y localidad ni de sus interacciones (Tabla 10).

Tabla 9. Longitud de las alas para ejemplares de *Aedes aegypti* de las localidades de San Bernardo, CABA y Resistencia criados a temperaturas variables. n: número de individuos que alcanzaron el estado adulto, DE: desvío estándar.

Temperatura (°C)	Localidad	Sexo	n	Media ± DE
11,5 ± 3	San Bernardo	♀	2	2,94 ± 0,16
		♂	3	2,39 ± 0,10
	CABA	♀	2	2,89 ± 0,02
		♂	1	2,23 ± 0
	Resistencia	♀	0	-
		♂	5	2,42 ± 0,10
15,7 ± 3,2	San Bernardo	♀	9	3,01 ± 0,09
		♂	14	2,41 ± 0,10
	CABA	♀	11	2,99 ± 0,08
		♂	12	2,31 ± 0,36
	Resistencia	♀	16	3,00 ± 0,08
		♂	11	2,46 ± 0,10

Tabla 10. Resultados del análisis de Modelos Lineales Generalizados de la longitud del ala en función de la temperatura, localidad y sexo y sus interacciones.

Factor	GL	F	p
Temperatura	1	1,49	0,226
Localidad	2	0,98	0,379
Sexo	1	84,73	<0,0001
temperatura *localidad	2	0,05	0,948
localidad*sexo	2	1,43	0,246
temperatura*sexo	1	0,09	0,761

Discusión

Los resultados del experimento a temperaturas constantes llevado a cabo en este capítulo permitieron tener una primera aproximación al efecto de las bajas temperaturas, sobre poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de localidades de diferentes zonas climáticas de Argentina. La supervivencia a 14°C fue similar entre localidades y por encima del 69%, valor que supera resultados de estudios previos del 24% a la misma temperatura (Bar Zeev, 1958). Además la supervivencia a 12°C observada para las poblaciones de San Bernardo y CABA son.

un resultado novedoso, ya que no se había registrado previamente el desarrollo completo de *Aedes aegypti* por debajo de los 14°C.

En cuanto a la comparación entre las poblaciones estudiadas, a 14°C no se detectaron diferencias en los tiempos de desarrollo (hasta pupa) así como tampoco en tiempos de desarrollo hasta adultos (Anexo). Esta última observación es importante para asegurar que las diferencias de desarrollo no se establecieran (o acentuaran) durante la permanencia como pupas. La supervivencia entre localidades también fue similar, sin embargo, las hembras de CABA fueron más pequeñas que las hembras de Resistencia y los machos de CABA más grandes que los machos de Resistencia y San Bernardo. Estos resultados sugieren que si bien las tres poblaciones tienen la misma supervivencia a bajas temperaturas, no todas tendrían la misma capacidad reproductiva. Es decir, en el caso de las hembras de CABA podrían tener menor capacidad reproductiva que las hembras de Resistencia, y los machos de CABA mayor que los de San Bernardo y Resistencia para esta temperatura constante.

A partir de los resultados de supervivencia en el primer experimento, tanto de la población de Resistencia a 14°C como de San Bernardo y CABA a 12°C se pudo establecer un criterio para determinar qué rango de bajas temperaturas variables era viable para criar las tres poblaciones.

En vista de los resultados obtenidos, hubiera sido interesante la inclusión de la población de Resistencia en el tratamiento de 12°C. Debido a que, según el conocimiento disponible previamente a la realización del experimento, se esperaba que ninguna de las poblaciones tuviera la capacidad de completar el desarrollo a esa temperatura, se decidió no utilizar en ese tratamiento los huevos disponibles en baja cantidad correspondientes a dicha población.

Para la temperatura variable “muy baja”, el menor tiempo de desarrollo hasta pupa de las hembras de Resistencia respecto a las hembras de CABA parecería sugerir una menor eficacia biológica de estas últimas. Sin embargo, solo lograron emerger hembras de CABA y San Bernardo, lo que hace suponer que las hembras de Resistencia fueron menos tolerantes a bajas temperaturas, en tanto que, el desarrollo más lento de aquellas hembras de localidades templadas fue lo que aseguró su supervivencia. Contrariamente, los machos de las tres poblaciones mantuvieron similar comportamiento en cuanto al tiempo de desarrollo.

Por otra parte, a la temperatura variable baja, los tiempos de desarrollo de los machos de San Bernardo fueron menores que los de CABA y Resistencia en tanto que para las hembras los tiempos fueron similares. Sin embargo, si bien para los machos los resultados para el tiempo de

desarrollo hasta adulto (Anexo) se mantuvieron similares entre poblaciones, las hembras de San Bernardo, en cambio acortaron sus tiempos respecto a Resistencia.

Teniendo en cuenta que los machos completan su desarrollo antes que las hembras, fue llamativo observar la similitud entre los sexos del tiempo de desarrollo de Resistencia a la temperatura variable “muy baja” y CABA a la temperatura variable “baja”. Si bien para Resistencia este resultado podría haberse dado debido a la dispersión entre los machos o bien el enlentecimiento del desarrollo en las hembras de Resistencia que finalmente murieron, no ocurrió lo mismo en CABA. Sin embargo al calcular el tiempo de desarrollo hasta adulto (Anexo) las diferencias entre sexos quedaron establecidas.

Los resultados descriptos en los párrafos anteriores para las temperaturas variables sugieren que la eficacia biológica podría establecerse en diferentes estados del desarrollo, según sean machos o hembras y posiblemente según la población estudiada. Tal como se observó a la temperatura variable muy baja, donde murieron todas las hembras de Resistencia, los sexos no parecerían ser igualmente tolerantes a las bajas temperaturas. Esto podría deberse a que tienen diferente gasto energético al completar el desarrollo. Asimismo también explicaría por qué en varias pupas muertas, a 12°C y a la temperatura variable muy baja, se observó una genitalia incompleta o indefinida. En otros estudios relacionados a la aptitud de los sexos se observó que los machos tienden a mantener el tiempo de desarrollo, en cambio las hembras tienden a mantener su tamaño corporal (Bedhomme *et al.*, 2003). Como consecuencia la extensión del tiempo de desarrollo para acumular más reservas podría llevar a las hembras a tener mortalidad más elevada que los machos (Maciá, 2009).

En cuanto a la comparación entre poblaciones de diferentes regiones, podría ser que a temperaturas muy bajas, los estados de larva (así como cada estadio) y de pupa, tuvieran distinta capacidad de respuesta pese a estar criándose a las mismas temperaturas (Amarasekare y Sifuentes, 2012) en relación a esto podría decirse entonces que las diferencias en la eficacia biológica entre poblaciones, en parte podría deberse a una menor vulnerabilidad a ese daño o a una mayor eficiencia para poder repararlo, ya sea por cuestiones genéticas, metabólicas, o comportamentales.

Estas observaciones podrían indicar que las diferencias, tanto entre sexos como entre poblaciones, no necesariamente tienen que darse como consecuencia del efecto sobre un estadio y/o estado particular sino como un efecto acumulativo de todos ellos (Amarasekare y Sifuentes, 2012).

Por último, la similitud del tamaño corporal entre temperaturas variables y entre localidades sugiere que en condiciones térmicas más extremas puede ser más apropiado considerar mediciones con mayor nivel de precisión. Si bien en este capítulo el tamaño corporal fue estimado a partir de la longitud del ala, existen otro tipo de mediciones corporales que podrían resultar de utilidad para realizar comparaciones. Por ejemplo, utilizar variables como la forma y el tamaño del ala, tal como estudiaron Garzón y Schweigmann (2018) en diferentes poblaciones de *Aedes albifasciatus*, podría ser más preciso para hallar diferencias que no llegaron a ser detectadas con la longitud de las alas para temperaturas variables utilizadas.

Asimismo, la baja supervivencia de la temperatura variable muy baja pone en evidencia que las condiciones térmicas fueron altamente estresantes (respecto a la temperatura variable baja) pese a que diariamente, la temperatura del agua permaneció al menos 8 horas por encima de 14°C. Estudios realizados con Coleoptera (Renault *et al.*, 2004) y Diptera (Cardoso *et al.*, 2002) demostraron que las temperaturas variables permiten que los individuos se recuperen incluso pudiendo reparar una lesión causada por frío, evitando así la muerte. Sin embargo en los resultados hallados en este experimento se puede observar que esto también depende del rango de temperaturas variables utilizado.

