

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

“Variación genética de *Nyssomyia trapedoi* (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador”

María Gabriela Vela Chauvín

Sonia Zapata, Ph. D., Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos biotecnológicos

Quito, mayo de 2014

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales
HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

“Variación genética de *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador”

María Gabriela Vela Chauvín

Sonia Zapata Mena, Ph.D.

Directora de Tesis

María de Lourdes Torres Proaño, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Gabriel Trueba Piedrahita, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre., Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, mayo de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: María Gabriela Vela Chauvín

C. I.: 1716073521

Fecha: Mayo de 2014

DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo y ayuda incondicional en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por ser mi guía y soporte a lo largo de toda mi vida. Siempre me han dado las fuerzas para salir adelante y superar cualquier obstáculo.

A mis profesores por los conocimientos impartidos, el apoyo y la infaltable motivación.

Agradezco especialmente a Sonia Zapata que más que mi directora de tesis llegó a ser mi amiga y alguien muy importante para mí.

RESUMEN

La leishmaniasis es considerada una enfermedad emergente a nivel mundial. En el Ecuador está presente en 22 de las 24 provincias del país, y se conoce que el principal vector de leishmaniasis cutánea es *Nyssomyia trapidoi*. En este estudio se realizaron colectas entomológicas entre febrero y abril del 2013 en 3 provincias del Ecuador (Bolívar, Esmeraldas y Manabí). Se colectaron 1506 flebótomos de los cuales 46,8% fueron machos y 53,2% hembras. En total se identificó 14 especies de flebótomos de las cuales, *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Lutzomyia hartmanni* y *Nyssomyia trapidoi* fueron las más abundantes. *Ny. trapidoi* se encontró en 6 de los 7 sitios de colección. La provincia con mayor diversidad de flebótomos fue Manabí. Se realizó un análisis de las secuencias de los genes mitocondriales citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y citocromo B (CytB), para 45 especímenes de *Ny. trapidoi*. Este análisis mostró una estratificación que separó a los individuos en 4 grupos principales, tres de ellos conformados por especímenes procedentes de dos cantones de la provincia de Bolívar, mientras que el último incluye especímenes de todas las provincias en estudio. Estos resultados pueden sugerir que *Ny. trapidoi* está experimentando un proceso de especiación, tanto simpátrica (poblaciones distintas en Bolívar) como alopátrica (poblaciones de Manabí o Esmeraldas distintas a Bolívar). Finalmente, se encontró que el 12,2% de hembras de *Ny. trapidoi* estuvieron infectadas con ADN de *Endotrypanum monterogeii*, un parásito perteneciente a la familia Trypanosomatidae, el cual está muy cercanamente emparentado con *Leishmania*. Este hallazgo permite pensar que en los lugares colectados *Ny. trapidoi* probablemente no es el vector principal de leishmaniasis.

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered an emerging disease worldwide. In Ecuador it has been reported in 22 of the 24 country's provinces. The sandfly species, *Ny. trapidoi*, is the main vector of this disease. In the present study entomological collections were carried out between February and April 2013 in 3 provinces of Ecuador (Bolívar, Esmeraldas y Manabí). From this collections there were found 1506 sand flies specimens, from which 46,8% were males and 53,2% were females. It was possible to identified 14 species of sand flies, from which *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Lutzomyia hartmanni* and *Nyssomyia trapidoi* were the most abundant. *Ny. trapidoi* was found in 6 out of the 7 places of collection. The province with more sand fly diversity was Manabí. A nucleotide analysis of the mitochondrial genes, cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome B (CytB) was performed for 45 specimens of *Ny. trapidoi*. From this analysis the samples were grouped in four clusters; three of them consisted of individuals from the province of Bolivar, and the fourth one grouped specimens from the three studied provinces. This results could suggest that *Ny. trapidoi* is going through sympatric speciation (different populations in Bolivar) and allopatric speciation (between populations in Bolivar and the other provinces). Finally, it was found that 12,2% of the female samples analyzed were infected with *Endotrypanum monterogeei*, a parasite from the Trypanosomatidae family that is closely related to *Leishmania*. This finding may suggest that, in the places of collection the principal vector of leishmaniasis is probably a another specie of sandfly.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	13
1.1. Leishmaniasis.....	13
1.2. El parásito	14
1.3. El vector	16
1.3.1. Biología y ciclo de vida.....	17
1.3.2. Capacidad Vectorial	19
1.3.3. Vectores de leishmaniasis cutánea en el Ecuador	20
1.4. Variación genética de Flebótomos.....	21
2. Justificación	23
3. Área de Estudio.....	24
4. Objetivos	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. Materiales	25
5.1. Colección y separación de especímenes	25
5.2. Identificación de especímenes	26
5.3. Extracción de ADN.....	26
5.4. Amplificación de ADN	27
5.5. Electroforesis en gel de agarosa.....	27
5.6. Secuenciamiento	28
5.7. Análisis filogenético	28
6. Métodos	28
6.1. Colección Entomológica.....	28
6.1.1. Colección de los especímenes	28
6.1.2. Separación de muestras	29
6.1.3. Montaje en placa	29
6.1.4. Identificación de especies.....	29
6.2. Análisis Molecular	30
6.2.1. Extracción de ADN	30
6.2.2. Amplificación de ADN mitocondrial citocromo B.....	31
6.2.3. Amplificación de ADN mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1	31

6.2.4. Amplificación de ADN de una región conservada de los minicírculos del kinetoplasto de Tripanosomatidae.....	31
6.2.5. Amplificación de una región de ARN ribosomal de la subunidad pequeña (SSU-rRNA) de Tripanosomatidae	32
6.2.6. Electroforesis en gel de Agarosa.....	32
6.2.7. Secuenciamiento.....	33
6.2.8. Análisis molecular.....	33
7. Resultados	34
7.1. Colección entomológica	34
7.2. Análisis molecular	34
7.2.1. Análisis de genes mitocondriales	34
7.2.2. Detección de ADN de Kinetoplasto de Tripanosomatidae	36
8. Discusión	36
9. Conclusiones	51
10. Recomendaciones.....	52
11. Referencias bibliográficas.....	54
12. Tablas.....	66
13. Figuras.....	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reservorios naturales de <i>Leishmania</i> (Nieves & Pimenta, 2002)	66
Tabla 2. Clasificación de flebótomos según Young y Duncan (1994)	67
Tabla 3. Clasificación de los flebótomos en América propuesta por Galati (2010).....	68
Tabla 4. Datos obtenidos del Ministerio de Salud del Ecuador (2013) sobre incidencia de Leishmaniasis en las distintas provincias del país en los años 2001-2012.....	69
Tabla 5. Ubicación geográfica de los sitios de colección de flebótomos en la presente investigación.....	70
Tabla 6. Reacción de PCR para el segmento del gen mitocondrial CytB	71
Tabla 7. Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación del segmento gen mitocondrial CytB	71
Tabla 8. Reacción de PCR para el segmento del gen mitocondrial COI.....	71
Tabla 9. Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación del segmento gen mitocondrial COI.....	72
Tabla 10. Reacción de PCR para una región conservada de los minicírculos del Kinetoplasto de Tripanosomatidae.....	72
Tabla 11. Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación de una región conservada de los minicírculos del kinetoplasto de Tripanosomatidae	72
Tabla 12. Reacción de PCR para una región de ARN Ribosomal de la subunidad Pequeña (SSU-rRNA) De Tripanosomatidae.....	73
Tabla 13. Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación de una región de ARN Ribosomal de la subunidad pequeña (SSU-rRNA) De Tripanosomatidae .	73
Tabla 14. Flebótomos recolectados mediante trampas de luz tipo CDC en tres provincias del Ecuador.....	73
Tabla 15. Especies de flebótomos identificadas de acuerdo con la clasificación de Galati (2012)	74
Tabla 16. Índices de polimorfismo dentro de la población de <i>Ny. trapidoi</i> , analizados en base a los dos genes mitocondriales (CytB y COI)	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> (CDC, 2013).....	75
Figura 2. Morfología externa de flebótomos adultos (Contreras, 2013)	75
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Nyssomyia trapidoi</i> en Sur América. (Young & Duncan, 1994)	76
Figura 4. Mapa del Ecuador con los sitios de colección (Noticias del Ecuador, 2012).	77
Figura 5. Características morfológicas de <i>Ny. trapidoi</i> para su identificación taxonómica (Young y Duncan, 1994)	78
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del gen CytB.....	79
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del gen COI.	79
Figura 8. Variabilidad nucleotídica encontrada en las secuencias de ADN alineadas.....	80
Figura 9. Árboles filogenéticos obtenidos por un análisis nucleotídico con el método Maximum Likelihood.	81
Figura 10. Árboles filogenéticos obtenidos por un análisis nucleotídico con el método Neighbor Joining.	82
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de una región conservada de los Minicírculos del Kinetoplasto de Tripanosomatidae.	83
Figura 12. Árbol filogenético para una región conservada (120pb) de los minicírculos del Kinetoplasto de Tripanosomatidae obtenido por un análisis nucleotídico con el método Neighbor Joining.	83

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por la picadura de dípteros hematófagos de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* (Vasquez, 2011). En el viejo mundo los vectores pertenecen a los géneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia*, mientras que en el nuevo mundo pertenecen al género *Lutzomyia* (Claborn, 2010). Existen tres tipos principales de leishmaniasis que son: cutánea, mucocutánea y visceral, las cuales son consideradas enfermedades zoonóticas y enzoóticas causadas por protozoarios flagelados pertenecientes al género *Leishmania* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae) (Vasquez, 2011).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la leishmaniasis es una enfermedad re emergente, no controlada y en expansión puesto que está presente en 98 países, afectando a un tercio de la población mundial. La incidencia global de esta enfermedad ha aumentado en los últimos años; por lo que ha sido clasificada por la OMS, como una enfermedad de nivel 1 de importancia (Restrepo, et al., 2011). Actualmente se conocen 15 especies de *Leishmania* que son patógenas para el ser humano y un total de 54 especies de posibles vectores (OMS, 2011).

En Ecuador la leishmaniasis fue reportada por primera vez en 1920 y se creía que era endémica de la Costa. Actualmente se conoce que la leishmaniasis tegumentaria se presenta como leishmaniasis cutánea, mucocutánea, cutánea recidiva y cutánea difusa. Está presente en 22 de las 24 provincias del país (Zapata, et al., 2012). Por último, no hay ningún reporte de la forma visceral de la enfermedad a pesar de que esta última si se ha encontrado en países vecinos como Colombia (Calvopiña, 2010).

De acuerdo a la OMS (2011), se reportan 60 000 casos por año de la Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en América. En el Ecuador, los datos del ministerio de Salud Pública, indican que la enfermedad tuvo una incidencia de aproximadamente 1512 casos durante el 2012. Cabe mencionar que anualmente hay casos de leishmaniasis asintomáticos o no reportados que no forman parte de la incidencia mencionada. Esto reduce la eficiencia en el control de la enfermedad, que constituye un problema de salud pública (Restrepo, et al., 2011).

La leishmaniasis está distribuida alrededor del mundo en las áreas templadas tropicales y subtropicales. En los seres humanos, clínicamente se manifiesta desde nódulos o úlceras en el sitio de la picadura del vector que cicatrizan espontáneamente; hasta complicaciones como desconfiguración del tejido e invasión de órganos (Calvopiña, 2010).

Existen tres tipos principales de leishmaniasis:

Cutánea: es causada por *Leishmania (Leishmania) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) peruviana* (Kato, et al., 2010). Se caracteriza por úlceras y nódulos en la piel en el sitio donde se dio la picadura del vector (Zapata, et al., 2012). Este tipo de leishmaniasis a su vez puede dividirse en:

- Leishmaniasis recidiva cutis (LRC): se caracteriza por formar nódulos dentro o alrededor de la cicatriz luego de un largo periodo de tiempo de (Kato, et al., 2010).
- Leishmaniasis cutánea difusa (DCL): produce nódulos no ulcerativos en todo el cuerpo que se asemejan a las lesiones de la piel causadas en la lepra (Kato, et al., 2010).

Mucocutánea: es causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, y ataca a las mucosas. Se inicia con una lesión y posteriormente produce deformaciones por la destrucción tisular. Normalmente va acompañada de una infección bacteriana que necrosa el tejido (Gómez, et al., 2012).

Visceral o Kala azar: es causada principalmente por *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*. En este caso el parásito se multiplica en los fagocitos mononucleares y causa inflamación del hígado y el bazo, lo que a su vez genera otros síntomas que si no son tratados pueden causar pérdida de peso, anemia, desnutrición e incluso la muerte (Berman, 1997).

1.2. EL PARÁSITO

La leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania* perteneciente a la familia Trypanosomatidae. Este género se divide en dos subgéneros: el primero es *Leishmania* que incluye a las especies que se desarrollan en el intestino anterior y medio del vector, y el segundo es *Viannia* que se desarrolla en el intestino posterior y medio (Lainson & Shaw, 1987).

Presenta un ciclo de vida que incluye dos estados por lo que necesita de dos hospederos, uno invertebrado (flebotomo) y un vertebrado (mamífero). Cuando se encuentra en el vector está como promastigote extracelular móvil; mientras que en el hospedador mamífero está como amastigote intracelular inmóvil (Figura 1). La transformación de un estado a otro se da por cambios en la temperatura y el pH (Kato, et al., 2010).

Luego de la picadura del vector los neutrófilos son los primeros en ser reclutados a los sitios donde hubo daño del tejido. Por esta razón son los que fagocitan la mayor cantidad de parásitos y juegan un papel crucial en el establecimiento de la infección (Kato, et al., 2010). Sin embargo, el blanco principal del parásito en los hospederos mamíferos son los macrófagos. Estos se pueden infectar de tres maneras: por infección directa, por fagocitosis de los neutrófilos infectados y por infección silenciosa de los parásitos liberados tras la muerte apoptótica de los neutrófilos (Kato, et al., 2010). *Leishmania*, cuando está dentro del hospedador humano, empieza a reproducirse por mitosis y eso es lo que causa lisis celular y daño en los tejidos (Azpura, et al., 2010).

Hay varios hospederos vertebrados de *Leishmania*. Algunos son naturales mientras que otros como el humano son accidentales. En 1978, Lainson y Shaw y posteriormente Nieves y Pimenta (2002) determinaron que los hospederos naturales de este parásito son roedores, marsupiales, osos perezosos, cánidos y primates no humanos. Algunas de las especies más comunes se presentan en la Tabla 1.

Se han reportado varias especies de *Leishmania* alrededor del mundo. La identificación adecuada de éstas es importante para el tratamiento y diagnóstico de pacientes, además que permite predecir el riesgo y posible expansión de la enfermedad en zonas endémicas de leishmaniasis (Kato, et al., 2005). *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) tropica* producen leishmaniasis cutánea, que en este estudio son de gran interés ya que son las principales causantes de la enfermedad en el país. Otras especies de importancia médica son *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* que ocasionan leishmaniasis mucocutánea y cutánea. Por último la leishmaniasis visceral que no ha sido reportada en el Ecuador y es ocasionada principalmente por *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum* (Bañuls, et al., 1999; Killick-Kendrick, 1990).

1.3. EL VECTOR

La subfamilia Phlebotominae que incluye a *Phlebotomus* y *Lutzomyia* son de importancia médica porque son vectores de parásitos como *Leishmania*; de bacterias como *Bartonella bacilliformis* (Calzada, et al., 2013) y de virus como el virus de la estomatitis vesicular (VEV), miembro del género Vesiculorivus de la familia Rhabdoviridae (CFSPH y IICAB , 2010).

Existen varias propuestas sobre la taxonomía de los flebótomos, y de éstas tres han sido las más aceptadas. La primera la propuso Artemiev en 1991, la cual se basó en las semejanzas morfológicas y la distribución geográfica. Él dividió la familia Phlebotominae en dos tribus Idiophlebotomini y Phlebotomini, luego en 7 subtribus, 24 géneros, 40 subgéneros y 70 grupos de especies. Posteriormente en 1994, Young y Duncan adoptaron la clasificación de Lewis et al. (1977) que divide en cinco géneros: *Warileya*, *Brumptomyia*, *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Lutzomyia*. De los cuales, el último es el único de importancia médica en América. Está subdividido en 15 sub géneros y 400 especies, 11 grupos de especies y algunas especies no agrupadas (Tabla 2). Por último en 1995, Galati propuso una tercera clasificación en la que considera 88 caracteres morfológicos y clasifica a la subfamilia Phlebotominae en dos tribus Hertigiini y Phlebotomini. La tribu Phlebotomini tiene distribución mundial y es de importancia médica porque contiene varias especies que son vectores de distintas enfermedades. Se divide en seis subtribus: Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina y Psychodopygina. Estas subtribus se clasifican a su vez en géneros, sub-géneros, series y grupos de especies (Tabla 3).

Actualmente se han identificado aproximadamente 800 especies de flebótomos pertenecientes a 5 géneros principales: *Phlebotomus* (94 especies), *Sergentomyia* (258 especies), *Lutzomyia* (379 especies), *Brumptomyia* (23 especies) y *Warileya* (5 especies). Alrededor de 80 especies de los géneros *Lutzomyia*, *Phlebotomus* y recientemente *Sergentomyia* son considerados posibles vectores de leishmaniasis (Kato, et al., 2010) (Ready, 2013).

La caracterización de las distintas especies de vectores de *Leishmania* es importante para los estudios epidemiológicos y para la identificación de los lugares endémicos de la enfermedad.

Esta se realiza generalmente por medio de la taxonomía clásica, la cual se basa en los caracteres morfológicos para detectar las diferencias entre especies. La genitalia y el cibario son las estructuras más relevantes en esta clasificación. Sin embargo, este tema ha sido controversial ya que varios autores han propuesto una taxonomía distinta para este grupo de especímenes; principalmente por la presencia de algunas especies crípticas que dificultan la clasificación basada en estas diferencias morfológicas (Dias, et al., 1998).

1.3.1. BIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA

Los flebótomos son insectos con metamorfosis completa, los huevos son depositados en lugares con materia orgánica para que al desarrollarse los especímenes puedan alimentarse. Su alimentación en etapas tempranas se basa en azúcares producidos por las plantas, áfidos y coccidios. En etapas adultas, solamente las hembras son hematófagas ya que necesitan de la sangre para la maduración de los huevos. Esta necesidad de alimentarse con sangre hace que el insecto desempeñe un papel como vector natural demostrado de varias enfermedades (Munsterman, 2005; Killicdk-Kendrick, 1999). En la saliva de estos insectos hay anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios, y compuestos vasodilatadores que facilitan su alimentación (Valenzuela, et al., 2001). Otros compuestos presentes en la saliva afectan a los macrófagos. Por ejemplo disminuyendo la síntesis de óxido nítrico y la respuesta TH1 polarizando hacia la respuesta TH2 que es inútil en el control del parásito (Davies, et al., 2000).

