

**EVALUACIÓN DEL MARCADOR MOLECULAR CITOCROMO  
OXIDASA I “CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN” EN MOSQUITOS DE  
IMPORTANCIA MÉDICA EN ZONAS COSTERAS DEL DEPARTAMENTO DE  
CÓRDOBA**

ANGIE LINETTE TORO CANTILLO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE POSGRADOS EN CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y

BIOTECNOLOGÍA

PAMPLONA- 2018

EVALUACIÓN DEL MARCADOR MOLECULAR CITOCROMO OXIDASA I  
“CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN” EN MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MÉDICA  
EN ZONAS COSTERAS DEL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA

ANGIE LINETTE TORO CANTILLO

Estudiante de Maestría

Anteproyecto para obtener el título de Magister en Biología Molecular y

Biotecnología

Director Externo

RICHARD HOYOS LOPEZ

Director Interno

NELSON FERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

PROGRAMA MAESTRÍA EN BIOLOGIA MOLECULAR Y

BIOTECNOLOGIA

PAMPLONA

## RESUMEN

La familia Culicidae son considerados vectores en la transmisión de patógenos, entre ellos arbovirus referentes a los géneros *Alphavirus* (familia Togaviridae) y *Flavivirus* (familia Flaviviridae), hemoparásitos como *Plasmodium* y parásitos como *Dirofilaria immitis* y *Wuchereria bancrofti*. La amplia distribución geográfica de los mosquitos y las perturbaciones antropogénicas que influyen en la dinámica vector – hospedero, los convierte en un problema de interés en salud pública, al facilitar la transmisión de dichos patógenos. Por ello, una de las principales tareas en estudios de eco-epidemiología o detección de patógenos en enfermedades transmitidas por vectores, es la identificación de especies de mosquitos presentes en zonas activas para patógenos de importancia médica. Sin embargo, la taxonomía clásica de mosquitos presenta dificultades asociadas a la similitud morfológica en especies relacionadas evolutivamente, la identificación incompleta debido al daño ocasionado al espécimen durante su captura, además del tiempo requerido si no se tiene la experiencia necesaria para la identificación de los mosquitos. Una alternativa para estudios rápidos en focos epidemiológicos, es la metodología códigos de barras de ADN, la cual mediante un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) permite identificar las especies que habitan en un ecosistema y generar información sobre posible riesgo epidemiológico en cuanto a la transmisión de arbovirus y/o protozoos presentes. En este sentido, este estudio evaluó la secuencia propuesta como códigos de barras - citocromo oxidasa I (COI), los aspectos evolutivos, la diversidad genética y la utilidad de la metodología en la separación de mosquitos potencialmente transmisores de patógenos en 14 especies de nueve géneros colectados en diferentes sitios del Norte de Córdoba (San Antero, San Bernardo y Puerto Escondido).

**Palabras claves:** Códigos de barras de ADN, Culicidae, Neighbor - Joining

## ABSTRACT

The Culicidae family are considered as potential vectors for the transmission of pathogens, including arboviruses related to the genera *Alphavirus* (family Togaviridae) and *Flavivirus* (family Flaviviridae), hemoparasites such as *Plasmodium* and parasites such as *Dirofilaria immitis* and *Wuchereria bancrofti*. The wide geographic distribution of mosquitoes and the anthropogenic disturbances that influence the vector-host dynamics, make them a problem of interest in public health, by facilitating the transmission of these pathogens. Therefore, one of the main tasks in studies of eco-epidemiology or detection of pathogens in vector-borne diseases is the identification of mosquito species present in active zones for pathogens of medical importance. However, the classical taxonomy of mosquitoes presents difficulties associated with morphological similarity in evolutionarily related species, the incomplete identification due to damage to the specimen during its capture, besides the required time if one does not have the experience necessary for the identification of mosquitoes. An alternative for rapid studies in epidemiological outbreaks, is DNA Barcode methodology, which, through a fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene allows the identification of species that inhabit an ecosystem and to generate information on possible epidemiological risk regarding the transmission of arboviruses and / or protozoa present. In this sense, this study evaluated the proposed sequence as barcode – cytochrome oxidase I (COI), evolutionary aspects, genetic diversity and the usefulness of the methodology in the separation of mosquitoes potentially transmitting pathogens in 14 species of nine genera collected in different sites in the North of Cordoba (San Antero, San Bernardo and Puerto Escondido).

**Key Words:** DNA-Barcode, Culicidae, Neighbor – Joining.

## Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	13
1. Problema	16
1.1 Título	16
1.2 Planteamiento del problema	16
1.2.1 Formulación del problema.	18
1.3 Justificación	18
1.4 Objetivos	20
1.4.1 Objetivo general.	20
1.4.2 Objetivos específicos.	20
2. Marco Referencial	21
2.1 Antecedentes	21
2.2 Estado del Arte.	28
2.2.1 Familia Culicidae.	28
2.2.2 Arbovirus.	38
2.2.3 Código de barras de ADN.	45
2.3 Marco conceptual	48
3 Metodología	50
3.1 Área de estudio	50
3.2 Colección de mosquitos	53
3.3 Identificación de especímenes	54
3.4 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN	55
3.4.1 Extracción y amplificación de ADN.	55
3.4.2 Análisis de datos.	56
4. Resultados	58
4.1 Especímenes colectados.	58

4.2 Extracción de ADN y PCR.	62
4.3 Géneros y composición nucleotídica.	63
5. Discusión	76
5.1 Metodología “Código de Barras”	76
5.2 Evolución y variabilidad genética de Citocromo Oxidasa I “Barcode”	79
5.3 Mosquitos y Patógenos emergentes/re-emergentes en Salud Publica	81
6. Conclusiones	84
7 . Recomendaciones	86
Bibliografía	87

## Tablas

Tabla 1. Lista de las tribus de mosquitos con sus representativos géneros	29
Tabla 2. Mosquitos del género <i>Aedes</i> como posibles y confirmados vectores en la transmisión de patógenos	35
Tabla 3. Arbovirus más importantes causantes de enfermedades humanas	39
Tabla 4. Lista de patógenos reportados por infección natural y/o incriminación vectorial por especies de mosquitos colectados en zonas rurales del departamento de Córdoba	43
Tabla 5. Generalidades de los especímenes utilizados en la metodología de códigos de barras de ADN	58
Tabla 6. Distancias genéticas intra-específicas con el modelo Kimura-2- parámetros y variabilidad genética en 14 especies de mosquitos colectados en tres zonas rurales del norte de Colombia.	65
Tabla 7. Prueba de saturación de sustitución para el primer y segundo codón dentro de la región del gen COI – códigos de barras.	66
Tabla 8. Comparación de las secuencias en las bases de datos BOLD System y GenBank	69
Tabla 9. Distancias genéticas inter-específicas en pares con Kimura-2 parámetros (en BOLD) y desviaciones estándar (fuente regular) entre 14 especies de mosquitos colectadas en áreas rurales de los municipios de Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y San Antero correspondientes al departamento de Córdoba (Colombia)	70

## Figuras

Figura 1. Anatomía externa en Culícidos adultos	30
Figura 2. Anatomía general de la larva en Culícidos	32
Figura 3. Anatomía general de la pupa en Culícidos	33
Figura 4. Ciclos de transmisión de arbovirus en la naturaleza	42
Figura 5. Posición del área de estudio Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y San Antero (Córdoba)	52
Figura 6. Tasas de transiciones y transversiones con respecto a las distancias genéticas estimadas para el primer y segundo codón dentro de la región del gen COI – códigos de barras con el modelo GTR	66
Figura 7. Tasa de saturación de sustitución de los codones 1 y 2 de la secuencia de nucleótidos dentro de la región del gen COI – códigos de barras.	67
Figura 8. (A) Histograma de distancias genéticas y (B) distancias clasificadas de 14 especies de mosquitos colectadas en áreas rurales de los municipios de Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y San Antero correspondientes al departamento de Córdoba (Colombia).	71
Figura 9. Dendrograma de Neighbor-joining de las secuencias por el método de Kimura-2- parámetros en los mosquitos colectados en tres zonas rurales del norte de Colombia.	73
Figura 10. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de las secuencias por el método GTR+I+G en los mosquitos colectados en tres zonas rurales del Norte de Colombia	74
Figura 11. Árbol filogenético bayesiano de las secuencias de códigos de barras de especies de mosquitos caracterizadas por zonas costeras del departamento de Córdoba (Colombia).	75

## Fotografías

Fotografía 1. Gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados con los cebadores MTNF/MTNR

63

## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son vectores en la transmisión de múltiples patógenos como arbovirus que a su vez, presentan una amplia variedad de taxones de ARN. Se incluyen los pertenecientes al género *Alphavirus* (familia Togaviridae); *Flavivirus* (familia Flaviviridae); *Bunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus* (familia Bunyaviridae); *Orbivirus* (familia Reoviridae); *Vesiculovirus* (familia Rhabdoviridae) y *Thogotovirus* (familia Orthomyxoviridae) (Blagrove et al., 2016; Gould, Higgs, Buckley, & Gritsun, 2006; Jones et al., 2008; Keesing et al., 2010), hemoparásitos como *Plasmodium* (Cohuet et al., 2004; Mekuria et al., 1991) y parásitos como *Dirofilaria immitis* y *Wuchereria bancrofti* (Licitra et al., 2010; Lima et al., 2003; Magalhaes et al., 2008; Vezzani et al., 2011).

Entre los objetivos de estudios entomológicos está el proporcionar información sobre la abundancia de mosquitos, determinar cambios y distribución geográfica de los vectores, logrando así generar medidas de prevención y/o control sobre enfermedades emergentes y re-emergentes (Tubaki et al., 2004). Sin embargo, las dificultades asociadas a la similitud morfológica en especies relacionadas evolutivamente, identificación incompleta debido al daño ocasionado al espécimen durante su captura o el tiempo prolongado demandado si no se tiene la experiencia necesaria resulta difícil el conocimiento oportuno sobre las especies presentes (Cywinska et al., 2006; Kumar et al., 2007a). Es por esto, que una identificación rápida y eficaz de las especies de mosquitos en zonas activas para patógenos de importancia médica, es un paso principal en posteriores medidas de prevención (Cook et al., 2005; Taira et al., 2012). Hebert et al., 2003 propuso el uso de códigos de barras de ADN en la identificación de especies de

animales a partir de una región estandarizada (aproximadamente 700 pb) perteneciente al gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) (Ashfaq et al., 2014; Cywinska et al., 2006; Hebert et al., 2004). Esta alternativa ha permitido la identificación y separación de una amplia gama de artrópodos hematófagos de importancia médica incluyendo Phlebotominae (Hoyos-Lopez et al., 2012), Simuliidae (Rivera & Currie, 2009), Tabanidae (Cywinska et al., 2010), y Ceratopogonidae (Augot et al., 2013). Los códigos de barras de ADN también se han utilizado en estudios sobre complejos de especies en mosquitos (Kumar et al., 2012), identificación de potenciales vectores de arbovirus y confirmación de las especies (Gómez et al., 2013; Ruiz et al., 2010).

Se han publicado estudios para la identificación de culícidos aplicando códigos de barras de ADN, como el de Batovska et al., 2016, quienes mediante el uso de códigos de barras de ADN para la identificación de mosquitos pertenecientes a la familia Culicidae en el sureste de Australia, lograron separar e identificar 113 especímenes representados por 29 especies, seis tribus y 12 géneros, además de demostrar la eficacia de la técnica al corroborar la especie *Macleaya macmillani*, la cual fue identificada como *Macleaya tremula* mediante claves morfológicas (Batovska et al., 2016) o el de Laurito et al., 2013, en el que emplearon secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) en adultos de especies *Culex* (*Culex*) de Argentina y Brasil para evaluar la identificación de especies y poner a prueba la utilidad del gen mitocondrial COI para los códigos de barras de ADN (Laurito et al., 2013).

En nuestro estudio se identificó la secuencia propuesta como códigos de barras - citocromo oxidasa I (COI) - para 186 especímenes representados por nueve géneros y 14 especies colectados en diferentes sitios de la costa del Caribe Colombiano con presencia de *Flavivirus* y *Alphavirus* en el Norte de Córdoba (Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y San Antero).

Se determinaron los aspectos evolutivos y la diversidad genética en las especies colectadas y la utilidad de la metodología códigos de barras de ADN en la separación de especies potencialmente transmisores de patógenos de importancia médica.

# 1. Problema

## 1.1 Título

EVALUACIÓN DEL MARCADOR MOLECULAR CITOCROMO OXIDASA I “CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN” EN MOSQUITOS DE IMPORTANCIA MEDICA EN ZONAS COSTERAS DEL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA.

## 1.2 Planteamiento del problema

Los seres humanos y animales infectados por arbovirus, pueden sufrir infecciones que van desde subclínicos o leves a febriles, encefálicos o hemorrágicos con una proporción significativa de muertes, a diferencia de los artrópodos infectados, puesto que no muestran signos detectables de enfermedad, a pesar de que el virus puede permanecer en el artrópodo durante toda la vida (Liang et al.,2015).

Entre los patógenos de importancia a nivel de salud pública están los arbovirus del género *Alphavirus*, el cual lo conforman virus como el de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), Virus de Encefalitis Equina del Este (VEEE), Virus de Encefalitis Equina del Oeste (VWEE), Chikungunya, Mayaro, entre otros (Borucki, 2010; Ferro et al., 2003; Forrester et al., 2014; Muñoz & Navarro, 2012; Smith et al., 2007) y los del género *Flavivirus*, entre los cuales se encuentran los Virus del Nilo Occidental (WNV), Virus de Dengue (DENV), Virus Zika (ZIKV), Virus de Fiebre Amarilla (YFV), Virus Usutu (USUV), Virus de Encefalitis de San Luis (SLEV)

entre otros (Moulis et al., 2015; Petersen et al., 2015; Vorou, 2016), hemoparasitos como *Plasmodium* (Cohuet et al., 2004; Mekuria et al., 1991) y parásitos como *Dirofilaria immitis* y *Wuchereria bancrofti* (Licitra et al., 2010; Lima et al., 2003; Magalhaes et al., 2008; Vezzani et al., 2011). Durante los estudios de estos patógenos se pudo determinar que entre los mosquitos implicados en su transmisión estaban las hembras de las especies *Aedes (Oc.) taeniorhynchus*, *A. (Oc.) sollicitans*, *Psorophora confinnis*, *Culex (Deinocerites) pseudus*, *Mansonia indubitans*, *Mansonia titillans* y *Culex (Melanoconion) spp.* (Kenney et al., 2012; Quiroz et al., 2009; Smith et al., 2007).

La identificación de culícidos mediante claves dicotómicas ha sido el método estándar convencional, sin embargo, la existencia de similitud morfológica entre especies relacionadas evolutivamente, evidenciando especies crípticas o hermanas, la identificación incompleta debido al daño ocasionado al espécimen durante su captura y el tiempo prolongado demandado debido a la poca experiencia en la identificación de culícidos han limitado el empleo de dichas técnicas convencionales (Chan et al., 2014; Harbach, 2007). Debido a esto, se genera la necesidad de utilizar metodologías diferentes que sean capaces de solucionar dichos inconvenientes (Besansky et al., 2003; Chan et al., 2014; Jinbo et al., 2011).

### **1.2.1 Formulación del problema.**

¿Es el empleo de códigos de barras de ADN una alternativa viable para la identificación de culícidos en tres áreas costeras del Norte de Córdoba activas para patógenos de importancia medica?

### **1.3 Justificación**

Las metodologías manejadas en biología molecular han sido de utilidad en la identificación de individuos y especies, puesto que se puede obtener la información genética a partir de un pequeño fragmento del organismo (Helmersson, 2013). El uso de códigos de barras de ADN ha permitido suplir ciertas limitaciones que presenta la identificación morfológica de las especies; al complementar, corroborar y reconocer nuevas especies, las cuales se almacenan en bases de datos como BOLD o GenBank, además de estudiar complejos de especies y conocer la riqueza biológica de las especies circulando en diferentes zonas geográficas (Bourke et al., 2013; Rozo-Lopez & Mengual, 2015; Ruiz-Lopez et al., 2013).

La metodología códigos de barras de ADN se ha probado en múltiples estudios para identificar y discriminar especies de difícil separación morfológica en zonas activas de transmisión de enfermedades y en hemípteros y dípteros como Tabanidae (Banerjee et al., 2015; Cywinska et al., 2010), Triatominae (Pagotto et al., 2013), Simuliidae (Ondrejicka et al., 2014; Rivera & Currie, 2009), Phlebotominae (Contreras-Gutierrez et al., 2013; Kumar et al., 2012; Pinto et al., 2015) y Calliphoridae (Solano et al., 2013). En estos estudios, el uso de la metodología de

códigos de barras de ADN permitió disipar las dificultades relacionadas con la identificación taxonómica, además de identificar y descubrir la diversidad críptica encontrada en especies pertenecientes a estas familias, reconociendo así la validez de la metodología de códigos de barras de ADN.

En mosquitos se ha observado un avance en la tipificación molecular de especies implicadas a nivel epidemiológico en países como India (Kumar et al., 2007a), Pakistán (Ashfaq et al., 2014), Argentina (Díaz-Nieto et al., 2013) y China (Wang et al., 2012), entre otros países, además de ser usado en la separación de complejos de especies (Conn et al., 2012; Moreno et al., 2013) y en la identificación de potenciales vectores de arbovirus (Golding et al., 2012).

En Colombia se han reportado casos de arbovirus que implican vigilancia entomológica en géneros y subgéneros de difícil identificación taxonómica (Hoyos-López et al., 2016). En este sentido, rápidos inventarios de diversidad en zonas activas son necesarios para identificar posibles vectores e incriminarlos o estudiar su ecología para determinar aspectos asociados al ciclo de transmisión de patógenos emergentes y re-emergentes (Hoyos-López et al., 2015; Rozo-Lopez & Mengual, 2015).

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general.**

Evaluar el marcador molecular citocromo oxidasa I “códigos de barras de ADN” en mosquitos de importancia médica en zonas costeras del departamento de córdoba.

### **1.4.2 Objetivos específicos.**

Con soporte de la metodología códigos de barras de ADN esta tesis pretende específicamente:

Discriminar las especies de culícidos potencialmente transmisores de patógenos de importancia clínico-veterinaria de acuerdo a claves morfológicas y códigos de barra de ADN.

Determinar aspectos evolutivos del marcador COI – códigos de barras de ADN en las secuencias tipificadas para las especies identificadas.

Estimar la diversidad genética de los mosquitos identificadas mediante el marcador molecular COI-códigos de barras de ADN.

## 2. Marco Referencial

### 2.1 Antecedentes

Entre los estudios de códigos de barra de ADN que avalan el uso de dicha técnica, está el de Cywinska et al., 2006, quienes emplearon el gen mitocondrial citocromo oxidasa I para generar los primeros códigos de barras de ADN en 37 especies de mosquitos canadienses (Diptera: Culicidae) de las provincias de Ontario y New Brunswick. Obtuvieron un fragmento de 617 pb del extremo 5' de la región COI, determinando un total de 302 secuencias. Las secuencias de cada especie de mosquito formaron grupos con una estrecha cohesión. Las divergencias de la secuencia COI fueron, en promedio, casi 20 veces más altas para las especies congénicas que para los miembros de una especie; Las divergencias entre las especies congénicas fueron del 10,4% (rango 0,2 - 17,2%), mientras que las de los congéneres promediaron 0,5% (rango 0,0 - 3,9%). Como conclusión, lograron recuperar y alinear el fragmento COI de todas las especies de mosquitos analizadas. Además, de detectar un posible pseudogén nuclear en la especie *Culex restuans*. Los especímenes formaron clusters distintivos y las divergencias de códigos de barras de ADN fueron relativamente grandes entre taxones. Por último, los límites de las especies eran congruentes con los establecidos por el trabajo taxonómico morfológico (Cywinska et al., 2006).

Kumar et al., 2007 realizaron un estudio para construir códigos de barras de ADN para varias especies de mosquitos predominantes en la India, que incluía especies vectoriales principales. Se usaron en total 111 ejemplares de mosquitos pertenecientes a 15 géneros y 63 especies

identificados morfológicamente. El enfoque de códigos de barras – COI- logró identificar 62 especies entre ellos, en confirmación con la taxonomía convencional. Sin embargo, dos especies estrechamente relacionadas, *Oc. portonovoensis* y *Oc. wardi* no se lograron diferenciar, puesto que sus linajes indicaron divergencia genética insignificante (distancia genética de Kimura a dos parámetros = 0,0043) (Kumar et al., 2007b).

Wang et al., 2012 emplearon códigos de barras de ADN para la subunidad 1 del gen mitocondrial COI en especies de mosquitos más comunes y de importancia epidemiológica en ocho provincias de China. Se recolectaron 404 especímenes, a los cuales posterior a un proceso de extracción y empleo de primers los cuales amplifican para el gen COI se determinó un total de 15 géneros y 122 especies de acuerdo a sus características morfológicas. Adicional determinaron las especies que se encontraban estrechamente relacionadas generando un Neighbor-Joining, el cual se basa en el criterio mínimo de evolución. La divergencia observada en las secuencias del gen COI fue aproximadamente 30 veces mayor para las especies del mismo género que para los miembros de la misma especie. La divergencia en más de 98% de las especies congéneres varió de 2,3% a 21,8%, mientras que la divergencia en los individuos conespecíficos varió de 0% a 1,67% (Wang et al., 2012).

Laurito et al., 2013 utilizaron secuencias del gen mitocondrial COI en adultos de 22 especies de *Culex* (*Culex*) de Argentina y Brasil para evaluar la identificación de las especies y probar la utilidad del COI para códigos de barras de ADN utilizando el mejor algoritmo de coincidencia cercana best-match. Construyeron una matriz de distancia usando el algoritmo de Kimura 2 parámetros, incluyendo las distancias intra e interespecíficas para 71 secuencias de códigos de barras COI. De los 12 linajes recuperados, cinco especies fueron morfológicamente confirmadas (*Cx. acharistus*, *Cx. chidesteri*, *Cx. dolosus*, *Cx. lygrus* y *Cx. saltanensis*) con divergencias

intraespecíficas inferiores al 1,75%. *Cx. bilineatus* es formalmente resucitado de la sinonimia de *Cx. dolosus* *Cx. maxi*, *Cx. surinamensis* y especies incluidas dentro del grupo Coronator se agruparon en un linaje sin resolver. La distancia intraespecifica de *Cx. pipiens* (3%) fue casi el doble de la interespecífica entre ella y *Cx. quinquefasciatus* (1,6%). Con respecto a los criterios de best-match, códigos de barras de COI identificó con éxito el 69% de todas las especies. Las demás secuencias permanecieron como ambiguamente, erróneas y no identificadas y con respecto a las especies del género *Culex*, códigos de barras COI no contiene suficiente información para distinguir (Laurito et al., 2013).