Del mismo modo que en lo sugerido en el tamaño corporal, pese a que la mayor mortalidad se produjo durante larva IV o pupa (tal como ocurrió a 12°C), esto no tiene por qué deberse a que estos sean los estados más vulnerables sino que también podría ser consecuencia de un daño acumulativo de condiciones de estrés permanente a temperaturas limitantes (Amarasekare y Sifuentes, 2012).

Si bien estos resultados permitieron tener una primera comparación entre poblaciones situadas en un gradiente térmico, la hipótesis planteada no quedaría demostrada con los resultados obtenidos hasta el momento. La comparación entre localidades resultó confusa ya que a temperaturas constantes la respuesta de la población de CABA fue diferente en cada sexo respecto a las otras poblaciones. Sin embargo a temperaturas variables la población que

pareció presentar mayor eficiencia biológica (debido al acortamiento del tiempo del desarrollo hasta adulto) fue San Bernardo.

Los resultados de los experimentos no se pudieron analizar en conjunto porque tienen distintas temperaturas medias. Sin embargo está demostrado por otros autores, que las comparaciones entre los regímenes (constante y variable) pueden mostrar similares o diferentes tiempos de desarrollo dependiendo de la temperatura media utilizada (Carrington *et al.*, 2013). Este es el motivo por el cual es importante utilizar temperaturas variables al estudiar diferentes parámetros biológicos. Por esta razón sería interesante el desarrollo de nuevos estudios que permitieran caracterizar el desarrollo de las diferentes poblaciones considerando un mayor número de réplicas y la comparación de temperaturas constantes y variables de igual temperatura media. Por ejemplo sería oportuno evaluar lo que ocurre con las tres poblaciones a 12°C en regímenes de temperatura constante y variable.

Entre tanto, si bien no es posible afirmar la adaptación de las poblaciones de clima templado (San Bernardo y CABA) respecto de Resistencia, mediante estos experimentos queda confirmado que al menos bajo condiciones experimentales las tres poblaciones de Argentina pueden llegar a adultos a temperaturas más bajas que las poblaciones estudiadas de otras regiones del planeta.

Anexo Capítulo II

Tiempo de desarrollo desde larva I hasta adulto para las temperaturas 14°C (constante) y 15,7 ± 3,2 °C (variable).

Temperatura (°C)	Localidad	Sexo	n	Media ± DE
14	San	♀	13	32,19 ± 2,56
	Bernardo	♂	11	28,59 ± 2,81
	CABA	♀	12	31,33 ± 1,27
		♂	14	29,93 ± 1,87
	Resistencia	♀	10	33,6 ± 3,07
		♂	8	28,88 ± 2,07
15,7 ± 3,2	San	♀	10	26,4 ± 1,37
	Bernardo	♂	17	23,79 ± 1,72
	CABA	♀	11	27,5 ± 1,84
		♂	13	25,88 ± 1,76
	Resistencia	♀	16	28 ± 1,79

Capítulo III:

Eclosión de *Aedes aegypti* en respuesta a diferentes condiciones de aclimatación y de inmersión

Introducción

En las zonas templadas existen cambios estacionales bien definidos (primavera, verano, otoño, invierno) con temperaturas y precipitaciones que varían regularmente (Figuerola y Mazzeo, 1998). Estos cambios actúan como señales que producen diversas modificaciones en los organismos en cuanto a su crecimiento, desarrollo, supervivencia, reproducción y latencia (Bradshaw y Holzapfel, 2017). Como estrategia adaptativa, los insectos que viven en regiones frescas pueden permanecer en estado de dormancia, la cual dependiendo de la especie, puede ocurrir en cualquiera de los estados de desarrollo cuando las condiciones climáticas son adversas (Vinogradova, 2007). Durante este período disminuye el metabolismo y los individuos pueden sobrevivir durante tiempos relativamente prolongados (Beck 1991, Denlinger 1991; Pérez y Noriega, 2013).

En *Aedes aegypti* la dormancia (asumida como quiescencia) ocurre en el embrión generando la inhibición de la eclosión de los huevos, lo que permite a los individuos tolerar períodos de falta de agua, o de condiciones térmicas que podrían resultar desfavorables para el desarrollo (Diniz *et al.*, 2017). Durante este periodo pueden sobrevivir porque los huevos tienen propiedades de resistencia a la desecación debido a la composición de la cutícula serosa que envuelve y protege al embrión (Rezende *et al.*, 2008; Farnesi *et al.*, 2015). Por esta razón en zonas templadas los individuos de *Ae. aegypti* pueden transcurrir el periodo invernal en etapa de huevo protegidos de las temperaturas frescas y la deshidratación.

Entre las variables ambientales más estudiadas que afectan la respuesta de eclosión de *Ae. aegypti* se encuentra la temperatura, cuyos efectos tienen relevancia tanto en los periodos previos como durante la inmersión (De Majo *et al.*, 2017).

Un eventual aumento de la temperatura seguido de precipitaciones, a finales del otoño, podría producir la eclosión de huevos de *Ae. aegypti*. Para esta especie existen antecedentes sobre diferentes temperaturas de aclimatación para huevos provenientes de CABA, en un caso

almacenados en campo ($11,5 \pm 3,8^{\circ}\text{C}$) y en laboratorio ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). En ese estudio pudo observarse que los huevos almacenados en campo bajo condiciones invernales tuvieron menor predisposición a eclosionar que aquellos almacenados en laboratorio con temperaturas más altas (Byttebier, 2017). Patrones similares fueron observados también para otras especies. Por ejemplo en *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae), la aclimatación a temperatura ambiental favorable durante siete días previo a la inmersión de los huevos, produjo una respuesta de eclosión mayor que cuando la exposición a esas temperaturas fue de un día (Campos *et al.*, 2007).

Respecto al efecto de las temperaturas durante la inmersión de los huevos, se sabe que a medida que disminuyen las temperaturas también disminuye la respuesta de eclosión (Farnesi *et al.*, 2009). Algunos autores sugieren que no hay eclosiones por debajo de los 13°C (Christophers, 1960), en tanto que en huevos provenientes de colonias Rockefeller (cepa de referencia *Ae. aegypti* susceptible a insecticidas), inmersos en una solución con nutrientes, se hallaron eclosiones a 12°C aunque no se conocen datos precisos sobre el porcentaje ni la supervivencia de las larvas (Farnesi *et al.*, 2009). En estudios en condiciones naturales llevados a cabo con huevos *Aedes aegypti* de CABA, se observó que la respuesta de eclosión ocurrió a temperaturas medias inferiores a 12°C . Sin embargo, los días en que se produjeron las eclosiones, las temperaturas máximas diarias tuvieron valores entre 12 y 18°C , por lo que es posible que las eclosiones se produjeran durante el día en horarios que superaron los 12°C (De Majo, 2017). En otros estudios realizados en laboratorio con huevos de la misma localidad inmersos en agua filtrada y a 12°C (temperatura constante), la respuesta de eclosión fue cercana al 70% (Byttebier *et al.*, 2014).

Así como existe un efecto de las bajas temperaturas de inmersión sobre la respuesta de eclosión también habrá un efecto sobre las larvas que hayan nacido, por ejemplo en estudios previos se ha observado eclosión a temperaturas inferiores a 10°C sin embargo la mortalidad de larvas fue total (Bond *et al.*, 1970). Es por ello que se esperaría que las poblaciones de zonas templadas frescas ajustaran su respuesta de eclosión a las condiciones térmicas locales, es decir que la predisposición a eclosionar fuera menor a temperaturas frescas evitando que las larvas que pudieran nacer mueran.

El objetivo de este capítulo fue evaluar en forma comparativa la respuesta a la eclosión a bajas temperaturas entre poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de localidades ubicadas a lo largo de un gradiente de temperatura invernal.

La hipótesis que se plantea es que la expansión de *Ae. aegypti* hacia regiones templadas más frescas, está asociada con la adaptación de las poblaciones para permanecer latente en el estado de huevos durante el periodo de bajas temperaturas. La predicción asociada con esta hipótesis es que las poblaciones de *Ae. aegypti* provenientes de localidades con condiciones térmicas frescas tengan una menor respuesta de eclosión a bajas temperaturas que las poblaciones de regiones cálidas.

Materiales y Métodos

Para llevar a cabo el experimento se realizó una colecta de huevos en las tres localidades de estudio, tal como se describió en el Capítulo II. A partir de esos huevos se generó una colonia para cada localidad, cuyos adultos fueron los progenitores de los huevos (Generación 1) que se utilizaron para el experimento (Figura 1).