Los flebótomos tienen siete estados de desarrollo: huevo, larva (4 estados), pupa y adulto. Su desarrollo ocurre en climas húmedos con temperaturas entre los 17°C a 31°C, temperaturas superiores pueden causar daños en los huevos y las larvas, y temperaturas inferiores retardan el desarrollo. El ciclo de vida comienza con la oviposición; las hembras tienen una glándula que segrega una sustancia para anclar los huevos en sustratos orgánicos. Se depositan entre 30 a 70 huevos y su desarrollo tarda entre 6 y 9 días (Feliciangeli, 2004; Mascari, 2008; Alexander & Usma, 1994). Los huevos tienen una coloración que varía de castaño claro a oscuro, tienen una forma elíptica con una longitud entre 300 a 500µm (Sierra, et al., 2000). El tiempo de incubación está entre los 4-20 días, posterior a eso vienen los 4 estados larvales cuyo periodo es de 18-31 días aproximadamente. Las larvas son vermiformes, con cuerpo alargado dividido en 12

segmentos; tres de ellos torácicos y 9 abdominales. Tienen la parte ventral plana, en este punto poseen ya un aparato bucal con el que se alimentan de la materia orgánica. En general los estadios larvales 2 y 3 son similares, mientras que la larva del primer estadio es la única que no tiene las setas caudales desarrolladas y la larva del cuarto tiene un esclerito oscuro en el octavo segmento abdominal. En el cuarto estadio la larva deja de alimentarse y busca un lugar seguro para convertirse en pupa. Las pupas son de alrededor de 2-4mm, de colores pardo o dorado y de forma alargada. El desarrollo de la pupa es de 10 a 20 días, posterior a esta etapa emerge el adulto (Young & Duncan, 1994; Montoya-Lerma & Ferro, 1999).

Los adultos son insectos de una longitud entre 2-3mm. Su color varía desde un gris amarillento hasta negro. Tienen tres pares de patas largas, alas lanceoladas que forman una V cuando están descansando, un tórax compuesto por diez segmentos (los tres últimos constituyen la genitalia) recubierto por cerdas largas y finas, una cabeza pequeña con ojos compuestos y antenas largas (Figura 2) (Young & Duncan, 1994; Galati, 2010).

Estos insectos son activos en las noches, por ello se albergan en casas, cuevas, o huecos entre las rocas durante el día. A diferencia de los mosquitos, éstos vuelan de manera silenciosa y con un movimiento peculiar de las alas que les permite acercarse fácilmente a los animales y personas sin ser detectados (Kato, et al., 2010).

Existe una relación entre vector y parásito regulada por compuestos que producen ambos organismos. Cuando se encuentran infectados los promastigotes del parásito deben adherirse al epitelio del intestino del vector para su posterior multiplicación y diferenciación. Esto se da por medio de un lipofosfoglicano del promastigote (se ha visto que hay distintas estructuras de acuerdo a cada especie) y la interacción con una proteína del intestino medio del vector (también especie específica). Por ejemplo en *P. papatasi* y *P. duboscqi*, la proteína PpGalec, una lectina β -galactosida de unión es esencial para que se dé la interacción entre parásito y vector. Esto sugiere que la capacidad vectorial depende mucho de las moléculas producidas por cada insecto (Kato, et al., 2010). Hay flebótomos que sólo se pueden infectar con una especie de parásito específica como *P. papatasi*, mientras que otros como *Lu. longipalpis* son susceptibles a varias especies de los subgéneros *Viannia* y *Leishmania* (Ready, 2013).

1.3.2. CAPACIDAD VECTORIAL

La capacidad vectorial se define como la eficiencia en la que un vector transmite alguna enfermedad, es decir la capacidad de un patógeno de ser transmitido. Esta capacidad depende del tiempo, la especie de vector y la especie de parásito. En otras palabras, la capacidad vectorial es el número de contactos potencialmente infectivos de una población de mosquitos por persona infectada por unidad de tiempo (Pesante, 1992; Kato, et al., 2010). Normalmente se calcula con la fórmula a continuación:

Capacidad vectorial = $C = ma^2 (P^n)/(-\ln P)$ donde,

- C = Capacidad vectorial a nuevas infecciones por infección por día.
- ma = # de picadas por humano por día.
- a = habito de picada al humano
- P = la probabilidad de supervivencia diaria
- n = el periodo de incubación intrínseco (en días)

Una de las características que se consideran al hablar de capacidad vectorial es que el vector sea capaz de transmitir el agente infeccioso pero no se vea afectado a pesar de estar infectado por el mismo. Por otro lado, que el vector se alimente a distintas horas, al azar y que tenga un número fijo de comidas por unidad de tiempo, a pesar del tipo de hospedador y la abundancia del vector. Aunque el éxito de alimentarse puede disminuir si varios vectores atacan al mismo hospedador. Para una alta capacidad vectorial se ha determinado también que el hospedador debe ser susceptible al agente infeccioso, es decir que con una mordida se contraiga dicho parásito (Sanofi, 2013).

Hay factores que determinan la capacidad vectorial para enfermedades humanas entre ellos están (Orellana, 2012):

- Dependientes del vector: susceptibilidad, persistencia del agente en el vector, antropofilia, domesticidad, mecanismo de transmisión, abundancia, ecología y biología del vector.

- Dependientes del agente: disponibilidad de reservorios, afinidad por el vector, capacidad de multiplicación en el vector, carga parasitaria y patogenicidad.
- Dependientes del medio ambiente: clima, relieve, hidrografía, vivienda, contaminación, población humana, reservorios, y actividad humana.

1.3.3. VECTORES DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN EL ECUADOR

En el Ecuador se han reportado 76 especies de flebótomos que pertenecen a 17 subgéneros de acuerdo a la clasificación de Galati. De éstos: *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi* y *Lutzomyia ayacuchensis* son considerados vectores comprobados (Zapata, et al., 2012). Calvopiña et al (2004) reportaron a *L. serrana* como vector de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* en la Amazonía. Sin embargo determinaron que *Lu. tortura*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. gomezi*, *Lu. flaviscutellata*, *Psy. carrerai thula*, y *Lu. castanea* podrían ser posibles vectores. Por otra parte, se ha reportado que *Psychodopygus panamensis* es vector natural de *L. panamensis* y *L. braziliensis* en Panamá, Ecuador, Colombia y Guatemala (Barreto, et al., 1997; Lainson, 2002)

Nyssomyia trapidoi se encuentra distribuida en la costa y en las estribaciones de la cordillera occidental de los Andes (Zapata, et al., 2012). Se la encuentra normalmente en bosques secundarios, plantaciones y cerca de las viviendas. También está presente en Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Colombia (Figura 3) (Young & Duncan, 1994).

Según los reportes *Nyssomyia trapidoi*, es vector de *Leishmania panamensis*. Sin embargo, en Colombia y Ecuador se ha encontrado infectado por otras especies que pertenecen al subgénero *Viannia* (Davies, et al., 2000; Takaoka, et al., 1990). En 1985, Zeledón et al. encontraron la presencia de *Leishmania panamensis* en muestras de *Ny. trapidoi* en Costa Rica. Un estudio realizado en el noroccidente de Pichincha demuestra que *Ny. trapidoi* presenta una alta diversidad genética que podría tener implicaciones directas en la transmisión de la leishmaniasis y otros agentes infecciosos (Zapata, et al., 2012; Davies, et al., 2000).

Los estudios realizados en esta especie de flebótomos tienen alta importancia médica; ya que es vector comprobado cómo se mencionó anteriormente. Se ha encontrado que tiene una alta

capacidad de adaptación y por ello las actividades humanas influyen su distribución, composición poblacional y en general diversidad (Valderrama, et al., 2011).

En el 2009, Rodríguez realizó un estudio en *Ny. trapidoi* y *Lu. gomezi* para mostrar la existencia de proteínas salivales biológicamente activas en estas especies, que son reconocidas por anticuerpos de sueros de perros con leishmaniasis, que posteriormente podrían ser utilizadas como protección contra la infección de *Leishmania*. Según otros estudios realizados en el 2011, *Lutzomyia gomezi*, *Ny. trapidoi* y *Psychodopygus panamensis* fueron las especies más ampliamente distribuidas en Panamá, sobretodo en lugares endémicos de leishmaniasis donde ha habido fragmentación de bosques y alteraciones del ecosistema (Valderrama, et al., 2011).

1.4. VARIACIÓN GENÉTICA DE FLEBÓTOMOS

Estudios antiguos realizados en flebótomos se basaban únicamente en los caracteres morfológicos. Sin embargo, con el desarrollo de la biología molecular se incrementó el uso de marcadores moleculares para realizar dichas investigaciones (Kato, et al., 2010). Dentro de los marcadores moleculares, los genes mitocondriales son ampliamente utilizados para el análisis de individuos inter e intraespecíficamente. En insectos han permitido descubrir especies crípticas en los distintos órdenes y determinar variaciones genéticas en las poblaciones (Hashiguchi, 2001).

En distintos estudios se ha usado la tipificación molecular con haplotipos de secuencias como citocromo oxidasa subunidad I (COI) y citocromo B (CytB) en ejemplares del género *Lutzomyia*, con la idea de su uso potencial para diferenciar especies de importancia en la transmisión de leishmaniasis (Hoyos & Uribe, 2012). Por otro lado, Bejarano et al. (2001) confirmaron la existencia de cuatro morfoespecies de *Lu. longipalpis*, vector de leishmaniasis visceral en América, que presentaron una divergencia nucleotídica en 149 sitios de la región 3' de la subunidad 4 de la NADH deshidrogenasa. Essingher et al. (1997), asociaron la divergencia nucleotídica de los genes mitocondriales CytB y NADH deshidrogenasa con la estructura poblacional y la dispersión de *P. papatasi* desde la subregión oriental mediterránea, hasta el norte de África, sur de Europa y occidente de Asia.

En 1999, Sanjoba et al. utilizaron el gen COI, para diferenciar cuatro especies de *Phlebotomus*: *P. papatasi*, *P. major*, *P. sergenti*, y *P. simici*. Las secuencias obtenidas mostraron una similitud del 80,8 a 85,3% concluyendo que las divergencias encontradas podrían servir para discriminar las especies en estudio (Bejarano, 2001). Posteriormente se utilizó el gen de citocromo B para observar la variación intraespecífica en *Lu. youngi*, en Costa Rica, Colombia y Venezuela. Con ello se realizó una comparación entre los especímenes y se confirmó la presencia de una nueva población de dicha especie en el departamento de Caidas en Colombia (Bejarano, 2000).

Torgerson et al. (2003) examinaron las relaciones genéticas en algunos grupos morfológicos del género *Lutzomyia* y dos de *Brumptomyia* usando 285pb del gen CytB. Con esto se obtuvo un árbol filogenético por el método de Neighbor Joining que agrupó a *Lutzomyia* con *Psathyromyia*, y formó además tres grupos monofiléticos correspondientes a *Nyssomyia*, Grupo *Verrucarum* y *Micropygomyia* Demostrando que este gen es bastante informativo para estos especímenes.

Se han realizado también estudios para encontrar especies crípticas en flebotomos. Por ejemplo Dvorak et al. (2006) estudiaron ITS2 (Espaciador transcrito interno 2) del gen ribosomal 28S en poblaciones de *Phlebotomus sergenti* con lo que revelaron la presencia de dos ramas de especies crípticas. En una investigación realizada en Brasil, se analizaron dos poblaciones de *Lu. longipalpis* que coexisten en dos estados del país. Se realizó un análisis genético utilizando microsatélites y también uno enzimático para medir la cantidad de feromonas producidas por los machos. A partir de esto se determinó que dichas poblaciones correspondían a especies gemelas que habitan en un mismo lugar (Maingon, et al., 2003).

En esta investigación se colectó flebotomos en tres provincias: Bolívar, Esmeraldas y Manabí; lugares en los que la transmisión de leishmaniasis es importante de acuerdo con las tasas de incidencia reportadas por el Ministerio de Salud Pública durante el año 2012 (Tabla 4). El objetivo fue analizar la variación genética de diferentes poblaciones de *Nyssomyia trapidoi* principal vector de leishmaniasis cutánea en la Costa ecuatoriana (Zapata, et al., 2012). Para el análisis se utilizó los genes mitocondriales citocromo B (CytB) y citocromo oxidasa subunidad

I (COI) debido a que en estudios anteriores se ha comprobado que éstos son filogenéticamente informativos para los flebótomos (Parvizi & Benlarbi, 2003).

2. JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador la leishmaniasis cutánea (LC) está distribuida en 22 de las 24 provincias (Tabla 4). Aparece clínicamente como nódulos o úlceras en el sitio de la picadura del vector (Diptera: Psychodidae) que está infectado con *Leishmania*. En la mayoría de casos la gente no recibe tratamiento y se cura espontáneamente pero en otros casos puede llegar a complicaciones como desconfiguración del tejido o incluso a la muerte en el caso de que haya una infección bacteriana secundaria (Calvopiña, et al., 2004). Entre los vectores principales de LC tenemos a: *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia ayacuchensis* (Zapata, et al., 2012).

Nyssomyia trapidoi es el principal vector de leishmaniasis cutánea en las zonas subtropicales y tropicales de Sudamérica (Davies, et al., 2000; Weigel, et al., 1994). Se encuentra distribuida en la costa y en las estribaciones de la cordillera occidental de los Andes. Esta especie de mosquito es antropofílica (prefiere alimentarse de sangre humana) y está muy adaptada a vivir en bosques secundarios y plantaciones cerca de las viviendas en poblados rurales (Zapata, et al., 2012).

En el Ecuador, estudios recientes muestran que existe una alta diversidad genética de *Ny. trapidoi* pero se desconoce las implicaciones epidemiológicas en la transmisión de leishmaniasis y otras infecciones (Zapata, et al., 2012). Adicionalmente, se encontró que 11.5% de *Ny. trapidoi* estaba infectado con *Endotrypanum* un parásito muy cercano filogenéticamente a *Leishmania* (Zapata, et al., 2012). Estos resultados demuestran la importancia de extender el estudio a otras provincias para caracterizar genéticamente las diferentes poblaciones (variantes genéticas) de *Ny. trapidoi* y relacionar esta variación con la capacidad de transmisión de patógenos. De igual manera, determinar si la distribución geográfica ha cambiado debido a factores climáticos, demográficos, deforestaciones, entre otros; que hace que su distribución sea cada vez más cerca de las personas y sus hogares con implicaciones directas en la salud de la gente que habita en zonas de transmisión (Santamaria, et al., 2006).

El uso de marcadores genéticos como el gen de citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y citocromo B de ADN mitocondrial permitirán determinar la distribución de haplotipos de *Ny. trapidoi*. La detección molecular del parásito (*Leishmania*) por otra parte, contribuye a establecer la capacidad de transmisión de *Leishmania* por parte de los diferentes haplotipos identificados (Santamaria, et al., 2006). Los resultados de este proyecto contribuirán a determinar posibles focos nuevos de transmisión de leishmaniasis. Lo cual favorecerá a los poblados de áreas sub urbanas y rurales de las provincias en estudio ya que se podrán realizar programas de control para evitar la transmisión de la enfermedad, teniendo un impacto positivo en la salud y calidad de vida de sus habitantes. También servirán como referencia para realizar futuras investigaciones en la especie *Ny. trapidoi* en otras provincias, analizando los nichos que ocupa y la capacidad vectorial en dichos lugares. Por otro lado, esta investigación permitirá determinar la distribución de otros géneros pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae en las provincias estudiadas.

3. ÁREA DE ESTUDIO

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio de Microbiología (análisis moleculares) y en el Laboratorio de Entomología y Medicina Tropical (Colección entomológica) de la Universidad San Francisco de Quito, en el Campus de Cumbayá.

Las muestras se colectaron en tres provincias del país (Tabla 5 y Figura 4). En el bosque secundario tropical de la localidad Santo Domingo de Onzole (Eloy Alfaro, Esmeraldas) en Febrero del 2013; en el bosque secundario tropical del Recinto La Tablada (Atacames, Esmeraldas) en Marzo del 2013. En Bolívar se colectó en el bosque secundario templado aledaño a la Finca Hualpa (Echandía) en Congreso y en el bosque secundario del Recinto Alsacia (Caluma) a mediados de Marzo 2013. Por último en Manabí se colectó a finales de Marzo (2013) en los bosques secundarios subtropicales cercanos al Caserío La Mina (Pedernales), Caserío Agua Sucia (El Carmen) y Caserío Murucumba (Junín).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la variación genética de *Nyssomyia traidoi* a través del uso de secuencias mitocondriales (COI y Cyt B), en las provincias de Esmeraldas, Manabí y Bolívar.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a *Nyssomyia traidoi* a través del uso de claves taxonómicas.
- Analizar las secuencias de genes mitocondriales para determinar la diversidad genética de las diferentes poblaciones de *Nyssomyia traidoi*.
- Detectar la presencia de ADN de kinetoplasto de *Leishmania* en *Ny. traidoi*

5. MATERIALES

5.1. COLECCIÓN Y SEPARACIÓN DE ESPECÍMENES

- Trampas tipo CDC (Centers for Disease Control) de luz blanca
- Baterías 6V (FAMMA MR12-6)
- Recargador de baterías (VMARK)
- Mallas entomológicas
- Frascos de colección
- Ligas
- Pinceles
- Etanol al 70%
- Tubos cónicos de tapa rosca de 1,5ml
- Algodón
- Estéreo microscopio (LEICA EZ4)

5.2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECÍMENES

- Portaobjetos y Cubreobjetos
- Pinzas entomológicas
- Pipetas Pasteur
- Jeringas de 1ml y agujas (NIPRO 30G*1/2)
- Alcohol al 70%
- Solución Marc André (hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%)
- Goma cloral (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábica 20% y Glicerina 13%)
- Microscopio óptico (LEICA DME)
- Estéreo microscopio (LEICA EZ4)
- Tupos eppendorf 1,5ml

5.3. EXTRACCIÓN DE ADN

- PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄. 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH7)
- CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8)
- Proteínasa K (Invitrogen)
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Acetato de Sodio 3M pH 5
- Etanol al 100%, etanol al 70%,
- Buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA)
- Microcentrifugadora Eppendorf ®
- Vortex (SMENSMAURO LAB MIXER)
- Baño María Shel LAB ®
- Tubos eppendorf 1,5ml
- Micropistilo plástico
- Micropipetas (Labnet)

5.4. AMPLIFICACIÓN DE ADN

- H₂O para PCR
- Buffer 5X
- MgCl₂ 25mM
- dNTPs 2mM
- Primer N1N-PDR (50uM):
5'GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA- -3'
- Primer C3B-PDR (50uM): 5'-CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAATGATA -3'
- Primer LepR (50uM): 5' - -TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA -3'
- Primer LepF (50uM): 5' - ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG -3'
- Primer JW11 (50uM): 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3'
- Primer JW12 (50uM): 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3'
- Primer KRD 5(50uM): 5' - GAT CTG GTT GAT TCT GCC AGT AG - 3'
- Primer KRD 3 (50uM): 5' - GAT CCA GCT GCA GGT TCA CCT AC - 3'
- Taq Polimerasa (GoTaq ®)
- Muestras de DNA de *Ny.trapidoi*
- Termociclador Eppendorf
- Tubos eppendorf de 0,2ml

5.5. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

- Cámara de electroforesis horizontal (C.B.S Scientific CO)
- TBE 1X
 - 54g de TRIS Base (Promega)
 - 27.5g de ácido bórico (Acros Organics)
 - 20mL de EDTA pH8 [0.5M]
 - 5000mL agua destilada estéril
- Agarosa LE
- Bromuro de etidio (molecular SIGMA biology)

- Amplicones de *Ny. Trapidoi* (NN-CytB; LepF-LepR; JW11-JW12)
- Micropipetas (Labnet)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Balanza analítica (ae ADAM AQT-600)
- Microondas (Panasonic USP 4,942,516)
- Parafilm

5.6. SECUENCIAMIENTO

- Amplicones NN-CytB
- Amplicones LepF-LepR
- Amplicones JW11-JW12

5.7. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

- Software: PRE GAP, GAP, MEGA, BIOEDIT, ARLEQUIN,

6. MÉTODOS

6.1. COLECCIÓN ENTOMOLÓGICA

6.1.1. COLECCIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Los especímenes fueron colectados con trampas tipo CDC de luz clara. Estas trampas se colocaron a partir de las 17h00 y se recogieron la mañana siguiente antes de las 08h00. Las trampas se instalaron en bosques secundarios a 1.5 metros de distancia del suelo.