Trabajo similar se realizó en la Universidad de Osmania, India, en donde Daravath et al., 2013 amplificaron el gen COI a partir de extractos de ADN de mosquitos de *Aedes albopictus* criados en laboratorio bajo especificas condiciones. Posteriormente, el producto de la PCR fue secuenciado y sometido al banco de genes del NCBI, evidenciando 100% de similitud del gen COI con especies de *Aedes albopictus* situados en diferentes zonas geográficas como Pondicherry, Karnataka y Hyderabad, aunque encontraron una variación distinguibles en sus frecuencias porcentuales de aminoácidos. Se pudo concluir que los mosquitos de *Aedes albopictus* son morfológicamente similares en todas las regiones pero diferentes a nivel molecular y presumen que el gen COI puede ser ligeramente diferente a nivel de aminoácidos de las respectivas especies que se puedan clasificar sobre la base de códigos de barras de ADN, pero las características fenotípicas generales no ha cambiado (Daravath et al., 2013).

Otra demostración de la importancia en la aplicación de códigos de barras de ADN es el realizado por Ashfaq et al., 2014 al analizar la diversidad de mosquitos (Diptera: Culicidae) en Pakistán mediante códigos de barras de ADN. En este estudio recolectaron 1684 mosquitos en 450 centros urbanos y rurales de Pujab y Khyber Pakhtunkhwa durante un periodo comprendido

entre 2010-2013, los cuales se clasificaron de acuerdo a claves taxonómicas. Posteriormente, procedieron con la parte molecular (Extracción y PCR de los especímenes), en este paso para la amplificación de la región del gen COI-5' se usaron pares de primers C\_LepFo1F (combinación de LepF1+LCO1490)/C\_LepFo1R (combinación de LepR1+HCO2198). Luego el amplicón de ser secuenciado y comparado con las secuencias reportadas en la base de datos GenBank reveló 32 especies con predominio de la especie *Culex quinquefasciatus* (61% de la colección), el género *Aedes* (*Stegomyia*) compuesta por 15% de los especímenes, representado por seis taxa con las dos especies vectores de dengue, *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*, dominante y ampliamente distribuido y *Anopheles* constituyó otro 6% de los especímenes con dominio de la especie *An. subpictus*. La divergencia de secuencias en las muestras de la misma especie osciló entre 0-2.4%, mientras que las especies congéneres evidencio 2.3-17.8% de divergencia y se comprobó que *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* fueron las especies dominante, encontrándose tanto en zonas rurales como urbanas. Por último paso, llegaron a la conclusión que la metodología de códigos de barras de ADN representa una herramienta importante al ser capaz de diferenciar especies a pesar de sus mínimas variaciones morfológicas y permitir el seguimiento de las poblaciones denominadas como vectores en la transmisión de patógenos de importancia epidemiológica (Ashfaq et al., 2014).

Investigación semejante se evidencia en el trabajo de Batovska et al. 2016 decidieron realizar la identificación molecular de mosquitos (Diptera: Culicidae) en el sureste de Australia aplicando códigos de barra. En este estudio se capturaron 113 especímenes, que, de acuerdo a claves morfológicas representaban 12 géneros y 26 especies colectados en el estado de Victoria, Australia. Luego de un proceso de extracción de ADN, procedieron con la PCR, el cual manejaron los pares de primers considerados como universales para el gen mitocondrial COI,

LCO1490/HCO2198, quienes amplificaron una secuencia de 648 pb. Luego de su secuenciación y comparado con la información encontrada en la base de datos GenBank, se evidenció que el análisis de Neighbor-Joining revelaron la presencia de 29 especies agrupadas por separado, a excepción de *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. pipiens* especie *molestus*, y *Cx. australicus* y *Cx. globocoxitus*. Estas cuatro especies son parte del subgrupo *Cx. pipiens*, mientras que *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* especie *molestus* y *Cx. australicus* forman el complejo *Culex* con distancias entre las misma especie y congéneres promedio fue de 0,8% y 7,6%, respectivamente, también demostraron la eficacia de los códigos de barras de ADN al distinguir especies exóticas de mosquitos endémicas al identificar un huevo *Stegomyia aegypti* interceptado en uno de los sitios de muestreo. Por lo que concluyeron que el uso de códigos de barras de ADN es una herramienta eficaz al reducir el tiempo requerido en la identificación de especies en el laboratorio, eliminando los errores evidenciados al aplicar técnicas convencionales en la clasificación de los especímenes (Batovska et al., 2016).

A nivel nacional, estudios relacionados con códigos de barra en Culícidos es reducida, sin embargo se pueden apreciar trabajos como el de Hoyos, Roman, Castaño y Gallego en el 2015, el cual se basaron en la implementación de códigos de barras de ADN para la tipificación de culícidos inmaduros de Armenia y Circasia (Quindío, Colombia). Las muestras usadas fueron 56 formas inmaduras de culícidos morfológicamente identificadas como: *Aedes (Stegomyia) aegypti*, *Culex (Culex) quinquefasciatus*, *Cx. (Phenacomyia) corniger*, *Cx. (Culex) nigripalpus* y *Cx. (Culex) grupo Coronator* en criaderos de zonas urbanas en Armenia y Circasia. Posteriormente se estimó la diversidad genética, distancias genéticas intra/inter-especie y dendograma de “Neighbor-Joining”. Los resultados obtenidos lograron discernir la separación de

los mosquitos y deducir el potencial uso del marcador en genética de poblaciones. Aunque, las especies del grupo Coronator – subgénero *Culex*, no ofreció información conveniente para su discriminación taxonómica. A nivel epidemiológico, las especies identificadas presentan antecedentes en la transmisión de alfavirus y flavivirus emergentes de interés en la salud pública colombiana donde el uso de códigos de barras de ADN puede facilitar estudios de ecología de mosquitos en áreas urbanas y la vigilancia epidemiológica de patógenos emergentes (Hoyos-López et al., 2015).

Estudio afín se presenta con el de Rozo-Lopez y Mengual et al., 2015, al trabajar con especies de mosquitos (Diptera, Culicidae) en tres ecosistemas de los Andes colombianos e identificación a través de códigos de barras de ADN y la morfología de los adultos. Un total de 22 especies de mosquitos de ocho géneros y 11 subgéneros fueron identificadas mediante las combinaciones de metodologías morfológicas y moleculares. Obtuvieron 77 secuencias de códigos de barras con 16 especies presentadas como nuevos registros de bases de datos públicas y analizaron la utilidad de los códigos de barras de ADN para discriminar especies de mosquitos del neotrópico mediante la compilación de 1.292 secuencias de un total de 133 especies y el uso de los métodos basados en “neighbor-joining” y máxima verosimilitud. De acuerdo a los resultados, concluyen que las dos metodologías proporcionan resultados similares mediante la resolución de 105 especies de mosquitos separados en grupos distintos, lo que evidencian la importancia de combinar metodologías morfológicas clásicos con herramientas moleculares para identificar con precisión los mosquitos de Colombia (Rozo-Lopez & Mengual, 2015).

Otro reporte registrado fue el de Zamora, Castaño y Hoyos en el 2015 al usar códigos de barras de ADN en la identificación de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) en la Tebaida (Quindío, Colombia). Un total de 55 especímenes en fase inmadura y 5 pupas de *Aedes*

colectadas en llantas usadas como ovitrampas en un remanente de plantas de guadua en zona rural de Tebaida. Se registraron las primeras secuencias para 13 especímenes de *Ae. albopictus*, identificando un origen asiático (Singapur) y evidenciando la utilidad de este método en la identificación molecular. En Colombia, estas secuencias pueden ser usadas para estudios en flujo de genes en otras poblaciones de mosquitos, ecología e incriminación vectorial en brotes epidémicos de arbovirus emergentes y re-emergentes (Zamora-Delgado et al., 2015).

## 2.2 Estado del Arte.

### 2.2.1 Familia Culicidae.

Los mosquitos culícidos (Diptera: Culicidae) se han relacionado como vectores en la transmisión biológica de una variedad de patógenos causales de enfermedades importantes en salud pública (Bueno-Marí, 2013). Son un grupo abundante que de acuerdo a su clasificación, pertenecen a la orden de los Dípteros, suborden Nematocera, Infraorden Culicomorpha y superfamilia Culicoidea, además presenta dos grandes subfamilias (Anophelinae y Culicinae), 113 géneros y 3555 especies, que se encuentran por lo general distribuidos en zonas templadas y tropicales a nivel mundial (**Tabla 1**) (Harbach, 2008a). La subfamilia Anophelinae está representada por tres géneros y Culicinae por 110 géneros distribuidos en 11 tribus, de los cuales sólo *Aedini*, *Culicini*, *Culisetini*, *Mansoniini*, *Orthopodomyini* y *Uranotaeniini* presentan representantes europeos (Chordá, 2014). A pesar de los múltiples trabajos dirigidos a esta familia, se tiene poco conocimiento en la distribución e historia evolutiva de estos mosquitos, particularmente en zonas silvestres ha limitado en el transporte de información que podría cooperar con la implementación de vigilancia en enfermedades emergentes y re emergentes transmitidas por vectores y contribuir en la expansión del panorama que se tiene sobre la distribución geográfica de esta población (Méndez-López et al., 2016). Su reproducción se efectúa en climas cálidos, húmedos y de baja altitud sobre el nivel del mar (Weaver & Reisen, 2010).

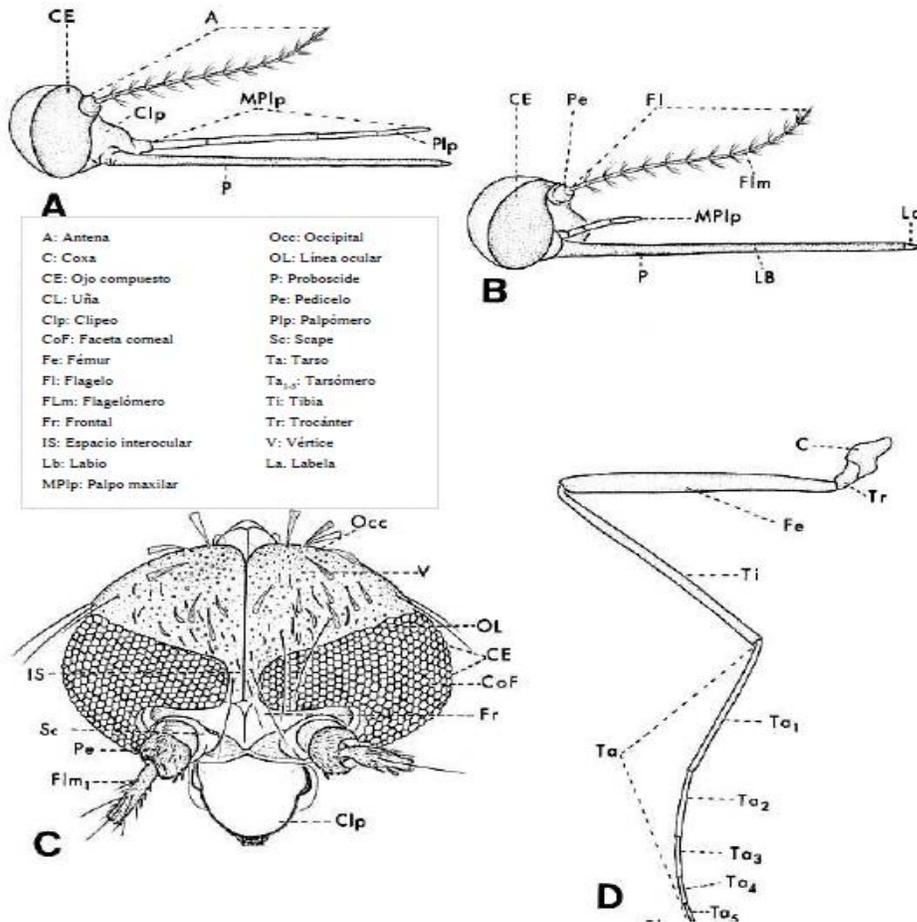
**Tabla 1.** Lista de las tribus de mosquitos y sus géneros representativos. Los géneros más importantes desde el punto de vista médico son en negrita. Tomado de Bosco, 2013

<b>Subfamilia</b>	<b>Tribu</b>	<b>Género representativo</b>
Anophelinae	Anophelini	<i>Anopheles</i> , <i>Bironella</i> , <i>Chagasia</i>
Culicinae	Aedini*	<i>Aedes</i> , <i>Haemagogus</i> , <i>Ochleratus</i> , <i>Psorophora</i> , <i>Armigeres</i> , <i>Stegomyia</i> , <i>Belkinus</i> , <i>kompia</i> , <i>Bothaella</i> , <i>Collessius</i> , <i>Finlaya</i> , <i>Udaya</i> , <i>Scutomyia</i> , <i>Opifex</i> , etc.
	Culicini	<i>Culex</i> , <i>Deinocerites</i> , <i>Galindomyia</i>
	Aedeomyiini	<i>Aedeomyia</i>
	Culisetini	<i>Culiseta</i>
	Ficalbiini	<i>Ficalbia</i> , <i>Mimomyia</i>
	Hodgesiini	<i>Hodgesia</i>
	Mansoniini	<i>Coquilletidia</i> , <b><i>Mansonia</i></b>
	Orthopodomyniini	<i>Orthopodomyia</i>
	Sabethini	<i>Sabethes</i> , <i>Trichoprosopon</i> , <i>Wyeomyia</i> , <i>Isostomyia</i> , <i>Topomyia</i> , <i>Shannoniana</i> , <i>Johnbelkinia</i> , <i>Kimia</i> , <i>Limatus</i> , <i>Malaya</i> , <i>Maorigoeldia</i> , <i>Onirion</i> , <i>Runchomyia</i> , <i>Tripteroides</i>
		Uranotaeniini
Toxorhynchitinae		<i>Toxorhynchites</i>

\*Hay 82 géneros de Aedini, pero sólo 14 géneros representativos se enumeran

Entre su morfología, los adultos de esta familia son pequeños (3.0-9.0 mm de largo) con cuerpo, patas y alas alargadas con patrón característico de venas uniformes, superficie cubierta de escamas, setas y fina pilosidad lo que proporciona patrones de ornamentación siendo característicos para cada especie, de cabeza pequeña, ocelos ausentes, probóscide prominente adaptada para picar en hembras, piezas bucales tipo estilete, antenas largas y filamentosas con escapo pequeño, pedicelo globoso y 13 delgados flagelomeros; tórax ovoide, ancho a nivel

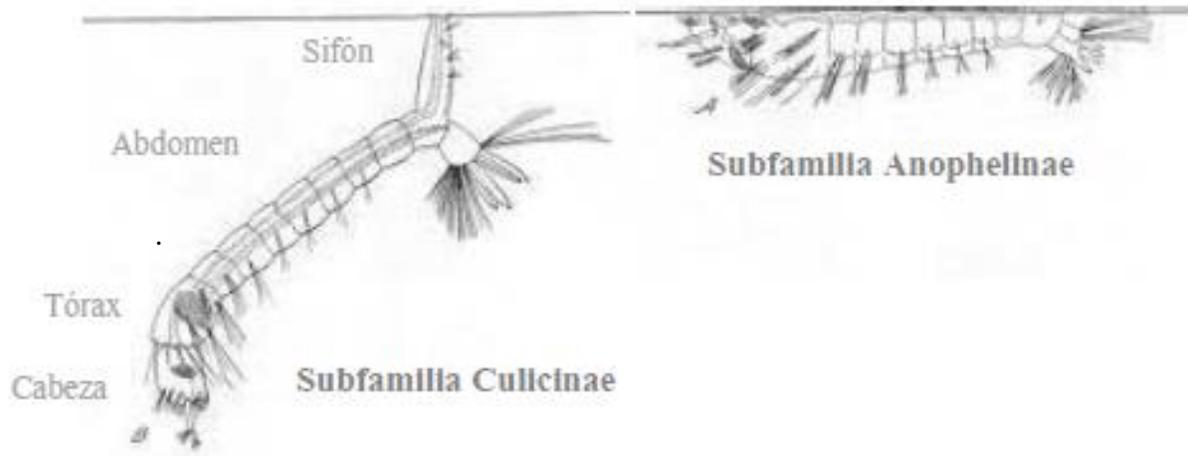
dorsal y generalmente con escamas, mesonoto con marcas de color; escutelo corto mayormente arqueado o trilobulado (**Figura 1**) (Marín et al., 2009; Tantely et al., 2016).



**Figura 1.** Anatomía externa en culícidos adulto (A, B) Estructura del aparato bucal y antenas; (C) Estructura de la cabeza; (D) Estructura de las patas. Tomado de Chordá, 2014.

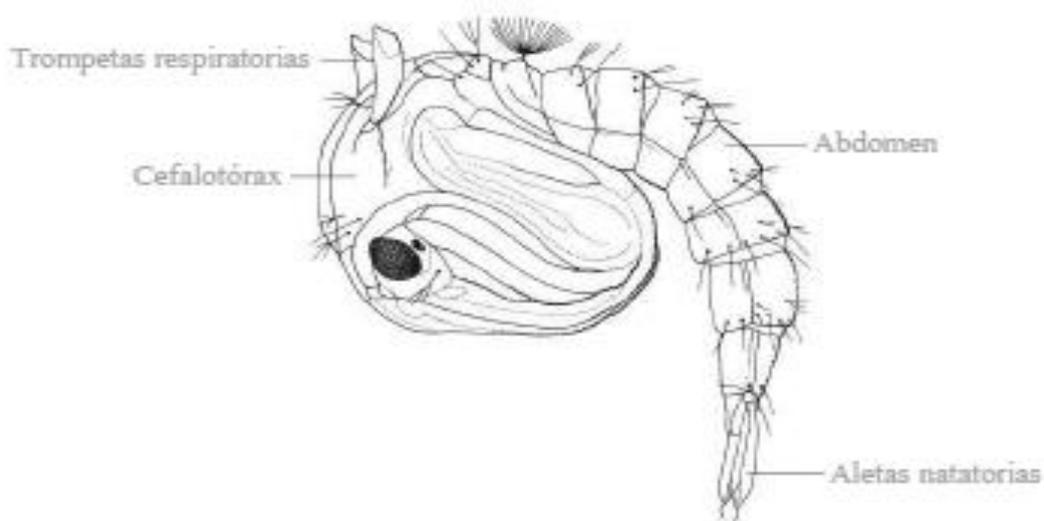
En cuanto a la forma inmadura, las larvas presentan cuatro estadios, donde se encuentran 193 pares de setas simétricas sin contar las piezas bucales, distribuidas así: seis en la antena, 19 en la cabeza, 15 en el protórax, 14 en el mesotórax, 13 en el metatórax, 12 en el segmento abdominal I, 15 en los segmentos abdominales II-VII, siete en el segmento abdominal VIII, 13 en el sifón o

en la placa pectinada si son anofelinos y en el aparato espiracular, y cuatro en el segmento abdominal X, de las cuales tienen mayor importancia taxonómica las localizadas en la cabeza, en el sifón y en los segmentos VIII y X del abdomen (Harbach, 2008a) (**Figura 2**). De las 19 pares de setas encontradas en la cabeza, solo las siete primeras, encontradas en la parte dorsal (1C-7C) se usan para su identificación, por el contrario, las setas ubicadas en la cara ventral (11C-17C) y las setas dorsales (8C-10C) carecen de importancia taxonómica (Harbach, 2007, 2008a). Otra clave de valor taxonómico son las setas encontradas en las antenas, de las cuales la 1A es la de mayor importancia, ya que su ubicación (mitad basal o mitad apical) como el número de ramas (simples o ramificadas) y su ornamentación (lisa o espiculada) son usadas en las principales claves de identificación, debido a que su forma varía entre géneros y especies. En cuanto al tórax y abdomen, actualmente se utilizan las setas 1P, 2P, 3P, 7P y las setas de los segmentos I, IV y X como claves taxonómicas, puesto que su forma y distribución varía entre especies. Ahora bien, tanto para las especies de la familia Culicinae como para Anophelinae, en el segmento VIII se encuentra el aparato espiracular (aparato respiratorio), el cual tiene un peine abdominal en ambos lados, que puede descansar sobre una placa esclerotizada (género *Aedeomyia* y casi todas las especies del género *Uranotaenia*) o directamente sobre el tegumento (las demás especies) y su disposición, número y forma de dientes representan un gran valor taxonómico, especialmente en los géneros *Aedes* y *Ochlerotatus* (Chordá, 2014).



**Figura 2.** Anatomía general de la larva en culícidos. (vista general) y posición adoptada sobre la película superficial. Tomado de Chordá, 2014.

A pesar de almacenar gran cantidad de caracteres taxonómicos, esta fase se emplea poco en la identificación, solo su quetotaxia es usada para distinguir especies que morfológicamente son muy similares en la fase larval y adulto. Su establecimiento se da en una amplia variedad de micro hábitats entre aguas estancadas o permanentes (**Figura 3**) (Barajas et al., 2013; González et al., 2016; Wolf, 2006).



**Figura 3.** Anatomía general de la pupa en culicidos. (vista lateral). Tomado de Chordá, 2014.

De acuerdo a la biología y evolución de cada especie, se pueden encontrar algunas cuyos estrictos requerimientos ecológicos limitan su población y las asocian a determinados ambientes y/o colecciones hídricas y otras especies capaces de habitar cualquier tipo de ambientes (Chordá, 2014), debido a su abundancia relativa en múltiples países y distribución indica que estos últimos han presentado mayor éxito evolutivo, al manejar gran plasticidad ecológica pueden completar una cantidad de ciclos biológicos, lo que aumentaría el número de generaciones al año (Harbach et al., 2012).