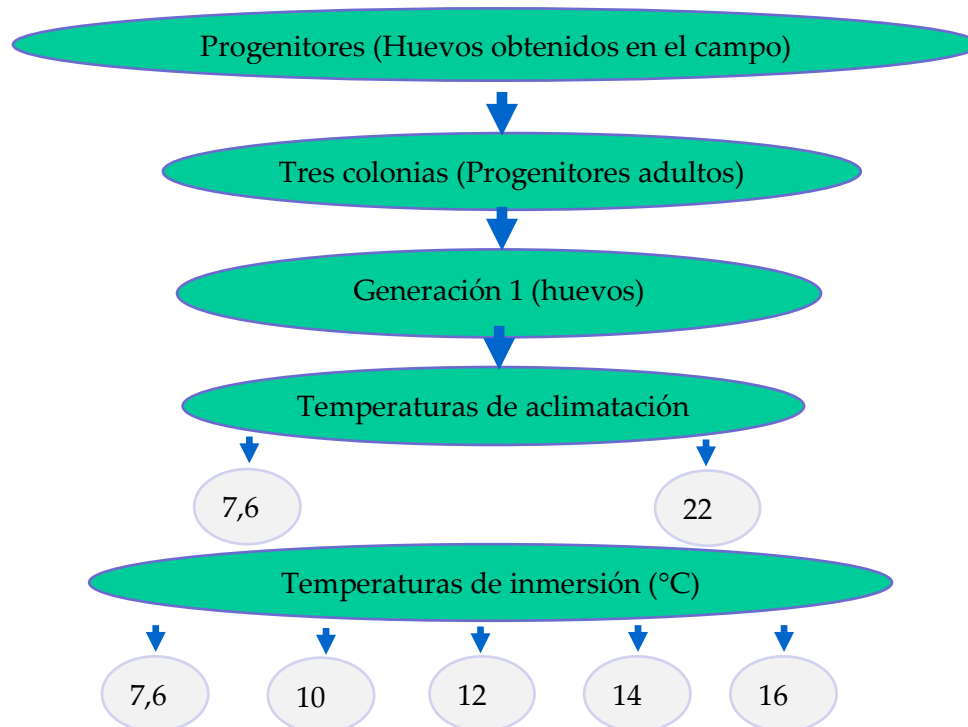


Figura 1. Diseño de la obtención de huevos y posterior ensayo de la proporción de eclosión bajo tratamientos de temperaturas constantes de aclimatación e inmersión.

Los huevos de *Ae. aegypti* colectados en las tres localidades (CABA, San Bernardo y Resistencia), fueron llevados al insectario del Instituto de Limnología “Dr. Raúl A. Ringuelet” (UNPL-CONICET) y mantenidos a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), y posteriormente aclimatados durante una semana en el insectario a 24°C con un fotoperíodo de 12 : 12 (luz : oscuridad). Para iniciar las colonias se sumergieron los huevos en bandejas con agua de red (aclimatada previamente durante seis días para alcanzar la temperatura ambiente y para permitir que el cloro se evapore) a la cual se le agregó media cucharadita de levadura como estímulo de eclosión (Figura 2 A). Una vez que los individuos llegaron a pupa las bandejas fueron colocadas dentro de las cajas de cría hasta que emergieran los adultos (Figura 2 B).



Figura 2. A) Bandejas de eclosión para iniciar las colonias. B) Cajas de cría. C) Alimentación de adultos dentro de las cajas de cría con un algodón embebido con una solución azucarada.

Las tres colonias fueron mantenidas con fotoperíodo 12 : 12 (luz : oscuridad) y a 24°C en cajas de cría, y alimentadas con solución azucarada (sacarosa) al 10% (Figura 2 B y C). Luego de la cópula las hembras tuvieron acceso a ingerir sangre de un roedor y aquellas que se alimentaron fueron separadas individualmente en recipientes de plástico transparente con un sustrato (bajalengua de madera) humedecido para que pudieran depositar los huevos. Cada recipiente fue provisto de una tela porosa de nylon y una tapa plástica perforada, donde se agregó una pasa de uva como alimento durante el tiempo que las hembras permanecieron dentro del recipiente. Una vez puestos los huevos, las hembras fueron llevadas a un freezer para que murieran por frío. Los

sustratos con huevos fueron mantenidos durante una semana en las mismas condiciones de temperatura y luz que las colonias, para asegurar el completo desarrollo de los embriones.

Diseño experimental

Aclimatación a dos temperaturas constantes

Los sustratos con huevos fueron transportados al laboratorio del Grupo de Estudio de Mosquitos, y allí se dividieron los huevos de cada colonia en dos grupos, los cuales fueron aclimatados durante siete días a una de dos temperaturas. Una de las temperaturas de aclimatación elegida fue de 7,6°C (que se mantuvo mediante una cámara fría) ya que los huevos mantienen su viabilidad a una temperatura de almacenamiento entre 6,6 y 17,8°C (Christophers, 1960), y simula una temperatura media por debajo de los valores para la época invernal en la Ciudad de Buenos Aires. La otra temperatura de aclimatación elegida fue de 22°C (temperatura ambiente del laboratorio) considerada como una condición de almacenamiento óptima (Byttebier, 2017), y que simula un eventual período de temperatura cálida durante la época invernal.

En ambos casos, junto a los recipientes con sustratos, se colocó un sensor (HOBO® Pendant Temperature Data Logger) que registró las temperaturas durante todo el período de aclimatación. El fotoperíodo de aclimatación fue de 10 : 14 (luz : oscuridad), representativo del invierno de la Ciudad de Buenos Aires.



Figura 3. Condiciones de aclimatación de los huevos en: A) cámara fría y B) temperatura ambiente.

Inmersión de los huevos a bajas temperaturas constantes

Una vez finalizado el periodo de aclimatación los bajalenguas fueron trasvasados individualmente a tubos Falcon® de 50 ml (30x115 mm) (Figura 4 A), con 40 ml de agua filtrada por ósmosis inversa. Todos los tubos fueron cubiertos con tapas de aislante térmico, e inmersos en uno de cinco cubetas térmicas (con un sensor para medir la temperatura horaria) controlados cada uno por termostatos programados a temperaturas constantes de 7,6°C, 10, 12, 14 y 16°C (Figura 4 B). La temperatura de 12°C fue la más representativa de la temperatura media del mes de julio. Las demás temperaturas fueron representativas de un gradiente térmico entre la mínima y máxima del mismo mes. Se utilizaron entre 5 y 9 réplicas (sustratos) por cubeta térmica, con un número de huevos mayor a 10 por sustrato. Cada sustrato contenía los huevos de una única hembra. El tiempo de inmersión de los sustratos con huevos a bajas temperaturas fue de 48 horas, luego fueron trasvasados a tubos secos y colocados nuevamente en las cubetas térmicas hasta finalizar el conteo de todos los sustratos. Para cada tubo se contaron la cantidad de larvas nacidas vivas, muertas, larvas a medio emerger, y huevos colapsados y semi-colapsados (considerados como huevos no viables) provenientes de cada sustrato. Las larvas a medio emerger eran aquellas que si bien habían roto el corion no finalizaron el proceso de eclosión.



Figura 4. Elementos utilizados durante el experimento. A) Sustrato con huevos, B) cubetas térmicas conteniendo los tubos en donde se hicieron eclosionar los huevos de *Aedes aegypti*.

Los siguientes procedimientos se realizaron para evaluar la viabilidad de los huevos. En primer lugar los sustratos con huevos fueron guardados en tubos secos a temperatura ambiente por un lapso de cinco días. Luego fueron sumergidos, a la misma temperatura, en 40 ml de una solución acuosa conteniendo 0,047 mg de levadura /ml de agua, lo que representa un estímulo fuerte para forzar a eclosionar a los huevos remanentes. Luego de 48 hs se inició el recuento de larvas nacidas (vivas y muertas), huevos colapsados y semi-colapsados en cada réplica, y en el momento del recuento los sustratos se fueron trasvasando a tubos secos. El conteo se realizó durante 12 días, y durante otros 12 días, los sustratos se mantuvieron a temperatura ambiente. Finalmente, para evaluar la viabilidad se llevó a cabo el diafanizado de huevos remanentes. Previamente se realizó el conteo de huevos enteros y se removieron aquellos huevos colapsados, o semi-colapsados. Luego se realizó la decoloración del corion con una solución de hipoclorito de sodio en concentraciones de 50 y 100% que permitió ver si el embrión se encontraba en buen estado (adaptado de Mortenson, 1949). Se consideraron como embriones viables aquellos con coloración blanquecina y que presentaron su segmentación y morfología completa (Figura 5 A), y como embriones no viables cuando la coloración fue ocre y su estado gelatinoso (Figura 5 B).