Posteriormente se los transfirió a envases con alcohol al 70% y se los transportó a la Universidad San Francisco de Quito al Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical.

6.1.2. SEPARACIÓN DE MUESTRAS

Para la separación de los especímenes pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae se utilizó un estéreo microscopio (LEICA EZ4). Los especímenes fueron almacenados en tubos cónicos de tapa rosca de 1,5ml con etanol al 70% a - 20°C.

6.1.3. MONTAJE EN PLACA

Se colocó cada espécimen sobre una lámina portaobjetos y se adicionó 2-3 gotas de alcohol al 70%, para evitar su desecación. Con ayuda de un estero microscopio (LEICA EZ4) se disectó con agujas estériles a nivel de los tres últimos segmentos abdominales, de la cabeza y del ala, luego estas estructuras estos fueron sometidas a proceso de aclaración por medio de la solución Marc André (Hidrato de cloral 40%, y ácido acético 30%), se agregó 1-2 gotas de dicha solución sobre las partes y se esperó alrededor de 20 segundos. Luego se colocó una gota de goma cloral (Hidrato de Cloral 30%, Goma Arábica 20% y Glicerina 13%) en una de las esquinas de la placa, y se sumergió en ella las estructuras aclaradas. La cabeza se colocó con los ojos hacia abajo y las antenas hacia el observador, el ala paralela y el abdomen con la parte ventral hacia el observador. Una vez situadas estas partes adecuadamente se colocó una lámina cubre objetos y se presionó ligeramente para asegurar que las estructuras no se muevan (Young & Duncan, 1994). El resto del cuerpo del insecto (tórax, extremidades y los segmentos proximales del abdomen) se almacenó en un tubo eppendorf (1,5ml) a -20°C, hasta ser utilizados en la extracción de ADN.

6.1.4. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

Para la identificación de los especímenes se utilizaron claves taxonómicas basadas en los caracteres morfológicos de Galati (2010) y Young (1994). Se observó las placas con un microscopio óptico (LEICA DME) en 40X, y se prestó especial atención a estructuras de interés taxonómico como el cibario, palpos y espermateca (Figura 5).

6.2. ANÁLISIS MOLECULAR

6.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción se utilizó el tórax, las extremidades y los segmentos proximales del abdomen de los especímenes de *Ny. trapidoi* previamente almacenados a -20°C . Primero se colocó 500 μl de PBS 1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4mM KH_2PO_4 , pH7) en el tubo que contenía la muestra y se realizó un lavado con esta solución. Luego se eliminó el PBS y se agregó 700 μl de CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8). Con un micropistilo plástico estéril se realizó una maceración mecánica del material biológico y se agregó 20 μl de Proteinasa K. Esto se homogenizó en un vórtex y se incubó por 2 horas a 65°C , agitando cada 15 minutos para facilitar la ruptura de las membranas celulares (Kieleczawa, 2006).

Una vez terminada la incubación se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se agregó 700 μl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Esto se mezcló invirtiendo el tubo vigorosamente hasta formar una emulsión. Luego se centrifugó a 1561 g por 5 minutos, con esto se obtuvo dos fases, la inferior u orgánica y la superior o acuosa que tiene el ADN en suspensión. Se transfirió aproximadamente 500 μl del sobrenadante a un tubo nuevo previamente rotulado. En este punto fue crucial no topar la interfase para evitar la contaminación con proteínas celulares. A continuación se agregó 1000 μl de etanol al 100% a -20°C y se invirtió delicadamente el tubo tres veces. Esto se dejó toda la noche a -20°C sin movimiento (Kieleczawa, 2006).

Al siguiente día se centrifugó la muestra a 1561 g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. Luego se lavó el pellet de ADN adicionando 1000 μl de etanol al 70% y se invirtió delicadamente. Se centrifugó nuevamente a 1561g por 10 minutos y se descargó el sobrenadante. Una vez realizados los lavados se dejó la muestra secando por 15-20 minutos en un tubo Eppendorf boca abajo sobre un papel absorbente. Finalmente se resuspendió la muestra en 50 μl de buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA) y se almacenó a -20°C (Kieleczawa, 2006).

6.2.2. AMPLIFICACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL CITOCROMO B

Se amplificó una región de 550 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo B (CytB). Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: N1N-PDR: 5'GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA--3' y C3B-PDR:5'-CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAATGATA -3' (Esseghir, et al., 1997). El volumen final de cada reacción fue 50 µl, para la cual se usó 5 µl de ADN dilución 1:4 (Tabla 6). Las condiciones de PCR están descritas en la Tabla 7.

6.2.3. AMPLIFICACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD 1

Se amplificó una región de 710 (pb) del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad 1 (COI). Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: LepR:5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3' y LepF: 5'-ATTCAACCAATCA TAAAGATATTGG-3' (Hajibabaei, et al., 2005). El volumen final de cada reacción fue 50 µl, para la cual se usó 5 µl de ADN dilución 1:4 (Tabla 8). Las condiciones de PCR están descritas en la Tabla 9.

6.2.4. AMPLIFICACIÓN DE ADN DE UNA REGIÓN CONSERVADA DE LOS MINICÍRCULOS DEL KINETOPLASTO DE TRIPANOSOMATIDAE

Se amplificó una región de 120 (pb) de una región conservada de los minicírculos del kinetoplasto de Tripanosomatidae. Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: JW11: 5'-CCT ATT TTA CAC CAA CCC CCA GT -3' y JW12: 5'-GGG TAG GGG CGT TCT GCG AAA -3' (Nicolas, et al., 2002). El volumen final de cada reacción fue 50 µl, para la cual se usó 5 µl de ADN dilución 1:4 (Tabla 10). Las condiciones de PCR están descritas en la Tabla 11.

6.2.5. AMPLIFICACIÓN DE UNA REGIÓN DE ARN RIBOSOMAL DE LA SUBUNIDAD PEQUEÑA (SSU-RRNA) DE TRIPANOSOMATIDAE

Se amplificó una región de 2200 (pb) de una región de ARN Ribosomal de la subunidad pequeña de Trypanosomatidae. Los primers utilizados para la amplificación de este segmento fueron: KRD 5: 5' - GAT CTG GTT GAT TCT GCC AGT AG - 3' y KRD 3: 5' - GAT CCA GCT GCA GGT TCA CCT AC - 3' (Clark, et al., 1995). El volumen final de cada reacción fue 50 µl, para la cual se usó 5 µl de ADN dilución 1:4 (Tabla 12). Las condiciones de PCR están descritas en la Tabla 13.

6.2.6. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para visualizar los resultados de las distintas amplificaciones se utilizó electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. Primero se armó la cámara de electroforesis horizontal. Después se pesó 1,5g de agarosa y se colocó en un Erlenmeyer. A esto se agregó 100ml del buffer TBE1X. Posteriormente se disolvió la mezcla en el microondas, asegurándose que no se evapore ni vierta el contenido del Erlenmeyer. Se homogenizó y se dejó enfriar el gel hasta una temperatura en la que el frasco sea tolerable al tacto. Luego se agregó 2 µl de bromuro de etidio, se agitó y se vertió la mezcla sobre el molde de solidificación de la cámara de electroforesis. Se colocó el peine para los pocillos y se dejó solidificar la agarosa por aproximadamente 15 minutos. A continuación se retiró el peine, se colocó TBE 1X sobre el gel hasta que lo cubra. Para cargar las muestras se cortó un pedazo de parafilm en el cual se colocó 2 µl de blue juice con 6 µl de cada muestra. Finalmente se cargó las muestras y se colocó un ladder de 100pb. La electroforesis corrió a 70V por 60 minutos (Irwin & Janssen, 2001).

6.2.7. SECUENCIAMIENTO

Los productos de PCR fueron enviados para secuenciamiento en ambos sentidos a Beckman Coulter Genomics, en Francia. En total se enviaron a secuenciar 48 muestras para CytB, 48 para COI. 9 para la región del kinetoplasto de Tripanosomatidae y 2 para 18s de Tripanosomatidae.

6.2.8. ANÁLISIS MOLECULAR

Los productos del secuenciamiento fueron editados con el paquete estadístico Staden (Gap y Pregap) para generar la secuencia consenso en cada espécimen. Dichas secuencias fueron analizadas con Blast para confirmar la identidad de las mismas (COI, CytB o Región del Kinetoplasto de Tripanosomatidae). Posteriormente, las secuencias fueron alineadas con el programa Bioedit.

Se utilizó el programa MEGA 5.2 para obtener los árboles generados por Neighbor Joining (NJ) y Maximum Likelihood (ML) con un bootstrap de 500 repeticiones. Además se obtuvo el número de sitios polimórficos e informativos y la composición nucleotídica. Por otro lado, se utilizó también el programa Arlequin 5.3.2 con el que se obtuvo la diversidad nucleotídica y haplotípica con lo que se determina patrones de divergencia intra/interespecífica.

Para el análisis del segmento del Kinetoplasto se utilizó el programa MEGA 5.2 con el que se construyó un árbol por el método Neighbor Joining. Se utilizaron secuencias depositadas en el gene bank para *Leishmania panamensis*, *Leishmania guayanensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major* y *Leishmania infantum*. Además se utilizó también una secuencia de *Leishmania* proveniente de una muestra clínica y *Endotrypanum* proveniente de la localidad de Paraíso Escondido en la provincia de Pichincha.

7. RESULTADOS

7.1. COLECCIÓN ENTOMOLÓGICA

Se colectó un total de 1506 especímenes pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae, en sitios endémicos de leishmaniasis en las provincias de Bolívar, Esmeraldas y Manabí. De estos, el 53,25% fueron hembras y el 46,75% machos (Tabla 14).

Se realizó la disección de 534 especímenes y mediante el uso de claves morfológicas de la clasificación de Galati (2012) se identificaron 14 especies pertenecientes a 9 géneros de flebótomos (Tabla 15). Los datos muestran que Manabí es la provincia que presenta mayor diversidad y número de especímenes capturados. *Pressatia dysponeta* fue la especie más abundante (38,4%). Por otra parte, en Esmeraldas se encontró también que *Pressatia dysponeta* es la especie predominante (65,6%), la cual junto a *Psychodopygus panamensis* representan el 87% del total de especímenes analizados. Por último se encontró que en Bolívar la especie más abundante fue *Nyssomyia trapidoi* representando el 27% de la población total de especímenes de la subfamilia Phlebotominae colectados en esta provincia.

Nyssomyia trapidoi vector reconocido de Leishmaniasis cutánea se encontró en 6 de los 7 sitios de colección. El único sitio donde no se encontró el mencionado vector fue en el Cantón Junín en la provincia de Manabí.

7.2. ANÁLISIS MOLECULAR

7.2.1. ANÁLISIS DE GENES MITOCONDRIALES

Se amplificó segmentos de los genes mitocondriales citocromo B (CytB) y citocromo oxidasa subunidad I (COI) de 45 muestras de *Nyssomyia trapidoi* capturadas en 6 localidades (Sto. Domingo de Onzole, La Tablada, Caluma, Echandía, El Carmen y Pedernales) de las tres provincias en estudio (Bolívar, Esmeraldas, y Manabí). Se obtuvo bandas de 550pb (CytB) y 710 pb (COI) (Figura 6 y Figura 7). Además se incluyó 3 secuencias de especímenes de *Ny.*

trapidoi capturados en el Recinto Paraíso Escondido en la provincia de Pichincha y una secuencia de *Ny. trapidoi* de Nicaragua.

Para el caso de CytB se encontró que todas las secuencias analizadas tenían un tamaño de 511pb y su composición nucleotídica: T (37,7%), A (14,9%), G (38,8%), C (8,7%). Dichas secuencias presentaron 37 sitios polimórficos de los cuales 12 fueron informativos (Figura 8). Por otro lado, para COI la secuencia era de 685pb y su composición nucleotídica: T (36,9%), A (27,9%), G (16,5%), C (18,7%). En este caso existieron 71 sitios polimórficos y 26 fueron informativos (Figura 8). Para corroborar estos resultados se calculó los índices de diversidad nucleotídica y haplotípica (Tabla 16) con el programa Arlequin 5.3.1, y se encontró nuevamente que el gen COI muestra mayor variabilidad y diversidad genética (36 haplotipos) que CytB (24 haplotipos).

Los árboles obtenidos por los métodos de Maximum Likelihood (ML) (Figura 9) y Neighbor Joining (NJ) (Figura 10), muestran topologías similares para los dos genes analizados. Se observó la existencia de 4 agrupaciones claras. La primera abarca las muestras: B6E10, B28H2, B6E5 y B6E2 provenientes de Bolívar de los cantones de Caluma y Echandía. Las mismas que, tanto con NJ como con ML muestran valores de bootstrap altos (mayores 95) para ambos genes (COI y CytB).

El segundo grupo está conformado por: B11B7, B11B6, B11B8, provenientes de Echandía. Estos fueron agrupados por ambos genes y métodos con valores de bootstrap débiles (mayor a 40). Sin embargo, si se considera solamente a B11B7 y B11B8 se encuentra un valor de bootstrap alto (mayor a 94) en el gen COI. La tercera agrupación está formada por: B6E7, B9F2, B6E8, B12F9, B12F8, y B12F6 provenientes únicamente de Echandía. En estas muestras el gen COI mostró una agrupación más marcada que CytB, con un bootstrap alto (mayor a 97).

Por último se encontró una agrupación por ambos métodos en la que no hay relación geográfica, ya que incluye a individuos de las cuatro provincias (Manabí, Bolívar, Esmeraldas y Pichincha). Sin embargo esta agrupación es más clara para COI que CytB. Un aspecto importante es que ninguna de las muestras recolectadas en el Ecuador se agrupa con la muestra de *Ny. trapidoi* proveniente de Nicaragua, la cual fue utilizada como el grupo externo.

7.2.2. DETECCIÓN DE ADN DE KINETOPLASTO DE TRIPANOSOMATIDAE

Para determinar la presencia de ADN de *Leishmania* en *Ny. trapidoi*, se amplificó una región conservada de los minicírculos de ADN del kinetoplasto de Tripanosomatida (Figura 11). Para esto se analizó 74 hembras de *Nyssomyia trapidoi*, ninguna de ellas con presencia de sangre y 5 machos como controles negativos. Nueve muestras dieron amplificación positiva, lo que corresponde al 12,2%. Todos los especímenes provinieron de la provincia de Bolívar tanto del cantón Echandía como de Caluma. Se realizó el análisis de estas secuencias junto a secuencias de diferentes especies de *Leishmania* y *Endotrypanum* proveniente de la localidad de Paraíso Escondido en la provincia de Pichincha. Todas las secuencias tuvieron 100% de homología entre ellas y se agruparon claramente con *Endotrypanum* (Figura 12).

La secuencia del ADNr 18s de Trypanosomatidae confirmó que se trata de *Endotrypanum monterogeei*.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se identificó 14 especies de flebótomos (Tabla 15) en las tres provincias (Bolívar, Esmeraldas y Manabí), estas especies han sido reportadas anteriormente en el país (CIPA, 2013). Manabí fue la provincia en la que se encontró mayor diversidad y abundancia de especies; esto puede deberse a que la colección se realizó en tres cantones distintos (Junín, Pedernales, El Carmen), que están geográficamente alejados y que tienen ecosistemas diferentes que pueden contribuir a una mayor diversidad de insectos. En esta provincia se encontraron 12 de las 14 especies identificadas, *Pressatia dysponeta* fue la especie predominante (38.4%). Sin embargo, los vectores *Psychodopygus panamensis*, *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia hartmanni* también están presentes en una cantidad considerable representando el 33.5% de los especímenes identificados en esta provincia.

En Esmeraldas, se encontró de igual manera 12 de las 14 especies identificadas en este estudio, sin embargo la mayoría de especímenes correspondieron a *Pressatia dysponeta*

(65,6%), una especie zoofílica. Dentro de esta provincia, La Tablada fue la localidad con mayor prevalencia de esta especie, ya que hay presencia de corrales de cerdos y gallineros junto a las viviendas. Además de la presencia de ganado y animales domésticos que atraen a las especies zoofílicas (Kato, et al., 2007). Calzada et al. (2013) también encontraron *Pressatia dysponeta* en un estudio realizado en un poblado en Panamá, donde había presencia de animales domésticos.

Asimismo, un estudio realizado en la Guyana Francesa demuestra que en una zona que había sido altamente influenciada por el ser humano y en la que se había establecido una comunidad tuvo una baja diversidad de flebótomos y predominancia de especímenes del género *Pressatia*, en los que no se encontró infección con *Leishmania* (Rotureau, et al., 2006).

Por último en Bolívar, se encontraron 8 de las 14 especies de flebótomos identificadas en esta investigación. *Nyssomyia trapidoi* (27%) y *Lutzomyia hartmanni* (26,4%) fueron las especies predominantes en el área. Estas dos especies son de importancia médica ya que ambas son vectores de leishmaniasis en el Ecuador (Jones, et al., 2010). Calzada et al. (2004) determinaron que *Lu. hartmanni* es el vector principal de *Leishmania mexicana* en Panamá.

La diversidad y abundancia de flebótomos encontrada en cada una de las provincias se debe principalmente a la localización geográfica de los sitios de muestreo. A pesar de que todos los especímenes se colectaron en ecosistemas de bosques secundarios siempre verdes, el clima y la geografía de cada sitio de colección varía lo que hace que tanto la flora como la fauna en cada lugar sea específica y por ende presente distintas especies de flebótomos en cada una (Valderrama, et al., 2008). Esta información se confirma con el estudio realizado por Feitosa y Castellón (2006) en el que se menciona que la diversidad de especies de flebótomos generalmente se ve influenciada por condiciones geográficas, meteorológicas, y microclimáticas presentes en un área.

En Bolívar por ejemplo los cantones elegidos para el muestreo fueron aledaños, lo que va a ocasionar que la fauna de flebótomos encontrada sea más parecida entre los mismos. Mientras que en Manabí, los sitios de muestreo están localizados en cantones no aledaños lo que

posiblemente determinó que sea la provincia con mayor diversidad. En Esmeraldas por otra parte, la cercanía del sitio de muestreo a un poblado determinó que la especie de flebótomos más abundante sea *Pressatia dysponeta*.

Por otra parte, se encontró que el 53,25% de los especímenes capturados en este estudio eran hembras. En la literatura se presenta que normalmente las hembras son más abundantes que los machos, y que el crecimiento y eficacia biológica de la población depende del número de las mismas (Valderrama, et al., 2011).

En cuanto al vector en estudio, *Ny. trapidoi* fue capturado en 6 de los 7 sitios de colección cuyos ecosistemas fueron bosques secundarios húmedos. Estas áreas presentan condiciones favorables para la presencia de flebótomos, que según Vasquez (2011) son: temperaturas entre 22 y 30 °C, alta humedad relativa y altitud entre 0 a 1750m.s.n.m. Otros autores como Davies et al. (2000) corroboran esta información y agregan que la presencia de *Ny. trapidoi* en bosques secundarios tropicales y subtropicales se debe también a la alta variedad de especies vegetales y animales que sirven como fuente de alimento.