Entre las enfermedades con gran trascendencia a nivel mundial transmitidas por estos mosquitos está la malaria o paludismo que es causada por el protozoo del género *Plasmodium* con estimación a padecerla 3200 millones de personas (García et al., 2010; Padilla & Montoya, 2011), dengue que actualmente constituye una de las patologías de mayor impacto globalmente con referencia a morbilidad, mortalidad y afectación económica (Guzman et al., 2010; Martínez, 2008; Stanaway et al., 2016) y se les ha involucrado con la transmisión de Encefalitis Equina Venezolana ocasionado por el arbovirus que lleva el mismo nombre (Fritz, 2005). Su

distribución y presencia de arbovirus están delimitadas por factores determinantes como temperatura, lluvia, barreras geográficas, humedad, topografía, huéspedes y agentes causales que influyen en la transmisión de los virus por sus vectores (Marquetti-Fernández et al., 2013; Torres et al., 2015). A nivel regional, Hoyos et al., 2016 detectaron mediante la metodología de RT-PCR la presencia de arbovirus pertenecientes a los géneros *Flavivirus* y *Alphavirus* en mosquitos de una zona rural de San Bernardo del Viento (Córdoba, Montería). Entre los arbovirus encontrados, corresponden al género flavivirus Virus del Dengue, Virus del Nilo Occidental, Virus de Encefalitis de San Luis y el virus de la Fiebre Amarilla y para el género alfavirus está la Encefalitis Equina Venezolana encontrado en los especímenes de *Culex*, *Ps. confinnis*, *De. atlanticus aff.*, *Ae. scapularis* y *Ma. titillans*, facilitando la transmisión de estos virus a reservorios y humanos, lo que podría generar un brote epidémico (Hoyos-López et al. 2016).

#### **2.2.2.1 Aedes.**

Mosquitos de este género están involucrados en la transmisión de múltiples virus como dengue, chikunguña, Zika, EEE, WEE, EEV, entre otros. El mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* es considerado vector de importancia en salud pública al ser la tercera especie más invasiva a nivel mundial, después de *Aedes aegypti* y *Culex pipens* (Paupy et al., 2009). Esta especie originaria en los bosques del sudeste de Asia progresivamente se fue adaptando a ambientes antropogénicos con capacidad de reproducirse de manera continua y sobrevivir a temperaturas por encima de 10°C y llegar hasta los 5°C debido a su capacidad de sintetizar una alta cantidad de lípidos, de acuerdo a estudios realizados para poblaciones de esta especie (Delatte et al., 2009;

Kobayashi et al., 2002). Otra especie considerada como sospechosa en la transmisión del VEEV es *Aedes (Protomacleaya) triseriatus*, quienes se vio involucrado en serios casos de encefalitis, sobre todo en pediátricos en América del Norte al reportar 42 – 172 casos anualmente entre los años 1960 – 1990, sin embargo su transmisión no es tan común como *Aedes (Stegomyia) albopictus*, también se han denominado como potenciales vectores de EEEV, WEEV, DENV y SLEV (**Tabla 2**), además de otras especies como *Ae. sollicitans*, *Ae. scapularis* y *Ae. thelcter* (McJunkin et al., 2001; Medlock et al., 2012; Styer et al., 2007).

**Tabla 2.** Mosquitos del género *Aedes* como posibles y confirmados vectores en la transmisión de patógenos, Tomado de Medlock. 2011.

Patógenos			<i>aegypti</i>	<i>albopictus</i>	<i>atropalpus</i>	<i>japonicus</i>	<i>koreicus</i>	<i>triseriatus</i>		
Virus	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya	■							
		Encefalitis Equina del Este		■		■		■		
		La Crosse Encefalitis Equina Venezolana		■	■	■		■		
		Encefalitis Equina del Oeste						■		
		Dengue	■					■		
		Encefalitis Japonesa		■		■				
		Encefalitis de San Luis				■		■		
	<i>Flavivirus</i>	Virus Nilo del Oeste			■	■	■	■		
		Fiebre Amarilla	■					■		
		Zika	■							
		<i>Bunyavirus</i>	Jamestown Canyon						■	
			Nematodos	<i>Dirofilaria</i>	<i>D. immitis</i> y <i>D. repens</i>		■			■

- Vector probado en campo
- Hallados infectados en estudios de campo y laboratorio con potencial de papel vectorial, pero no probado en campo
- Solo los estudios de competencia de laboratorio que hayan demostrado una participación potencial en la transmisión
- No vector o no conocido

### **2.2.2.2 Anopheles.**

Los mosquitos de este género están relacionados con la transmisión de múltiples patógenos, ya sean parásitos como *Plasmodium*, causante de la malaria, *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi*, responsables de la filariosis linfática y virus causantes de la EEV y O'nyong'nyong (Afrane et al., 2013). Se conoce aproximadamente 460 mosquitos de este género, los cuales cerca de 100 especies actúan como vectores en la transmisión de enfermedades a humanos o animales. Dentro de las características del ciclo de vida de estos mosquitos esta la tasa de picadura, la duración del ciclo gonotrófico, fecundativo y la supervivencia y desarrollo de los estados inmaduros y adultos, los cuales pueden verse afectados por diversos factores como el cambio climático, cambios ambientales, que a su vez alteran el ciclo de transmisión de las diversas enfermedades (Depinay et al., 2004).

Las condiciones climáticas pueden afectar la fisiología de estas especies; en la fase inmadura, el desarrollo larval es detenido a temperaturas por debajo de 18°C, lo que aumenta el riesgo de muerte; pero al aumentar su temperatura debido al cambio climático, las larvas culminarían su desarrollo en menor tiempo y consecuentemente aumentaría el número de descendencia (Godfray, 2013). En cuanto al estado adulto, un incremento en la temperatura podría acelerar su digestión de ingesta sanguínea, aumentando así la tasa de picadura, tasa de fecundidad y reproductividad (Afrane et al., 2008; Afrane et al., 2006).

### 2.2.2.3 *Culex*

Especies de este subgénero se encuentran implicadas como vectores principales en la transmisión enzoótica del arbovirus de EEV, EEE y del WNV (Cupp et al., 2007; Williams & Savage, 2009).

El ciclo enzoótico regularmente se produce en bosques intactos, con pozos estables y presencia de específicas plantas acuáticas requeridas para el desarrollo larval (Kenney et al., 2012).

Estudios de identificación realizados en diferentes zonas de Ecuador, Bolivia y Perú han reportado la propagación de los subtipos ID e IE, los cuales afectan a especies silvestres (Aguilar et al., 2009). Las especies incluidas como principales transmisores de EEV están *Culex spissipes* (Theobald), *Culex dunni* Dyar (Bolivia) y *Culex (Mel) pedroi*, *Culex. (Mel) adamesi* y *Culex. (Mel) vomerifer* (Colombia) (Berti et al., 2013).

La especie *Cx. (Melanoconion) erraticus* presenta un amplio grupo de animales de orden de mamíferos, aves, reptiles y al menos un anfibio dentro de su ciclo alimenticio, además de estar implicados como vectores en la transmisión de la variante IC del virus de EEV (Mendenhall et al., 2012). Otra especie transmisora de este virus y otros patógenos es *Culex quinquefasciatus*, quienes se desarrollan en aguas estancadas, ricas en materia orgánica, con amplia distribución altitudinal, registrando en Colombia un extenso rango de altitud comprendido entre 0 hasta 2600 msnm (Garcia et al., 2010). En cuanto a los especímenes adultos hembras del género son difíciles de identificar entre especies, debido a que son altamente conservadas a nivel morfológico, adicional a estos inconvenientes se anexan los agravantes por las técnicas de captura y manipulación, pues dañan o deterioran los caracteres externos de utilidad para su identificación (Williams & Savage, 2011).

### 2.2.2 Arbovirus.

Son virus transmitidos por una variedad de vectores hematófagos tales como Culicidae (mosquitos), Simuliidae (moscas negras), Cimicidae (chinchas), Phthiraptera (piojos), Acari (ácaros) e Ixodoidea (garrapatas) a huéspedes vertebrados y a causa de la distribución geográfica de dichos vectores, los arbovirus exhiben gran dispersión a nivel global (Weaver & Reisen, 2010). Existe una amplia variedad de taxones de virus de ARN que incluyen los *Alphavirus* (familia Togaviridae); *Flavivirus* (familia Flaviviridae); *Bunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus* (familia Bunyaviridae); *Orbivirus* (familia Reoviridae); *Vesiculovirus* (familia Rhabdoviridae) y los *Thogotovirus* (familia Orthomyxoviridae) (Gubler, 2001).

Karabatsos en 1985 registró 534 virus en el Catálogo Internacional de Arbovirus, de los cuales 214 están clasificados, 287 son considerados posibles arbovirus y 33 de ellos son provisionales, en donde 134 causan enfermedades en el hombre. Son taxonómicamente diversos, perteneciendo a ocho familias virales y 14 géneros, siendo los más importantes para la salud pública los pertenecientes a tres familias: Flaviviridae, Togaviridae y Bunyaviridae (Gubler, 2001).

En mosquitos, los géneros de la familia Culicidae son los encargados en la transmisión de estos arbovirus, como el virus de la Encefalitis Japonesa, Virus del Nilo Occidental, Virus de Encefalitis Equina Venezolana, Virus de Encefalitis Equina del Este, Chikungunya, Dengue, Mayaro, Usutu, Virus Gamboa, entre otros (**Tabla 3**) (Blagrove et al., 2016; Ferro et al., 2003; Nuñez et al., 2014). Para una transmisión exitosa, es importante determinar la interacción entre el virus-vector, teniendo en cuenta la competencia vectorial y la capacidad que tiene el vector para

infectarse con el virus, facilitar su replicación y por último la transmisión de este a un hospedero susceptible (Contreras-Gutiérrez & Uribe, 2014), además de las barreras naturales, inmunológica y la presencia de receptores específicos para el virus son las que favorecerán la transmisión o no del virus (Contreras-Gutiérrez & Uribe, 2014).

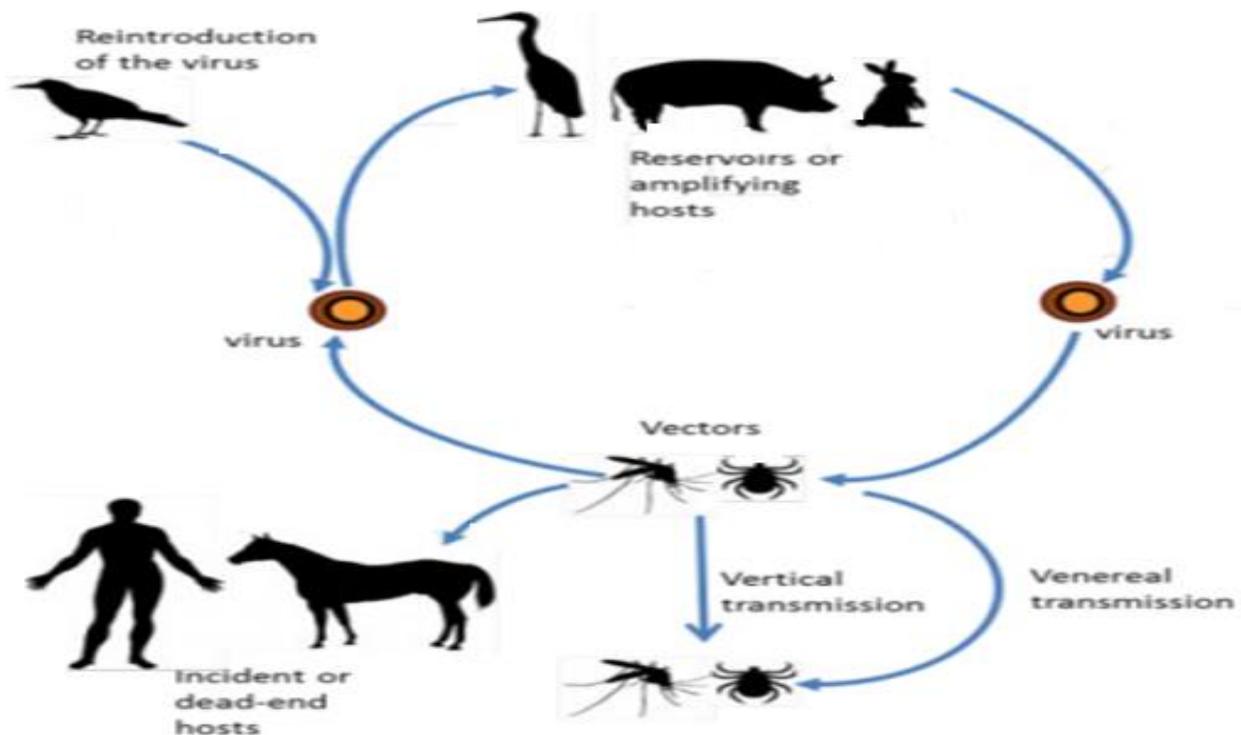
**Tabla 3.** Arbovirus más importantes causantes de enfermedades humanas. U: urbano, S: suburbano, R: rural, SFI: enfermedad febril sistémica, ME: meningoencefalitis, HF: fiebre hemorrágica. Tomado de Gubler, 2001.

Familia/Virus	Vector	Hospedero vertebrado	Ecología <sup>b</sup>	Enfermedades en humanos <sup>c</sup>	Distribución geográfica	Epidémicos
Togaviridae						
Chikungunya <sup>a</sup>	Mosquitos	Humanos, primates	<u>U</u> ,S,R	SFI	África, Asia	Si
Ross River <sup>a</sup>	Mosquitos	Humanos, marsupiales	<u>R</u> ,S,U	SFI	Australia, Pacífico del Sur	Si
Mayaro <sup>a</sup>	Mosquitos	Aves	<u>R</u> ,S,U	SFI	Suramérica	Si
O'nyong-nyong <sup>a</sup>	Mosquitos	?	R	SFI	África	Si
Sinbis	Mosquitos	Aves	R		Asia, África, Australia, Europa, Américas	Si
Barmah Forest <sup>a</sup>	Mosquitos	?	R	SFI	Australia	Si
Encefalitis Equina del Este	Mosquitos	Aves	R	SFI,ME	Américas	Si
Encefalitis Equina del Oeste	Mosquitos	Aves, conejos	R	SFI,ME	Américas	Si
Encefalitis Equina Venezolana <sup>a</sup>	Mosquitos	Roedores	R	SFI,ME	Américas	Si
Flaviviridae						
Dengue 1-4 <sup>a</sup>	Mosquitos	Humanos, primates	<u>U</u> ,R,S	SFI,HF	Mundial en el trópico	Si
Fiebre Amarilla <sup>a</sup>	Mosquitos	Humanos, primates	<u>R</u> ,S,U	SFI,HF	África, Suramérica	Si
Encefalitis japonesa	Mosquitos	Aves, Cerdos	<u>R</u> ,S	SFI,ME	Asia, Pacífico	Si

Encefalitis Murray Valley	Mosquitos	Aves	R	SFI,ME	Australia	Si
Rocio	Mosquitos	Aves	R	SFI,ME	Suramericas	Si
Encefalitis de San Luis	Mosquitos	Aves	<u>R</u> ,S,U	SFI,ME	Americas	Si
Nilo del Oeste <sup>a7</sup>	Mosquitos	Aves	<u>R</u> ,S,U	SFI,ME	Africa, Asia, Europa, Norteamerica	Si
Enfermedad de Kyasanar Forest <sup>a</sup>	Garrapatas	Primates, roedores, camellos	R	SFI,HF,ME	India, Saudi, Arabia	Si
Fiebre hemorrágica de Omsk	Garrapatas	Roedores	R	SFI,HF	Asia	No
Encefalitis transmitidas por garrapatas	Garrapatas	Aves, roedores	R,S	SFI,ME	Europa, Asia, Norteamerica	No
Bunyaviridae						
Fiebre de la mosca de arena <sup>a</sup>	Mosca de arenas	?	R	SFI	Europa, Africa, Asia	Si
Fiebre del Valle del Rift <sup>a</sup>	Mosquitos	?	R	SFI,HF,ME	Africa, Medioeste	Si
Encefalitis La Crosse	Mosquitos	Roedores	<u>R</u> ,S	SFI,ME	Norteamerica	No
Encefalitis California	Mosquitos	Roedores	R	SFI,ME	Norteamerica, Europa, Asia	Si
Fiebre hemorrágica de Crimea y Congo	Garrapatas	Roedores	R	SFI,HF	Europa, Asia, Africa	Si
Oropouchea	Mosquitos	?	<u>R</u> ,S,U	SFI	Centro y Suramerica	Si

Las enfermedades re-emergentes son aquellas que aparecen después de cierto periodo, siendo considerados de importancia, ya que bajo las condiciones cambiantes de la naturaleza y los ecosistemas particulares, han resurgido en proporciones epidémicas constituyendo un problema de salud (Contreras-Gutiérrez & Uribe, 2014). Los brotes de arbovirus emergentes factiblemente están relacionados con pequeños cambios en la genética viral o la introducción de nuevas cepas que incrementen los niveles de virulencia y viremia en los vertebrados, ampliando así el rango

del huésped y aumentando el potencial de amplificación (Weaver & Reisen, 2010). Por otra parte, los cambios genéticos aumentarían la tasa de transmisión al intensificar la competencia vectorial, además de la variación de especies vectores, creación de nuevos nichos debido a cambios ambientales o a invasiones relacionadas con viajes o comercio, que permiten su prolongación a ambientes permisivos que con frecuencia son seguidas por invasiones de los arbovirus que transmiten (Batista et al., 2013; Weaver & Reisen, 2010). Las enfermedades causadas por arbovirus empiezan con la picadura de un artrópodo portador del virus, en donde el artrópodo absorbe cierta cantidad de sangre necesaria para facilitar la ovulación, y en el proceso adquiere una concentración razonable del virus, quien no afecta el ciclo de vida del insecto y puede o no causarle daño (Perng & Chen, 2013). Posteriormente, el virus migra al intestino medio del mosquito infectando las células epiteliales, en donde se multiplica y atraviesan la lámina basal para llegar a la hemolinfa. Luego, invaden las glándulas salivales, donde mantienen una infección persistente y se multiplican, aquí el virus es liberado junto con la saliva cuando el mosquito tiene otra ingestión sanguínea llamada período de incubación extrínseca (Muñoz & Navarro, 2012). **(Figura 4)**.



**Figura 4.** Ciclos de transmisión de arbovirus en la naturaleza. Tomado de Perng, 2013.

Algunos de los virus pertenecientes al género *Flavivirus* se consideran de gran importancia debido al impacto que ocasionan a nivel de salud pública con el desarrollo de enfermedades emergentes, como el virus dengue (DENV), quien se encuentra ampliamente distribuido en áreas tropicales y subtropicales, la emergencia del Virus Nilo del Oeste (WNV) en el continente americano, la propagación del virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) por Asia y Oceanía, además de la reciente aparición del virus Usutu (USUV) en Austria en 2001, que se dispersó a Hungría en 2005, encontrándose en mosquitos en España en 2006, siendo éstas las únicas

especificaciones del virus conocidas fuera del continente africano asociándose a enfermedad y muerte en aves (Bakonyi et al., 2007; Weissenböck et al., 2002).

Los *Alphavirus*, comúnmente denominados virus del "Viejo Mundo" y "Nuevo Mundo", generalmente están asociados con enfermedades reumáticas en humanos (Viejo mundo) y Virus causantes de encefalitis (Nuevo mundo), quienes están asociados principalmente a enfermedades encefálicas potencialmente mortal en las Américas (Strauss & Strauss, 1994). Entre los virus causantes de enfermedades reumáticas están el virus chikungunya (CHIKV), el Virus de Ross River (RRV), el Virus de Barmah Forest (BFV), el Virus O'nyong-nyong (también conocido como Igbo Ora), el grupo Sindbis de Virus y el Virus Mayaro y con respecto a los virus causantes de enfermedades cefálicas comprenden el Virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV), Virus de Encefalitis Equina del Oeste (WEEV), Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) (**Tabla 4**) (Borucki, 2010; the Center for Food Security & Public Health & Intitute for International Cooperation in Animal Biologics, 2015; Vargas, Jaime, & Vera, 2009).

**Tabla 4.** Lista de patógenos reportados por infección natural y/o incriminación vectorial por especies de mosquitos colectados en zonas rurales del departamento de Córdoba. Fuente propia.

2017

Especies	Patógenos	Referencias
<i>Anopheles aquasalis</i>	Malaria Virus de Encefalitis Equina Venezolana <i>Wuchereria bancrofti</i>	(Sinka et al., 2010) (Pina-costa et al., 2014) (Farrar et al., 2009) (Paily, Hoti, & Das, 2009)
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	Virus Gamboa Virus de Encefalitis Equina Venezolana	(Nunes et al., 2014) (Farrar et al., 2009)
<i>Aedes aegypti</i>	Virus de Dengue Virus de Fiebre Amarilla Virus Chikungunya Virus de Zika	(Carrington & Simmons, 2014) (Gardner, Ryman, & Genetics, 2015) (Coffey et al., 2014) (Vorou, 2016)
<i>Aedes scapularis</i>	Malaria aviar Virus Mayaro Virus de Encefalitis Equina Venezolana <i>Dirofilaria immitis</i> <i>Wuchereria bancrofti</i> Virus Kairi Virus Rocio Virus Caraparu Virus Melao Virus Ilheus Virus de Fiebre Amarilla	(Ferreira, Rodrigues, Sato, Borges, & Braga, 2016) (Muñoz & Navarro, 2012) (Farrar et al., 2009) (Petersen et al., 2015)
<i>Culex (melanoconion) spp.</i>	Virus de Encefalitis Equina Venezolana	(Ferro et al., 2003) (Carrara et al., 2007)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Virus de Encefalitis de San Luis Virus del Nilo Occidental <i>Dirofilaria immitis</i>	(Rojas-Mogollon, Hernandez-Neuta, Moncada-Alvarez, Quiñonez, & Renteria-Ledezma, 2013) (Kent, Crabtree, & Miller, 2010) (Carvalho et al., 2008)
<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	Virus Kairi Virus Cachey Valley Virus de Encefalitis Equina Venezolana	(Blitvich et al., 2012) (Farrar et al., 2009) (F. Bello & Becerra, 2017)

	Virus de Encefalitis Equina del Este <i>Dirofilaria immitis</i> Virus del Nilo Occidental	(F. J. Bello, Segura, Sciences, Biology, & Unit, 2014)
<i>Haemagogus lucifer</i>	Virus de Fiebre Amarilla	(Liria & Navarro, 2010)
<i>Psorophora confinnis</i>	Virus de Encefalitis Equina Venezolana	(Farrar et al., 2009) (Aguilar et al., 2011)
<i>Mansonia titillans</i>	Malaria aviar Virus de Encefalitis Equina Venezolana Virus del Nilo Occidental	(Ferreira et al., 2016) (Farrar et al., 2009) (Moulis et al., 2015)

### 2.2.3 Código de barras de ADN.

Esta técnica molecular se ha convertido una herramienta útil para la identificación de fauna y recientemente la flora, al usar marcadores genéticos cortos provenientes de una parte estándar del genoma de un organismo con el fin de identificarlo como perteneciente a un determinado individuo, raza / variedad o especie (Barcaccia et al., 2016; Sarkar & Trizna, 2011). Sin embargo, los códigos de barras de ADN se pueden aplicar como herramientas para abordar temas fundamentales en ecología, evolución y biología de la conservación, como el ensamblaje de las especies en las comunidades, las múltiples interacciones de las especies con ambientes poco conocidos, los hábitats más ricos evolutivamente para ser objeto de protección (Kress et al., 2015).