Figura 5. A) Embriones viables en la que se puede observar la cabeza con escama de eclosión, ojos y abdomen segmentado. B) Embriones no viables de coloración ocre cuya morfología es indefinida.

Análisis de datos

Los huevos eclosionados (HE) resultaron de la suma de larvas vivas + larvas muertas + larvas a medio emerger (también larvas muertas) observadas a partir de la primera inmersión. El total de huevos viables (THV) resultó de la suma para las dos inmersiones de larvas vivas + larvas muertas + larvas a medio emerger + huevos enteros con el embrión viable. La proporción de eclosión (PE) se calculó mediante la división de HE/THV.

A partir de los resultados del experimento se analizó el efecto de las temperaturas de aclimatación (2 niveles, variable continua) las temperaturas de inmersión (5 niveles, variable continua) y las localidades de origen (3 niveles, variable categórica) sobre la respuesta de eclosión. Además se incluyó una variable aleatoria a nivel de observación (cada sustrato fue considerado como una réplica) para considerar la sobre dispersión de los datos. El análisis de la proporción de huevos eclosionados se llevó a cabo mediante Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM), con una distribución de tipo Binomial y una función de enlace Logit. Para el análisis estadístico se utilizó R software, Versión 3.4.4 (R Core Team 2018), a través de una interfaz amigable en el software Infostat versión 1.2 (Di Rienzo *et al.*, 2018). Se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Fisher LSD de rangos (Conover, 1999).

Resultados

En todos los tratamientos se registró una gran proporción de larvas vivas. Para la localidad de San Bernardo la cantidad total de huevos, larvas nacidas y larvas vivas fue de 6.019, 285 y 269 respectivamente; para CABA, la cantidad total de huevos, larvas nacidas y larvas vivas fue de 5.921 huevos, 449 y 359 respectivamente; para Resistencia, la cantidad total de huevos, larvas nacidas y larvas vivas fue de 5.377, 706 y 483 respectivamente.

Si bien se observó una alta supervivencia larval hasta 48 hs luego de la inmersión de los huevos, independientemente de las localidades, no se observa con claridad un patrón definido de supervivencia al acrecentar las temperaturas. Por ejemplo en Resistencia se observaron dos grupos que presentaron mortalidad alta (en ambas temperaturas de aclimatación y 14°C de inmersión) o completa (a 7,6°C y 10°C, de aclimatación e inmersión, respectivamente) de las larvas nacidas. (Figura 6). Del total de larvas nacidas en cada tratamiento, al menos durante 48 hs desde el momento de inmersión, sobrevivieron más del 70%, a excepción del tratamiento a 22°C y 14°C de temperaturas de aclimatación e inmersión, respectivamente (Figura 6 C).

Independientemente de la temperatura de aclimatación, principalmente en CABA se observa una tendencia a una mayor respuesta de eclosión cuando la temperatura de inmersión es más alta. En las otras localidades si bien se observa una tendencia similar se produce una mayor respuesta de eclosión a 14°C (temperatura de inmersión) siendo menor a 16°C. Asimismo a 14°C (inmersión) en la mayoría de los casos se observa mayor mortalidad de larvas principalmente en las provenientes de Resistencia y en menor medida en las de CABA.

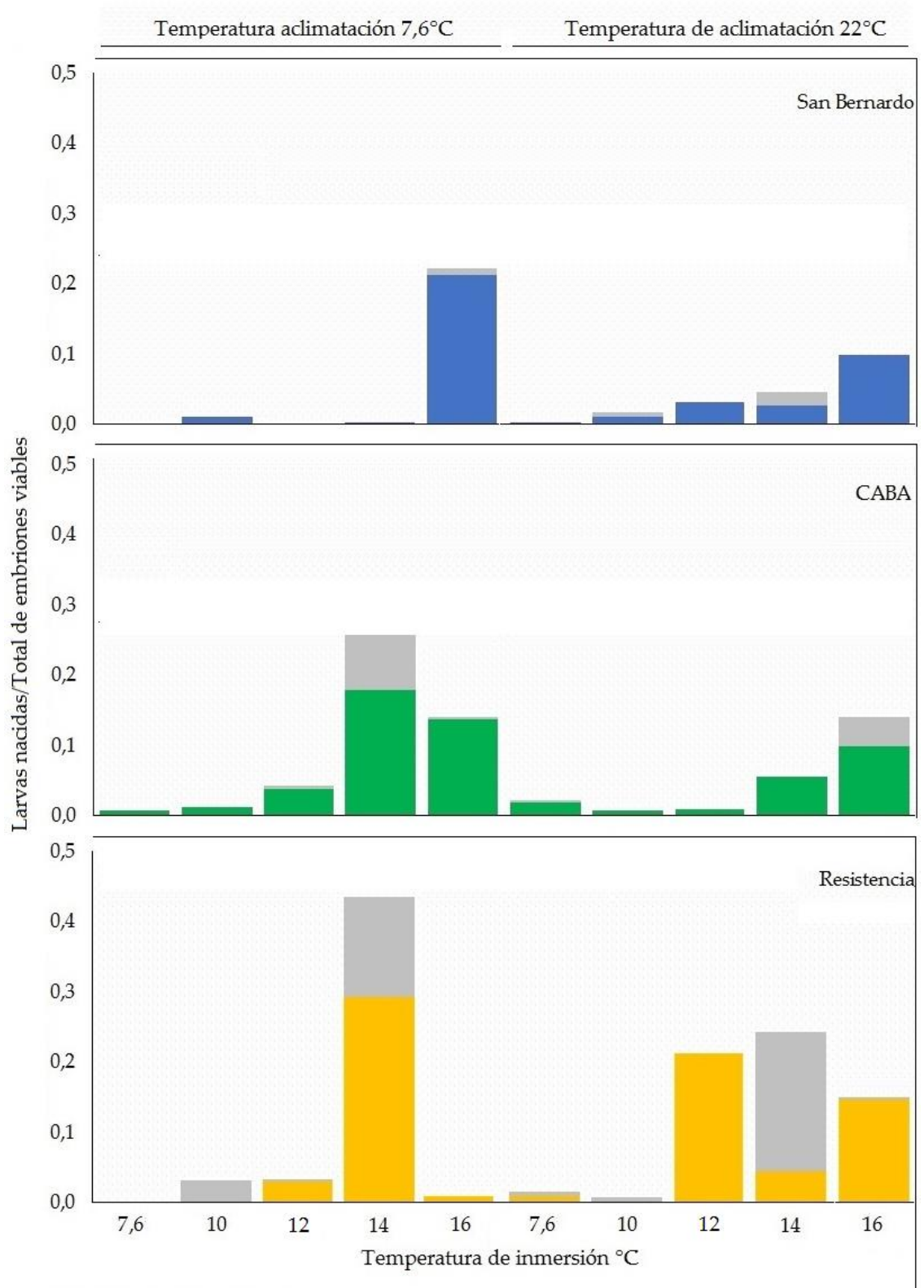


Figura 6. Proporción de larvas nacidas luego de las 48 hs de inmersión a temperaturas constantes para las localidades de: A) San Bernardo, B) CABA y C) Resistencia. Larvas vivas en color azul, verde y amarilla; larvas muertas en gris.

Mediante el diafanizado de los huevos se observó que el 99% de los huevos que no eclosionaron fueron viables. Una baja cantidad de huevos eclosionaron rápidamente al agregar la solución acuosa con hipoclorito de sodio. Además, en algunos huevos el corion se transparentaba rápidamente (1-2 minutos), en cambio en otros la decoloración completa del corion se extendió hasta 15-20 minutos.

No se hallaron efectos significativos de las variables, ni de la interacción entre ellas, sobre la proporción de eclosión de huevos de *Ae. aegypti* (Tabla 1 y Figura 6).

Tabla 1. Resultados del análisis de Modelos Lineales Generalizados Mixtos de la respuesta de eclosión en función de las variables temperatura de aclimatación, temperatura de inmersión, localidad y sus interacciones.

Factor	GL	F	p
Localidad	2	7,50E-09	> 0,9999
Temperatura de aclimatación	1	6,70E-10	> 0,9999
Temperatura de inmersión	4	4,00E-10	> 0,9999
Localidad*Temperatura de aclimatación	2	1,60E-08	> 0,9999
Temperatura de aclimatación*Temperatura de inmersión	4	2,60E-10	> 0,9999
Localidad*Temperatura de inmersión	8	3,90E-09	> 0,9999
Localidad*Temperatura de aclimatación*Temperatura de inmersión	8	2,10E-09	> 0,9999

Tabla 2. Resumen del número total de sustratos, y del número de sustratos sin eclosiones por cada tratamiento.