Sin embargo, Le Pont et al. (1994) mencionaron que si bien *Ny. trapidoi* se encuentra distribuido en bosques, el impacto de la antropización ha causado que esta especie migre hacia los lugares habitados domésticos (dentro de las viviendas) y peridomésticos (alrededor de las casas). En general se encontró que *Ny. trapidoi* se siente atraída por las plantaciones de café y cacao, lo cual ha llevado a que la incidencia de leishmaniasis aumente en estas áreas (Mouchet, et al., 1994).

Por otro lado, Calzada et al. (2013) en un estudio determinaron que los ambientes degradados, tienden a disminuir la diversidad de especies de flebótomos en general y a aumentar la abundancia de especies consideradas vectores de distintos patógenos como *Leishmania*; ya que estas especies tienen una capacidad mayor para adaptarse a nuevos microclimas. Se ha registrado que *Lu. gomezi*, *Lu. hartmanni*, *Psy. panamensis* y *Ny. trapidoi* son las especies que más se adaptan a ambientes degradados y por ende tienen un rango de distribución mayor (Valderrama, et al., 2011). En el presente estudio, como se puede ver en la tabla 15, las especies

antes mencionadas están ampliamente distribuidas en las tres provincias (Bolívar, Manabí y Esmeraldas) y representan el 40% del total de especímenes analizados.

Calvopiña et al. (2004) demuestran en su estudio que *Ny. trapidoi* es la especie vector predominante de flagelados y que es de importancia epidemiológica en el país. Además en Colombia, Costa Rica y Panamá también es uno de los vectores principales de dicha enfermedad transmitiendo *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. colombiensis* y *L. aristedesi*, causantes de leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Sharma & Singh, 2008).

En Esmeraldas, se capturó un bajo número de *Ny. trapidoi* a pesar de estudios anteriores que habían identificado a esta especie como vector principal en La Tablada (Esmeraldas), Santo Domingo de los Colorados y Zumba (Zamora Chinchipe) (Bañuls, et al., 1999). Por otra parte, en esta misma provincia se encontró en Santo Domingo de Onzole, un número representativo de *Psychodopygus panamensis* considerado posible vector de leishmaniasis, lo que podría justificar los distintos casos de leishmaniasis reportados en la zona (Ministerio de Salud Pública, 2013).

Lo mismo ocurrió en la provincia de Manabí, donde *Psychodopygus panamensis* es la segunda especie más abundante encontrándose en mayor número en el cantón El Carmen (Manabí) y se podría pensar que es el posible vector de la zona. En Bolívar, *Psychodopygus panamensis* representa tan solo un (7.9%) (Tabla 15) de los especímenes identificados por lo que en esta provincia el posible vector seguramente es *Lutzomyia hartmanni* que además de ser abundante en la provincia ha sido reportado como vector de *Leishmania* en varios estudios (Calvopiña, et al., 2004; Hashiguchi, 2001; Killick-Kendrick, 1999).

En cuanto a *Lutzomyia gomezi* se ha reportado que es vector de *Leishmania (V.) braziliensis* (Sharma & Singh, 2008). En el presente estudio fue identificada en las tres provincias, pero con mayor abundancia en Manabí. Esta especie habita en zonas peridomésticas, en troncos de árboles y madrigueras, en plantaciones de café e incluso a nivel intradoméstico por lo que podría considerarse posible vector de leishmaniasis (Ministerio de Protección Social, 2011).

Un aspecto que pudo haber influenciado la distribución de las distintas especies en cada uno de los sitios de colección, es la época del año en la que se realizó la colecta. Las colecciones

entomológicas de se realizaron entre los meses de febrero-marzo, que corresponden a la época lluviosa tanto en la Sierra como en la Costa (Fries, 2013). El nivel de precipitación puede afectar positiva o negativamente a las poblaciones haciendo que la época de colección arroje resultados distintos y que sea importante considerar este tema (Vasquez, 2011)

Un factor importante cuando se realiza la recolección de especímenes es que si se colocan las trampas en un día lluvioso, la cantidad de insectos colectados es muy baja porque los flebótomos no salen de sus áreas de descanso hasta que cese la lluvia. Sin embargo, si se coloca la trampa un día después de un día de lluvia el número de especímenes es mucho mayor, ya que es ahí, cuando van en busca de alimento (Vasquez, 2011). Este efecto podría explicar los resultados obtenidos en el cantón Junín en Manabí, donde hubo lluvia todos los días de recolección de muestras y no se obtuvo gran cantidad de flebótomos. Además que fue el único de los 7 sitios de recolección donde no se encontró ningún espécimen de *Ny. trapidoi*.

De acuerdo con algunos estudios, *Ny. trapidoi* tiene picos durante el año en el que su densidad poblacional aumenta, pero en general es una especie que prevalece todo el año (Contreras, 2013). Para algunas especies de flebótomos como *Lu. gomezi*, la estación de lluvia en Ecuador causa un aumento en el número de especímenes presentes, esto se atribuye a un efecto de longevidad en los adultos. Mientras que en otras especies como es el caso de *Ny. trapidoi* y *Psy. panamensis*, la lluvia causa un descenso poblacional y más bien se ve una correlación positiva en época seca (Calvopiña, et al., 2004; Vasquez, 2011; Davies, et al., 2000; Young & Duncan, 1994). La reducción de la abundancia de flebótomos en época lluviosa se atribuye a disminuciones en la actividad fisiológica de las larvas o efectos mecánicos en los sitios de cría, por ejemplo inundaciones en los sitios de crías (Vasquez, 2011).

Otra consideración que se debe tomar al realizar una colecta es la hora de recolección. En este estudio se realizó desde las 17h00 ya que *Ny. trapidoi* inicia su actividad al anochecer y se mantiene activo durante la noche, mientras que durante el día desciende a nivel del suelo y reposa en el tronco de los árboles y en la hojarasca (Contreras, 2013). Según Davies et al. (2000) este comportamiento varía dependiendo del lugar donde se encuentre, ya que si está en el exterior de las casas va a salir a alimentarse más temprano pero si se encuentra en el interior

tiene que esperar que se duerman las personas para salir a alimentarse. Otros flebótomos que tienen actividad nocturna son *Lu. hartmanni* y *Lu. gomezi*.

En cuanto a la distribución geográfica de vectores, *Ny. trapidoi* se distribuye a lo largo de la Costa ecuatoriana, tiene una amplia distribución geográfica, ya que ha sido reportada también en Colombia, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá (Contreras, 2013). *Lu. gomezi* también es vector en Panamá. *Psy. panamensis* se encuentra también en Nicaragua y Panamá, mientras que *Lu. hartmanni* está presente en Venezuela, Honduras y Colombia. En general, se podría decir que Panamá tienen una distribución de especies vectoras más parecidas al Ecuador, a excepción de *Lu. ovallesi* presente en Panamá que no ha sido reportada en Ecuador (Sharma & Singh, 2008).

La identificación de los especímenes se basó en características morfológicas, las cuales han sido muy utilizadas para la taxonomía e identificación de especies. Sin embargo, no es útil cuando se busca las variaciones intraespecíficas. Las mayores debilidades del análisis morfológico son: la necesidad de un experto en taxonomía, la dificultad de discernir entre especies crípticas o entre variabilidad intraespecífica, y el mantenimiento adecuado de las muestras, ya que un mal mantenimiento o mal montaje del insecto puede causar un daño que impide la identificación del mismo. Por esto, el desarrollo de los marcadores moleculares ha permitido identificar de manera más precisa y simple a los flebótomos (Kato, et al., 2010).

Los marcadores genéticos más utilizados para resolver variaciones intraespecíficas son los genes mitocondriales, puesto que son de herencia materna y normalmente no sufren recombinación. Por otra parte, tiene una tasa rápida de acumulación de mutaciones, ya que su material genético no está empacado con histonas como el ADN nuclear y por ello ocurre mayor degeneración. Además se ha visto que el ADN mitocondrial suele estar expuesto a daño oxidativo producto de los radicales libres que la propia mitocondria produce durante el metabolismo (Esseghir, et al., 1997). Por ello puede ser suficientemente discriminatorio para análisis comparativos entre especies e incluso dentro de una misma especie, porque permite ver las acumulaciones de cambios dentro de cada población (Raboudii, et al., 2004).

En esta investigación se utilizaron segmentos de dos genes mitocondriales citocromo oxidasa subunidad I (COI) y citocromo B (CytB). Ambos genes han sido utilizados anteriormente en el análisis de flebotomos y se ha encontrado que son informativos (Parvizi & Benlarbi, 2003; Bejarano, 2001; Esseghir, et al., 1997). Hoyos y Uribe (2012) realizaron un estudio en el que se utilizó COI en *Lutzomyia longipalpis* y se logró discriminar entre haplotipos de las distintas especies para identificar a todos los especímenes colectados en un foco de transmisión de leishmaniasis.

El análisis de las secuencias de 45 especímenes de *Ny. trapedoi* de diferentes sitios geográficos muestra que el gen COI presenta mayor polimorfismo (26 sitios informativos) que el gen CytB (12 sitios informativos). En un estudio realizado por Clare et al. (2011) se encontró que COI es un marcador genético más poderoso que otros cuando se utiliza para la identificación de especies y haplotipos. Además Zapata et al (2012) en un estudio realizado en la provincia de Pichincha (Puerto Quito), hallaron que el gen COI permite una estratificación mayor de *Ny. trapedoi*, debido a que este gen es más discriminatorio.

Los árboles filogenéticos obtenidos a partir del análisis de genes mitocondriales muestran que los individuos analizados formaron cuatro grupos bien definidos (Figura 9 y Figura 10). Tres de ellos agruparon principalmente a individuos provenientes de la provincia de Bolívar tanto del cantón de Echandía como Caluma. Mientras que solo uno agrupó a especímenes de las tres provincias de los distintos sitios de colección. Este resultado es el más relevante de esta investigación, ya que podría sugerir que esta especie está pasando por un proceso de especiación alopátrica.

El análisis filogenético de dos o más genes permite corroborar o descartar procesos de especiación. Por ejemplo si el análisis de un gen agrupa a dos individuos, pero el análisis de otro gen no los agrupa entonces la relación filogenética de estos individuos es incierta. Si la agrupación de estos dos individuos se repite en los dos genes entonces se podría decir que existe una evidencia de que estos individuos tienen una relación filogenética cercana (Nei & Kumar, 2000).

En este trabajo se observó que las secuencias nucleotídicas de ciertos individuos (obtenidos únicamente en la provincia de Bolívar) se agruparon de la misma manera cuando se analizó las secuencias de los dos genes mitocondriales CytB y COI (Figura 9 y Figura 10). Esta observación constituye evidencia de que estos individuos están estrechamente relacionados y que podrían estar frente a un proceso de aislamiento reproductivo posiblemente geográfico. Las tres agrupaciones que se formaron en esta provincia son claras y bien definidas (bootstrap mayor a 50), como se ve en las figuras 9 y 10; lo que podría sugerir que los flebótomos en esta área (provincia de Bolívar) se están reproduciendo entre sí y no están distribuyéndose ampliamente por la zona.

Adicionalmente, en este estudio se encontró que en la misma provincia de Bolívar hay ciertos individuos que se agrupan entre sí, lo que podría sugerir que hay también un posible proceso de especiación simpátrica. Las poblaciones pueden aislarse genéticamente dentro de una misma área como resultado de patrones de comportamiento y reproducción como: colonización, dispersión restringida, reproducción asexual, selección, depredación entre otros (Odum, 1986).

Por otro lado, en el estudio realizado por Zapata et al. (2012), se encontró que dos poblaciones de *Psy. geniculata* habitan en simpatria en una misma área (Parque Nacional Yasuní). Esto se evidenció a partir de un análisis morfológico, morfométrico y molecular de los especímenes del área, en el que se encontró que a pesar de ser la misma especie se está dando un proceso de especiación. Se encontró diferencias morfológicas en la genitalia de los machos; lo cual podría estar influenciando en la preferencia sexual de las hembras a algún morfotipo en específico y causando la separación de las dos poblaciones.

Singh & Kulathinal (2000) mencionan en su estudio que los genes relacionados con la reproducción sexual suelen presentar tasas de acumulación de mutaciones superiores a otros genes. Lo cual podría crear diferencias morfológicas en los individuos, que ocasionen cierto aislamiento reproductivo en poblaciones dentro de una misma área simplemente por cambios en el comportamiento o los posibles aislamientos anatómicos en la reproducción. En el presente estudio, no se encontraron diferencias morfológicas importantes en los especímenes (hembras) de las tres agrupaciones formadas en la provincia de Bolívar. Sin embargo, las diferencias

morfológicas son más evidentes en los machos que en las hembras (Singh & Kulathinal, 2000), por lo que esta podría ser una de las razones por las que no se encontró ninguna diferencia en los especímenes analizados.

Hay factores relacionados con los comportamientos de cortejo y la selección sexual que se ha visto que ocasionan especiación en flebótomos. Entre las características más comunes son la pigmentación del cuerpo, el tamaño del individuo, la forma y tamaño de las alas y los sonidos de cortejo. Se ha visto en insectos, que el movimiento de las alas es determinante para el apareamiento de estos individuos. Por ejemplo, los machos del género *Blepharoneura* exhiben un movimiento rápido de sus alas que causa una vibración en las hojas de las plantas atrayendo así a las hembras. Sin embargo, cuando la hembra está cerca presentan un movimiento lento rotatorio con giros grandes (Marsteller, et al., 2009).

Algunos estudios han mencionado que los sonidos emitidos por los insectos antes y durante el cortejo son excelentes herramientas para estudios de diversidad en flebótomos, ya que la variación en estos puede ocasionar un aislamiento reproductivo, además que ha permitido diferenciar especies crípticas (Vigoder, et al., 2010; Oliveira, et al., 2001). Los genes involucrados en este comportamiento son: cac (cacofónicos) y per (periodo), ambos han permitido determinar diferencias inter e intraespecíficas en estos insectos (Oliveira, et al., 2001).

Oliveira et al. (2001) hicieron un estudio en *Lutzomyia longipalpis* en el que se amplificó un segmento de cac y se encontró un alto polimorfismo entre las poblaciones estudiadas. Se mencionó que las variaciones en estos genes hacen que exista un distinto reconocimiento de las hembras hacia los machos. Cuando el gen cac muta, se producen cambios en las canciones de apareamiento, por ejemplo las canciones contienen más ciclos de los normales o los intervalos entre cada ciclo se alargan. En la presente investigación se encontró evidencia de un posible proceso de especiación simpátrica en la provincia de Bolívar que podría estar relacionado a cambios en las conductas sexuales como las anteriormente mencionadas.

Este tipo de comportamientos (movimientos en las alas y sonidos de apareamiento) en ciertas ocasiones ejercen una selección sexual que deriva en cambios evolutivos, que aceleran la

especiación de poblaciones sin necesidad de estar geográficamente aisladas o de cambiar patrones de comportamiento alimenticio u hospederos (Marsteller, et al., 2009). Panhuis et al. (2001) mencionan en su estudio que los modelos clásicos de especiación en insectos se basan en diferencias en los rasgos sexuales tanto morfológicos como de conducta pero que también se presenta como resultado de pleiotropia, deriva génica o adaptación a ciertas condiciones ambientales. Se ha visto que los hábitos alimentarios de los flebótomos pueden ocasionar especiación, ya que cambian el hospedero o la fuente de azúcar, lo cual lleva a que haya menos interacción con otros individuos de la especie formando así dos poblaciones distintas. Por ejemplo algunos se adaptan a vivir en las copas de los árboles, mientras que otros permanecen en el sotobosque y se adaptan a la flora y fauna de esa área (Simsek, et al., 2007).

En el estudio de Drés & Mallet (2002) se mencionó que por lo menos tres cambios se observan cuando las especies se están especiando. El primero es el cambio en un carácter ecológico que determina como usan los recursos a su alrededor (ej. cambio en el aparato bucal), el segundo es el cambio en sus características que causan algún tipo de preferencia sexual (ej. color, forma y tamaño de las alas) y por último un cambio en algún carácter de apareamiento que determina si el emparejamiento es selectivo, no selectivo, o al azar. En general estos rasgos son controlados por varios loci, por lo que si se logra distinguir estos tres cambios lo más seguro es que están frente a un proceso de especiación.

En vectores primarios la estructura de las poblaciones está moldeada por su rango de dispersión (determinante clave para el flujo de genes) y abundancia (determinante clave para un tamaño de población efectiva). En general, se espera homogeneidad en las poblaciones ya que hay intercambio moderado de genes y por ende diversidad común entre los individuos, incluso en un amplio rango de distribución (Donnelly, et al., 2002). Sin embargo, se han reportado poblaciones de vectores que han sufrido algún tipo de efecto fundador ocasionado por el uso de insecticidas en el área, por un aislamiento geográfico temporal (construcción de carreteras), o por otras condiciones que obligan a la población a separarse por un tiempo de la población original. Estas nuevas poblaciones cambian ciertas características que hacen que a pesar de que ya no estén aisladas las poblaciones, éstas no se puedan agrupar como una sola población pero que tampoco sean consideradas especies distintas (Donnelly, et al., 2002).

Algo similar a lo mencionado anteriormente se encontró en la presente investigación, ya que dentro de Bolívar hay tres poblaciones distintas de *Ny. trapidoi* que se agrupan con ambos genes, lo que podría sugerir que están sufriendo un proceso de especiación. Sin embargo, no se puede afirmar que ya son subespecies o que ya no hay compatibilidad sexual entre las mismas; ya que se tendría que hacer algún experimento que muestre que no hay apareamiento o que los descendientes no son fértiles o viables, para afirmar este hecho.

Algo importante que hay que mencionar es que de los 45 especímenes de *Ny. trapidoi* analizados, el 45.45% correspondían a especímenes colectados en Bolívar, 34.1% a especímenes colectados en Manabí, el 13.6 % a especímenes colectados en Esmeraldas y 6,8% a especímenes provenientes de Paraíso Escondido. Al haber mayor abundancia de *Ny. trapidoi* en Bolívar se podría esperar que haya mayor variedad y polimorfismo en los individuos de esta zona. Bolívar puede que tenga las condiciones ambientales ideales para el crecimiento de esta especie, lo que ocasiona la mayor abundancia y diversidad.

La cuarta agrupación por su parte, involucra a especímenes de todas las provincias, sin embargo este grupo no está bien definido ni presenta una estratificación clara. Esto sugiere que las poblaciones de estas provincias no están expuestas a factores ambientales y biológicos que conduzcan a procesos de aislamiento reproductivo a pesar de la localización y el hábitat en el que se encuentran. Lo interesante de esta agrupación es que contiene individuos de Bolívar, lo que muestra que los especímenes de esta provincia no están aislados completamente sino que si hay cierta interacción con el resto del país. Por otra parte, los grupos 1, 3 y 4 comparten un ancestro común más reciente que el grupo 2.

La especiación alopátrica normalmente se da por aislamiento geográfico, o por sucesos como un cuello de botella o un efecto fundador fuerte, que resultan en deriva génica (Almond, 1982). En este caso el aislamiento geográfico podría ser la explicación a lo que está ocurriendo en la provincia de Bolívar. Esta provincia está conformada por la Hoya de Chimbo, un ramal de la Cordillera Occidental de los Andes con elevaciones que van desde los 3000 m.s.n.m hasta los 5000 m.s.n.m. (Yanchacaiza, M. 2007), que crea una barrera geográfica natural entre Bolívar y

las otras provincias, lo que podría dificultar la dispersión de *Nyssomyia trapidoi* y dar una posible explicación a la posible especiación encontrada en este estudio.