El establecimiento de secuencias de ADN para las identificaciones biológicas no es algo reciente y el concepto de códigos de barras de ADN para las identificaciones rápidas y fiables a nivel de especies, incluyendo animales, plantas, hongos y microorganismos, es un tema que se propuso hace un poco más de una década (Hebert et al., 2003; Hebert & Gregory, 2005). En animales,

una secuencia corta de ADN de 600 pb que codifica para el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) se ha implementado y estandarizado como códigos de barras de ADN, sin embargo, este gen no funciona para hongos y plantas, por lo que se requiere evaluar otros tipos de genes de acuerdo al estudio (Kress & Erickson, 2007). Para los biólogos evolutivos y ecologistas, entre sus objetivos está entender el origen de las especies y los factores que causan la disparidad en la riqueza de especies en diferentes biomas a nivel mundial, puesto que en ciertas regiones es aún desconocida; por lo que el implemento de una metodología como los códigos de barras de ADN ha sido particularmente útil en el descubrimiento de especies crípticas o hermanas y no reconocidas previamente, sobretodo en especies pertenecientes a familias consideradas de importancia medica como es el caso de Tabanidae (Banerjee et al., 2015; Cywinska et al., 2010), Triatominae (Pagotto et al., 2013), Simuliidae (Ondrejicka et al., 2014; Rivera & Currie, 2009), Phlebotominae (Contreras-Gutierrez et al., 2013; Kumar et al., 2012; Pinto et al., 2015), Calliphoridae (Solano et al., 2013) y Muscidae (M. A. Smith et al., 2008). A nivel global, esta metodología ha tenido gran auge, de acuerdo a los estudios reportados, como en el 2015, los investigadores Banerjee, Kumar, Maity & Colaboradores identificaron a través de la metodología de códigos de barras de ADN en insectos de la familia Tabanidae, quienes son vectores implicados en la transmisión de tripanosomiasis (surra) en la India. Debido a la falta de caracteres morfológicos estables, su correcta identificación ha sido limitada. La metodología de códigos de barras de ADN se implementó con el fin de evaluar su utilidad para discriminar los vectores potenciales en la trasmisión de la tripanosomiasis (surra) en la India. Tomaron 46 muestras pertenecientes a siete especies de cuatro géneros, del cual, el análisis reveló que todas las especies morfológicamente identificables pueden discriminarse, además de demostrar la presencia de especies crípticas en *Chrysops dispar* (Banerjee et al., 2015). Otras especies que

han sido analizadas aplicando la metodología de códigos de barra ha sido en las moscas de carne de Diptera: Sarcophagidae, por su importancia forense. Una de las investigaciones se ha llevado a cabo en Australia seguido por los investigadores Meiklejohn, Wallman y Dowton, en la cual buscaban identificar mediante códigos de barra la fase inmadura de las moscas de la carne (Diptera: Sarcophagidae) de importancia forense. Los resultados obtenidos indicaron que los estados inmaduros de *Sarcophaga impatiens* (larvas o pupas), son una fuente de tejido adecuada para la identificación a nivel de especie molecular usando los códigos de barras de ADN, complementando así la identificación morfológica previamente realizada (Meiklejohn et al., 2013). A nivel nacional, se han evidenciado múltiples trabajos en la identificación molecular de especies basados en la metodología de códigos de barra, como es el estudio de Solano, Wolff & Castro en el 2013, al utilizar el gen mitocondrial COI como herramienta de diagnóstico molecular en la identificación de califóridos de importancia forense en Colombia. Emplearon secuencias de muestras colectadas en Colombia y otras tomadas de Genbank, al cual se les efectuó análisis de divergencia de nucleótidos y análisis de “Neighbor-Joining”, con base en las distancias genéticas calculadas con el modelo Kimura-2-Parámetros, además se realizaron análisis bayesianos y una representación gráfica de la variación del fragmento de COI para cada especie. Se obtuvieron secuencias con un tamaño de 545 pb; los valores de distancia intra-específica oscilaron entre 0%-2,904% y la distancia inter-específica entre 0,188%-18,07%, observándose un solapamiento de distancias, ocasionado principalmente por la inclusión de especies con solo una secuencia. Al excluir las especies con una sola secuencia y tratar a *Lucilia eximia* como dos subgrupos, se logró observar un gap de distancias de 2,292%, el cual es un valor óptimo para la validación de esta técnica. Se observaron monofilias recíprocamente

específicas en la mayoría de las especies, concluyendo que el gen COI es un buen marcador para delinear especies de la familia Calliphoridae en Colombia (Solano et al., 2013).

### **2.3 Marco conceptual**

Arbovirus: Son un grupo de virus que existen en la naturaleza principalmente, debido a la transmisión biológica entre huéspedes vertebrados susceptibles por artrópodos hematófagos (Arredondo-Garcia et al., 2016).

Códigos de barras de ADN. Es un método taxonómico, el cual utiliza secuencias cortas como marcadores genéticos a partir de determinado sitio del genoma de ADN en un organismo (Goldstain & DeSalle, 2010).

Complejos de especie. Se utiliza para describir grupos de especies estrechamente relacionadas y se suele utilizar para describir especies recién derivadas que tienen pocas diferencias morfológicas entre los miembros del complejo (Reinert et al., 1997).

Especie críptica. Se refieren a dos o más especies distintas que están o fueron descritas como una sola especie porque son difíciles o imposibles de identificar basándose en la morfología (Bickford et al., 2007).

Virus emergentes: Aquellos que o bien han aparecido recientemente, o han aumentado su prevalencia o alcance geográfico (Holmes, 2004).

Virus re-emergente: Son virus que reaparecen en cierta localidad geográfica después de una larga ausencia (Pujol, 2000).

### 3 Metodología

#### 3.1 Área de estudio

El área de estudio abarcó las veredas de los municipios de Puerto Escondido (El Palmar, 8°57'49.10" N, 76°13'55.45" W), San Bernardo del Viento (Chiquí, 9°19'57.37" N, 75°58'48.21" W) y San Antero (Santa Rosa, 9°21'00.02" N, 75°42'59.86" W) en el departamento de Córdoba (Colombia).

Los municipios de San Antero, San Bernardo del Viento y Puerto Escondido se caracterizan por presentar una altitud menor a los 100 metros, además de contener múltiples manglares, con suelos bien irrigados por arroyos ocasionando varios estanques (Cortes-Castillo & Rangel, 2011). Con respecto a la fauna, se tienen pocos estudios sobre la biodiversidad presente en el municipio de San Antero, sin embargo resaltan una variedad de aves como *Harpia harpyja* (Águila arpía), *Leucopternis plumbeus* (Águila pizarra), *Anas bahamensis* (Pato caribeño), *Agamia agamí* (Garza colorada), *Egretta rufescens* (Garza rojiza), *Falco peregrinus* (Halcón peregrino), mamíferos como *Aotus lemurinus*, *Ateles geoffroyi*, *Cebus albifrons* y *Saguinus oedipus* (Primates), *Akodon affinis* (Roedor), *Panthera onca* (Jaguar), *Lontra longicaudis* (Nutria) y reptiles representados por las especies *Batrachemys dahli*, *Chelydra serpentina* y *Chelonia mydas* (Tortugas) (Rojas-Giraldo & Sierra-Correa, 2010); En el municipio de San Bernardo del Viento se incluyen 296 especies de aves (pertenecientes a 61 familias, de las cuales 64 son migratorias), 117 especies de mamíferos (40 familias y 90 géneros), representados por *Oligoryzomys* spp. y *Zygodontomys* spp. (Roedores), *Artibeus* spp., *Carollia* spp. y *Sturnira* spp.

(Murciélagos), *Bradypus* spp. (Perezosos), *Didelphis marsupialis* (Zarigüeyas) y *Aoutus lemurinus*, *Ateles geoffroyi*, *Cebus albifrons* y *Sanguinus oedipus* (Primates) (Estela & López-Victoria, 2005; Racero, Ballesteros, & Perez, 2015) . Por último, en el municipio de Puerto Escondido la falta de estudios ha limitado la información sobre la biología y ecología presente. A pesar de esto, se ha reportado la presencia de aves perteneciente a las especies *Egretta alba*, *Crotophaga major*, *Bubulcus ibis*, *Columbina talpacoti*, *Progne chalybea*; mamíferos representados por las especies *Glossophaga comisaris* (Muricuelago), *Sciorus* sp (Ardilla), *Dasyus* sp (Armadillo) y reptiles como *Caimán crocodylus* (Babilla), *Chironius carinatus*, *Bothrops atrox* (Serpientes), *Polychurs marmoratus* (Camaleón) e *Iguana iguana* (Iguana) (Garcia, 2010). Con respecto a los animales peri-domésticos más comunes en las áreas agrícolas cerradas a los manglares y relictos de bosque seco (aproximadamente 400 m) son bovinos, pollos, cabras, caballos y burros, además de pequeños campos de arroz que son cultivados por la gente rural dentro de los manglares y cerca de las casas humanas. (**Figura 5**).



**Figura 5.** Posición del área de estudio Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y San Antero (Córdoba). 2017.

### 3.2 Colección de mosquitos

Se realizaron siete salidas por cuatro días para cada municipio, en donde la colecta se efectuó entre los periodos Febrero-Abril / Septiembre-October del 2015 y Julio-Agosto del 2016, utilizando diferentes trampas con el fin de obtener la mayor cantidad de mosquitos. Las metodologías de colecta fueron:

1. Trampa de luz CDC: Se dispusieron de siete trampas distribuidas de la siguiente manera: dos trampas ubicadas en mangles, dos trampas situadas en cultivos de arroz, dos trampas instaladas en los bordes del manglar y por último una trampa ubicada en pastizales, todas a una altura de 1,30 m del nivel del suelo y separadas cada una por un transecto de 7,4 Km. El tiempo de operación para cada trampa fue de 12 horas a partir de las 18:00 hasta las 06:00 horas, con un esfuerzo de colecta de 336 horas para las siete salidas distribuidas en los periodos mencionados. Para cada trampa se registró fecha, hora, coordenadas, tipo de cobertura (Contreras et al., 2012; May-Uc et al., 2011).
2. Trampa Shannon: Se instalaron cuatro trampas distribuidas una por sitio: manglar, cultivos de arroz, borde del manglar y pastizales a una altura de 1,50 m del nivel del suelo. Se operaron desde las 18:00 hasta las 21:00 horas, con un esfuerzo de colecta de 84 horas por las siete salidas distribuidas en los periodos mencionados anteriormente. Cada trampa llevaba su respectivo registro que incluye fecha, hora, coordenadas, tipo de cobertura (Córdova et al., 2011; Tejada et al., 2003).

3. Búsqueda activa: Se implementó en sitios de reposo con aspirador bucal, operados desde las 09:00 hasta las 15:00 horas, con un esfuerzo de colecta de 168 horas para las siete salidas. Con ello, se capturaron especímenes que no son atraídos por fuentes luminosas. Los ambientes específicos inspeccionados fueron huecos, superficies de árboles, lugares húmedos y abundante materia orgánica (Jawara et al., 2009; L'Ambert et al., 2012).

### 3.3 Identificación de especímenes

Los mosquitos colectados se separaron de la entomofauna y almacenaron en crioviales, que fueron puestos en un tanque de nitrógeno líquido y transportados al laboratorio de Ciencias Biomédicas y Biología Molecular (Universidad del Sinú). Las muestras se separaron teniendo en cuenta las características morfológicas como: los palpos maxilares, quienes en *Anopheles* se muestran tan largos como la probóscide y en *Aedes* son más cortos, el escutelo redondeado con setas uniformemente distribuidas y ausencia de setas y escamas postpronotales para *Anopheles*, probóscide fuertemente curvada ligeramente en forma dorsal para especies del género *Aedes*, ausencia de un grupo central de setas en el postpronoto para el género *Haemagogus*, antenas más largas que la probóscides para el género *Deinocerites*, cuarto tarsomero de patas delanteras y medias más largos que anchos y setas ausentes en la base de la vena subcostal del ala (vista ventral) con escamas largas y angostas sobre las venas R2 y R3 para *Culex*, fémur de pata media con mechón de escamas en el ápice para *Aedeomyia*, fémur con escamas negras y blancas mezcladas pero sin bandas pre-apicales de escamas blancas y escamas anchas en las

venas R2 y R3 para *Mansonia* (Berti et al., 2013; Cova-Garcia, Sutil, & Rausseo, 1966; Forattini, 2002; Jiménez et al., 2012; Lane, 1953).

### **3.4 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN**

#### **3.4.1 Extracción y amplificación de ADN.**

A los mosquitos colectados e identificados, se les realizó extracción de ADN aplicando el protocolo de alta concentración de sales modificado de Collins (Collins et al., 1987).

Posteriormente se usaron los pares de cebadores MTNF (5´-

GGATTTGGAAATTGATTAGTTCCT T-3´)/ MTNR (5´-

AAAAATTTTAATTCCAGTTGGAACAGC -3´) (Kumar et al., 2007a), los cuales amplifican

un fragmento de aproximadamente 700 pb de la región de código de barras de ADN a partir del

gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), siguiendo la mezcla de PCR propuesta por Kumar

(Kumar et al., 2007a). Cada mezcla de PCR contenía 1x NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> de buffer, 1 mM cada dNTPs, 5

mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM de cada primer, 0,4 U de Taq polimerasa (Bioline, Maryland) y 4 µl del

ADN molde y se llevó hasta un volumen final de 50 µl con agua grado biología molecular.

Dentro de los parámetros del termociclador está un solo ciclo de 95°C por 5 minutos; seguido de

35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 45°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; un ciclo final de

extensión de 72°C por 5 minutos y posteriormente 4°C en infinito (Hold)

### 3.4.2 Análisis de datos.

Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon con el programa BioEdit v7.2.0 (Hall, 1999) para generar la secuencia consenso de cada espécimen. El alineamiento múltiple se realizó usando el programa ClustalW (Larkin et al., 2007), y luego examinado visualmente, para asegurar que no existían codones de parada ni mutaciones en el marco de lectura, posteriormente se les realizó un BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) con el fin de comparar las secuencias registradas del gen mitocondrial COI para las especies almacenadas en GenBank y BOLD Systems. El análisis se realizó bajo los parámetros de la iniciativa códigos de barras de ADN previamente definido por Hebert en el 2003 (Hebert et al., 2003).

Se determinó el modelo de sustitución Tiempo General Reversible “GTR+I+G”, mediante el Criterio de Información de Akaike (AIC) con el programa jModeltest versión 2.1.4 (Posada & Posada, 2008). Las Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares (MOTU's) fueron obtenidas por los grupos jerárquicos definidos en el dendrograma mediante el método de Máxima Verosimilitud “Maximum Likelihood”, desde el modelo Tiempo General Reversible “GTR+I+G” soportado en el programa MEGA 6.0 (Kimura, 1980). Asimismo se realizó la inferencia bayesiana (IB) con el programa MrBayes (v.3.2) (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

La matriz de distancias genéticas intra e inter específicas se calcularon mediante el uso del programa MEGA v6.0 utilizando el modelo evolutivo de Kimura-2-parámetro (Tamura, Dudley, Nei, & Kumar, 2007; Tamura, Stecher, Peterson, Filipinski, & Kumar, 2013). Posteriormente se evaluó la composición nucleotídica, entropía por sustitución y la saturación de nucleótidos fue analizada graficando el número absoluto de transiciones y transversiones contra los valores de

distancia genética mediante el uso del programa DAMBE (Xia, 2002). Por último, el número de haplotipos, la frecuencia haplotípica, el número de sitios polimórficos (S), el número promedio de diferencias nucleotídicas (k), los parámetros de diversidad genética como la diversidad haplotípica (DH) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), se calcularon mediante el programa DNAsp v5.0 (Cywinska et al., 2006; Tamura et al., 2007; Versteirt et al., 2015; Wang et al., 2012).

## 4. Resultados

### 4.1 Especímenes colectados.

Para este estudio se analizaron áreas rurales de los municipios de Puerto Escondido (El Palmar, 8°57'49.10" N, 76°13'55.45" W), San Bernardo del Viento (Chiquí, 9°19'57.37" N, 75°58'48.21" W) y San Antero (Santa Rosa, 9°21'00.02" N, 75°42'59.86" W) correspondientes al departamento de Córdoba. Se colectó un total de 550 especímenes, de los cuales 186 fueron tomados para este proyecto debido a que se encontraban en buen estado y de acuerdo a las características morfológicas se clasificaron en nueve géneros: *Aedeomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Deinocerites*, *Haemagogus*, *Mansonia*, *Ochlerotatus* y *Psorophora* (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Generalidades de los especímenes utilizados en la metodología de códigos de barras de ADN.

Especies	Sexo	Zona de muestreo	Hábitat/Trampa	Municipio
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	H	Orilla del manglar	Agujero en el árbol	San Bernardo del Viento
	H	Orilla del manglar	Agujero en el árbol	San Bernardo del Viento
	H	Casa cerca al manglar	CDC light	San Bernardo del Viento
	M	Casa cerca al manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Casa cerca al manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
	H	Casa cerca al manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
	M	Área peri urbana	Contenedor artificial	San Antero
	H	Área peri urbana	Contenedor artificial	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
<i>Aedes (Ochlerotatus) scapularis</i>	M	Orilla del manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
	M	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	M	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
	M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido

	M	Manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
	H	Manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
<i>Aedes</i>	M	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>(Ochlerotatus)</i>	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>taeniorhynchus</i>	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
	M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Campos de arroz	Aspirador manual	Puerto Escondido
<i>Aedeomyia</i>	H	Campos de arroz	Aspirador manual	Puerto Escondido
<i>(Aedeomyia)</i>	M	Campos de arroz	Aspirador manual	Puerto Escondido
<i>squamipennis</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
	M	Manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
	H	Manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
	M	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
	M	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>Anopheles</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>(Nyssorhynchus)</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>aquasalis</i>	M	Manglar	Agujero en el árbol	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Agujero en el árbol	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Agujero en el árbol	San Bernardo del Viento
<i>Anopheles</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>neomaculipalpus</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>Culex</i>	H	Campos de arroz	CDC light – CO2	Puerto Escondido
<i>(Culex)</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
<i>corniger</i>	M	Casa cerca al manglar	Agujero en el árbol	Puerto Escondido
	H	Casa cerca al manglar	Agujero en el árbol	Puerto Escondido
	M	Casa cerca al manglar	Agujero en el árbol	San Antero
	H	Casa cerca al manglar	Agujero en el árbol	San Antero
	H	Casa cerca al manglar	Agujero en el árbol	San Antero
	H	Campos de arroz	Aspirador manual	San Antero
<i>Culex</i>	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
<i>(Culex)</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
grupo	H	Orilla al manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>salinarius</i>	M	Orilla al manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
<i>Culex</i>	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido

<i>Culex quinquefasciatus</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero	
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero	
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero	
	H	Bosque relicto	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
	M	Bosque relicto	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
	M	Bosque relicto	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
	H	Casa cerca al manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
	H	Manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido	
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido	
	M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido	
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido	
	<i>Culex (Melanoconion) erraticus</i>	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
		H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
		H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
H		Manglar	CDC light – CO2	San Antero	
M		Manglar	CDC light – CO2	San Antero	
H		Manglar	CDC light – CO2	San Antero	
H		Casa cerca al manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
H		Orilla al manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
M		Orilla al manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
H		Campos de arroz	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
H		Campos de arroz	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
H		Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido	
H		Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido	
M		Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido	
M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido		
M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido		
H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido		
H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido		
H	Manglar	Aspirador manual	San Antero		
H	Manglar	Aspirador manual	San Antero		
M	Manglar	Aspirador manual	San Antero		
M	Manglar	Aspirador manual	San Antero		
H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero		
H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero		
H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero		
H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero		
H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero		
M	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero		
H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero		
H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento		
<i>Deinocerites atlanticus</i>	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento	
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento	
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento	
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento	
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento	
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento	
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento	
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento	

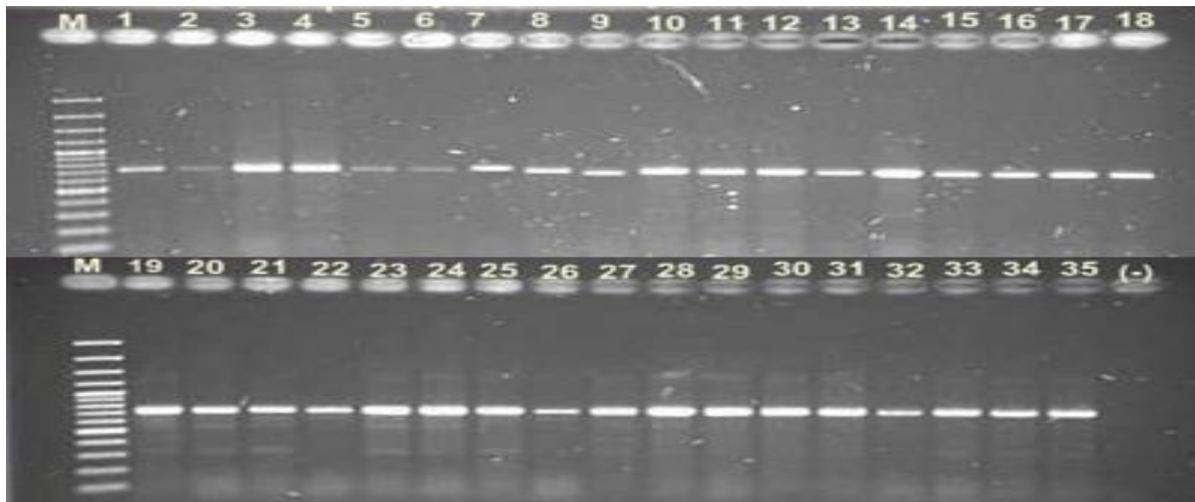
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Campo de arroz	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Campo de arroz	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Campo de arroz	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
<i>Deinocerites atlanticus</i>	H	Campo de arroz	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Campo de arroz	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	M	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	M	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	M	Manglar	Aspirador manual	San Antero
<i>Haemagogus (Haemagogus) lucifer</i>	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	M	Manglar	Aspirador manual	Puerto Escondido
	H	Manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
<i>Mansonia (Mansonia) titillans</i>	H	Manglar	CDC light – CO2	Puerto Escondido
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Antero

	M	Manglar	CDC light – CO2	San Antero
	H	Manglar	Aspirador manual	San Antero
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	Aspirador manual	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	M	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
<i>Psoro</i>	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>phora</i>	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Antero
<i>(Grabhamia)</i>	H	Orilla del manglar	CDC light – CO2	San Bernardo del Viento
<i>confinnis</i>				

#### 4.2 Extracción de ADN y PCR.

El método de extracción a base de altas concentraciones de sales descrito por Collins (Collins et al., 1987) y modificado por Caldera y Jaramillo (Atencia et al., 2016), permitió obtener ADN de buena calidad, libre de impurezas, permitiendo obtener resultados confiables durante la PCR. (ThermoScientific, 2011). De los cebadores usados en la PCR, se observó la amplificación del gen COI para el total de 186 especímenes de 14 especies de mosquitos pertenecientes a la familia Culicidae previamente identificados por claves taxonómicas usando los cebadores MTNF (5'-GGATTTGGAAATTGATTAGTTCCT T-3') / MTNR (5'-AAAAATTTTAATTCCAGTTGGAACAGC -3'). La banda amplificada presentó un tamaño de ~700 pb y se pudo apreciar mediante el uso del programa QUANTUM-CAPT Software (Fotografía 1).