Localidad de origen	Temperatura de aclimatación (°C)	Temperatura de inmersión (°C)	N° de sustratos	N° de sustratos sin eclosiones	Valor máximo de eclosión
CABA	7,6	7,6	8	6	0,019
		10	9	7	0,063
		12	9	5	0,172
		14	9	1	0,929
		16	9	8	0,845
	22	7,6	6	4	0,148
		10	8	7	0,231
		12	6	5	0,034
		14	7	4	0,500
		16	9	5	0,670
San Bernardo	7,6	7,6	9	9	0,000
		10	8	6	0,035
		12	7	7	0,000
		14	9	8	0,010
		16	9	3	0,935
	22	7,6	9	8	0,159
		10	9	5	0,116
		12	10	6	0,197
		14	9	4	0,203
		16	9	5	1,000
Resistencia	7,6	7,6	8	8	0,000
		10	8	6	1,000
		12	8	5	0,119
		14	8	4	0,871
		16	5	3	0,036
	22	7,6	7	6	0,056
		10	8	6	0,024
		12	8	5	0,832
		14	7	4	0,983
		16	7	2	0,558

Se observó una gran variabilidad en respuesta de eclosión entre sustratos, para la mayor parte de los tratamientos (Tabla 2). Por ejemplo en todos los tratamientos se registraron sustratos en los cuales no hubo eclosión aunque los huevos estuvieran viables, y algunos tratamientos con sustratos con eclosión superior al 50 %.

Discusión

La baja eclosión fue similar en las tres poblaciones independientemente de las temperaturas de aclimatación e inmersión. Además la proporción de eclosión fue de una sexta parte respecto a los resultados de estudios previos realizados para poblaciones de CABA con huevos colectados en campo e inmersos a temperaturas similares (Byttebier *et al.*, 2014). Las metodologías aplicadas en cada estudio podrían explicar por qué huevos provenientes de CABA tuvieron respuestas de eclosión tan disimiles. Una diferencia metodológica radicó en el origen de los huevos ya que en el experimento de Byttebier *et al.* (2014) fueron obtenidos a partir de ovitrampas colocadas en campo, en cambio en este estudio fueron obtenidos mediante una colonia en laboratorio bajo condiciones de temperaturas constantes y 12 : 12 (luz : oscuridad).

La segunda diferencia radica en la edad de los huevos, que fue de tres meses en el experimento de Byttebier *et al.* (2014) y de dos semanas en este estudio. En el estudio de Byttebier *et al.* (2014) se observó que huevos de mayor edad eclosionaban en menor proporción que los huevos de menor edad. Del mismo modo, en otros estudios llevados a cabo con huevos provenientes de colonias de laboratorio de distintas edades, se observó menor respuesta de eclosión en los huevos de mayor edad (Brown *et al.*, 2016). Se sabe además, que existen una serie de factores que pueden desencadenar diferentes respuestas de eclosión; por ejemplo los efectos de la temperatura y fotoperiodo sobre los progenitores, así como también la carga genética que portan es decir, un efecto materno o paterno (Gillet, 1955; Boyer *et al.*, 2012; Helinski *et al.*, 2012).

En laboratorio, la temperatura, humedad y nutrientes ingeridos por los progenitores son variables conocidas o que pueden controlarse. En lo que concierne a los huevos luego de ser depositados en los sustratos (en laboratorio) las condiciones térmicas y de humedad también son conocidas. Sin embargo cuando se utilizan huevos colectados en campo todos estos factores son desconocidos. A partir de estas inconsistencias observadas (experimento del capítulo, Byttebier *et al.* 2014 y Brown *et al.*, 2016) se plantean como posibles estudios futuros la interacción de tres

variables que podrían estar teniendo efectos sobre la respuesta de eclosión; origen (laboratorio/campo), edad y bajas temperaturas.

Más allá de las diferencias halladas en los estudios debe tenerse en cuenta que el alcance de los resultados del experimento descrito en este capítulo podría ser limitado debido a la variabilidad de huevos eclosionados por sustrato y el bajo número de réplicas que se utilizó para poder realizar los tratamientos en ese rango térmico, por lo que estas serían dos cuestiones a tener en cuenta para estudios futuros.

Durante los últimos años se han realizado nuevos estudios de embriogénesis en *Ae. aegypti* algunos de los cuales evaluaron el efecto que tiene la temperatura sobre la velocidad de crecimiento del embrión o las propiedades de resistencia que se generan durante esta etapa (Rezende *et al.*, 2008; Farnesi *et al.*, 2015). Sin embargo aún no hay estudios que hayan evaluado que efectos tienen la temperatura, fotoperíodo y la humedad durante la etapa de desarrollo embrionario (embriogénesis) sobre la posterior respuesta de eclosión.

En un número bajo de réplicas se observó gran cantidad de huevos eclosionados para la temperatura de inmersión. Si bien cada réplica correspondió a la postura de una hembra se desconoce si se produjo más de una cópula (con distintos machos). Esta observación resulta interesante ya que se ha estudiado tanto en condiciones experimentales como en poblaciones naturales puede darse el caso de poliandria al menos en una baja proporción, 14% y 6,5 % respectivamente (Gillet, 1955; Boyer *et al.*, 2012; Helinski *et al.*, 2012). De este modo una posible explicación es que la respuesta de eclosión de los huevos podría estar regulada por diferencias genéticas entre los huevos provenientes de la misma hembra (que hayan copulado con diferentes machos, es decir poliandria). La variabilidad en la respuesta de eclosión puede tener diferentes orígenes, sin embargo su importancia radica en que es considerada como un mecanismo que tiene una consecuencia evolutiva a largo plazo. Al eclosionar el total de huevos en diferentes tiempos aumenta el número de oportunidades (cobertura de apuestas) para que al menos cierta cantidad de individuos puedan llegar a adultos. En definitiva puede favorecer la colonización de la especie en ambientes fluctuantes (Starrfelt y Kokko, 2012).

En lo que respecta a la supervivencia larval, a 7,6; 10; 12; 14; 16°C, se observó que al menos dentro de las 48 hs de inmersión, pueden sobrevivir sin el agregado de nutrientes (Figura 6). Independientemente del tratamiento, sugeriría que la supervivencia no estaría condicionada por

las temperaturas de aclimatación e inmersión y además que estas poblaciones tienen gran tolerancia a exposiciones cortas a baja temperatura.

Los resultados obtenidos en este experimento no se sustentan con la hipótesis planteada, ya que se pudo ver que las tres poblaciones de *Ae. aegypti* ante las mismas condiciones térmicas presentaron baja y similar respuesta de eclosión.

DISCUSIÓN GENERAL Y PROYECCIONES FUTURAS

Aedes aegypti comparte con las otras especies de la tribu Aedini la capacidad de que sus huevos permanecen en estado latente bajo condiciones climáticas desfavorables como por ejemplo largos periodos de sequía, pudiendo eclosionar cuando las condiciones propicias se restablezcan. A diferencia de otras especies, además de los ambientes naturales (fitotelmata), utiliza como sitios de cría recipientes artificiales. Estas características les otorgan a los individuos de esta especie la posibilidad de dispersarse por medios pasivos, permitiéndole invadir nuevos territorios. Teniendo en cuenta esas características se planteó como objetivo general de la tesis, estudiar los mecanismos que favorecen y/o impiden la expansión del rango de distribución y el incremento de las abundancias de las poblaciones de *Ae aegypti* en la región templada de Argentina.

El estudio se abordó con trabajo de campo y experimento en condiciones controladas de laboratorio. En el capítulo I se exponen los resultados de los relevamientos en depósitos, destacándose la expansión de *Ae. aegypti* hacia zonas templadas más allá de la distribución conocida hasta 2013. Durante los muestreos se observó que los neumáticos al aire libre funcionaban como importantes focos de cría, no solo de *Ae. aegypti* sino también de otros mosquitos del género *Culex*. Estos focos son de gran importancia debido a que además de *Ae. aegypti*, algunas especies del género *Culex*, que también los utilizan, son potenciales vectores de arbovirus (Contigiani et al., 2016).