Por otro lado, los flebótomos tienen un rango de vuelo limitado lo que puede llevar a las poblaciones a especiarse, ya que al no volar distancias muy largas ni desplazarse con el viento pueden aislarse reproductivamente en una zona. Según un estudio realizado en 1974 por Chaniotis se encontró que el promedio de vuelo está en un radio de 57m, con pocos individuos llegando a un máximo de 200m. Este factor puede ocasionar que se vayan aislando las poblaciones porque la migración entre lugares va a ser baja y por ende se reproducirán solo entre los individuos del mismo lugar. Es decir, que la baja dispersión de los flebótomos y la presencia del relieve montañoso en Bolívar, podrían ser los motivos principales por el que en dicha provincia se está presenciando un posible proceso de especiación alopátrico.

En este estudio, se realizó también un análisis de diversidad genética con el programa Arlequin 3.5 que permite calcular la diversidad de haplotipos en base a las secuencias de genes analizados. Con ello se confirmó que algunos de los especímenes de las agrupaciones obtenidas por NJ y ML corresponden a un mismo haplotipo. Es decir que se refiere a un único ADN mitocondrial que se distingue de otra secuencia homóloga por al menos una sustitución nucleotídica o un cambio de aminoácido (Hoyos & Uribe, 2012). En este caso COI permitió mayor diferenciación entre individuos, discriminándolos de mejor manera e identificando más número de haplotipos.

Por otra parte, se calculó también la diversidad haplotípica (h), que para COI es de 0,9687 lo cual es bastante alto mientras que para CytB es de 0,8566. Sin embargo, la diversidad nucleotídica (π) en ninguno de los dos genes es alta (COI 0,11 y CytB 0,006), lo que indica que los cambios de nucleótidos en las secuencias no se repiten varias veces para cada sitio, sino que ocurren en muchos sitios pocas veces. Lo que además corrobora el número de sitios informativos encontrados que en ambos genes es bajo en comparación con los sitios polimórficos existentes.

Otra parte importante dentro de este trabajo, fue la detección de ADN de una región del kinetoplasto de Trypanosomatidae en las muestras analizadas. De 74 especímenes de *Ny. trapidoi*, 9 de ellos tuvo amplificación de este segmento, lo que equivale al 12.2%. Este

porcentaje es más alto que el encontrado por Kato et al. (2005) donde los flebótomos analizados presentaron presencia de ADN de Trypanosomatidae en el 1.7% (Chanchan) y el 5,9% (Alausi) respectivamente.

El kinetoplasto de DNA se ha visto que es un segmento ideal para el análisis de especies de la familia Trypanosomatidae, ya que está presente en un número de 10 000 copias por célula, en todas las especies que corresponden a esta familia. En el caso de *Leishmania* es muy utilizado ya que se conoce la secuencia para la mayoría de especies y existe una región variable que permite discriminar adecuadamente entre las mismas (Aransay & Scoulica, 2000). Sin embargo, la única manera de establecer la vía más segura para caracterizar una especie de *Leishmania* es el secuenciamiento, ya que la relación entre los géneros de la familia Trypanosomatidae es muy cercana (Kato, et al., 2007; Zapata, et al., 2012).

Los resultados del secuenciamiento de las 9 muestras indicaron que se trata de *Endotrypanum* y para identificar la especie se secuenció una región de ARN ribosomal de la subunidad pequeña de Trypanosomatidae que mostró que todos los especímenes tenían presencia de *Endotrypanum monterogeei*, no *Leishmania*. En un estudio realizado por Kato et al. (2007) se encontró que *Lu. hartmanni* tenía presencia de ADN de *Endotrypanum* en zonas endémicas de leishmaniasis. Zapata et al. (2012) encontraron 11.5% de *Ny. trapidoi* infectadas con ADN de *Endotrypanum monterogeei* en Paraíso Escondido. En ambos estudios se esperaba presencia de ADN de *Leishmania* ya que las muestras se recolectaron en zonas donde se reportan frecuentemente casos de leishmaniasis.

Leishmania y *Endotrypanum* son los géneros más cercanamente relacionadas de la familia Trypanosomatidae (Kato, et al., 2007). Tanto así, que algunas especies que fueron consideradas *Leishmania* (*L. hertigi*, *L. deanei*, *L. colombiensis* y *L. equatoriensis*), posteriormente se clasificaron como especies de *Endotrypanum* (Katakura, et al., 2003).

Tanto *Endotrypanum* como *Leishmania* son transmitidos por flebótomos del género *Lutzomyia* (Silveira, et al., 1998). En la actualidad, dos especies han sido reconocidas en el país, *E. schaudinni* y *E. monterogeei* (Silveira, et al., 1998). En los bosques neotropicales de Brasil,

Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guyana Francesa y Panamá se encontró que en un mismo hospedador vertebrado (perezoso), puede haber infección con más de un parásito perteneciente a los tripanosomátidos, es decir que tanto *Endotrypanum* como *Leishmania*, pueden estar presentes en el animal (Ramos & Grimaldi, 1999). Esto determina que dentro de un mismo ecosistema pueden coexistir los distintos parásitos de esta familia. Además que reconstrucciones genéticas de Trypanosomatidae han demostrado que *Leishmania* y *Endotrypanum* están más cercanamente relacionados que otros organismos de esta familia (Ramos & Grimaldi, 1999), y que requieren de condiciones ambientales similares para su supervivencia.

Una de las mayores diferencias de estos dos parásitos es que mientras *Leishmania* es capaz de colonizar un rango amplio de mamíferos en el que se incluyen los humanos, las infecciones por *Endotrypanum* se dan únicamente en animales silvestres como los perezosos. Se han hecho ensayos dentro del laboratorio para forzar la infección de otros tejidos mamíferos con este parásito, pero ninguno ha sido exitoso (Silveira, et al., 1998).

Los organismos del género *Endotrypanum* son los únicos del grupo Kinetoplastida que infectan los eritrocitos de algunos mamíferos (Ramos & Grimaldi, 1999). A diferencia de *Leishmania*, no se ha encontrado evidencia que *Endotrypanum* tenga la capacidad de evitar su destrucción por macrófagos como lo hace *Leishmania*, lo cual podría justificar su corto rango de hospedadores. Se ha determinado que la supervivencia de *Leishmania* dentro de los macrófagos se debe a un lipofosfoliglicano de la superficie de este parásito y otros factores de virulencia como metaloproteasas GP63, cisteína proteasa B, y fosfolípidos glicosilinositolícos (Olivier, et al., 2012). Esta diferencia en las moléculas de superficie, seguramente determina que *Endotrypanum* no cause infección en los humanos y este restringido a los mamíferos del superorden Edentata (osos hormigueros, perezosos y armadillos) (Franco, et al., 2000).

Se ha reportado la presencia de *Endotrypanum* principalmente en perezosos de los géneros *Choloepus* y *Bradypus*, aunque no se conoce el efecto que este parásito tiene en estos animales, en algunas ocasiones se ve deformación en los eritrocitos pero no mayor efecto en la salud del animal (Silveira, et al., 1998; Gilmore, et al., 2001; Franco, et al., 2000).

En esta investigación se encontró presencia de ADN de *Endotrypanum* solamente en muestras provenientes de Bolívar, lo cual puede justificarse porque en esta provincia si se ha reportado presencia de perezosos (*Choloepus hoffmanni*) que son los hospederos naturales del parásito (Valderrama, et al., 2011; Caiza, 2013). Calvopiña et al. (2004) identificaron y aislaron parásitos del género *Endotrypanum* de perezosos en el bosque tropical en la zona del pacífico, este bosque presenta condiciones ambientales similares a los sitios de recolección por lo que la fauna en ambos lugares es parecida. La infección natural con promastigotes morfológicamente similares a *Leishmania* que pertenecen al género *Endotrypanum* ha sido observada también en otros flebótomos como *Lu. gomezi*, *Lu. hartmanni* y *Psy. panamensis* (Franco & Grimaldi, 1999; Katakura, et al., 2003; Calvopiña, et al., 2004; Valderrama, et al., 2011).

Como se puede ver los parásitos flagelados tienen un amplio rango de vectores por lo que la razón principal de no haber encontrado *Leishmania* en el presente estudio podría ser que en los lugares de muestreo *Ny. trapidoi* no es el vector principal sino algún otro flebótomo. El parásito como su vector tienen ciclos de vida que se ven influenciados por el ambiente. Por lo que otra razón de no haber encontrado *Leishmania* podría ser que el clima no favorecía al crecimiento de la población. Se ha determinado por ejemplo, que temperaturas muy altas hacen que la población disminuya (Chaves & Pascuala, 2006). *Psychodopygus panamensis* en este estudio se encontró en todos los sitios de muestreo y en altas proporciones por lo que se podría concluir que tal vez el vector en esas zonas en esa época del año es dicha especie.

Otra razón por la que podría no haberse detectado ADN de *Leishmania*, se debe a que en estudios anteriores las tasas de infección reportadas en poblaciones de flebótomos son bajas. Por ejemplo, en el artículo publicado por Santos da Silva & Grunewald (1999) se analizaron 920 especímenes en los cuales se reportó una tasa de infección del 0.3%. En otro estudio realizado en Ecuador se encontró una tasa de infección con ADN de *Leishmania* de 1.7% en un área cercana al río Chanchan y de 5.9% en el cantón Alausí (Kato, et al., 2005). En el presente estudio se analizaron 74 especímenes de *Ny. trapidoi* que representan una muestra muy pequeña en comparación a las investigaciones mencionadas; y por ende el tamaño de la población podría haber sido un limitante en la detección de este parásito.

En general, cabe mencionar que la distribución de la leishmaniasis está limitada a la distribución de los flebótomos y ligada a su comportamiento ya sea antropofílico o zoofílico (Vasquez, 2011). Cada nicho ecológico es único y el desarrollo del ciclo de transmisión de la leishmaniasis es multifactorial, siendo difícil proponer de manera definitiva un modelo predictivo para una zona (Vasquez, 2011). Como se muestra en el presente estudio, reportes sobre vectores y leishmaniasis antiguos no siempre muestran lo que ocurre actualmente. Es por esto que este estudio debe extenderse a más sitios de colección por provincia y al análisis de más de un posible vector.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se identificó 14 especies de flebótomos en las tres provincias analizadas (Bolívar, Esmeraldas y Manabí), estas especies han sido reportadas anteriormente en el país (CIPA, 2013). Manabí fue la provincia en la que se encontró mayor abundancia y diversidad en estos insectos, principalmente por la localización más distante entre los sitios de colección. *Pressatia dysponeta*, *Psychodopygus panamensis*, *Lutzomyia hartmanni* y *Nyssomyia trapidoi* fueron las especies más abundantes. Las tres últimas son vectores confirmados de leishmaniasis en el Ecuador por lo que son de importancia médica.

Por otro lado, se determinó la variabilidad genética de especímenes de *Ny. trapidoi* de las tres provincias (Manabí, Bolívar y Esmeraldas). En general no se encontraron agrupaciones claras en las provincias de Esmeraldas y Manabí. Sin embargo, en Bolívar hay agrupaciones bien determinadas que sugieren que en la zona se está dando algún tipo de especiación o aislamiento reproductivo en las poblaciones, tanto de convivencia simpátrica como alopátrica. Se ha visto que generalmente las poblaciones con un buen rango de dispersión tienen frecuencias genéticas similares, mientras que las poblaciones con baja dispersión tienden a aislarse (Donnelly, et al., 2002) por lo que se podría decir que en Bolívar los especímenes tienen un bajo rango de dispersión.

Por otro lado, el gen COI demostró ser más informativo que el gen CytB en el análisis de *Ny. trapidoi* ya que permitió mayor estratificación y diferenciación de los individuos. Esto se

corroborar con los 26 sitios informativos encontrados para COI en comparación a los 12 encontrados para el CytB.

No se encontró presencia de ADN de *Leishmania* en ninguna de las 74 muestras de *Ny. trapidoi* analizadas. Lo que sugiere que el vector en estas zonas endémicas de leishmaniasis seguramente es alguna otra de las especies encontradas. Otra razón podría ser que debido a las bajas tasas de infección con *Leishmania* anteriormente reportadas, la cantidad de especímenes utilizada en esta investigación fue insuficiente para la detección de este parásito.

Por otra parte, se halló 9 muestras con presencia de *Endotrypanum monterogeii*, este parásito es de la misma familia que *Leishmania* pero no se ha reportado que tenga como hospedero al ser humano, sino que se restringe a los mamíferos del superorden Edentata. Lo que propone que se colectó en zonas en las que hay presencia de estos animales.

10. RECOMENDACIONES

Para lograr un resultado más representativo se debería analizar una muestra más grande de *Ny. trapidoi* y tratar de incorporar especímenes de países cercanos como Colombia y Perú para observar si hay haplotipos similares a los presentes en el Ecuador. También se debería incorporar provincias cercanas a Bolívar como Los Ríos, Cotopaxi o Chimborazo para confirmar si hay o no la presencia de especímenes similares a los encontrados en las tres poblaciones de *Ny. trapidoi* de Bolívar que mostraron un posible proceso de especiación.

Por otro lado, se debería hacer colecciones entomológicas en diferentes periodos del año para ver cuando son los picos de transmisión de *Leishmania* y relacionarlos con los posibles vectores, además de entender como el cambio climático influye en la incidencia de la enfermedad en el país.

Como en el presente estudio no se encontró que *Ny. trapidoi* es el vector de *Leishmania panamensis* y *L. guaynensis* en las áreas de colección, se debería hacer la detección de ADN de kinetoplasto en las demás especies de flebotomos encontradas para detectar cuáles podrían ser

también vectores en estas zonas. En este caso hay que poner mayor atención en las especies *Psychodopygus panamensis*, *Lu. hartmanni* y *Lu. gomezi*, ya que tuvieron gran prevalencia en las zonas de recolección.

Un estudio muy interesante que se podría realizar es el establecimiento de colonias de flebótomos en laboratorio y realizar cruces controlados entre especímenes de Bolívar y de las otras provincias estudiadas, para observar si realmente las poblaciones han sufrido los suficientes cambios y son incapaces de reproducirse. También sería importante aislar las poblaciones dentro de Bolívar que presentaron diferenciación y ver si entre ellas hay aislamiento reproductivo.

Es necesario determinar si la especiación se está dando por cambios en características reproductivas ya sea morfológicas o de conducta, o si se están dando por cambios en la alimentación. Un análisis que debería realizarse es la amplificación del gen *cac* para ver si hay polimorfismo entre las poblaciones y determinar así que la especiación se está dando por cambios conductuales. En el caso de que esta no sea la explicación, se podría hacer un análisis del origen de la fuente de sangre para observar de qué se están alimentando las distintas poblaciones en Bolívar y ver si realmente la especiación observada es por cambios en la alimentación de los insectos. Para confirmar los resultados y comprobar que la especiación no es solo en genes mitocondriales (ya que estos tienen tasas de acumulación de mutaciones más elevadas), se podría complementar con el análisis de genes nucleares como el factor de elongación alfa o ITS2 (Zapata et al. 2012).

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, P., 2003. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3era ed. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud.

Alexander, B. & Usma, M., 1994. Potential sources of sugar of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia youngi* in a Colombian coffee plantation. *Ann tropical medicine parasitology*, 88(5), pp. 543-549.

Almond, W., 1982. A causal analysis of stages in allopatric speciation. *Oxford surveys in evolutionary biology*, Volumen 19, pp. 219-257.

Aransay, A. & Scoulica, E. T. Y., 2000. Detection and Identification of Leishmania DNA within Naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle Kinetoplastic DNA. *Applied and Environmental microbiology*, Volumen 66, pp. 1933-1938.

Artemiev, M., 1991. A classification of the subfamily Phlebotominae. *Parassitologia*, Volumen 33, pp. 69-76.

Azpura, J., De la Cruz, D. & Valderama, A. y. W. D., 2010. *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLOS*, Volumen 4.

Bañuls, A. y otros, 1999. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador are *Leishmania panamensis* and *Leishmania guyanensis* distinct taxa. *American society of tropical medicine and hygiene*, Volumen 61, pp. 838-845.

Barreto, M., Burbano, M. & Barreto, P., 1997. Nuevos registros de flebotominos (Diptera: Psychodidae) y triatomos (Hemiptera: Reduviidae) para Risaralda, Cauca y Valle del Cauca, Colombia. *Colombia médica*, 28(3), pp. 116-122.

Beati, L., Caceres, A., Lee, J. & Munstermann, L., 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies of Peru and Colombia based on the analysis of 12s and 28s ribosomal DNA sequences.. *Internal parasitology*, Volumen 34, pp. 225-234.

Bejarano, E., 2000. Estructura poblacional y variabilidad genética en vectores de leishmaniosis *Lutzomyia* spp.. *Latreia*, 13(109).

Bejarano, E., 2001. Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniosis: utilidad de los genes mitocondriales. *Biomédica*, Volumen 21, pp. 182-191.

Berloches, S., 1984. Insect molecular systematics. *annual review of entomology*, Volumen 29, pp. 403-433.

Berman, J., 1997. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical infectious diseases*, Volumen 24, pp. 684-703.

Caiza, R., 2013. *Plan de desarrollo turístico para el cantón de Echandía, Provincia de Bolívar, Riobamba*: Escuela superior politécnica de Chimborazo.

Calvopiña, M., 2010. Leishmaniasis en Ecuador. *Revista Facultad de Ciencias Médicas Universidad Central del Ecuador*, Volumen 35, pp. 6-7.

Calvopiña, M., Armijos, R. & Hashiguchi, Y., 2004. Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador. Current status of knowledge. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Volumen 99, pp. 663-672.

Calzada, J. y otros, 2013. Changes in Phlebotomine Sand Fly species composition following insecticide thermal fogging in a rural setting of western Panama. *PLOS One*, Volumen 8.

Caterino, M., Cho, S. & Sperling, F., 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of babel. *annual revision entomology*, Volumen 45, pp. 1-54.

CDC, 2013. *Leishmaniasis*. [En línea] Available at: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> [Último acceso: 28 10 2013].

CFSPH y IICAB, 2010. *Estomatitis vesicular*. [En línea] Available at: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/estomatitis_vesicular.pdf [Último acceso: 18 Agosto 2013].

Chaniotis, B., 1974. Sugar feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* under experimental conditions. *Journal of medical entomology*, Volumen 11, pp. 73-79.

Chaves, L. & Pascuala, M., 2006. Climate cycles and forecast of cutaneous leishmaniasis, a nonstationary vector borne disease. *Plos Meidine*.

Christensen, K., 2003. *Population genetics*. segunda ed. s.l.:Oxford University Press.

CIPA, 2013. *Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America*. [En línea] Available at: <http://cipa.snv.jussieu.fr/cgi-bin/cipaexplorer.pl?card=repository&db=cipa&id=7&lang=fr> [Último acceso: 18 Diciembre 2013].

Claborn, D., 2010. The biology and control of leishmaniasis vectors. *Journal of global infectious diseases*, 2(2), pp. 127-134.

Clare, E., Lim, B., Fenton, M. & Hebert, P., 2011. Neotropical bats: estimating species diversity with DNA barcodes. *Plos One*, Volumen 6.

Clark, G., Martin, D. & Diamond, L., 1995. Phylogenetic relationship among Anuran Trypanosomes as revealed by ribotyping. *Entomological Microbiology*, 42(1), pp. 92-96.