**Fotografía 1.** Gel de agarosa al 1% de los productos de PCR amplificados con los cebadores MTNF/MTNR



M: Marcador de peso molecular Hyperlader IV de 100 pb DNA Ladder; Carril 1-3: *Ad. squamipennis*, carril 4-6: *Ae. aegypti*, carril 7-9 *Ae. scapularis*, carril 10-11: *An. aquasalis*, carril 12-14: *An. neomaculipalpus*, carril 15 - 16: *Cx. corniger*, carril 17-18: *Cx. erraticus*, carril 19 - 21: *Cx. complejo salinarius*, carril 22-24: *Cx. quinquefasciatus*, carril 25-26: *De. atlanticus*, carril 27-28: *Hg. lucifer*, carril 29 - 31: *Ma. titillans*, carril 32-33: *Oc. taeniorhynchus*, carril 34-35: *Ps. confinnis*, (-): Control negativo.

#### 4.3 Géneros y composición nucleotídica.

Las secuencias de 657 pb, correspondientes al fragmento 5' del gen COI obtenidas de los 186 especímenes de mosquitos concernientes a los géneros *Aedeomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Deinocerites*, *Haemagogus*, *Mansonia*, *Ochlerotatus* y *Psorophora*, pertenecen a las posiciones 295 a 945 del gen mitocondrial COI en *Aedes aegypti* (Número de acceso en GenBank: AF425846.1), usado como genoma de referencia.

El análisis de composición nucleotídica reveló un alto contenido de Adenina-Timina (68,5%) para todas las secuencias (promedio A= 30,2%, T= 38,3%, C= 16% y G= 15,5%). No se observaron inserciones, deleciones o codones de parada, descartando pseudogenes o copias nucleares de origen mitocondrial (NUMTs).

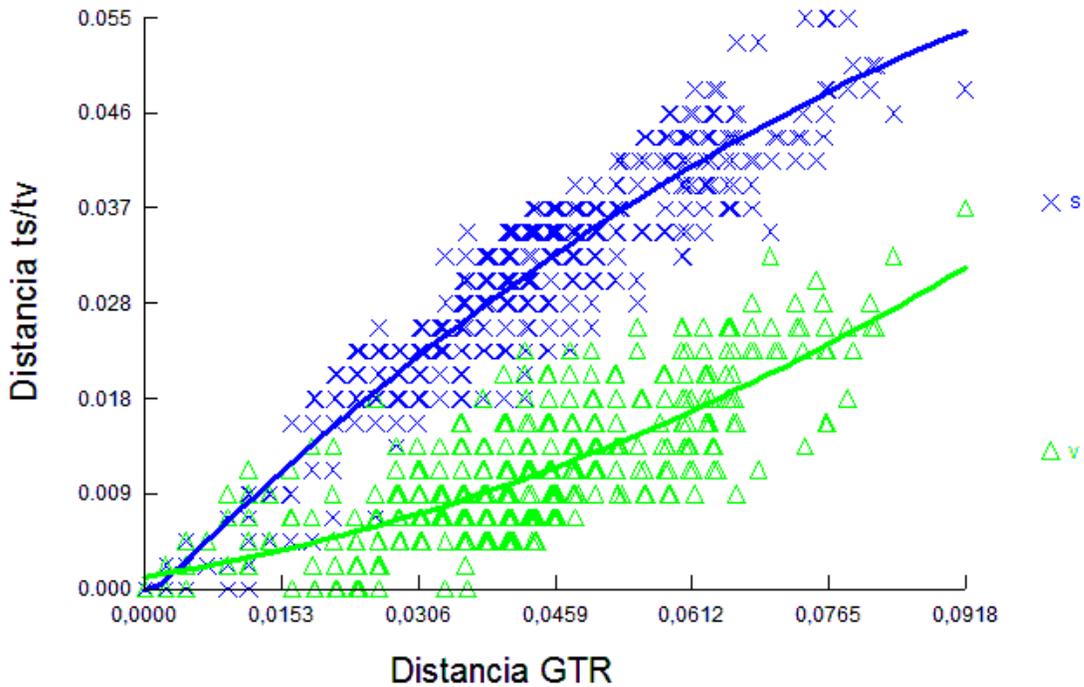
En el alineamiento de las 186 secuencias, fueron identificados 397 sitios conservados, 260 sitios variables y 53 haplotipos, con un rango de sitios polimórficos entre 2 y 26 posiciones, entre 1 a 7 haplotipos y una alta diversidad haplotípica y nucleotídica ( $>0.5$ ), siendo principalmente sustituciones no sinónimas relacionadas con la posición del tercer codón (**Tabla 6**).

La variación intra-específica fue menor a 2% para todas las especies, con un rango para las distancias genéticas de 0-1.3% (**Tabla 6**). Para la especie *Ps. confinnis* no se observó variación intra-específica y otras especies como *Oc. taeniorhynchus*, *Cx. erraticus* y *Cx. quinquefasciatus* mostraron una baja variación intra-específica. Por otra parte, las especies *Ae. aegypti* y *An. aquasalis* obtuvieron una alta divergencia intra-específica, sin embargo se encontraban dentro de los valores de corte establecidos por otros estudios para estas especies de mosquitos.

**Tabla 6.** Distancias genéticas intra-específicas con el modelo Kimura-2- parámetros y variabilidad genética en 14 especies de mosquitos colectados en tres zonas rurales del norte de Colombia. N = especímenes, S = sitios polimórficos, H = haplotipos, Hd = diversidad de haplotipos, Pi = diversidad de nucleótidos.

Especies	N	S	H	Hd	Pi	K2P rango intra-especie
<i>Ad. squamipennis</i>	8	12	5	0.893	0.0055	0.006
<i>Ae. Aegypti</i>	8	13	4	0.750	0.0098	0.010
<i>Ae. Scapularis</i>	7	4	3	0.667	0.0027	0.003
<i>An. Aquasalis</i>	10	26	6	0.844	0.0130	0.013
<i>An. neomaculipalpus</i>	2	2	2	1.000	0.0030	0.003
<i>Cx. corniger</i>	2	4	2	1.000	0.0060	0.006
<i>Cx. erraticus</i>	15	4	5	0.676	0.0015	0.002
<i>Cx. grupo salinarius</i>	12	11	3	0.591	0.0088	0.009
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	11	5	5	0.818	0.0022	0.002
<i>De. atlanticus</i>	50	8	3	0.615	0.0048	0.005
<i>Ha. lucifer</i>	25	18	7	0.777	0.0076	0.008
<i>Ma. titillans</i>	23	8	4	0.696	0.0032	0.003
<i>Oc. taeniorhynchus</i>	10	2	3	0.722	0.0016	0.002
<i>Ps. confinnis</i>	3	0	1	0.000	0.0000	0.000
Total	186	260	53	0.958	0.1064	-

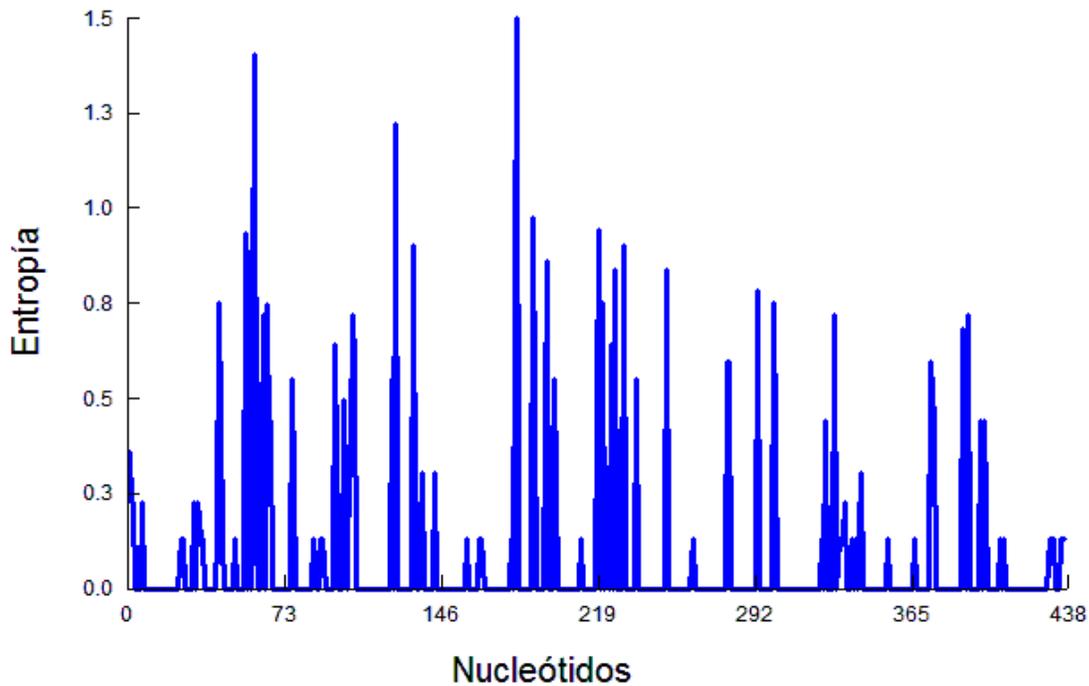
La tasa de saturación de sustitución para las posiciones del primer y segundo codón graficado contra las distancias genéticas mediante el modelo GTR indicaron que, tanto Ts como Tv exhibieron una relación lineal sugiriendo que las secuencias no estaban saturadas (**Figura 6**). Además, la prueba de saturación sustancial por Xia (2002), reveló que el valor de Iss era menor que el Iss.c, indicando que las secuencias no sufrieron una saturación sustancial, pudiendo utilizarse para la codificación de barras de ADN y estudios filogenéticos (**Tabla 7**) y en la gráfica de variables de sustitución por sitio se observó una variabilidad constante distribuida a lo largo de todo el alineamiento (**Figura 7**).



**Figura 6.** Tasas de transiciones y transversiones con respecto a las distancias genéticas estimadas para el primer y segundo codón dentro de la región del gen COI – códigos de barras con el modelo GTR.

**Tabla 7.** Prueba de saturación de sustitución para el primer y segundo codón dentro de la región del gen COI – códigos de barras.

NumOTU	Iss	Iss.cSym	T	DF	P	Iss.cAsym	T	DF	P
4	0,043	0,791	72,680	435	0,0000	0,758	69,491	435	0,0000
8	0,044	0,745	63,617	435	0,0000	0,634	53,507	435	0,0000
16	0,043	0,709	60,715	435	0,0000	0,500	41,644	435	0,0000
32	0,044	0,695	59,047	435	0,0000	0,367	29,338	435	0,0000



**Figura 7.** Tasa de saturación de sustitución de los codones 1 y 2 de la secuencia de nucleótidos dentro de la región del gen COI – códigos de barras.

Las secuencias obtenidas en este estudio fueron comparadas con secuencias que se encuentran almacenadas en las bases de datos de GenBank y BOLD, con el fin de comparar y determinar la similitud que presenten y la especie más cercana de acuerdo al criterio de Best-Match (Ratnasingham & Hebert, 2007, 2013). Para las especies *Ad. squamipennis*, *Ae. aegypti*, *Ae. scapularis*, *An. aquasalis*, *An. neomaculipalpus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Ma. titillans* y *Oc. taeniorhynchus* se obtuvo una concordancia que oscilaba entre 96 a 100% de similitud con las secuencias almacenadas en las bases de datos de GenBank y BOLD. Con respecto a las secuencias de *Cx* complejo *salinarius* se encontró un 99,7% para *Cx. maxi* y 99,5% para *Cx. usquatus* de acuerdo a la base de datos BOLD, sin embargo en GenBank se observó una semejanza del 100% para *Cx* complejo *salinarius*; para las secuencias de la especie de *Cx. corniger* correspondió un 98,66% para *Ae. albopictus*, y un 98,27% para *Cx. corniger* al usar la base de datos BOLD, en cuanto a *Cx. erraticus* se estimó un 99,2% de semejanza con las

especies *Cx. conspirator*, *Cx. declarator*, *Cx. nigripalpus* y en un 98,8% para *Cx. erraticus* mediante la base de datos BOLD, pero en GenBank se observó un alto porcentaje de similitud para la especie *Cx. erraticus*. Con respecto a *De. atlanticus* se alcanzó entre 92 – 94% de semejanza con secuencias pertenecientes a las especies *De. cancer*, *De. duttoni* y *De. australicus*. Las secuencias de *Hg. lucifer* se encontró entre un 89 a 90.9% de similitud con especies de *Ma. titillans*, *Ma. indubitans* y *Ma. dyari*. Por último con las secuencias de la especie de *Ps. confinnis* se obtuvo un 98,2% de similitud para *Ps. columbiae* en la base de datos BOLD y para la base de datos en GenBank se obtuvo gran similitud para las especies en un 100%, sin embargo es importante aclarar que las especies *Ps. columbiae* y *Ps. confinnis* forman parte del complejo *Psorophora confinnis* y su nombre varía de acuerdo a la distribución geográfica (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Comparación de las secuencias en las bases de datos BOLD System y GenBank.

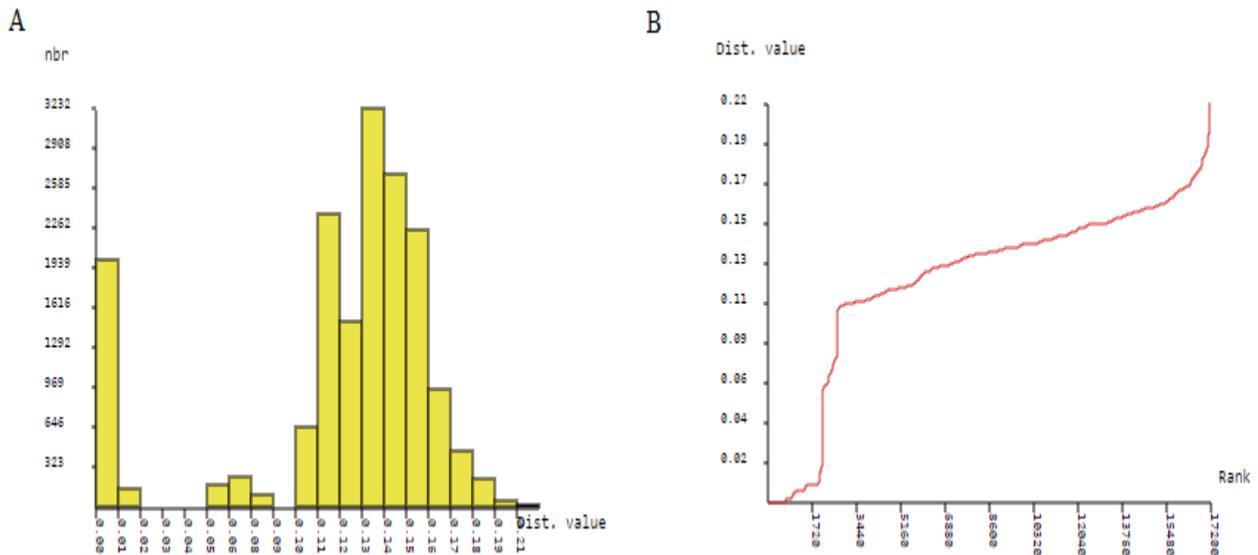
<b>Especies</b>	<b>BOLD SYSTEM</b>	<b>GenBank</b>
<i>Ad. squamipennis</i>	<i>Ad. squamipennis</i> (98,2%)	<i>Ad. squamipennis</i> (100%)
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. aegypti</i> (99%)	<i>Ae. aegypti</i> (99%)
<i>Ae. scapularis</i>	<i>Ae. scapularis</i> (97%)	<i>Ae. scapularis</i> (100%)
<i>An. aquasalis</i>	<i>An. aquasalis</i> (96,8%)	<i>An. aquasalis</i> (100%)
<i>An. neomaculipalpus</i>	<i>An. neomaculipalpus</i> (98%)	<i>An. neomaculipalpus</i> (99%)
<i>Cx. corniger</i>	<i>Ae. albopictus</i> (98,6%) <i>Cx. corniger</i> (98,2%)	<i>Cx. corniger</i> (100%)
<i>Cx. erraticus</i>	<i>Cx. conspirator</i> (99,2%) <i>Cx. declarator</i> (99,1%) <i>Cx. nigripalpus</i> (99,1%) <i>Cx. erraticus</i> (98,8%)	<i>Cx. erraticus</i> (100%)
<i>Cx. complejo salinarius</i>	<i>Cx. maxi</i> (99,7%) <i>Cx. usquatus</i> (99,5%)	<i>Cx. complejo salinarius</i> (99%)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	<i>Cx. pipiens</i> (99,7%) <i>Cx. quinquefasciatus</i> (99,7%)	<i>Cx. quinquefasciatus</i> (100%)
<i>De. atlanticus</i>	<i>De. cancer</i> (94,5%) <i>De. duttoni</i> (91,9%) <i>De. australicus</i> (91,2%)	<i>De. atlanticus</i> (100%)
<i>Hg. lucifer</i>	<i>Ma. titillans</i> (90,9%) <i>Ma. indubitans</i> (90,7%) <i>Ma. dyari</i> (89%)	<i>Hg. lucifer</i> (100%)
<i>Ma. titillans</i>	<i>Ma. MBI-03</i> (99,3%)	<i>Ma. titillans</i> (100%)
<i>Oc. taeniorhynchus</i>	<i>Oc. taeniorhynchus</i> (99,5%)	<i>Oc. taeniorhynchus</i> (100%)
<i>Ps. confinnis</i>	<i>Ps. columbiae</i> (98,2%)	<i>Ps. confinnis</i> (100%)

La distancia genética entre especies mediante el parámetro de K2P evidenció un promedio entre 6.2 y 19.5% (**Tabla 9**), sin valores superpuestos en las distancias genéticas intra / inter-especies.

**Tabla 9.** Distancias genéticas inter-específicas en pares con Kimura-2 parámetros (en BOLD) y desviaciones estándar (fuente regular) entre 14 especies de mosquitos colectadas en áreas rurales de los municipios de Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y San Antero correspondientes al departamento de Córdoba (Colombia).