En muchas de las localidades visitadas, la principal problemática según palabras de los dueños de los depósitos, es que se ven obligados a acumular las cubiertas debido a que no tienen asignado un destino cercano en donde se las destruya. Los pocos lugares de reciclado distan cientos de kilómetros de los depósitos, lo cual no es redituable dado los altos costos del transporte para los acopiadores. Esto trae como consecuencia, que en los municipios donde no hay una regulación y control por parte del estado, los neumáticos terminan en basurales a cielo abierto, transformándose éstos en focos de *Ae. aegypti*.

Al relacionar la presencia de *Ae. aegypti* con las temperaturas y precipitaciones de las localidades visitadas, los resultados muestran que estas variables podrían estar limitando la expansión del mosquito. Como resultados de la investigación, se observó que por debajo de los 700 mm de precipitación anual acumulada y 14,5°C de temperatura media anual, hay menor

probabilidad de hallar *Ae. aegypti*. Estos resultados fueron corroborados en parte con los estudios experimentales, donde se demostró que las bajas temperaturas funcionaron como un factor limitante en la supervivencia de los individuos. Por otra parte, se observó que las bajas temperaturas al momento de la inmersión de los huevos, pueden inhibir parcialmente la eclosión. Si esta situación se diera en condiciones naturales, bajo temperaturas invernales y eventuales lluvias, se podría especular que solo un número reducido de huevos eclosionen, y que las larvas no puedan completar su desarrollo. En tanto que aquellos que no eclosionen, permanezcan latentes hasta que las condiciones térmicas del ambiente sean más cálidas. De ocurrir esto, la persistencia interanual de *Ae. aegypti* en un nuevo sitio, sería factible.

Los resultados experimentales muestran que frente a condiciones térmicas frescas estresantes (entre los 7,6°C y 15,7°C de temperatura media) las tres poblaciones estudiadas tienen similar tolerancia, independientemente de que provengan de regiones con condiciones climáticas diferentes.

El hallazgo de *Ae. aegypti* en localidades con temperaturas más frías que las conocidas, como por ejemplo Villa Gesell, no es una evidencia suficiente para asegurar la persistencia interanual, ya que además de las variables estudiadas existen otras que también podrían ser limitantes para el desarrollo y reproducción de la especie. Por ejemplo, la época del año en que ingresan los huevos transportados accidentalmente a una nueva localidad, podría ser una variable determinante para el asentamiento de *Ae. aegypti*. Si el ingreso ocurriera durante la temporada cálida, y especialmente al inicio del año, la posibilidad de éxito sería mayor que si ocurriera al final del otoño o a principios de invierno, donde se esperaría que solo algunos huevos puedan eclosionar. Esto implicaría un costo alto para las larvas, en términos de supervivencia, a causa de las bajas temperaturas.

El aporte de esta tesis da lugar al planteo de nuevas hipótesis y futuros estudios que permitan comprender más cabalmente los mecanismos de los cuales se vale *Ae. aegypti* para ir colonizando y estableciéndose en localidades donde hasta el momento no está presente.

Entre las hipótesis se plantea que:

- a) La tolerancia a bajas temperaturas es diferente entre poblaciones durante las etapas inmaduras del desarrollo. Los huevos provenientes de zonas frescas puestos a bajas temperaturas, podrían completar su desarrollo embrionario en menor tiempo que aquellos que

proviene de zonas cálidas. Además, las poblaciones presentarían diferentes tolerancias observables en el tiempo de supervivencia de larvas nacidas a bajas temperaturas. Podrían entonces evaluarse dos instancias, los tiempos de desarrollo embrionario a bajas temperaturas y si larvas nacidas a bajas temperaturas logran completar su desarrollo hasta adultos.

- b) Una segunda hipótesis es que, si bien a bajas temperaturas todas las poblaciones tienen similar tolerancia en el tiempo total de desarrollo, el efecto se hace evidente en el éxito reproductivo de los adultos emergidos. Por lo cual, luego de obtener adultos, criados a bajas temperaturas, provenientes de zonas cálidas y templadas podría evaluarse si presentan diferente éxito reproductivo.

Entre los posibles estudios se mencionan:

- 1) Comprobar en cuáles de las localidades donde fue hallado *Ae. aegypti* recientemente, logró establecerse y proliferar de un año a otro.
- 2) Existen otras variables climáticas como la velocidad del viento y la humedad relativa que no fueron consideradas en esta tesis, y podrían estar influyendo directa o indirectamente sobre el desplazamiento y colonización de parte de *Ae. aegypti*. El viento podría por ejemplo ser una variable limitante sobre la actividad de vuelo, que es de vital importancia en la búsqueda de alimento, pareja y de sitios de oviposición. Por otra parte, niveles bajos de humedad afectan a los adultos causando mortalidad por deshidratación. Además, en climas secos la evaporación del agua de los recipientes es más rápida que en climas húmedos ocasionando desecación en los hábitats que utiliza *Ae. aegypti* para la oviposición y el posterior desarrollo de los estados inmaduros. Estudios en campo en los que se incluyeran la humedad y los vientos locales permitirían complementar información sobre las variables que pueden favorecer (o evitar) la presencia *Ae. aegypti* en nuevas localidades.
- 3) Debido a que *Ae. aegypti* vive en el entorno urbano, los hábitos de limpieza o mantenimiento de las viviendas y depósitos, y otros aspectos culturales, son factores que favorecen o impiden el establecimiento y la proliferación de este mosquito, cuando las condiciones ambientales son propicias. Por esta razón,

además de las variables ambientales, son necesarios estudios referidos a los factores socio-culturales para comprender mejor los mecanismos de expansión de este vector.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliaga V. S., Ferrelli F., Piccolo M. C.** (2017). Regionalization of climate over the Argentine Pampas. *Int. J. Climatol.* 37: 1237-1247.
- Almirón W. R. y Brewer M. M.** (1995). Preferencia de hospedadores de Culicidae (Diptera) recolectados en el centro de la Argentina. *Rev. Saúde Pública.* 29: 108-114.
- Amarasekare P. y Sifuentes R.** (2012). Elucidating the temperature response of survivorship in insects. *Funct. Ecol.* 26: 959-968.
- Anónimo** (2012). (<http://temasdeenfermeria.com.ar/2012/03/muestras-positivas-para-larvas-de-aedes-en-olavarria/>).
- Avilés G., Cecchini R., Harrington M., Cichero J., Asis R. y Rios C.** (1997). *Aedes aegypti* in Cordoba province, Argentina. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 255-258.
- Bar Zeev M.** (1958). The effect of temperature on the growth rate and survival of the immature stages of *Aedes aegypti* (L.). *Bull. Entomol. Res.* 49: 157-163.
- Beck S. D.** (1991). Chapter 9. Thermoperiodism. In: Lee R. E., Denlinger D. L. (Eds.). *Insects at Low Temperature*. Chapman & Hall, New York.
- Becker N., Pluskota B., Kaiser A., Schaffner F.** (2012) Exotic mosquitoes conquer the world. In: Melhorn H. (Ed.) *Arthropods as vectors of emerging diseases. Parasitology Research Monographs* 3. Springer, Berlin.
- Bedhomme S., Agnew P., Sidobre C. y Michalakis Y.** (2003). Sex-specific reaction norms to intraspecific larval competition in the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Evol. Biol.* 16: 721-730.
- Bejarano J., Del Ponte E., Orfila R.** (1959). *Primeras Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas, Primera Parte*. Buenos Aires, Argentina.
- Benjamini Y. y Hochberg Y.** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B.* 57: 289-300.
- Bergero P. E., Ruggerio C. A., Lombardo R., Schweigmann N. J. y Solari H. G.** (2013). Dispersal of *Aedes aegypti*: field study in temperate areas using a novel method. *J. Vector Borne Dis.* 50: 163-170.
- Bond H. A., Keirans J. E., Babbitt M. F.** (1970). Environmental influences on the viability of overwintering *Aedes aegypti* (L.) eggs. *Mosq. News* 30: 528-533.
- Boyer S., Toty C., Jacquet M., Lemperiere G. y Fontenille D.** (2012) Evidence of multiple inseminations in the field in *Aedes albopictus*. *PLoS ONE* 7: e42040.