Contreras, M., 2013. *Lutzomyia spp en zonas cafeteras de la region andina colombiana: taxonomia e importancia médica*. Universidad Nacional de Colombia.

Coral, R., Slamanca, F. & y Buentello, L., 1995. Aportacion del ADN mitocondrial en el estudio filogenético de las poblaciones indígenas de América. *Antropología médica*, Volumen 32.

Davies, C. y otros, 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad. Saúde Pública*, Volumen 16, pp. 925-950.

DeVienne, D., 2003. *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Versailles: Science publishers INC.

Dias, E. y otros, 1998. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Lutzomyia longipalpis* laboratory population. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 40(1), pp. 49-53.

- Donnelly, M., Simard, F. & Lenhmann, T., 2002 . Evolutionary studies of malaria vectors.. *Trends in parasitology. Elsevier.* , 18(2).
- Drés, M. & Mallet, J., 2002. Host races in plan-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *The royal society*, Volumen 357, pp. 471-492.
- Dvorak, V. y otros, 2006. A comparison of the intraspecific variability of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917. *Journal of vector ecology*, 31(2), p. 229.
- Esseghir, S., Ready, P., Killick-Kendrick, R. & Ben-Ismail, R., 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology*, 6(3), pp. 211-225.
- Essenahir, S., Ready, P. & Ben-Ismail, R., 2000. Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larrousius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the mediterranean subregion. *Biol. J. Linn Soc*, Volumen 69.
- Feitosa, M. & Castellón, E., 2006. Fauna de flebotomíneos em fragmentos de floresta ao redor de conjunto habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. *Estratificacao Vertical. Acta Amazonica*, 36(4), pp. 539-548.
- Feliciangeli, M., 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandfly. *Medical veterinary entomology*, Volumen 18, pp. 71-80.
- Franco, A. & Grimaldi, G., 1999. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree sloths. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(2), pp. 261-268.
- Franco, A., Machado, G., Moreira, C. & Grimaldi, G., 2000. Minicircle kDNA microheterogeneity in *Endotrypanum* indicate diversity within this Genus. *Mem Innst Oswaldo Cruz*, 95(2), pp. 189-191.
- Fries, D., 2013. Estaciones climáticas en el Ecuador. *Revista Perspectivas*, Volumen 6.
- Galati, E., 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae with emphasis on American groups.. *Bol. Dir Malariol. Saneamient ambient.* , Volumen 35, pp. 133-142.

Galati, E., 2010. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos.. *Apostila Disciplina HEP 5752. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Departamento de Epidemiologia. Facultad de Salud Pública de São Paulo, Brasil Press.*, Volumen 1.

Gilmore, D., Da Costa, C. & Duarte, D., 2001. Sloth biology: an update on their physiological ecology, behavior and role as vectors of arthropods and arboviruses. *Barzilian journal of medical and biological research*, Volumen 34, pp. 9-25.

Gómez, M. y otros, 2012. Leishmaniasis mucocutánea diseminada. *Revista Argentina de Dermatología*, Volumen 62, pp. 193-196.

Hajibabaei, M. y otros, 2005. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *PNAS*, 106(4), p. 968–971.

Hashiguchi, Y., 2001. Studies on new world leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador. *Kyowa printing and Co*, Volumen 6.

Holsinger, K., 2012. *Population Genetics*. Connecticut: Department of Ecology & Evolutionary Biology, U-3043.

Hoyos, R. & Uribe, S. y. V. I., 2012. Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) mediante "Código de Barras". *Revista Colombiana de entomología*, Volumen 38, pp. 134-140.

Hugh, M. & Hubbert, W. y. H. H., 2000. *Zoonoses*. Iowa: Iowa State Press.

Irwin, N. & Janssen, K., 2001. *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3era ed. Nueva York: Ferdowsi University of Mashhad.

Jones, L. y otros, 2010. New records of Phlebotomine sand flies from Ecuador. *Proceedings of the entomological society of Washington*, Volumen 112, pp. 47-53.

Katakura, K. y otros, 2003. Identification of *Endotrypanum* species from sloth, a squirrel and *Lutzomyia* sandflies in Ecuador by PCR amplification and sequencing of the mini exon gene. *J. Vet. Med. Sci*, 65(5), pp. 649-653.

Kato, H. y otros, 2010. Molecular Epidemiology for vectors research on Leishmaniasis. *International Journal of environmental research an public health*, Volumen 7, pp. 814-826.

Kato, H. y otros, 2008. Short Report: Natural Infection of *Lutzomyia tortura* with *Leishmania* (Viannia) *naiffi* in an Amazonian area of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(3), pp. 438-440.

Kato, H. y otros, 2007. Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for leishmania infection by molecular biological methods. *Am. J. Trp. Med. Hygiene*, 77(2), pp. 324-329.

Kato, H. y otros, 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the andean areas of Ecuador by PCR. *Am. J. Trop. Hygiene*, 72(1), pp. 87-93.

Kieleczawa, I., 2006. DNA Sequencing II optimizing preparation and cleanup. *Jones and Barlett Publishers*, pp. 49-53.

Killicdk-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinical dermatology*, 17(3), pp. 279-289.

Killick-Kendrick, R., 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and veterinary entomology*, Volumen 4, pp. 1-24.

Lainson, R. & Shaw, J., 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in latin america. *Macmillan Journals LTD*, 273(5664), pp. 595-600.

Lainson, R. & Shaw, J., 1987. *Evolution, classsification and geographical distribution of leishmania*. 1 ed. Londres: Killick- kendricks.

Lainson, R. S. J., 2002. New World Leishmaniasis: The Ecology of Leishmaniasis and the Diversity of Leishmanial Species in Central and South America. *World Class Parasites*, pp. 11-31.

Lanteri, A., Loiacono, M. & . Margaria, C., 2002. Aporte de la biología molecular a la conservación de los insectos. *MARCO SISTEMÁTICO DEL PROYECTO PRIBES*, pp. 207-220.

Levi, R., 1958. Provisional list of the Culicidae, Simuliidae, Phlebotomus and Culicoides of Ecuador. *Proceedings tenth international congress of entomology*, Volumen 3.

Lewis, D., 1977. Proposal for stable classification of phlebotomine sand flies. *Systematic entomology*, 319-332

Maingon, R. y otros, 2003. Genetic identification of two sibling species of *Lutzomyia longipalpis* that produce distinct male sex pheromones in Sobral, Ceará, Brazil. *Molecular ecology*, Volumen 12, pp. 1879-1894.

Marsteller, S., Adams, D., Collyer, M. & Condon, M., 2009. Six cypric species on a single species of host plant: morphometric evidence for possible reproductive character displacement. *The royal entomological society: Ecological entomology*, Volumen 34, pp. 66-73.

Mascari, T., 2008. Novel methods for the control of phlebotomine sand flies. *Tesis de doctorado. Universidad de Londres*.

Ministerio de Protección Social, 2011. *Guía de atención de la leishmaniasis*. 11 ed. Antioquia: Edimeco.

Ministerio de Salud Pública, 2013. *Anuario de vigilancia epidemiológica de enfermedades de la piel*. [En línea] Available at: http://public.tableausoftware.com/views/piel/CASOSPORPROVINCIA?:embed=y&:display_count=no

[Último acceso: 18 agosto 2013].

Montoya-Lerma, J. & Ferro, C., 1999. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. En: *Insector de Colombia. Volumen II*. Bogotá: Centro editorial Javeriano, pp. 211-245.

Mouchet, J., Le Pont, F., Echeverria, R. & Guderian, R., 1994. Leishmaniose en equateur. Leishmaniose et anthropisation sur la facade pacifique. *Ann. Soc Belge Med trop*, Volumen 74, pp. 35-41.

Munsterman, L., 2005. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. *Biology of disease vectors*. Elsevier, Volumen 2, pp. 141-151.

- Nei, M. & Kumar, S., 2000. Molecular evolution and phylogenetic. *Oxford University press Inc*
- Nicolas, L., Prina, E., Milon, G. & Lang, T., 2002. Real-Time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), pp. 1666-1669.
- Nicolas, V. y otros, 2012. Assessment of Three Mitochondrial Genes (16S, Cytb,CO1) for Identifying Species in the Praomyini Tribe (Rodentia: Muridae). *PLoS ONE*, 7(5).
- Nieves, E. & Pimenta, P., 2002. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania viannia Braziliensis* and *L eishmania Amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei*. *The american society of tropical medicine and hygiene*, 67(6), pp. 640-647.
- Noticias de Ecuador, 2012. *Mapas de la Provincia del Ecuador*. [En línea] Available at: <http://ecuadorecuatoriano.blogspot.com/2012/07/mapa-provincias-ecuador.html> [Último acceso: 28 10 2013].
- Odum, E., 1986. Fundamentos de ecología. En: s.l.:Interamericana, pp. 343-345.
- Oliveira, S. y otros, 2001. Courtship song genes and speciation in sand flies.. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* , 96(3), pp. 403-405.
- Olivier, M. y otros, 2012. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and infection*, Volumen 14, pp. 1377-1389.
- OMS, 2011. *Leishmaniasis en las Américas: Situación actual y desafíos para el control*. [En línea] Available at: http://new.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=992&itemid=888
- Orellana, P., 2012. Mosquitos Vectores de enfermedades. *Ministerio de Salud y ambiente de la nacion. Argentina* .
- Panhuis, T., Butlin, R., Zuk, M. & Tregenza, T., 2001. Sexual selection and speciation.. *Trends in Ecology and evolution*, 16(7).

- Parvizi, P. & Benlarbi, M. y. R. P., 2003. Mitochondrial and Wolbachia markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Medical and Veterinary Entomology*, Volumen 17, pp. 351-362.
- Pesante, D., 1992. Epidemiología de Enfermedades originadas por vectores. *Universidad de Puerto Rico - Recinto Universitario de Mayagüez*, pp. 1-26.
- Raboudii, F. y otros, 2004. Aphid species identification using cuticular hydrocarbons and cytochrome b gene sequences. *Blackwell Verlag JEN*, 129(2), pp. 75-80.
- Ramos, A. & Grimaldi, G., 1999. Characterization of *Endotrypanum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a unique parasite infecting the neotropical tree Sloths. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(2), pp. 261-268.
- Ready, P., 2000. Sand Fly Evolution and its relationship to Leishmania Transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Volumen 95, pp. 589-590.
- Ready, P., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual review of entomology*, Volumen 58, pp. 227-250.
- Restrepo, C. y otros, 2011. Amplified Fragment Length Polymorphisms reveals high intraspecific variability in field isolates of *Leishmania panamensis*. *Current trends in Biotechnology and Pharmacy*, Volumen 5, pp. 1183-1192.
- Rodriguez, J., 2009. *Caracterización preliminar de las proteínas activas de las glándulas salivales de Ny. trapidoi y L. gomezi vectores de Leishmaniasis cutanea*. Santander: Universidad Industrial de Santander.
- Rotureau, R. y otros, 2006. DIVERSITY AND ECOLOGY OF SAND FLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE:PHLEBOTOMINAE) IN COASTAL FRENCH GUIANA. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(1), pp. 62-69.
- Sangiorgi, B. y otros, 2012. Natural Breeding places for phlebotomine sand flies in a semiarid region of Bahia state, Brazil. *Journal of Tropical medicine*.

Sanjoba, C. y otros, 1999. Nucleotide sequence variations of the cytochrome c oxidase subunidad 1 gene within *Phlebotomus* species vectors insects for leishmaniasis. *International symposium of phlebotomine sandflies*, p. 33.

Sanofi, 2013. *Measurement of vectorial capacity and its significance*. [En línea] Available at: http://www.impact-malaria.com/web/malaria_training/vectorial_capacity_transmission_measurement_vectorial [Último acceso: 04 11 2013].

Santamaria, E., Ponce, M., Zipa, Y. & Ferro, C., 2006. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá piedemonte del valle del Magdalena Medio, Colombia.. *Biomédica; Instituto nacional de Salud Colombia*, Volumen 26, pp. 82-94.

Santos da Silva, O. & Grunewald, J., 1999. Contribution to the Sand Fly Fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania* infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Volumen 94(5) pp. 579-582.

Sharma, U. & Singh, S., 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal Vector Borne diseases*, Volumen 45, pp. 225-272.

Sierra, A., Vélez, U. & Uribe, S., 2000. Identificación de *Lutzomyia* spp grupo verrucarum por medio de microscopia electronica de sus huevos. *Biología tropical*, 48(2), pp. 615-622.

Silveira, X. y otros, 1998. Glycoinositol phospholipids from *Endotrypanum* species express epitopes in common with saccharide side chains of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *Biochemistry journal*, Volumen 329, pp. 665-673.

Simsek, F. A. B. y otros, 2007. Distribution and altitudinal structuring of phlebotomine sand flies in southern Anatolia, Turkey: their relation to human cutaneous leishmaniasis. *Journal of vector entomology*, 32(2), pp. 269-279.

Singh, R. & Kulathinal, R., 2000. Sex gene pool evolution and speciation: a new paradigm. *Genes Genet Syst*, 75(3), pp. 119-130.

- Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *TREE*, Volumen 15, pp. 199-205.
- Takaoka, H., Gómez, E., Alexander, J. & Hashiguchi, Y., 1990. Further studies on the natural infections of Ecuadorian sandflies (Diptera, Psychodidae) with *Leishmania* promastigotes.. *Journal of medical entomology*, Volumen 27, pp. 701-702.
- Tamura, k. y otros, 2012. *MEGA 5.2*. s.l.:s.n.
- Terán, R., 2006. *Caracterización de dos morfotipos encontrados en machos de Lutzomyia geniculata mediante marcadores morfométricos y moleculares*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Torgerson, D., Lampo, M., Velasquez, Y. & Woo, P., 2003. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia*. *Am. J. Trop. Med Hy*, 60(5), p. 454-493.
- Valderrama, A., M., H. & Salazar, A., 2008. Relación entre la composición de especies del género de *Lutzomyia* franca y los diferentes tipos de bosque en Panamá. *Acta zoológica mexicana*, 24(2), pp. 67-78.
- Valderrama, A., Tavares, M. & Dilermando, J., 2011. Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae) vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(8), pp. 1024-1031.
- Valenzuela, J. y otros, 2001. Toward a defined anti leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine*, Volumen 194, pp. 331-342.
- Vasquez, A., 2011. Variación estacional de la abundancia y la infección con *Leishmania* spp. en flebótomos de un área rural de Villavicencio. *Universidad Nacional de Colombia*.
- Vigoder, F., Souza, N. & Peixoto, A., 2010. Copulatory courtship song in *Lutzomyia migonei*.. *Mem Inst Oswaldo Cruz*., 105(8), pp. 1065-1067.

Weigel, M. y otros, 1994. La leishmaniasis cutánea en la región subtropical del Ecuador: percepciones, conocimientos y tratammientos populare. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, Volumen 117, pp. 400-413.

Wobeser, G., 2007. *Disease in wild animals*. 2da ed. Nueva York: Springer.

Yanchacaiza, M., 2007. "*Sitios naturales de Bolívar para promover el ecoturismo de la provincia*". Universidad tecnológica equinoccial. Quito.

Young, D. & Duncan, M., 1994. *Guide to hte identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in mexico,west indies, central and south america (Diptera: Psychodidae)*. 54 ed. Florida: Memoirs of the american entomological institute.

Zapata, S. y otros, 2012. Morphometric and molecular characterization of the series Guyanensis (Diptera, Psychodidae, Psychodopygus) from the ecuadorian Amazon basin with the description of a new spercies. *Infection, genetics and evolution*, Volumen 12, pp. 966-977.

Zapata, S. y otros, 2012. A study of a population of Nyssomyia trapedoi (Diptera:Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasites and Vectors*, Volumen 144.

Zeledón, R., Murillo, J. & Guitierrez, H., 1985. Flebotomos antropofilicos y Leishmaniasis cutanea en Costa Rica. *Bol of sanit. Pana.*, Volumen 99.

12. TABLAS

TABLA 1. Reservorios Naturales De *Leishmania* (Nieves & Pimenta, 2002)

Nombre común	Nombre científico	Parásito
Perezoso de dos dedos	<i>Choloepus hoffmani</i>	<i>L. (Viannia) panamensis</i>
Perezoso de tres dedos	<i>Bradypus griseus</i>	<i>L. (Viannia) panamensis</i>
Rata espinosa	<i>Proechimys sp</i>	<i>L. (Viannia) brazilensis</i>
Mapache	<i>Procyon sp</i>	<i>L. amazonensis</i>
Ratón silvestre	<i>Melanomys caliginosus</i>	<i>L. (Viannia) panamensis</i>
Ratón enano	<i>Microryzomys minutus</i>	<i>L. (Viannia) panamensis</i>
Rata	<i>Ratus rattus</i>	<i>L. (Viannia) panamensis</i>
Conejo de páramo	<i>Sylvilagus brazilensis</i>	<i>L. (Viannia) brazilensis</i>
Perro	<i>Cannis familiaris</i>	<i>L. (Viannia) panamensis,</i> <i>Leishmania peruviana</i>

TABLA 2. Clasificación de Flebótomos según Young y Duncan (1994)

Género	Sub-género	Grupo de especies
<i>Lutzomyia</i>	<i>Lutzomyia</i>	
	<i>Sciopemyia</i>	<i>Migonei</i> <i>Verrucarum</i> <i>Delpozoi</i>
	<i>Coromyia</i>	
	<i>Dampfomyia</i>	<i>Saulensis</i>
	<i>Pintomyia</i>	
	<i>Pressatia</i>	<i>Baityi</i>
	<i>Evandromyia</i>	
	<i>Viannamyia</i>	<i>Rupicola</i>
	<i>Psathyromyia</i>	<i>Aragoi</i> <i>Lanei</i> <i>Deishbachi</i>
	<i>Trichopygomyia</i>	
	<i>Nyssomyia</i>	
	<i>Trichophoromyia</i>	
	<i>Psychodopygus</i>	
	<i>Micropygomyia</i>	<i>Pilosa</i> <i>Oswaldoi</i>
	<i>Helcocyratomyia</i>	

TABLA 3. Clasificación de los flebótomos en América propuesta por Galati (2010)

Subtribu	Género	Sub-género	Serie	Grupo de especie
Sergentomyiina	<i>Sergentomyia</i> <i>Deamenyia</i> <i>Micropygomyia</i>	<i>Sylvamyia</i> <i>Sauromyia</i> <i>Coquilletimyia</i> <i>Micropygomyia</i>	Oswaldoi Autroclavata Vexator Chiapanesis Cayennensis Pilosa	
Lutzomyiina	<i>Sciopemyia</i> <i>Lutzomyia</i> <i>Migonemyia</i> <i>Pintomyia</i> <i>Dampfomyia</i> <i>Exapapillata</i> <i>Pressatia</i> <i>Trichopygomyia</i> <i>Evandromyia</i>	<i>Helcocyrtomyia</i> <i>Castromyia</i> <i>Tricholateralis</i> <i>Lutzomyia</i> <i>Migonemyia</i> <i>Blancasmyia</i> <i>Pintomyia</i> <i>Pifanomyia</i> <i>Coromyia</i> <i>Dampfomyia</i> <i>Aldamyia</i> <i>Evandromyia</i> <i>Barrettomyia</i>	Pacae Monicola Pia Verrucarum Evansi Serrana Townsendi Infraespinosa Saulensis Rupicola Tupynambai Monstruosa Cortelezzii	<i>Delpozoi</i>
Psychodopygina	<i>Psathyromyia</i> <i>Viannamyia</i> <i>Martinsmyia</i> <i>Bichromomyia</i> <i>Psychodopygus</i> <i>Nyssomyia</i> <i>Trichophoromyia</i>	<i>Foratinella</i> <i>Xiphomyia</i> <i>Psathyromyia</i>	Lanei Shannoni Arturi Davisi Panamensis Guyanensis Chagasi Bispinosus	<i>Alphabetica</i> <i>Gasparviannai</i>