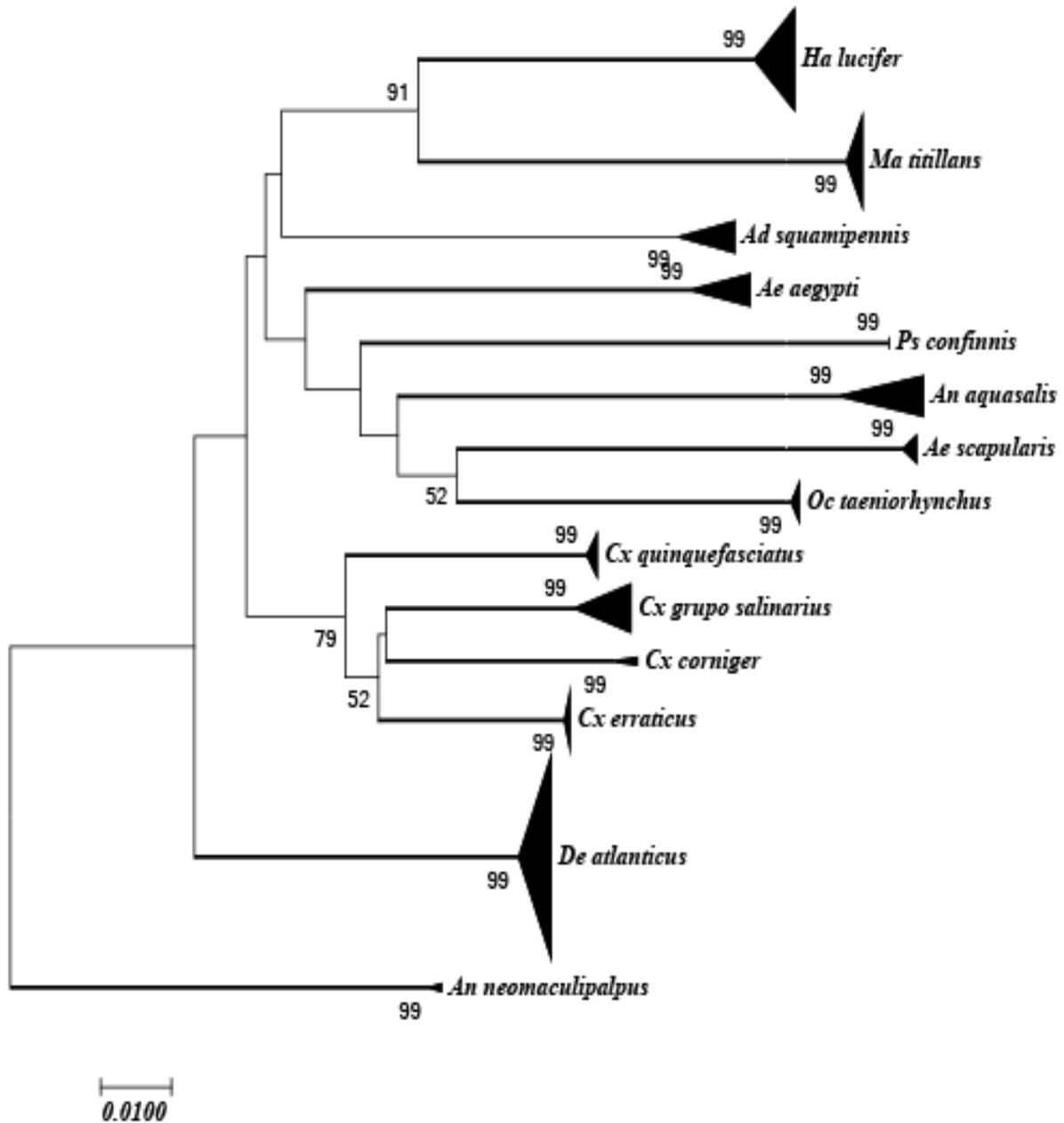
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>1 Ad. Squamipennis</i>		<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,013</b>	<b>0,014</b>	<b>0,014</b>	<b>0,016</b>	<b>0,016</b>	<b>0,014</b>	<b>0,017</b>	<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,017</b>	<b>0,014</b>
<i>2 Ae. aegypti</i>	0,124		<b>0,016</b>	<b>0,013</b>	<b>0,014</b>	<b>0,014</b>	<b>0,016</b>	<b>0,016</b>	<b>0,015</b>	<b>0,015</b>	<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	<b>0,013</b>
<i>3 Ae. scapularis</i>	0,145	0,146		<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	<b>0,016</b>	<b>0,017</b>	<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,015</b>	<b>0,015</b>
<i>4 Cx. erraticus</i>	0,113	0,113	0,123		<b>0,010</b>	<b>0,013</b>	<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,013</b>	<b>0,015</b>	<b>0,009</b>	<b>0,015</b>	<b>0,014</b>	<b>0,010</b>
<i>5 Cx. quinquefasciatus</i>	0,129	0,117	0,146	0,069		<b>0,013</b>	<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,013</b>	<b>0,016</b>	<b>0,010</b>	<b>0,016</b>	<b>0,017</b>	<b>0,011</b>
<i>6 De. atlanticus</i>	0,124	0,129	0,156	0,105	0,107		<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	<b>0,015</b>	<b>0,015</b>	<b>0,013</b>	<b>0,015</b>	<b>0,015</b>	<b>0,014</b>
<i>7 Ha. lucifer</i>	0,141	0,147	0,153	0,123	0,127	0,136		<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	<b>0,017</b>	<b>0,015</b>	<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	<b>0,014</b>
<i>8 Ma. titillans</i>	0,140	0,148	0,174	0,131	0,128	0,145	0,116		<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	<b>0,016</b>	<b>0,019</b>	<b>0,014</b>
<i>9 Oc. taeniorhynchus</i>	0,132	0,131	0,115	0,105	0,109	0,137	0,158	0,162		<b>0,014</b>	<b>0,013</b>	<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	<b>0,013</b>
<i>10 Ps. confinnis</i>	0,176	0,148	0,141	0,141	0,160	0,147	0,184	0,181	0,134		<b>0,015</b>	<b>0,016</b>	<b>0,018</b>	<b>0,014</b>
<i>11 Cx. complejo salinarius</i>	0,134	0,127	0,130	0,062	0,076	0,112	0,139	0,163	0,112	0,146		<b>0,014</b>	<b>0,015</b>	<b>0,010</b>
<i>12 An. aquasalis</i>	0,143	0,144	0,142	0,133	0,155	0,154	0,171	0,155	0,137	0,162	0,133		<b>0,016</b>	<b>0,014</b>
<i>13 An. neomaculipalpus</i>	0,171	0,168	0,144	0,128	0,154	0,137	0,174	0,195	0,146	0,179	0,139	0,147		<b>0,015</b>
<i>14 Cx. corniger</i>	0,122	0,108	0,135	0,065	0,072	0,114	0,125	0,114	0,102	0,137	0,069	0,136	0,140	

El análisis de ABGD y BGA reveló notoriamente gap entre las distancias intraespecíficas e interespecíficas de las especies de mosquitos colectadas en áreas rurales de los municipios de Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y San Antero correspondientes al departamento de Córdoba (Colombia) (**Figura 8A-B**).

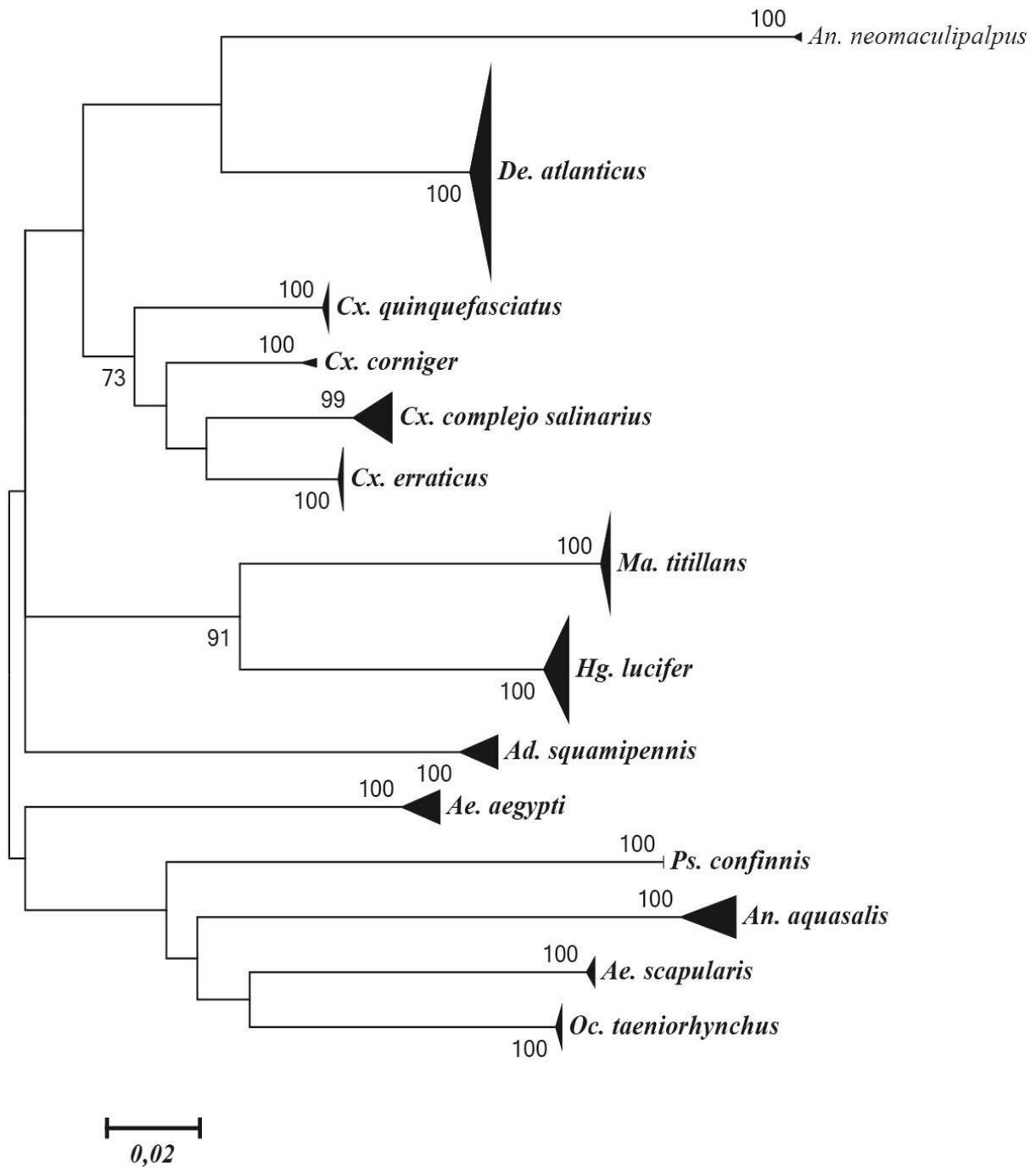


**Figura 8.** (A) Histograma de distancias genéticas y (B) distancias clasificadas de 14 especies de mosquitos colectadas en áreas rurales de los municipios de Puerto Escondido, San Bernardo del Viento y San Antero correspondientes al departamento de Córdoba (Colombia).

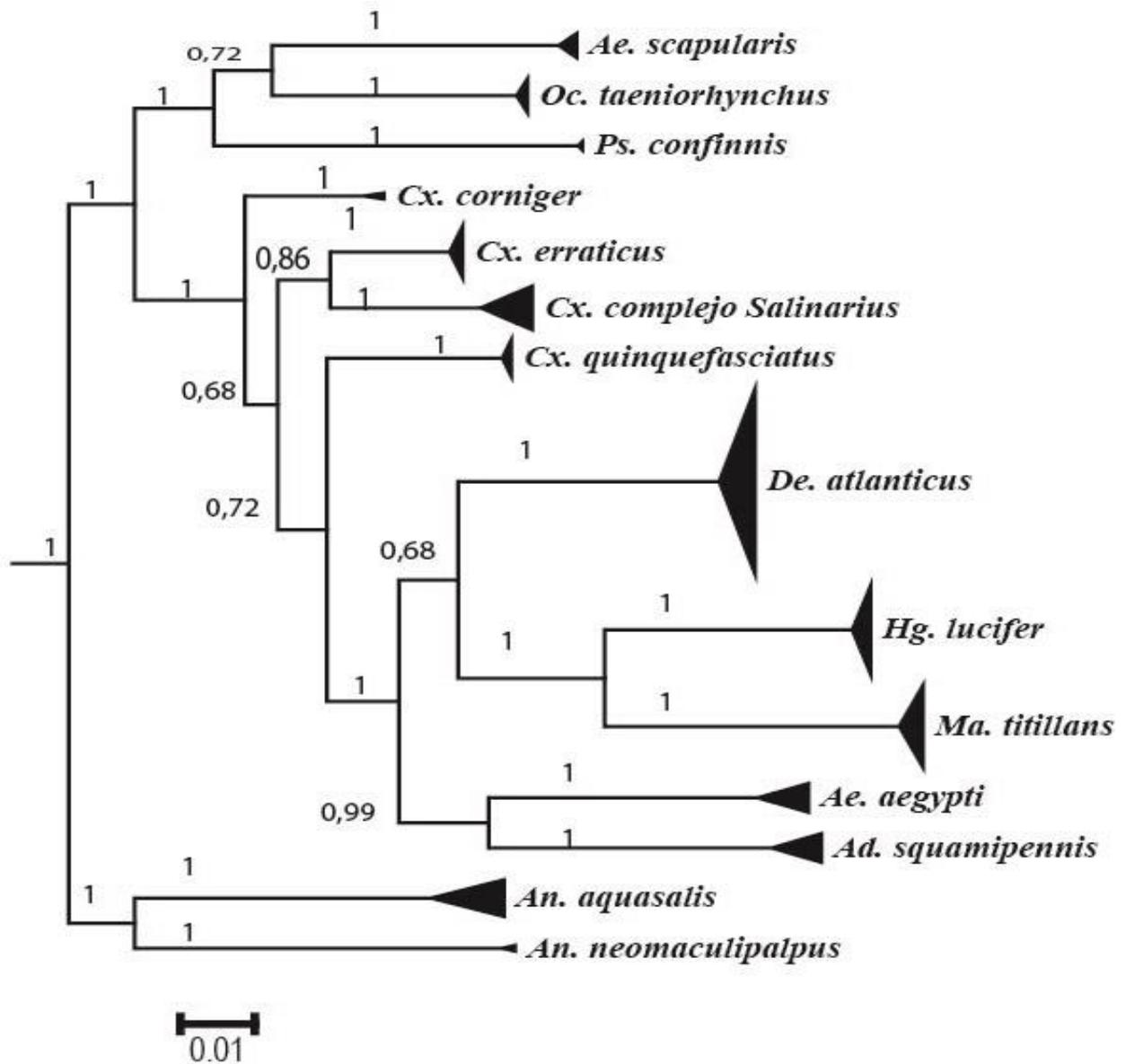
Un dendrograma de Neighbor-Joining y Máxima Verosimilitud (**Figura 8, 9**) evidencia 14 clusters (MOTU's) correspondientes a diferentes grupos taxonómicos identificados por características morfológicas y permitiendo su discriminación entre especies. Todos los nodos se recuperaron con altos valores de bootstrap (> 90%). Los MOTU se encontraron bien delimitados y correspondían a distancias intra-inter genéticas caracterizadas para cada especie. Se utilizó GTR+I+G como modelo de sustitución para el conjunto de datos de nucleótidos, de acuerdo al criterio Akaike determinado por el jModelTestv2. El análisis bayesiano se realizó por 5.000.000 generaciones, descartando el primer 25% de las topologías muestreadas (**Figura 10**).



**Figura 9.** Dendrograma de Neighbor-joining de las secuencias por el método de Kimura-2-parámetros en los mosquitos colectados en tres zonas rurales del norte de Colombia. Entidades admitidas con valores de arranque de 100% (réplicas = 1000).



**Figura 10.** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de las secuencias por el método GTR+I+G en los mosquitos colectados en tres zonas rurales del Norte de Colombia, utilizando el umbral de secuencia del 2% de la Iniciativa Mosquito Barcode (Gunay et al., 2015). Entidades admitidas con valores de arranque de 100% (Bootstrap = 1000).



**Figura 11.** Árbol filogenético bayesiano de las secuencias de códigos de barras de especies de mosquitos caracterizadas por zonas costeras del departamento de Córdoba (Colombia). El número en los nodos indica la probabilidad posterior del clado. El conjunto de datos final comprendía 657 nucleótidos, incluyendo todas las posiciones de codones.

## 5. Discusión

### 5.1 Metodología “Código de Barras”

De acuerdo a las claves morfológicas usadas para la discriminación de los especímenes estudiados, se obtuvo un total de nueve géneros y 14 especies (*Aedeomyia*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Deinocerites*, *Haemagogus*, *Mansonia*, *Ochlerotatus* y *Psorophora*), las cuales fueron confirmadas mediante la técnica de códigos de barra de ADN. No se encontraron especies cripticas o hermanas, ni complejos de especies. Resultado similar obtuvo Chan et al., 2014 al lograr 100% de éxito en la identificación de 128 especímenes pertenecientes a 13 géneros y 45 especies de acuerdo a claves morfológicas y confirmadas mediante la técnica de códigos de barra de ADN (Chan et al., 2014). Por otra parte, Batovska (2016) identificó en el sureste de Australia 26 especies de 113 especímenes usando claves morfológicas, mientras que, por identificación molecular reveló tres especies más, para un total de 29 especies, siendo *Culex palpalis*, *Macleaya macmillani* y una especie desconocida que previamente se identificó como *Tripteroides atripes* las especies que se encontraban erróneamente identificadas (Batovska et al., 2016). Las especies silvestres son difíciles de identificar molecularmente, debido a que su taxonomía corresponde a grupos con escasa información sobre biología, ecología y ausencia de secuencias de referencia, adicionalmente las claves de identificación no se encuentran actualizadas. Siendo el caso de *Deinocerites* spp. y la sección *Melanoconion* del mismo subgénero homónimo; este último no tiene claves morfológicas y la identificación requiere un reconocimiento de caracteres para cada especie, revisar las estructuras de la genitalia masculina contrastando cada especie de esta sección. Los inventarios rápidos o estudios de biodiversidad

usando códigos de barras de ADN para mosquitos en este tipo de ecosistemas silvestres necesitan un esfuerzo adicional en taxonomía para generar una biblioteca de secuencias de referencia para la investigación en ecología de mosquitos y arbovirus.

En la topología inferida para las secuencias caracterizadas, se generan clados monofiléticos apoyados (con valores de bootstrap > 80% y de consenso de mayoría de 100%) con especies/secuencias que corresponden con la denominación de la unidad molecular taxonómica de especie, recuperándose catorce MOTU's en arboles reconstruidos mediante Máxima Verosimilitud / Inferencia Bayesiana. Otros análisis realizados en BOLD (best-match) permiten indicar la identificación molecular y nombres taxonómicos para cada consulta utilizada, sin evidenciarse la presencia de especies crípticas o complejos de especies. Sin embargo, dentro del conjunto de secuencias analizadas no se tenían suficientes especies del género *Culex*, los cuales presentan dificultades por solapamiento de haplotipos en diferentes grupos de especies, lo que dificulta la discriminación correcta de especies (Laurito et al. 2013, Rozo-Lopez y Mengual 2015, Hoyos López et al. 2015).

De acuerdo con Aliabadian et al., 2009, el éxito de los códigos de barras de ADN dependen de las diferencias entre las distancias genéticas intra/inter-específicas, las cuales no se deben sobreponer ni solaparse (gap) (Aliabadian et al., 2009). Con respecto a esto, en este estudio, la divergencia intra-específica fue menor a 2% para todas las especies, con un rango de 0-1.3%, mientras que la distancia inter-específica estimada se encontraron entre los rangos 6.2-19.5%, además de no evidenciarse superposición, logrando una clara discriminación molecular de cada especie estimada. Resultados similares fueron reportados por Cywinska et al., 2006, el cual

reportó que las divergencias de la secuencia de COI para 37 especies originarias de Canadá fueron aproximadamente 20 veces más altas para especies congénicas que para miembros de una especie. La divergencia intra-específicas fue del 0 – 3.9%, mientras que la distancia inter-específica presentaba un rango entre 0.2 – 17.2% (Cywinska et al., 2006). Wang et al., 2012, reportó las distancias intra/inter-específica para una población de 122 especies de mosquitos procedentes de China, el cual encontró que la mayoría de la divergencia de la secuencia intra-específica presentaban un rango de 0 - 1.67%, mientras que la divergencia inter-específica estaba en un rango de 2.3-21.8% (Wang et al., 2012). Ashfaq et al., 2014 reportó una divergencia intra-específica para 32 especies de mosquitos procedentes de Pakistan entre 0-2.4% y la distancia inter-específica mostraron un rango entre 2.3-17.8% (Ashfaq et al., 2014). En estudios a nivel nacional, se tiene el de Hoyos – López et al., 2015, el cual obtiene una divergencia intra-especie para 56 culícidos en estado inmaduro de los municipios de Armenia y Circasia de 0 – 0,0316 y la distancia inter-específica con un rango de 0,059 – 0,137 (Hoyos-López et al., 2015a). Zamora-Delgado et al., 2015, observó que la variedad intra- especie para 55 especímenes pertenecientes al género Aedes en estado inmaduro en zona rural de la Tebaida (Quindío) fue baja (0.001), indicando individuos conespecíficos de la misma especie y la distancia genética inter-específica fue de 0.137, el cual corresponde con los estimados para la identificación de especies en mosquitos (Zamora-Delgado et al., 2015).

Los criterios basados en gráficos para la identificación de especies, describen la similitud genética de forma visual como los arboles filogenéticos, proporcionando fiabilidad estadística (Goldstein and DeSalle 2010). En este estudio se realizaron los arboles de Neighbor – Joining, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana para las 180 secuencias generando 14 grupos monofiléticos con niveles de congruencia mayores al 70%. Rozo-López y Mengual 2015

implementaron los métodos de Neighbor – Joining y Máxima Verosimilitud a una compilación de 1292 secuencias, el análisis basado en árboles en este estudio mostró 105 especies de mosquitos (de 133 especies totales) separados en distintos grupos. Dado que el agrupamiento de NJ se realizó considerablemente más rápido que el enfoque de MV y de hecho se ha utilizado en la gran mayoría de los estudios de códigos de barras publicados, estos resultados indican que es una elección eficaz para los análisis de códigos de barras de mosquitos, similar a lo observado para otros organismos (Rozo-López and Mengual 2015).

## **5.2 Evolución y variabilidad genética de Citocromo Oxidasa I “Barcode”**

La composición del gen mitocondrial COI de las secuencias es rica en AT, que es similar a los estudios anteriores (Cywinska et al., 2010; Hoyos et al., 2012; Tamura et al., 2013) y trabajos previos para mosquitos de importancia médica (Cywinska et al., 2006; Taira et al., 2012; Wang et al., 2012). La región COI en las especies de mosquitos se caracterizó por la acumulación de Ts y Tv de manera lineal con alta tasa de Ts en la primera y segunda posición de codón, ya que mostró un aumento constante a lo largo de la distancia genética con el modelo GTR. Resultado similar obtuvo Vadivalagan et al., 2015 al observar acumulación de Ts y Tv de forma lineal en el segundo codón, mientras que la primera y tercer codones experimentaron baja tasa de Tv y altas Ts en especímenes de *Ae. aegypti* en el Sur de la India (Vadivalagan et al., 2015). Por el contrario, Wang et al., 2012 reportó un alto nivel de Tv conforme iba aumentando la divergencia de las secuencias, sugiriendo a su vez un estudio adicional sobre el uso de Tv como un índice adicional de similitud taxonómica molecular (Wang et al., 2012). Murugan et al., 2016 coincidió

con Wang al reportar que la región COI de las especies de mosquitos pertenecientes a los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* procedentes de la India, se caracterizaron por la alta tasa de Tv al confrontarlas con el modelo de distancia genética F84 (Murugan et al., 2016). Esto se podría deber a la amplia divergencia genética causada por las sustituciones entre y dentro las especies, también se debe tener en cuenta que en los estudios realizados por Wang y Murugan se trabaja con el tercer codón, el cual tiende a evolucionar más rápido y acumular residuos pudiendo interferir con los valores de Ts/Tv.

El uso de genes mitocondriales, a pesar de ser controversial debido a la restricción en especies estrechamente relacionadas causado por altas tasas de sustitución nucleotídica, exhibe múltiples ventajas con respecto a los genes nucleares al poseer estricta transmisión materna con alta tasa de mutación causado por el sistema de reparación limitada, rápida evolución y robustez contra la degradación, además de tener una estructura simple conservada (San et al., 2006). Sin embargo, el gen COI se considera como el marcador molecular por excelencia para estudios evolutivos y filogenéticos al presentar una alta tasa de sustitución que permite resolver relaciones en categorías bajas como familias, géneros y especies utilizando una secuencia genética corta y estandarizada de aproximadamente 600 pb, teniendo ventaja con respecto a los otros marcadores moleculares mitocondriales (Mandal et al., 2014, Roe & Sperling 2007).