- Bradshaw W. E., Holzapfel C. M. (2017).** Chapter 2. Natural variation and genetics of photoperiodism in *Wyeomyia smithii*. En: Goodwin S. (Ed.). *Advances in Genetics*. Elsevier BV.
- Briegel H. (1990).** Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 36: 165-172.
- Brown H. E., Smith C., Lashway S. (2016).** Influence of the Length of Storage on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Egg Viability. *J. Med Entomol.* 0: 1-3.
- Bryant J. E., Holmes E. C. y Barrett A. D. (2007).** Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 3: e75.
- Byttebier B., De Majo M. S. y Fischer S. (2014).** Low temperature hatching response of *Aedes aegypti* eggs: effects of hatching media and storage conditions. *J. Med. Entomol.* 51: 97-103.
- Byttebier B. (2017).** *Ecología invernal de los huevos de Ae. aegypti (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Buenos Aires.* Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Camargo S. (1967).** History of *Aedes aegypti* eradication in the Americas. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 36: 602-603.
- Campos R. E. (1993).** Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) en la localidad de Quilmes (Buenos Aires, Argentina). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 52: 36-36.
- Campos R. E. y Maciá A. (1998).** Capítulo 28. Culicidae. En: Morrone, J. J. y Coscarón S. (Eds.), *Biodiversidad de los Artrópodos Argentinos: una perspectiva biotaxonomica.* Ed. Sur, La Plata.
- Campos R. E.; SY V. E.; Castro L. (2007).** Effects of continuous drought and immersion on hatchability of *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) eggs stored at low temperature. *Rev. Soc Entomol Arg.* 66: 131-136.
- Carbajo A. E., Gómez S. M., Curto S. I. y Schweigmann N. J. (2004).** Variación espacio-temporal del riesgo de transmisión de dengue en la Ciudad de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires).* 64: 231-234.
- Carbajo A. E., Cardo M. V. y Vezzani D. (2019).** Past, present and future of *Aedes aegypti* in its South American southern distribution fringe: What do temperature and population tell us?. *Acta Trop.* 90: 149-156.
- Cardoso V. V, Ferreira M. P., Montagner J. M., Fernandez C. G, Moreira J. C. y Oliveira A. K. (2002).** The effects of constant and alternating temperatures on the reproductive potential, life span, and life expectancy of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Dipteria: Tephritidae). *Braz. J. Biol.* 62: 775-786.

- Carrington L. B., Armijos M. V., Lambrechts L., Barker C. M. y Scott T. W.** (2013). Effects of fluctuating daily temperatures at critical thermal extremes on *Aedes aegypti* Life-History Traits. PLOS One 8:e58824.
- Chang L. H., Hsu E. L., Teng H. J. y Ho C. M.** (2007). Differential survival of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) larvae exposed to low temperatures in Taiwan. J. Med. Entomol. 44: 205–210.
- Christophers S.** (1960). *Aedes aegypti* (L). *The yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure*. Cambridge University Press, London.
- Clements A. N.** (2012). *The biology of mosquitoes, Transmission of Viruses and Interactions with Bacteria*. Cambridge, Cabi Publishing.
- Colinet H, Sinclair B. J., Vernon P. y Renault D.** (2015). Insects in fluctuating thermal environments. Annu. Rev. Entomol. 60: 123-140.
- Collings, B. J.; Hamilton, M. A.** (1988). Estimating the power of the two-sample Wilcoxon test for location shift. Biometrics, 44: 847-860.
- Conover W. J.** (1999). *Practical nonparametric statistics*, Third Edition. New York: John Wiley & Sons.
- Contigiani M. S., Díaz A. L., Spinsanti L. I., Tauro L. B.** (2016). Capítulo 13. Arbovirus. En Berón C. M., Campos R. E., Raquel M. Gleiser R. M., Leonardo M. Díaz-Nieto L. M. Salomon O. D, Schweigmann N. (Eds.). *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina*. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.
- Couret J. y Benedict M.Q.** (2014). -A meta-analysis of the factors influencing development rate variation in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) B). BMC. Ecol. 14: 3. doi: 10.1186/1472-6785-14-3.
- Cupp E. W., Zhang D., Yue X., Cupp M. S., Guyer C., Sprenger T. R., Unnasch T. R.** (2004). Identification of reptilian and amphibian blood meals from mosquitoes in an eastern equine encephalomyelitis virus focus in central Alabama. Am. J. Trop. Med. Hyg. 71: 272-276.
- Curto S. I., Boffi R., Carbajo A.E. y Plastina R.** (2002). Reinfestacion del territorio argentino por *Aedes aegypti*. Salomón OD (Ed.). *Actualizaciones en Artropodología Sanitaria Argentina*. Serie: Enfermedades transmisibles. RAVE, Comp., Buenos Aires.
- Darsie R. F.** (1985). Mosquitoes of Argentina. Part I. Keys for identification of adult females and fourth stages larvae in english and spanish (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics. 17: 153-253.

- De Majo M. S.** (2017). *Factores ambientales que afectan la eclosión de los huevos y la supervivencia de los estados inmaduros de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) durante la temporada fría en una región templada*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- De Majo M. S., Montini P., Fischer S.** (2017). Egg hatching and survival of immature stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under natural temperature conditions during the cold season in Buenos Aires, Argentina. *J. Med. Entomol.* 54: 106-113.
- Denlinger D.L.** (1991). Chapter 8. Relationship between Cold Hardiness and Diapause. En: Lee R. E. y Denlinger D. L. (Eds.). *Insects at low temperature*. Chapman and Hall, New York.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C. W.** (2018). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz-Nieto L., M. Maciá A., Perotti M. A. y Berón C. M.** (2013). Geographical limits of the southeastern distribution of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Argentina. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e1963.
- Diniz D. F. A., de Albuquerque C. M. R., Oliva L. O., de Melo-Santos M. A. V. y Ayres C. F. L.** (2017). Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasit. Vectors.* DOI: 10.1186/s13071-017-2235-0.
- Domínguez C. y Lagos S.** (2001). Presencia de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en la provincia de Mendoza, Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 60: 79-80.
- Eisen L., Monaghan A. J., Lozano-Fuentes S., Steinhoff D. F., Hayden M. H. y Bieringer P. E.** (2014). The impact of temperature on the bionomics of *Aedes (Stegomyia) aegypti*, with special reference to the cool geographic range margins. *J. Med. Entomol.* 51: 496-516.
- Farnesi L. C., Martins A. J., Valle D. y Rezende G. L.** (2009). Embryonic development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of different constant temperatures. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104: 124-126.
- Farnesi, L. C., Menna-Barreto F. R. S., Martins A. J., Valle D. y Rezende G. L.** (2015). Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J. Insect Physiol.* 83: 43-52.

- Figuerola P. I., Mazzeo N. A.** (1998). Urban–rural temperature differences in Buenos Aires. *Int. J. Climatol.* 18: 1709-1723.
- Fischer S., De Majo M.S., Quiroga, L., Páez M. y Schweigmann N.** (2017). Long-term spatio-temporal dynamics of the mosquito *Aedes aegypti* in temperate Argentina. *Bull. Entomol. Res.* 107: 225–233. doi: 10.1017/s0007485316000869
- Garzón M. J., Schweigmann N.** (2015). Thermal response in pre-imaginal biology of *Ochlerotatus albifasciatus* from two different climatic regions. *Med. Vet. Entomol.* 29: 380-386.
- Garzón M. J., Schweigmann N.** (2018). Wing morphometrics of *Aedes (Ochlerotatus) albifasciatus* (Macquart, 1838) (Diptera: Culicidae) from different climatic regions of Argentina. 11: 303. *Parasit. Vectors.* <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2888-3>.
- Gillet J. D.** (1955). The inherited basis of variation in the hatching response of *Aedes* eggs (Diptera: Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 46: 255-265.
- Gordon R. M.** (1922). Note on the bionomics of *Stegomyia calopus*, Meigen, in Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 16:425-439.
- Grech M. G., Ludueña-Almeida F., Almirón W. R.** (2010). Bionomics of *Aedes aegypti* Subpopulations (Diptera: Culicidae) from Argentina. *J. Vector Ecol.* 35: 277-285.
- Grech M., Visintin A., Laurito M., Estallo E., Lorenzo P., Roccia I., Korin M., Goya F., Ludueña Almeida F., Almirón W.** (2012). New records of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Neuquén and La Rioja provinces, Argentina. *Rev. Saude Pública*, 46: 387-389.
- Harbach R. E., Knight K. L.** (1980). *Taxonomists' glossary of mosquito anatomy*. Plexus Publishing, Inc. New Jersey.
- Headlee T. J.** (1940). Relative effects on insect metabolism of temperatures derived from constant and variable sources. *Jour. Econ. Ent.* 33: 361-364.
- Helinski M. E., Valerio L., Facchinelli L., Scott T. W., Ramsey J., Harrington L. C.** (2012). Evidence of polyandry for *Aedes aegypti* in semifield enclosures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86: 635-641.
- Horsfall W. R.** (1955). *Stegomyia aegypti: Mosquitoes, their bionomics and relation to disease*. The Ronald Press Company, New York.