TABLA 4. Datos obtenidos del Ministerio de Salud del Ecuador (2013) sobre Incidencia de Leishmaniasis en las distintas provincias del país en los años 2001-2012

Provincia	2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Azuay	9	4,9	1	0,58			16	9,06	6	0,93	1	0,15	7	1,05	6	0,87	4	0,58	4	0,58	1	0,13	2	0,26
Bolivar	68	37	52	2,99	91	51,7	175	99,1	189	107	107	60,1	36	20,1	82	45,2	62	34,1	129	71	73	37,69	74	37,81
Carchi			3	1,91	1	0,63									6	3,57	7	4,17	9	5,36	4	2,31	2	1,14
Cañar			3	1,41	4	1,86	30	13,8	18	8,23	11	4,98	8	3,58	4	1,75	14	6,12	3	1,31	5	2,08	3	1,23
Chimborazo	20	4,68	14	3,39	15	3,58	12	2,84	15	3,51	15	3,47	20	4,57	12	2,67	2	0,45	1	0,22	12	2,49	14	2,88
Cotopaxi	25	8,24	29	8,13	23	6,37	37	10	38	10,1	25	6,5	15	3,83	7	1,71	5	1,22	21	5,14	15	3,48	7	1,6
El Oro	8	1,43	12	2,22	22	4,02	23	4,11	5	0,87	9	1,54	11	1,85	19	3,06	40	6,45	23	3,71	13	2,05	6	0,93
Esmeraldas	429	103	276	69,7	265	66	692	169	446	107	217	51,2	125	29	241	54	225	50,4	127	28,8	122	21,72	207	36,23
Galápagos																								
Guayas	30	0,88	26	0,77	26	0,73	49	1,41	26	0,74	72	2,03	23	0,64	13	0,38	27	0,8	17	0,5	9	0,23	3	0,08
Imbabura	6	1,82	17	4,84	43	12,1	26	7,15	30	8,06	60	15,8	63	16,2	44	10,8	74	18,2	92	22,6	51	12,15	28	6,57
Loja	3	0,7	10	2,41			3	0,71	1	0,24	10	2,34	2	0,46	1	0,23	1	0,23	2	0,46	1	0,21	5	1,04
Los ríos	39	5,88	41	6,13	35	5,16	66	9,56	59	8,39	55	7,68	63	8,65	78	10,3	33	4,37	110	14,6	35	4,28	47	5,66
Manabi	504	39,8	125	10,2	402	32,4	585	46,7	350	27,6	96	7,49	81	6,24	120	9,01	220	16,5	101	7,59	55	3,83	59	4,06
Morona	53	37	143	11,9	25	20,5	113	91,2	107	85,1	156	122	183	141	145	109	175	131	140	105	268	170,1	215	132,76
Napo	34	4,1	51	6,2	46	55,2	55	64	39	44	39	42,8	48	51,4	40	40,6	43	43,7	59	59,9	74	67,57	53	47,26
Pastaza	61	98,2	23	35,9	4	6,16	16	23,8	17	24,5	29	40,5	41	55,8	46	59,1	54	69,4	46	59,1	54	60,64	49	53,44
Pichincha	343	13,9	286	11,6	196	7,84	415	16,4	384	14,9	386	14,8	242	9,14	393	16,4	393	16,4	353	14,7	239	8,78	281	10,11
Sucumbios	36	24,9	26	19,5	18	13,3	33	23,4	45	30,6	65	12,6	65	41,3	74	43,9	60	35,6	68	40,3	53	23,48	41	21,48
Tungurahua	1	0,22																						
Zamora	36	34,9	68	84,9	65	80,1	94	115	54	65,3	65	77,7	36	42,5	27	31,2	42	48,5	92	106	128	131,05	50	49,92
Orellana	49	68,7	47	52,6	55	60,7	54	56,9	96	96,8	118	115	116	109	121	106	140	122	133	116	113	80,33	246	171,52
Sto. Domingo																	114	34,9	99	30,3	59	15,24	120	30,37
Sta. Elena																					1	0,31		
Total	1754	14,1	1253	9,9	1336	10,4	2494	19,2	1925	14,6	1536	11,5	1185	8,71	1479	10,7	1735	12,6	1629	11,6	1385	9,07	1512	9,74

C= número de casos ; T= tasa de incidencia (por 100.000 habitantes)

TABLA 5. Ubicación geográfica de los sitios de colección de *Flebótomos* en la presente investigación

Sitios de colección	Cantón	Provincia	Altitud Msnm	Latitud	Longitud	Tipo de ecosistema
Santo Domingo de Onzole	Eloy Alfaro	Esmeraldas	220	N00°48.112'4''	W 79°04.154'31''	Bosque Secundario Siempreverde de Tierras Bajas de la Costa; clima tropical-húmedo.
Reciento La Tablada	Atacames	Esmeraldas	150	N00°44'16.49''	W 79°57'38.34''	Bosque Secundario Siempreverde de Tierras Bajas de la Costa; clima tropical-húmedo
Caserío La Mina	Pedernales	Manabí	254	N 00° 1' 59.15"	W 79° 57' 4.3482"	Bosque Secundario Siempreverde de Tierras Bajas de la Costa; clima subtropical-húmedo
Caserío Murucumba	Junín	Manabí	165	N00° 55' 0.11"	W 80° 8' 2.565"	Bosque Secundario Siempreverde de Tierras Bajas de la Costa; clima subtropical-seco
Caserío Agua Sucia	El Carmen	Manabí	298	N 00° 13' 32.7"	W 79° 22' 41.79"	Bosque Secundario Siempreverde de Tierras Bajas de la Costa; subtropical-húmedo
Recinto La Alsacia	Caluma	Bolívar	418	S1° 40' 16.17"	W 79° 14' 39.87"	Bosque Secundario Siempreverde Piemontano de la Costa. Clima subtropical-templado
Recinto El Congreso	Echandía	Bolívar	711	S 1° 22' 36.18"	W 79° 15' 39.085"	Bosque Secundario Siempreverde Piemontano de la Costa. Clima subtropical-templado

TABLA 6. Reacción de PCR para el segmento del gen mitocondrial CytB

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H ₂ O de PCR		23,5
Buffer	5X	10
MgCl ₂	25mM	4
Dntps	2mM	5
C3B	50mM	1
N1N	50mM	1
Taq	1.5U	0,5
ADN		5

TABLA 7. Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación del segmento gen mitocondrial CytB

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minuto	1
Desnaturalización cíclica	94°C	30 segundos	10
Primer annealing	40°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Desnaturalización cíclica	94°C	30 segundos	35
Segundo annealing	48°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minuto	1

TABLA 8. Reacción de PCR para el segmento del gen mitocondrial COI

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H ₂ O de PCR		27,5
Buffer	5X	10
MgCl ₂	25mM	3,6
Dntps	2mM	5
Lep F	50mM	1
Lep R	50mM	1
Taq	1.5U	0,5
ADN		5

TABLA 9. Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación del segmento gen mitocondrial COI

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minuto	1
Desnaturalización cíclica	94°C	30 segundos	5
Primer annealing	45°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Desnaturalización cíclica	94°C	30 segundos	35
Segundo annealing	52°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minuto	1

TABLA 10. Reacción de PCR para una región conservada de los minicírculos del Kinetoplasto de Tripanosomatidae

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H ₂ O de PCR		8,5
Buffer	5X	5
MgCl ₂	25mM	2,5
Dntps	2mM	5
JW11	50mM	0,375
JW12	50mM	0,375
Taq	1.5U	0,25
ADN		8

TABLA 11. Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación de una región conservada de los minicírculos del kinetoplasto de Tripanosomatidae

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minuto	1
Desnaturalización cíclica	94°C	1 minuto	30
Primer annealing	59°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	10 minuto	1

TABLA 12. Reacción de PCR para una región de ARN Ribosomal de la subunidad pequeña (SSU-rRNA) De Tripanosomatidae

Reactivos	Concentración	Volumen (ul)
H ₂ O de PCR		15,8
Buffer	1X	3
MgCl ₂	25mM	2,4
Dntps	2mM	1,8
KRD 3	50mM	0,48
KRD5	50mM	0,48
Taq	2.5U	0,14
ADN		6

TABLA 13. Condiciones utilizadas para PCR en el termociclador en la amplificación de una región de ARN Ribosomal de la subunidad pequeña (SSU-rRNA) de Tripanosomatidae

	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	3 minutos	1
Desnaturalización cíclica	94°C	1 minuto	30
Primer annealing	57°C	30 segundos	
Extensión	72°C	30 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

TABLA 14. Flebótomos recolectados mediante trampas de luz tipo CDC en tres provincias del Ecuador

Provincia	Sitios de colección	Machos	Hembras	Total
Esmeraldas	Santo Domingo de Onzole	215	306	521
	La Tablada			
Bolívar	Caluma	102	180	282
	Echandía			
Manabí	Junín	387	316	703
	Agua Sucia			
	La Mina			
Total		704	802	1506
Porcentaje		46,75%	53,25%	

TABLA 15. Especies de flebótomos identificadas de acuerdo con la clasificación de Galati (2012)

Especie	Esmeraldas	Porcentaje	Bolívar	Porcentaje	Manabí	Porcentaje
<i>Pressatia dysponeta</i>	126	65,6%	18	10,1%	63	38,4%
<i>Psychodopygus panamensis</i>	35	18,2%	14	7,9%	25	15,2%
<i>Nyssomyia trapidoi</i>	6	3,1%	48	27,0%	20	12,2%
<i>Lutzomyia hartmanni</i>	9	4,7%	47	26,4%	10	6,1%
<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i>	0	0,0%	35	19,7%	2	1,2%
<i>Lutzomyia gomezi</i>	4	2,1%	13	7,3%	19	11,6%
<i>Sciopemyia sordellii</i>	5	2,6%	0	0,0%	10	6,1%
<i>Psathyromyia shannoni</i>	2	1,0%	2	1,1%	7	4,3%
<i>Pintomyia serrana</i>	1	0,5%	0	0,0%	5	3,0%
<i>Trichophoromyia reburra</i>	1	0,5%	1	0,6%	1	0,6%
<i>Psathyromyia aragoi</i>	1	0,5%	0	0,0%	1	0,6%
<i>Lutzomyia tortura</i>	1	0,5%	0	0,0%	0	0,0%
<i>Evandromyia saulensis</i>	1	0,5%	0	0,0%	0	0,0%
<i>Psathyromyia barrettoi majuscula</i>	0	0,0%	0	0,0%	1	0,6%
Total	192		178		164	

TABLA 16. Índices de polimorfismo dentro de la población de *Ny. trapidoi*, analizados en base a los dos genes mitocondriales (CytB y COI)

	CytB	COI
Tamaño de la secuencia	511pb	685pb
Número de secuencias	45	45
Número de haplotipos	24	36
Diversidad Haplotípica	0.8566	0.9687
Diversidad Nucleotídica	0.006296	0.112732

13. FIGURAS

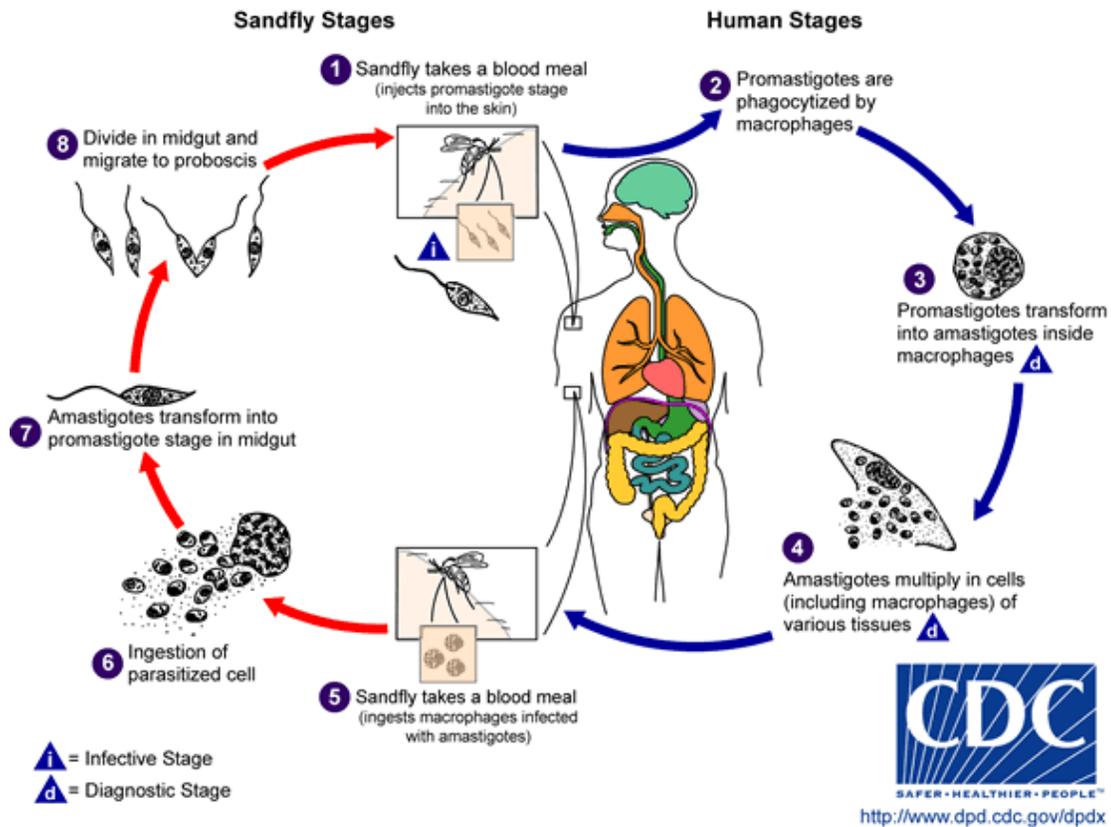


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Leishmania* (CDC, 2013)

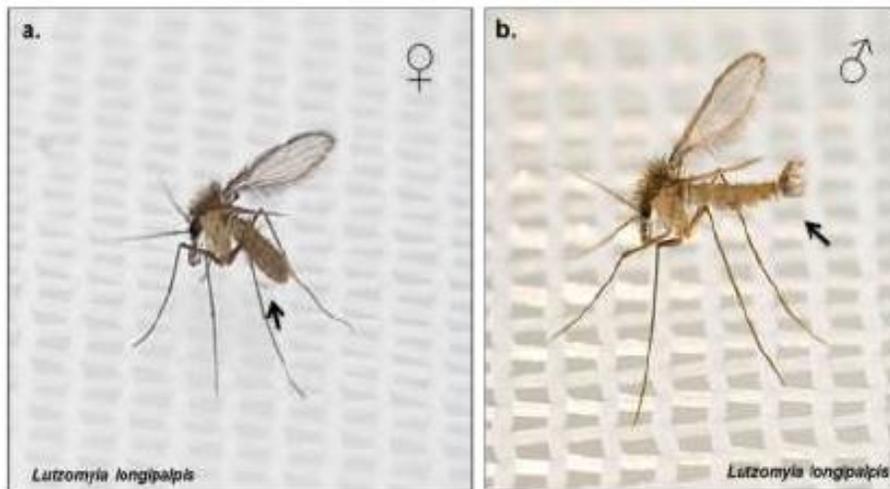


FIGURA 2. Morfología externa de flebótomos adultos. a. Representa una hembra de *Lutzomyia Longipalpis* y b. Un macho de *Lu. Longipalpis* (Contreras, 2013)



FIGURA 3. Distribución geográfica de *Nyssomyia Trapidoi* en Sur América. (Young & Duncan, 1994)



FIGURA 4. Mapa del Ecuador con los sitios de colección. 1. Santo Domingo de Onzole. 2. La Tablada 3. La Mina 4. Agua Sucía 5. Murucumba 6. Echandía 7. Caluma. Editado sobre Mapa Base Ecuador (Noticias del Ecuador, 2012).

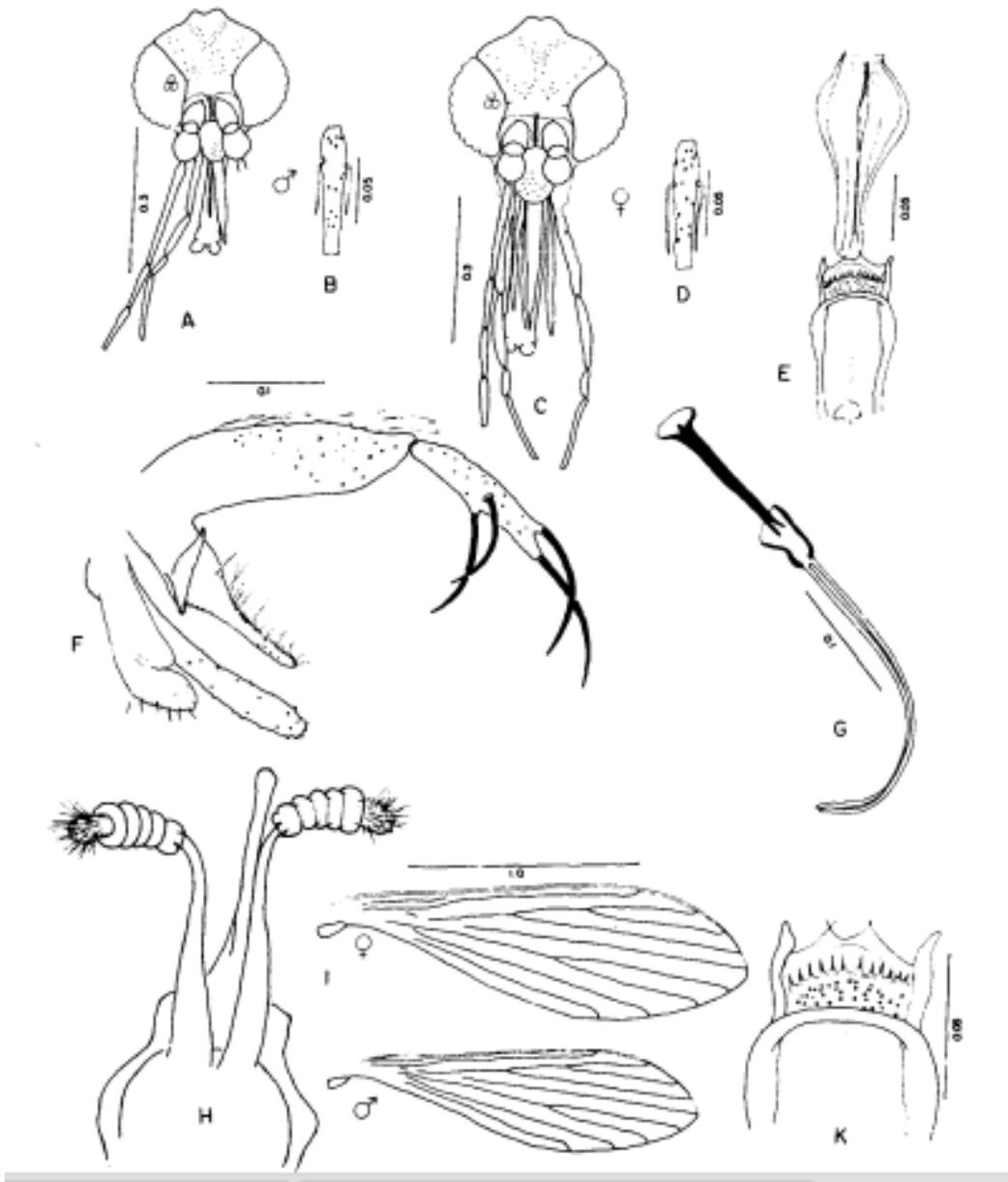


FIGURA 5. Características morfológicas de *Ny. trapidoi* para su identificación taxonómica. A. Cabeza de un macho B. Flagelómeros de macho C. Cabeza de hembra D. Flagelómeros de hembra. E. Cibario F. Terminalia masculina G. Bomba y filamentos genitales H. Espermateca I. Ala de hembra J Ala de macho K. Cibario de hembra (Young y Duncan, 1994)

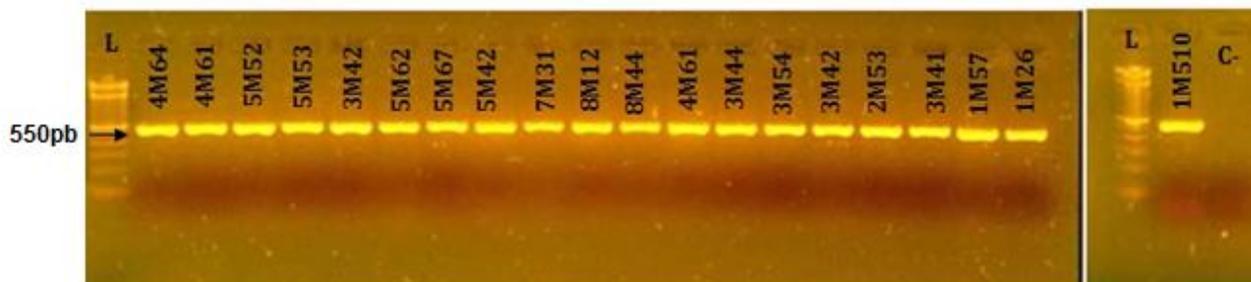


FIGURA 6. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del gen CytB de 20 muestras de Manabí. Estándar de tamaño (L) es de 100pb.