En cuanto al tamaño del fragmento a usar del gen mitocondrial COI, Harvey et al., 2003 pudo observar que un pequeño fragmento de 278 pb permite discriminar especies de moscas necrófagas de importancia forense, sin embargo, afirma que para obtener la separación de especies estrechamente cercanas como es el caso de *Calliphora augur* y *Calliphora dubia*, se requiere de una región más grande (Harvey et al., 2003). Debido a esto, múltiples estudios en la actualidad se centraron en la amplificación de un fragmento de aproximadamente 600 pb, el cual

permite obtener mayor información a nivel filogenético, logrando discriminar una variedad de especies ya sean vertebrados como invertebrados y resolver los inconvenientes presentados con especies crípticas o hermanas. Sin embargo, un estudio realizado por Gunning et al., 2002, consiguió obtener un amplificado de 900 pb, por lo que no se requiere limitar la longitud del fragmento a solo 600 pb (Gunning et al., 2002).

### **5.3 Mosquitos y Patógenos emergentes/re-emergentes en Salud Pública**

Las especies de mosquitos identificadas en este estudio son de gran relevancia en epidemiología y entomología médica debido a que son potenciales vectores de patógenos humanos como arbovirus y protozoos. De acuerdo a esto, *Psorophora confinnis* se considera un vector enzoótico para VEEV, encontrándose en diferentes regiones de Colombia (Ferro et al., 2008) y su complejo fue definido por ensayo isoenzimático, el cual permitió distinguir cuatro especies: *Ps. confinnis* en América del Sur, *Ps. columbiae* en América del Norte, *Ps. funiculus* en Colombia, *Ps. toltecum* en el Suroeste de los Estados Unidos y el Oeste de México, y *Ps. jamaicensis* en el Caribe (Lanzaro et al., 2015). Trabajo realizado por Hoyos-López et al. 2016 manifestó la presencia de *Ps. confinnis* en Lorica – Córdoba (Chiquí - San Bernardo del Viento, aproximadamente ~ 30 km), identificándose como *Ps. confinnis* como especie presente en Colombia e informó que dichos especímenes estaban infectados con VEEV.

Hoyos et al. 2016 demostró la presencia de mosquitos de especie *Culex (Mel.) erraticus* infectados con el Virus del Nilo Occidental (WNV) en San Bernardo del Viento (Hoyos-López et al., 2016), en ecosistemas relacionados con manglares y campos de arroz. Esta especie de

mosquito es un vector competente para el Virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV), el subtipo IC del Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) y el Virus de Encefalitis de Saint Louis (SLEV) (Mendenhall et al., 2012). Por otro lado, *Culex quinquefasciatus* se ha encontrado infectado con SLEV, WNV, VEEV (Rutledge et al., 2003, Dow et al., 1964, Day y Curtis 1999, Arrigo et al. 2010). Otros estudios han evidenciado patrones de alimentación selectiva, identificados en fuentes de alimentación de sangre relacionadas con roedores, lagartos, ranas, humanos, mamíferos y alta frecuencia en aves (Edman et al. 1971, Alencar et al., 2005). Especímenes de *Cx. erraticus* mostraron patrones similares de hábitos alimenticios, con preferencias asociadas a aves, mamíferos y reptiles, pudiendo cruzar ciclos de arbovirus en diferentes grupos de vertebrados (Mendenhall et al., 2012). El comportamiento oportunista de *Cx. nigripalpus* y *Cx. erraticus*, los convierte en candidatos para establecer un puente entre los ciclos de transmisión enzoóticos y humanos de arbovirus (Kilpatrick et al., 2006, Cupp et al., 2007).

*Aedes (Ochlerotatus) taeniorhynchus* es considerado un vector epizootico de los subtipos IAB-IC del Virus de Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) (Weaver et al., 2004) y también ha sido identificado como vector competente del Virus de Encefalitis de St. Louis (Nayar et al., 2001), Virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV) (Ortiz et al. 2005), el Virus del Nilo Occidental (WNV) (Eastwood et al., 2011) y ha sido incriminado en la transmisión de *Dirofilaria immitis* en América del Sur y Central (Manrique-Saide et al., 2008).

Las larvas de *Ma. titillans* prefieren pequeños lagos, estanques, ríos con poca corriente y pantanos, asociados con las plantas flotantes (Lounibos y Linley 1987). Sus patrones de alimentación muestran un amplio espectro con tendencia a mamíferos y aves (Edman et al., 1971). Parra et al. (2012) registró esta especie en fragmentos forestales de Urabá (Antioquia)

cerrados a hábitats humanos y Groot et al. (1996) encontró insectos infectados con VEEV en Magangué (Bolívar) en 1970-1971. En granjas de cocodrilos de Florida (EE. UU.) se registró la presencia de mosquitos de *Ma. titillans* infectados con WNV (Unlu et al., 2010) y con SLEV - genotipo IV en manglares de San Bernardo del Viento (Córdoba) (Hoyos-López et al., 2015).

El estado inmaduro de *De. atlanticus* se desarrolla en agua acumulada en el interior de agujeros excavados por los cangrejos y los mosquitos adultos generalmente son activos en la noche, donde las hembras son consideradas oportunistas e ingieren sangre de una gran variedad de vertebrados que incluyen mamíferos, reptiles, anfibios y aves (R. E. Harbach et al., 2012; McIver & Siemicki, 1976). Debido al poco estudio sobre el comportamiento, ecología y biología de los mosquitos de esta especie, se desconoce ciertamente el papel que desempeñan como vectores en transmisión de posibles enfermedades en vertebrados (Betancourt & Loaiza, 2016). Sin embargo, en Colombia se han tenido registros de la especie *De. atlanticus*, como es el trabajo de Ferro en el 2015, el cual estudió si las condiciones ambientales eran favorables para la reaparición del VEEV en un zona rural del municipio de Manaure (Guajira). Dicho trabajo reportó la presencia de especies como *Ae. taeniorhynchus* y *Ps. confinnis*, los cuales tenían relación con precipitaciones y temperaturas y la especie *De. atlanticus* fue la especie con mayor abundancia (91%) de los especímenes colectados, convirtiéndolo en un vector de importancia en esa zona, ya que aún se presentan ciertas condiciones ambientales y epidemiológicas que podrían favorecer la reaparición del virus de VEEV en esta localidad (Ferro et al., 2015). Otro estudio fue el de Hoyos en el 2016 en una zona rural de San Bernardo del Viento (Colombia), en donde lograron detectar el VEEV en especímenes pertenecientes a las especies *Culex*, *Ps. confinnis*, *Ae. scapularis* y *Ma. titillans*, siendo este el primer reporte para *De. atlanticus* (Hoyos-López et al., 2016).

## 6. Conclusiones

En este estudio se obtuvieron secuencias de COI para 186 especímenes, representados por 9 géneros y 14 especies, las cuales al ser sometidas a la base de datos BOLD Systems presentaron discrepancia para ciertas especies, lo que evidencia la necesidad de una valoración de las secuencias ingresadas y su posterior validación en dicha base de datos; difiriendo de la base de datos en GenBank que se obtuvo una total correspondencia con las especies, afirmando la identidad de las secuencias obtenidas. El marcador molecular COI – códigos de barra de ADN presentó una variabilidad nucleotídica constante, con una distancia inter-especifica superior con respecto a la variación intra-especifica, además de generarse agrupaciones de acuerdo a las especies de mosquitos identificados bajo los modelos evolutivos de Kimura-2-Parametros y General – Time – Reversible, usado en la Inferencia Bayesiana, concluyendo así que la metodología códigos de barra-COI permitió la separación e identificación de las especies de mosquitos usadas en este estudio, las cuales de acuerdo a múltiples trabajos a nivel internacional y nacional se encuentran involucradas en la transmisión de patógenos de importancia clínica y veterinaria.

El uso del gen mitocondrial COI “código de barras” en la identificación de especies resulta ser efectivo y accesible para estudios de sistemática y taxonomía, así como en estudios poblacionales en la mayoría de las especies, puesto que permite la definición de relaciones filogenéticas a nivel de especies cercanamente relacionadas, además de ser un buen marcador para las relaciones evolutivas entre poblaciones de una misma especie.

Con respecto a las especies trabajadas pertenecientes al género *Culex*, se logró su correcta separación e identificación, sin embargo las especies colectadas de este género no son representativas para evaluar la confiabilidad del marcador códigos de barras de ADN, y de acuerdo a los inconvenientes que plantea este género con su identificación a nivel morfológico (falta de claves dicotómicas, escasas revisiones de subgéneros, ausencia de catálogos, complejos de especies y las evidencias de una alta diversidad críptica morfológica y molecular), sería adecuado continuar con este estudio enfocándose en este género con especies representativas para obtener resultados fiables con respecto al empleo de esta metodología. Adicional a este, también es requerido realizar este estudio en especies correspondientes a los géneros *Deinocerites*, *Mansonia* y *Haemagogus*, debido al poco conocimiento que se tiene de dichos géneros en cuanto a su ecología e importancia clínica-veterinaria a nivel nacional y en zonas costeras.

## 7 . Recomendaciones

Se recomienda profundizar en el estudio de especies del género *Culex* (subgéneros *Culex* y *Melanoconion*) en municipios del departamento de Córdoba, determinando las especies presentes mediante la revisión taxonómica, implementación de la metodología códigos de barras (COI) y marcadores moleculares como ND4 e ITS-2. “Taxonomía integrativa de especies del subgénero *Culex* y *Melanoconion* en zonas con actividad de patógenos emergentes de Córdoba (Colombia)”.

## Bibliografía

- Afrane, Y. A., Little, T. J., Lawson, B. W., Githeko, A. K., & Yan, G. (2008). Deforestation and vectorial capacity of *Anopheles gambiae* giles mosquitoes in malaria transmission, Kenya. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(10), 1533–1538.
- Afrane, Y. A., Zhou, G., Lawson, B. W., Githeko, A. K., & Yan, G. (2006). Effects of microclimatic changes caused by deforestation on the survivorship and reproductive fitness of *Anopheles gambiae* in western Kenya highlands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *74*(5), 772–778.
- Afrane, Y., Githeko, A., & Yan, G. (2013). The Ecology of *Anopheles* Mosquitoes under Climate Change: Case Studies from the Effects of Environmental Changes in East Africa Highlands. *National Instituto Of Health*, 204–210.
- Aguilar, P., Adams, P., Suárez, V., Beingolea, L., Vargas, J., Manock, S., ... Kochel, T. (2009). Genetic Characterization of Venezuelan Equine Encephalitis Virus from Bolivia, Ecuador and Peru: Identification of a New Subtype ID Lineage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *3*(9), 8.
- Aguilar, P., Estrada-Franco, J., Navarro-Lopez, R., Ferro, C., Haddow, A., & Weaver, S. (2011). Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: hidden under the dengue umbrella. *NIH Public Access*, *6*(6), 32.
- Aliabadian, M., Kaboli, M., Nijman, V., & Vences, M. (2009). Molecular Identification of Birds : Performance of Distance-Based DNA Barcoding in Three Genes to Delimit

Parapatric Species. *PLoS One*, 4(1).

Arredondo-Garcia, J., Mendez-Herrera, A., & Medina-Cortina, H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica Arbovirus in Latin America. *Acta Pediatr Mex*, 37(2), 111–131.

Ashfaq, M., Hebert, P., Mirza, J., Khan, A., Zafar, Y., & Mirza, S. (2014). Analyzing Mosquito (Diptera: Culicidae) Diversity in Pakistan by DNA Barcoding. *PloS One*, 9(5), 12.

Atasheva, S., Young Kim, D., Akhrymuk, M., Morgan, D., Frolova, E., & Frolov, I. (2016). Pseudoinfectious Venezuelan Equine Encephalitis Virus: a New Means of Alphavirus Attenuation. *Journal of Virology*, 87(4), 13.

Atencia, M., Pérez, M., Jaramillo, M., Caldera, S., Cochero, S., & Bejarano, E. (2016). Primer reporte de la mutación F1534C, asociada con resistencia cruzada a DDT y piretroides, en *Aedes aegypti* de Colombia. *Biomédica*, 36, 20.

Augot, D., Ninio, C., Akhouni, M., Lehrter, V., Couloux, A., Jouet, D., & Depaquit, J. (2013). Characterization of two cryptic species, *Culicoides stigma* and *C. parroti* (Diptera: Ceratopogonidae), based on barcode regions and morphology. *Journal of Vector Ecology*, (December), 260–265.

Bakonyi, T., Erdélyi, K., Ursu, K., Cso, T., Lussy, H., Chvala, S., Nowotny, N. (2007). Emergence of Usutu Virus in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12), 3870–3874.

Banerjee, D., Kumar, V., Maity, A., Ghosh, B., Tyagi, K., Singha, D., Rath, S. (2015). Identification through DNA barcoding of Tabanidae (Diptera) vectors of surra disease in India. *Acta Tropica*, 150, 52–58.

- Barajas, Y., Suaza, J., Torres, C., Leon, G., Uribe-Soto, S., & Charles, P. (2013). Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 9.
- Barcaccia, G., Lucchin, M., & Cassandro, M. (2016). DNA barcoding as a molecular tool to track down mislabeling and food piracy. *Diversity*, 8(1).
- Batista, P. M., Andreotti, R., Almeida, P. S. De, Marques, A. C., Rodrigues, S. G., Chiang, J. O., & Fernando, P. (2013). Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46, 684–690.
- Batovska, J., Blacket, M., Brown, K., & Lynch, S. (2015). Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution*, 6(9), 11.
- Bello, F., & Becerra, V. (2017). Genetic variability and heterogeneity of Venezuelan equine encephalitis virus vector *Ochlerotatus* ... Genetic variability and heterogeneity of Venezuelan equine encephalitis virus vector *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera : Culicidae ) populations of t. *Genetics and Molecular Research*.
- Bello, F. J., Segura, N. A., Sciences, H., Biology, E., & Unit, G. (2014). Analysis of the genetic variability and structure of *Ochlerotatus taeniorhynchus* (Diptera : Culicidae ) populations from the Colombian Atlantic coast on the basis of random amplified polymorphic DNA markers. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 4110–4123.
- Berti, J., Guzmán, H., Estrada, Y., Pérez, E., Ramírez, R., Sánchez, V., Guerra, L. (2013). *Primer registro de Culex (Carrollia) anduzei Cerqueira & Lane, 1944 en Venezuela y*

*Culex (Melanoconion) durni* Dyar, 1918 en el estado Bolívar. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*.

Besansky, N. J., Severson, D. W., & Ferdig, M. T. (2003). DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: What you don't know can hurt you. *Trends in Parasitology*, 19(12), 545–546.

Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155.

Blagrove, M. S. C., Sherlock, K., Chapman, G. E., Impoinvil, D. E., McCall, P. J., Medlock, J. M., Weaver, S. (2016). Evaluation of the vector competence of a native UK mosquito *Ochlerotatus detritus* (*Aedes detritus*) for dengue, chikungunya and West Nile viruses. *Parasites & Vectors*, 9(1), 452.

Blitvich, B. J., Saiyasombat, R., Travassos, A., Tesh, R. B., Calisher, C. H., & Garcia-rejon, J. E. (2012). Orthobunyaviruses, a Common Cause of Infection of Livestock in the Yucatan Peninsula of Mexico. *American Journal Tropical of Medical and Hygiene*, 87(6), 1132–1139.

Borucki, M. (2010). Eastern equine encephalitis virus. *Lawrence Livermore National Laboratory*, 1–6.

Bourke, B. P., Oliveira, T. P., Suesdek, L., Bergo, E. S., Anice, M., & Sallum, M. (2013). A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera : Culicidae). *Parasites & Vectors*, 6, 1–16.

- Bueno-Marí, R. (2013). Estudio faunístico de los mosquitos (Díptera, Culicidae) de la comarca del Somontano de Barbastro y su posible relevancia en la difusión del paludismo. *Anales de Biología*, 35, 12.
- Campbell, N., & Reece, J. (2007). *Biología* (Editorial). Gestora de Derechos Autorales.
- Carrara, A., Coffey, L., Aguilar, P., Moncayo, A., Travassos, A., Nunes, M., Weaver, S. (2007). Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infection of Cotton Rats. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 8.
- Carrington, L. B., & Simmons, C. (2014). Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Frontiers in Immunology*, 5(June), 1–8.
- Carvalho, G. A. De, Alves, L. C., Maia, R. T., De, C. F. S., Antonio, R., & Aparecida, M. (2008). Vector competence of *Culex quinquefasciatus* Say , 1823 exposed to different densities of microfilariae of *Dirofilaria immitis* ( Leidy , 1856 ). *Revista Brasileira de Entomologia*, 658–662.
- Chan, A., Chiang, L.-P., Hapuarachchi, H., Tan, C.-H., Pang, S.-C., Lee, R., Lam-Phua, S.-G. (2014). DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasites & Vectors*, 7, 12.
- Chan, A., Chiang, L., Hapuarachchi, H. C., Tan, C., Pang, S., Lee, R., Ng, L. (2014). DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasite*, 7, 1–12.
- Chordá, F. (2014). Biología de mosquitos ( Díptera : Culicidae ) en enclaves representativos de la Comunidad Valenciana. Universidad de Valencia.

- Coffey, L. L., Failloux, A., & Weaver, S. C. (2014). Chikungunya Virus–Vector Interactions. *Viruses*, 4628–4663.
- Cohuet, A., Simard, F., Wondji, C. S., Antonio-nkondjio, C., Awono-ambene, P., & Fontenille, D. (2004). High Malaria Transmission Intensity Due to *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) in a Village of Savannah–Forest Transition Area in Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, 901–905.
- Collins, F. H., Mendez, M. a, Rasmussen, M. O., Mehaffey, P. C., Besansky, N. J., & Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(1), 37–41.
- Conn, J. E., Correa, M. M., Rosero, D. A., Jaramillo, L. M., & Gutie, L. A. (2012). Genetic Diversity of *Anopheles triannulatus* s. l. (Diptera : Culicidae) from Northwestern and Southeastern Colombia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(53), 910–920.
- Contreras-Gutiérrez, M., & Uribe, S. (2014). Arbovirus y virus específicos de insectos : flebotomíneos un caso de interés. *Boletín del museo entomológico francisco luis gallego*, pp. 11–24.
- Contreras-Gutiérrez, M., Vivero, R., & Uribe, S. (2013). DNA Barcode: una herramienta para la identificación de *Lutzomyia* spp. a partir de larvas. *Boletín del museo entomológico francisco luís gallego*, pp. 7–16.
- Contreras, M., Vivero, R., Bejarano, E., & Carrillo, L. (2012). Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en el área de influencia del río Amoyá en Chaparral,

Tolima. *Biomédica*.

- Cook, S., Diallo, M., Sall, A. A., Cooper, A., & Holmes, E. C. (2005). Mitochondrial Markers for Molecular Identification of Aedes Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Involved in Transmission of Arboviral Disease in West Africa. *Evolution Journal of Medical Entomology*, 42(1), 19–28.
- Córdova, O., Vargas, F., Hashiguchi, Y., Kato, H., & Gómez, E. (2011). Identification of Leishmania species in patients and phlebotomines in transmission areas in a region of Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(3), 446–53.
- Cortes-Castillo, D., & Rangel, O. (2011). Mangrove forests in a salinity gradient at Cispatá bay - Boca Tinajones, department of Córdoba-Colombia. *SciELO*, 33(1), 155–176.
- Cova-García, P., Sutil, E., & Rausseo, J. (1966). Mosquitos de Venezuela. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social.
- Cupp, E., Hassan, H., Oldland, W., Lilley, B., & Unnasch, T. (2007). West Nile Virus Infection in Mosquitoes in the Mid-South USA, 2002–2005. *Entomological Society of America*, 44(1), 9.
- Cywinska, A., Hannan, M. A., Kevan, P. G., Roughley, R. E., Iranpour, M., & Hunter, F. F. (2010). Evaluation of DNA barcoding and identification of new haplomorphs in Canadian deerflies and horseflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(4), 382–410.
- Cywinska, A., Hunter, F. F., & Hebert, P. D. N. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20(4), 413–424.
- Daravath, S., Madhavi Yadav, M., Chakrapani, P., & Reddy Naik, B. (2013). Molecular

Identification of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and Quantitative Analysis of COI gene in South-Indian species. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2(8), 8.

Delatte, H., Gimonneau, G., Triboire, A., & Fontenille, D. (2009). Influence of Temperature on Immature Development, Survival, Longevity, Fecundity, and Gonotrophic Cycles of *Aedes albopictus*, Vector of Chikungunya and Dengue in the Indian Ocean. *Journal of Medical Entomology*, 46(1), 9.

Depinay, J.-M. O., Mbogo, C. M., Killeen, G., Knols, B., Beier, J., Carlson, J., McKenzie, F. E. (2004). A simulation model of African *Anopheles* ecology and population dynamics for the analysis of malaria transmission. *Malaria Journal*, 3(1), 29.

Derraik, J. (2005). Mosquitoes breeding in container habitats in urban and peri-urban areas in the Auckland Region, New Zealand. *Entomotropica*, 20(2), 5.

Díaz-Nieto, L. M., Maciá, A., Parisi, G., Farina, J. L., Vidal-Domínguez, M. E., Perotti, A., & Berón, C. M. (2013). Distribution of Mosquitoes in the South East of Argentina and First Report on the Analysis Based on 18S rDNA and COI Sequences. *PLoS ONE*, 8(9), 1–10.

Estela, F., & López-Victoria, M. (2005). Aves de la parte baja del río sinú, caribe colombiano; inventario y ampliaciones de distribución. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, (896), 7–42.

Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D., & White, N. (2009). *Manson's Tropical Diseases*.

Ferreira, F., Rodrigues, R. A., Sato, Y., Borges, M. A. Z., & Braga, É. M. (2016). Searching for putative avian malaria vectors in a Seasonally Dry Tropical Forest in Brazil. *Parasites & Vectors*, 1–12.