INDEC (2010). Censo 2010 Provincia de Buenos Aires. Resultados definitivos por partido.

(Disponible en:

<http://www.estadistica.ec.gba.gov.ar/dpe/Estadistica/CENSO2010%20REVISION/librocenso2010.pdf>)

Junín B., Grandinetti H., Marconi J. M., Carcavallo R. U. (1995). Vigilancia de *Aedes aegypti* (L.) en la ciudad de Buenos Aires. Entomol. Vect. 2: 71-75.

Jupp P. G., Kemp A. (1992). *Aedes albopictus* and other mosquitoes imported in tires into Durban, South Africa. J. Am. Mosq. Control Assoc. 8: 321-322.

Klowden M. J. (1997). Endocrine aspects of mosquito reproduction. Arch. Insect Biochem. Physiol. 35: 491-512.

Lambrechts L., Paaijmans K. P., Fansiri T., Carrington L. B., Kramer L. D. (2011). Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. 108: 7460-7465.

Li C. F., Lim T. W., Han L. L., Fang R. (1985). Rainfall, abundance of *Aedes aegypti* and dengue infection in Selangor, Malaysia. Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health. 16: 560-568.

Lounibos L. P. (1981). Habitat segregation among African treehole mosquitoes. Ecological Entomology 6: 129-54.

Lounibos L. P. (2002). Invasions by insect vectors of human disease. Annu. Rev. Entomol. 47: 233-266.

Maciá A. (2009). Effect of larval crowding on development time, survival and weight at metamorphosis in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. 68: 107-114.

Masuh E. (2008). Re-emergence of dengue in Argentina: Historical development and future challenges. Dengue Bull. 32: 44-54.

Micieli M., García J., Achinelly M., Martí G. (2006). Dinámica poblacional de los estadios inmaduros del vector del Dengue *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): un estudio longitudinal (1996–2000). Rev. Biol. Trop. 54: 979-983.

Ministerio de Salud de Argentina. (2010). Situación del dengue en Argentina, primer semestre de 2009. Boletín epidemiológico periódico. Edición especial 2009. (http://www.msal.gob.ar/saladesituacion/boletines_epidemiologia/pdfs/boletin_epidemiologico_dengue.pdf).

- Ministerio de Salud de Argentina.** (2016). Boletín integrado de vigilancia. N° 317, Semana epidemiológica 27. (<http://www.msal.gov.ar/images/stories/boletines/Boletin-Integrado-De-Vigilancia-N317-SE27.pdf>).
- Mohammed A., Chadee D. D.** (2011). Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Acta Trop.* 119: 38-43.
- Monath T. P.** (1994). Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2395-2400.
- Moore C. G., Cline B. L., Tiben E. R.** (1978). *Aedes aegypti* in Puerto Rico environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1225-1231.
- Mortenson E. W.** (1949). The use of hypochlorite sodium to study *Aedes nigromaculis* (Ludlow) embryos (Diptera: Culicidae). *Mosq. News.* 10: 211-212.
- Natiello M., Ritacco V., Morales A., Deodato B., Picollo M., Dinerstein E., Enria D.** (2008). Indigenous Dengue Fever, Buenos Aires, Argentina. *Emerging Infect. Dis.* 9: 1498-1499.
- O.M.S.** (1990). Las condiciones de la salud en las Américas. 1: 152-174.
- Otero M., Solari H. G., Schweigmann N.** (2006). A stochastic population dynamics model for *Aedes aegypti*: formulation and application to a city with temperate climate. *Bull. Math. Biol.* 68: 1945-1974.
- Ousset J. H., De Ustarán K. J., Lombardo B.** (1967). Erradicación del *Aedes aegypti* en la República Argentina. *Segundas Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas.* 2: 81-88.
- Pérez M. H., Noriega F. G.** (2013). *Aedes aegypti* Pharate 1st instar quiescence: a case for anticipatory reproductive plasticity. *J. Insect Physiol.* 59: 318-324.
- Pinto Severo O.** (1955). Campaign of eradication of *Aedes aegypti* in the Americas; its organization, development and results since December 1954. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 38: 378-98.
- Ponlawat A., Harrington L. C.** (2007). Age and body size influence male sperm capacity of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 44: 422-426.
- Powell J. R.** (2018). Mosquito-borne human viral diseases: Why *Aedes aegypti*? *American J. Trop. Med. Hyg.* 98: 1563-1565.
- Powell J. R., Gloria-Soria A., Kotsakiozi P.** (2018). Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. *BioScience* 68: 854-860. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy119>.

- Powell J. R., Tabachnick W. J.** (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 108: 11-17.
- R Core Team** (2018) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Reiter P., Sprenger D.** (1987). The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3: 494-501.
- Renault D., Nedved O., Hervant F., Vernon P.** (2004). The importance of fluctuating thermal regimes for repairing chillinjuries in the tropical beetle *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) during exposure to low temperature. *Physiol. Entomol.* 29: 139-145.
- Rezende G. L., Martins A. J., Gentile C., Farnesi L. C., Pelajo-Machado, M., Peixoto A. A., Valle D.** (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *B.M.C. Dev. Biol.* 8:82 doi:10.1186/1471-213X-8-82.
- Richardson K., Hoffmann A. A., Johnson P., Ritchie S. A., Kearney M. R.** (2011). Thermal sensitivity of *Aedes aegypti* from Australia: Empirical data and prediction of effects on distribution. *J. Med. Entomol.* 8: 914-924.
- Rossi G. C., Lestani E. A., D'Oria J. M.** (2006). Nuevos registros y distribución de mosquitos de la Argentina (Diptera: Culicidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 65: 51-56.
- Rubio A., Cardo M. V., Vezzani D.** (2011). Tire-breeding mosquitoes of public health importance along an urbanization gradient in Buenos Aires, Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 106: 678-684.
- Rueda L. M., Patel K. J., Axtell R. C., Stinner R. E.** (1990). Temperature-dependent development and survival rates of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 27: 892-898.
- Scott T. W., Naksathit A., Day J. F., Kittayapong P., Edman J. D.** (1997). A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57: 235-239.
- Schneider J. R., Chadee D. D., Mori A., Romero-Severson J., Severson D. W.** (2011). Heritability and adaptive phenotypic plasticity of adult body size in the mosquito *Aedes aegypti* with implications for dengue vector competence. *Infect. Genet. Evol.* 11: 11-16.

- Silva R. M., Oliveira Vitala W., Fonseca R. N., Muniz Martins Y. P., Alves Lemos F. J., Silva Vaz I, Logulloa C.** (2018). Hypometabolic strategy and glucose metabolism maintenance of *Aedes aegypti* egg desiccation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 227: 56-63.
- Starrfelt J., Kokko H.** (2012). Bet-hedging-a triple trade-off between means, variances and correlations, *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 87: 742-755.
- Stein M., Alvarez C. N., Alonso A. C., Bangher D. N., Willener J. A., Campos R. E.** (2018). New records of phytotelmata and containers mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Argentina. *Zootaxa* 4399: 87-100.
- Tun Lin W., Burkot T. R., Kay B. H.** (2000). Effects of temperature and larval diet of development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Med. Vet. Entomol.* 14: 31-37.
- Tun Lin W., Lenhart A., Nam V. S., Rebollar-Téllez E., Morrison A. C., Barbazan P., Kroeger A.** (2009). Reducing costs and operational constraints of dengue vector control by targeting productive breeding places: a multi-country non-inferiority cluster randomized trial. *Trop. Med. Int. Health.* 14: 1143-1153.
- Van Handel E., Day J. F.** (1989). Correlation between wing length and protein content of mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5: 180-182.
- Vargas H. C., Farnesi L. C., Martins A. J., Valle D., Rezende G. L.** (2014). Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.* 62: 54-60.
- Vezzani D., Carbajo A. E.** (2008). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 103: 66-74.
- Vinogradova E. B.** (2007). Chapter 5. Diapause in aquatic insects, with emphasis on mosquitoes. In: Alekseev V. R., De Stasio B. T., Gilbert J. J. (Eds.). *Diapause in aquatic invertebrates: theory and human use.* London, Springer..
- Zahouli J. B. Z., Koudou B. G., Müller P., Malone D., Tano Y., Utzinger J.** (2017). Urbanization is a main driver for the larval ecology of *Aedes* mosquitoes in arbovirus-endemic settings in south-eastern Côte d'Ivoire. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005751. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005751>