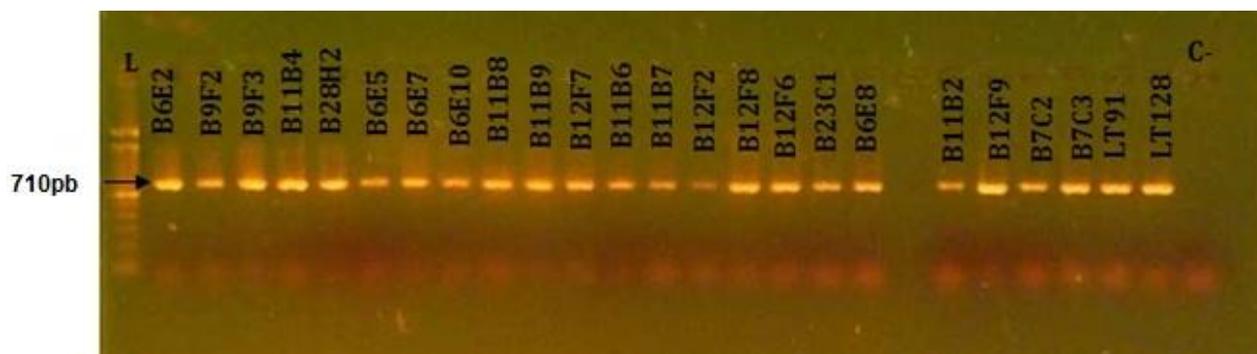


FIGURA 7. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de un segmento del gen COI de 22 muestras de Bolívar y 2 de Esmeraldas. Estándar de tamaño (L) es de 100pb.

A)	1222233444 235012211778 127762802342	B)	11112233333344556666 13577900492203457824124467 36424403267921389878133991
1M26	TTGCTATAACCAT	1M26	GTGTTTACCGTACATCCCTGATACTA
3M41	1M510
3M54	5M42
E41	3M54
4M61	5M62
4M64	7M31
5M42	8M44
5M52	E41
5M53	LT91
5M62	LT128
5M67	B9F3
7M31	4M64-
E81	5M52-
8M12	3M41-
8M44	E71-G..A...C...C.GCG...
B7C3_pos	B11B2-G..A...C...C.GCG...
B9F3	P001	.C...-G..A...C...C.GC....
P038	P038-G..A...TC...C.GCG...
P138	P138-G..A.....TC.GCG...
ELT91	KE1163-NICARAGUA	..A.-G..A.G.....C.....
ELT128	B12F7_POS	..A.-GT...TG.TT...GC.T..
ELT211C.	B12F2-GT.A..TG.T...GC....
1M510C.	B11B4-GT...TG.T...GC.TA.
P001G.....C	B12F6_POS-GTT..GTG.T...A.C.T..
B11B6G.....	B12F8-GTT..GTG.T...A.C.T..
B11B7_posG.....	B12F9-GTT..GTG.T...A.C.T..
B11B8G.....	B9F2-GTT..GTG.T...A.C.T..
B12F2	A.....	B6E7-GTT..GTG.T...A.C.T..
B12F7_pos	A.A.....	B6E8-GTT..GTG.T...A.C.T..
B11B4	A.A.....	B28H2_POS	..AC-CGT.....T..A.C....
B11B9	ACA.....	B6E10	..AC-CGT.....T..A.C....
B6E7	A.....C.T..	B6E5_POS	..AAC-CGT.....T..A.C....
B6E8	A.....C.T..	B6E2	..ACACGT.....T..A.C....
B12F6_pos	A.....C.T..	B11B7_POS	.GA.-CGT.AC...C...A.GC....
B12F8	A.....C.T..	B11B8	.GA.-GT.AC...C...A.GC....
B9F2C.T..	B11B6	...CA.G..AC...C...C.GC....
B12F9	AA.....C.T..	3M44	A.....G...T.....T
E71	.A.....	5M53	A.....T.....T
B28H2_posG..T.T..	LT211	.A.....T.....T
B6E2G..T.T..	E81T.....T
B6E5_posG..T.T..	4M61T.....T
B6E10G..T.T..	5M67T.....T
KE1163-Nicaragua	..AT.....C	B7C3_POSA.....
3M44	...T.....	8M12A.

FIGURA 8. Variabilidad nucleotídica encontrada en las secuencias de ADN alineadas. a) CytB mtDNA (511 bp) y b) COI mtDNA (685 bp). Las bases que son idénticas se representan con un punto. Las inserciones y deleciones se representan con un guión. Los números de la parte superior indican la posición del nucleótido en la secuencia.

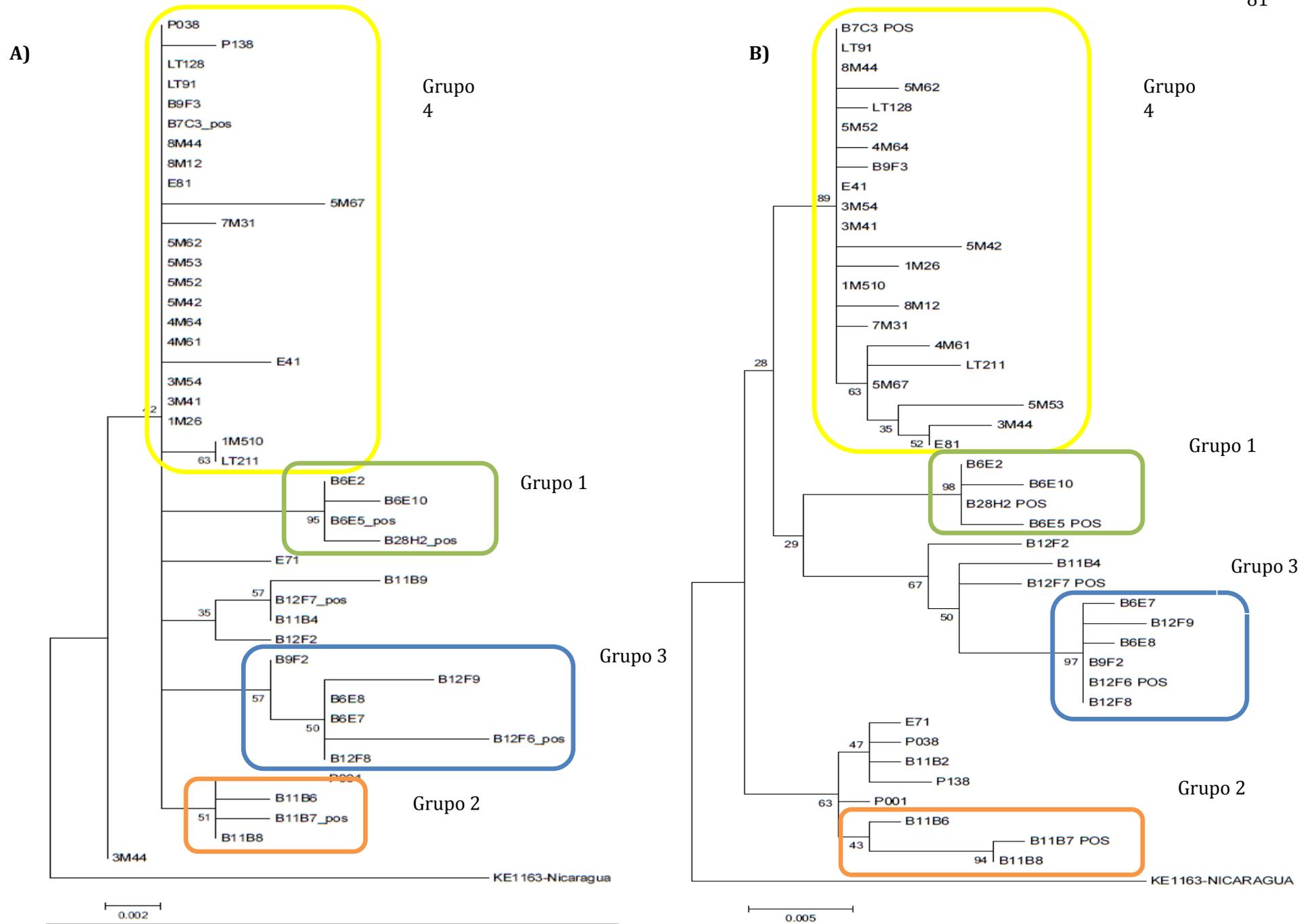


FIGURA 9. Árboles filogenéticos obtenidos por un análisis nucleotídico con el método Maximum Likelihood. A) CytB mtDNA y B) COI mtDNA. Se analizaron un total de 45 muestras de *Ny. trapidoi*. Los valores de bootstrap se encuentran en los nodos (500 réplicas). M, Manabí; B, Bolívar; LT y E, Esmeraldas; P, Pichincha

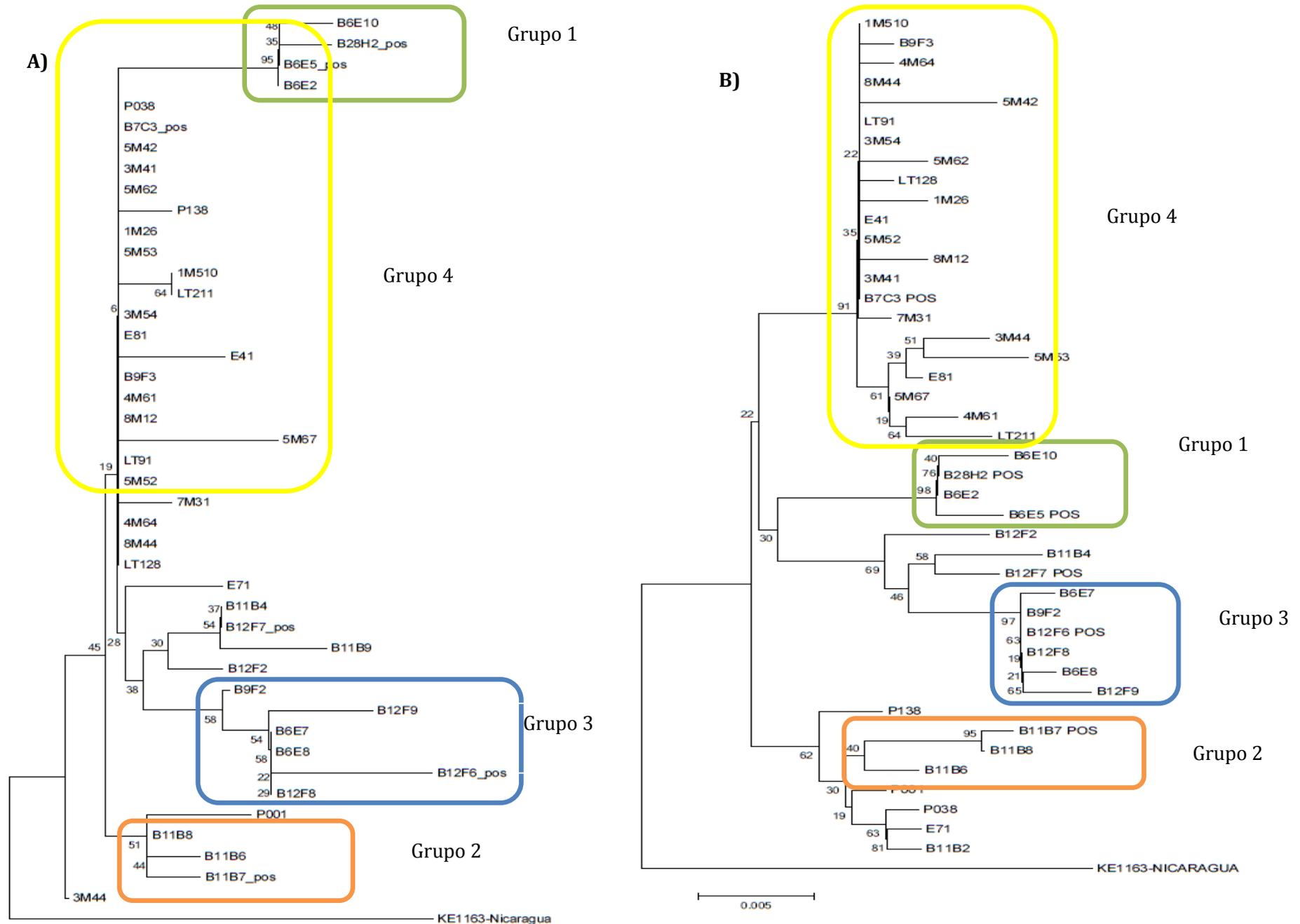


FIGURA 10. Árboles filogenéticos obtenidos por un análisis nucleotídico con el método Neighbor Joining. A) CytB mtDNA y B) COI mtDNA. Se analizaron un total de 45 muestras de *Nyctinomys trapidoi*. Los valores de bootstrap se encuentran en los nodos (500 réplicas). M, Manabí; B, Bolívar; LT y E, Esmeraldas; P, Pichincha.

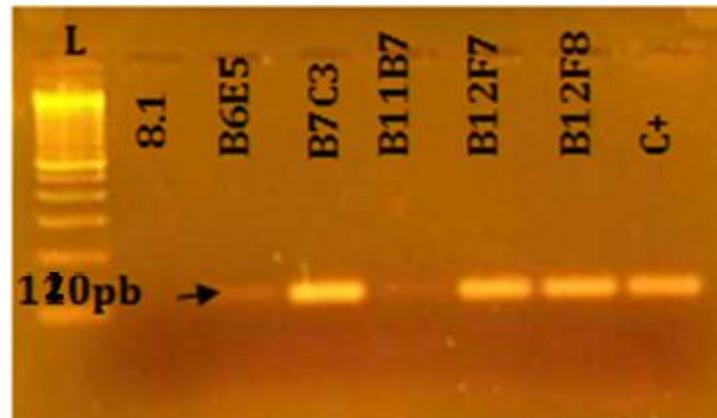


FIGURA 11. Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de la amplificación de una región conservada de los Minicírculos del Kinetoplasto de Tripanosomatidae En 6 muestras. El control positivo fue la muestra de una lesión de un paciente con Leishmaniasis cutánea. Estándar de tamaño (L) es de 100pb.

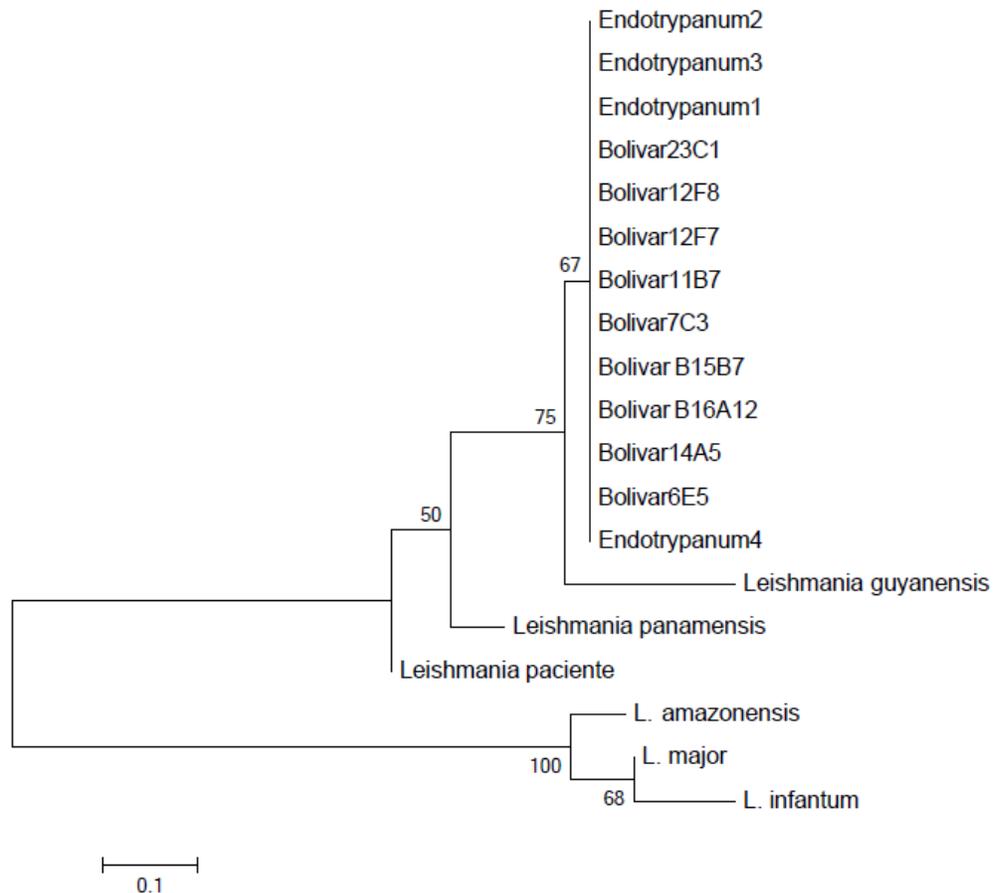


FIGURA 12. Árbol filogenético para una región conservada (120pb) de los minicírculos del Kinetoplasto de Tripanosomatidae obtenido por un análisis nucleotídico con el método Neighbor Joining. Se analizaron un total de 9 muestras de *Ny. trapidoi* de Bolívar. Los valores de bootstrap se encuentran en los nodos.