- Ferro, C., Boshell, J., Moncayo, A., Gonzalez, M., Ahumada, M., Kang, W., & Weaver, S. (2003). Natural Enzootic Vectors of Venezuelan equine encephalitis virus, Magdalena Valley, Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), 6.
- Forattini, O. (2002). *Culicidología Médica*. (L. Gualberto, Ed.) (Edusp). Sao Paulo.
- Forrester, N., Coffey, L., & Weaver, S. (2014). Arboviral Bottlenecks and Challenges to Maintaining Diversity and Fitness during Mosquito Transmission. *Viruses*, 6, 14.
- Fritz, A. (2005). "Identificación de dípteros culícidos entre la i región y región metropolitana de chile, bajo el programa de vigilancia entomológica para *Aedes aegypti*, años 2000 – 2003." Universidad de Chile.
- Garcia, C., Escovar, J., Londoño, Y., & Moncada, L. (2010). Altitud y tablas de vida de poblaciones de *Culex quinquefasciatus* (Diptera Cucilidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 36(10), 62–67.
- García, M., García, M. ., Mellado, M. ., & Villota, J. (2010). *Patología infecciosa importada I: malaria*.
- Garcia, P. (2010). República de colombia departamento de cordoba municipio de puerto escondido esquema de ordenamiento territorial 2001-2010 "ordenando el territorio por un compromiso comun."
- Gardner, C. L., Ryman, K. D., & Genetics, M. (2015). Yellow Fever: A Reemerging Threat. *Clin Lab Med.*, 30(1), 237–260.
- Godfray, H. C. J. (2013). Mosquito ecology and control of malaria. *Journal of Animal Ecology*, 82, 15–25.

- Golding, N., Nunn, M. A., Medlock, J. M., Purse, B. V., Vaux, A. G. C., & Schäfer, S. M. (2012). West Nile virus vector *Culex modestus* established in southern England. *Parasites & Vectors*, 2–6.
- Goldstain, P., and DeSalle, R. (2010). Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. *BioEssays*, 33(2), 12.
- Gómez, G., Jaramillo, L., & Correa, M. M. (2013). Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the *Albitarsis* Complex from Colombia. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1082–1092.
- González, C., Jercic, M., Rada, V., Saldarriaga, M., Pavletic, C., & Parra, A. (2016). Manual de culícidos (diptera: culicidae) de la zona norte y centro de Chile, incluyendo isla de Pascua. (C. González, M. Jercic, V. Rada, M. Saldarriaga, C. Pavletic, & A. Parra, Eds.) (Second). Chile.
- Gould, E. A., Higgs, S., Buckley, A., & Gritsun, T. S. (2006). Potential Arbovirus Emergence and Implications for the United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4).
- Gubler, D. J. (2001). Human Arbovirus Infections Worldwide. *ANNALS*, 13–24.
- Gunay, F., Alten, B., Simsek, F., Aldemir, A., & Linton, Y. (2015). Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors. *Acta Tropica*, 143, 112–120.
- Gunning, K.M., McIntyre, E., Brown, C., Chansky, K., Bourey, J., Johnson, B., Wheaton, A., Wike, C. 2002. ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer: Further advances to expand productivity. Applied Biosystems Document #105549. Accessed August 1, 2006.

- Gutiérrez, C., Thébaud, G., Smith, D., & Weaver, S. (2015). Demographics of Natural Oral Infection of Mosquitos by Venezuelan Equine Encephalitis Virus. *Journal of Virology*, 89(7), 3.
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, 8(12), S7–S16.
- Harbach, R. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*, 23, 48.
- Harbach, R. (2008). Culicidae Meigen, 1818.
- Harbach, R. E., Kitching, I. J., Culverwell, C. L., Dubois, J., & Linton, Y. M. (2012). Phylogeny of mosquitoes of tribe culicini (Diptera: Culicidae) based on morphological diversity. *Zoologica Scripta*, 41(5), 499–514.
- Harvey, M. L., Dadour, I. R and Gaudieri S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Science International*. 131, 134-139.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & Jeremy, R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society*, (January), 313–321.
- Hebert, P. D. N., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852–859.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10).

- Helmersson, E. (2013). Molecular identification of mosquito species Evaluation of a rapid DNA extraction method together with DNA barcoding as a tool for identification of species. Uppsala University.
- Holmes, E. (2004). Los virus emergentes. *Evolucionismo*.
- Hoyos-López, R., Roman, S., Castaño, J. C., & Gallego-Gómez, J. C. (2015a). Código de barras para la tipificación de culícidos inmaduros de Armenia y Circasia ( Quindío , Colombia ). *Revista Colombiana de Entomología*, 41(62), 218–227.
- Hoyos-López, R., Soto, S. U., Rúa-uribe, G., & Gallego-gómez, J. C. (2015b). Molecular identification of Saint Louis Encephalitis virus genotype IV in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110, 719–725.
- Hoyos-López, R., Suaza-Vasco, J., Rúa-Uribe, G., Uribe, S., & Gallego-Gómez, J. C. (2016). Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from coastal ecosystems in the Colombian Caribbean. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*.
- Hoyos, R., Vivero, R., Contreras, M., & Sandra, U. (2013). Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en un área rural de Santa Fe de Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*.
- Jawara, M., Smallegange, R. C., Jeffries, D., Nwakanma, D. C., Awolola, T. S., Knols, B. G. J., Conway, D. J. (2009). Optimizing odor-baited trap methods for collecting mosquitoes during the malaria season in the gambia. *PLoS ONE*, 4(12), 2–7.
- Jiménez, P., Conn, J. E., Wirtz, R., & Brochero, H. (2012). Anopheles (Diptera : Culicidae)

vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia. *Biomédica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 32, 13–21.

Jinbo, U., Kato, T., & Ito, M. (2011). Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science*, 14(2), 107–124.

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 990–994.

Jose, J., Snyder, J., & Kuhn, R. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol*, 4, 30.

Keesing, F., Belden, L. K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C. D., Holt, R. D., Ostfeld, R. S. (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468(7324), 647–652.

Kenney, J., Adams, P., Gorchakov, R., Leal, G., & Weaver, S. (2012). Genetic and Anatomic Determinants of Enzootic Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infection of *Culex (Melanoconion) taeniopus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4), 12.

Kent, R. J., Crabtree, M. B., & Miller, B. R. (2010). Transmission of West Nile Virus by *Culex quinquefasciatus* Say Infected with *Culex Flavivirus Izabal*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(5).

Kimura, M. (1980). Journal of Molecular Evolution A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol*, 16(1330), 111–120.

- Kobayashi, M., Nihei, N., & Kurihara, T. (2002). Analysis of Northern Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by Geographical Information System. *Journal of Medical Entomology*, 39(1), 8.
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS ONE*, 2(6).
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 30(1), 25–35.
- Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., & Jambulingam, P. (2007a). DNA Barcodes Can Distinguish Species of Indian Mosquitoes ( Diptera : Culicidae ). *Journal of Medical Entomology*, 44(1), 1–7.
- Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., & Jambulingam, P. (2007b). DNA Barcodes Can Distinguish Species of Indian Mosquitoes ( Diptera : Culicidae ), 1–7.
- Kumar, N. P., Srinivasan, R., & Jambulingam, P. (2012). DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 414–420.
- L'Ambert, G., Ferré, J. B., Schaffner, F., & Fontenille, D. (2012). Comparison of different trapping methods for surveillance of mosquito vectors of West Nile virus in Rhône Delta, France. *Journal of Vector Ecology*, 37(2), 269–275.
- Lane, J. (1953). *Neotropical Culicidae*. University of São Paulo.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., Mcwilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2 . 0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–

2948.

- Laurito, M., Oliveira, T. M. P. de, Almirón, W. R. Icardo, & Sallum, M. A. Nice M. (2013). COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *108*, 110–122.
- Liang, G., Gao, X., & Gould, E. A. (2015). Factors responsible for the emergence of arboviruses ; strategies , challenges and limitations for their control. *Emerging Microbes and Infections*, (February), 1–5.
- Licitra, B., Chambers, E. W., Kelly, R., & Burkot, T. R. (2010). Detection of *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) by Polymerase Chain Reaction in *Aedes albopictus*, *Anopheles punctipennis*, and *Anopheles crucians* (Diptera: Culicidae) From Georgia, USA. *Journal of Medical Entomology*, *47*(4), 634–638.
- Lima, C. A., Almeida, W. R., Hurd, H., & Albuquerque, C. (2003). Reproductive Aspects of the Mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) Infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *98*, 217–222.
- Liria, J., & Navarro, J. (2010). Modelo de nicho ecológico en *Haemagogus Williston* (Diptera: Culicidae), vectores del virus de la fiebre amarilla. *Biomedica*, *21*(3), 149–161.
- López, R. H., Soto, S. U., & Gallego-gómez, J. C. (2015). Evolutionary relationships of West Nile virus detected in mosquitoes from a migratory bird zone of Colombian Caribbean. *Virology Journal*, 1–6.
- Magalhaes, T., Oliveira, I. F., Melo-santos, M. A. V, Oliveira, C. M. F., Lima, C. A., & Ayres,

- C. F. J. (2008). Expression of defensin, cecropin, and transferrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae), and the abnormal development of nematodes in the mosquito. *Experimental Parasitology*, 120(4), 364–371.
- Mandal, S., Chhakchhuak, L., Gurusubramanian, G. & Senthil, N. (2014). Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects. *De Gruyter Open*. 2: 1-9.
- Marín, R., Marquetti, M., Álvarez, Y., Gutiérrez, J., & González, R. (2009). Especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) y sus sitios de cría en la Región Huetar Atlántica, Costa Rica. *Biomed*, 20, 9.
- Marquetti-Fernández, M., Saint-Jean, Y., Fuster-Callaba, C., GonzálezBroche, R., & Leyva, M. (2013). Contribución al conocimiento de la distribución y aspectos biológicos de algunas especies de mosquitos en Haití. *Anales de Biología*, 35, 9.
- Martínez, E. (2008). Dengue. *Estudios avanzados*, 22(64), 20.
- Mattar, S., & González, M. (2015). Now is the time for the Zika virus. *Rev.MVZ Córdoba*.
- May-Uc, E., Hernández, H., & Rebollar, E. (2011). Distribución de flebotominos (diptera: psychodidae) en quintana roo, México. *Acta Zoológica Mexicana*.
- McJunkin, J., De los Reyes, E., Irazuzta, J., Caceres, M., Khan, R., Minnuch, L., Thompson, A. (2001). LA CROSSE ENCEPHALITIS IN CHILDREN. *New England Journal of Medicine*, 344(11), 7.
- Medlock, J., Hansford, K., Schaffner, F., Versteir, V., Hendrickx, G., Zeller, H., & Van Bortel, W. (2012). A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks,

and Control Options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(6), 13.

Meiklejohn, K. A., Wallman, J. F., & Dowton, M. (2013). DNA Barcoding Identifies all Immature Life Stages of a Forensically Important Flesh Fly (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Forensic Sciences*, 58(1), 184–187.

Mekuria, Y., Granados, R., Tidwell, M., Williams, D., Wirts, R., & Roberts, R. (1991). Malaria transmission potential by anopheles mosquitoes of dajabon, dominican republic. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7.

Mendenhall, I. H., Tello, S. A., Neira, L. A., Castillo, L. F., & Ocampo, C. B. (2012). Host Preference of the Arbovirus Vector *Culex erraticus* (Diptera : Culicidae) at Sonso Lake , Cauca Valley Department , Colombia. *Journal of Medical Entomology*, (1996), 1092–1102.

Méndez-López, R., Castillo-Martínez, A., Garza-Hernandez, J., Gonzalez-Alvarez, V., Sanchez-Ramos, F., & Ortega-Morales, A. (2016). Primer registro de *Culex panocossa* Dyar, 1923 (DIPTERA: CULICIDAE) en tabasco, México. *Entomología Mexicana*, 3, 4.

Moreno, M., Bickersmith, S., Harlow, W., Hildebrandt, J., Mckee, S. N., Silva-do-nascimento, T. F., ... Conn, J. E. (2013). Phylogeography of the neotropical *Anopheles triannulatus* complex (Diptera : Culicidae) supports deep structure and complex patterns. *Parasites & Vectors*, 1–17.

Moulis, R., Peaty, L., Heusel, J., Lewandowski, H., Harrison, B., Kelly, R., & Hager, E. (2015). *Mansonia titillans*: New Resident Species or Infrequent Visitor in Chatham County, Georgia, and Beaufort County, South Carolina, USA. *Journal of the American Mosquito Control Association*.

- Muñoz, M., & Navarro, J. C. (2012). Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica*, 32(2), 288–302.
- Murugan, K., Vadivalagan, C., Karthika, P., Panneerselvam, C., Paulpandi, M., Subramaniam, J., Benelli, G. (2016). DNA barcoding and molecular evolution of mosquito vectors of medical and veterinary importance. *Parasitology Research*, 115(1), 107–121.
- Nunes, M., Chiang, J., de Lima, C., Martins, L., Aragão, A., Cardoso, J., Vasconcelos, P. (2014). New Genome Sequences of Gamboa Viruses ( Family Bunyaviridae , Genus Orthobunyavirus ) Isolated in Panama and Argentina. *Genome Announcements*, 2(6), 2–3.
- Ondrejicka, D. A., Locke, S. A., Morey, K., Borisenko, A. V, & Hanner, R. H. (2014). Status and prospects of DNA barcoding in medically important parasites and vectors. *Trends in Parasitology*, 1–10.
- Padilla, J., & Montoya, R. (2011). Guía de Atención Clínica de Malaria. *Asociación Colombiana de Infectología*, 15(4), 22.
- Pagotto, D., Ceretti-junior, W., Obara, M. T., & Marrelli, M. T. (2013). Mitochondrial PCR-RFLP Assay to Distinguish *Triatoma brasiliensis macromelasoma* from *Triatoma brasiliensis brasiliensis* Subspecies ( Hemiptera : Reduviidae ). *Journal of Tropical Medicine*, 1–8.
- Paily, K., Hoti, S., & Das, P. (2009). A review of the complexity of biology of lymphatic filarial parasites. *J Parasit Dis*, (Clark 1994).
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., & Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, 11, 9.

- Perng, G., & Chen, W. (2013). Arboviral Encephalitis. In *World's largest Science, Technology & Medicine* (p. 23).
- Petersen, V., Devicari, M., & Suesdek, L. (2015). High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. *Parasites & Vectors*, 1–9.
- Pina-Costa, A. De, Brasil, P., Maria, S., Santi, D., Araujo, M. P. De, Suárez-mutis, M. C., Daniel-Ribeiro, C. T. (2014). Malaria in Brazil : what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109, 618–633.
- Pinto, I. D. S., Dias, B., Alencastre, A., Rodrigues, F., Ferreira, A. L., Rezende, H. R., Peixoto, A. A. (2015). DNA Barcoding of Neotropical Sand Flies Species Identification and Discovery within. *PLoS One*, 1–18.
- Posada, D., & Posada, D. (2008). jModelTest : Phylogenetic Model Averaging jModelTest : Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*.
- Pujol, F. (2000). Virus emergentes y reemergentes.
- Quiroz, E., Aguilar, P., Cisneros, J., Tesh, R., & Weaver, S. (2009). Venezuelan Equine Encephalitis in Panama: Fatal Endemic Disease and Genetic Diversity of Etiologic Viral Strains. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(6), 7.
- Racero, J., Ballesteros, J., & Perez, J. (2015). Mamíferos del departamento de Córdoba-Colombia: historia y estado de conservación. *Biota Colombiana*, 16.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. (2007). BARCODING BOLD : The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, 355–364.

- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2013). A DNA-Based Registry for All Animal Species : The Barcode Index Number ( BIN ) System. *PLoS ONE*, 8(8).
- Reinert, J. F., Kaiser, P. E., & Seawright, J. A. (1997). Analysis of the Anopheles (Anopheles) quadrimaculatus Complex of Sibling Species (Diptera : Culicidae) Using Morphological , Cytological , Molecular , Genetic , Biochemical , and Ecological Techniques in an Integrated Approach. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13, 1–102.
- Richard Hoyos, L., Sandra Uribe, S., & Vélez, I. (2012). Tipificación de especímenes colombianos de lutzomyia longipalpis (diptera: Psychodidae) mediante “código de barras.” *Revista Colombiana de Entomología*, 38(1), 134–140.
- Rivera, J., & Currie, D. C. (2009). Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 224–236.
- Roe, A. D. & Sperling, F. A. H. (2007). Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA Barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44. 325-345.
- Rojas-Giraldo, X., & Sierra-Correa, P. C. (2010). *Plan Integral de Manejo DMI Cispatá - La Balsa - Tinajones y sectores aledaños.*
- Rojas-Mogollon, M., Hernandez-Neuta, G., Moncada-Alvarez, L., Quiñonez, M., & Renteria-Ledezma, L. (2013). Actividad de picadura de Culex quinquefasciatus. *Rev. Fac. Med.*, 61(3), 261–266.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3 : Bayesian phylogenetic inference under

mixed models. *Bioinformatic Applications Note*, 19(12), 1572–1574.

Rozo-Lopez, P., & Mengual, X. (2015). Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: Identification through DNA barcoding and adult morphology. *ZooKeys*, 2015(513), 39–64.

Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R. C., Ponsonby, D. J., Herrera, M., Anice, M., Sallum, M., Alarcon, J. (2013). Systematics of the Oswaldoi Complex ( Anopheles , Nyssorhynchus ) in South America. *Parasites & Vectors*, 6, 1–13.

Ruiz, F., Linton, Y.-M., Ponsonby, D., Conn, J., Herrera, M., Quiñonez, M., Wilkerson, R. (2010). Molecular comparison of topotypic specimens confirms Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(7), 5.

San, D., Gower, D. J., Zardoya, R. & Wilkinson M. (2006). A hotspot of gene order rearrangement by tandem duplication and random loss in the vertebrate mitochondrial genome. *Molecular Biology and Evolution*. 23(1), 227-234.

Sarkar, I. N., & Trizna, M. (2011). The barcode of life data portal: Bridging the biodiversity informatics divide for DNA barcoding. *PLoS ONE*, 6(7).

Sinka, M. E., Rubio-palis, Y., Manguin, S., Patil, A. P., Temperley, W. H., Gething, P. W., Hay, S. I. (2010). The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas : occurrence data , distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors*, 1–26.

Smith, D., Adams, P., Kennedy, J., Wang, E., & Weaver, S. (2007). Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector Aedes taeniorhynchus: Infection initiated by a

small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck. *Virology*, 372, 11.

Smith, D., Arrigo, N., Leal, G., Muehlberger, L., & Weaver, S. (2007). Infection and Dissemination of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in the Epidemic Mosquito Vector, *Aedes taeniorhynchus*. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(1), 12.

Smith, M. A., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., Deans, A. R., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. N. (2008). Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12359–12364.

Solano, J. J., Wolff, M., & Castro, L. (2013). Identificación molecular de califóridos (Diptera : Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(22), 281–290.

Stanaway, J. D., Shepard, D. S., Undurraga, E. a., Halasa, Y. a., Coffeng, L. E., Brady, O. J., Murray, C. J. L. (2016). The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 1–12.

Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiological*, 58(3), 491–562.

Styer, L., Kent, K., Albright, R., Bennett, C., Kramer, L., & Bernard, K. (2007). Mosquitoes Inoculate High Doses of West Nile Virus as They Probe and Feed on Live Hosts. *PLoS Pathogens*, 3(9), 9.

Taira, K., Toma, T., Tamashiro, M., & Miyagi, I. (2012). DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago, Japan. *Medical Entomology*

*and Zoology*, 63(4), 289–306.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipitski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Tantely, M., Goff, G., Boyer, S., & Fontenille, D. (2016). An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar. *Parasite*, 23(20), 42.
- Tejada, A., Cáceres, A., Miranda, J., Palacios, O., & Zorrilla, V. (2003). Vectores de la leishmaniasis tegumentaria en el valle del Rímac, 218–222.
- The Center for Food Security & Public Health, & Intitute for International Cooperation in Animal Biologics. (2015). *Eastern, Western and Venezuelan Equine Encephalomyelitis*.
- ThermoScientific. (2011). NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. Protocols and Product Manuals.
- Torres, M., Rojas, H., Zesati, G., Bravo, L., & Alatorre, L. (2015). Modelo biogeográfico de los mosquitos *Culex* spp. (Diptera: Culicidae) en México. *Boletín Geográfico*, 37, 16.
- Tubaki R. M., Menezes R. M., Cardoso R. and Bergo E. S. (2004). Studies on entomological monitoring: Mosquito species frequency in Riverine habitats of the igarapava dam, Southern region, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 46 (4): 223-229.
- Vadivalagan, C., Karthika, P., Murugan, K., Wei, H., Aziz, A. T., Alsalhi, M. S., & Devanesan,

- S. (2015). Genetic deviation in geographically close populations of the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): influence of environmental barriers in South India. *Parasitol Res*, 1–12.
- Vargas, D., Jaime, J., & Vera, V. (2009). Aspectos generales del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV). *Orinoquia*, 13(1), 9.
- Versteirt, V., Nagy, Z. T., Roelants, P., Denis, L., Breman, F. C., Damiens, D., Van Bortel, W. (2015). Identification of Belgian mosquito species (Diptera: Culicidae) by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), 449–457.
- Vezzani, D., Mesplet, M., & Eiras, D. F. (2011). PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. *Parasitol Res*, 108, 985–989.
- Vorou, R. (2016). Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *International Journal of Infectious Diseases*, 48, 85–90.
- Wang, G., Li, C., Guo, X., Dong, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Zhao, T. (2012). Identifying the Main Mosquito Species in China Based on DNA Barcoding. *PLoS ONE*, 7(10), 11.
- Weaver, S., & Reisen, W. (2010). Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Res.*, 85(2), 36.
- Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-bauder, B., & Nowotny, N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 652–656.

Williams, M., & Savage, H. (2009). Identification of *Culex* (Melanoconion) Species of the United States Using Female Cibarial Armature (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 46(4), 8.

Williams, M., & Savage, H. (2011). Development of Multiplexed Species Specific Polymerase Chain Reaction Assays for Identification of the *Culex* (Melanoconion) Species (Diptera: Culicidae) of the Southeastern United States Based on rDNA. *Journal of Medical Entomology*, 48(5), 6.

Wolf, M. (2006). *Insectos de Colombia*. (M. Wolf, O. Gallo, J. Cardona, & R. Callejas, Eds.) (First).

Xia, X. (2002). Data analysis in molecular biology and evolution.

Zamora-Delgado, J., Carlos Castano, J., & Hoyos-Lopez, R. (2015). DNA barcode sequences used to identify *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in La Tebaida (Quindio, Colombia). *Revista Colombiana de Entomologia*, 41, 212–217.