

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudios filogenéticos de *Pintomyia serrana* y *Pi. robusta*, en Ecuador mediante el gen Citocromo c Oxidasa I (COI)

Kimberly Lizeth Caranqui Cobo

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Estudios filogenéticos de *Pintomyia serrana* y *Pi. robusta*, en
Ecuador mediante el gen
Citocromo c Oxidasa I (COI)**

Kimberly Lizeth Caranqui Cobo

Nombre del profesor, Título académico

Renato León, Ph.D.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Kimberly Lizeth Caranqui Cobo

Código: 00131979

Cédula de identidad: 172524918-7

Lugar y fecha: Quito, 4 de mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Los flebótomos (Díptera: Psychodidae) son diminutos insectos voladores que miden entre 1.5-3.5mm, son crepusculares o nocturnos y habitan zonas cálidas tropicales o subtropicales. Las hembras se caracterizan por ser hematófagas (alimentarse de sangre). Al mismo tiempo, con la sangre de sus hospederos pueden ingerir patógenos como el parásito *Leishmania* spp. y/o bacterias como *Bartonella bacilliformis* que al ser transmitidos en una próxima picadura al ser humano producen importantes enfermedades como leishmaniasis y/o bartonelosis.

El objetivo de este estudio fue usar técnicas moleculares para investigar la filogenia de los flebótomos *Pintomyia serrana* y *Pintomyia robusta*, posibles vectores de estas enfermedades en el Ecuador. Las hembras de estas especies son crípticas y no pueden ser diferenciadas en base a caracteres morfológicos como la forma y tamaño de la espermateca y el cibario.

Para este estudio, se colectaron flebótomos usando trampas de luz CDC, el aspirador denominado Mosquito Magnet y cebo humano protegido. Los especímenes fueron colectados en zonas de bosque aledañas a la población "Praderas de Toachi" al margen de la represa en construcción Toachi-Pilatón y en Zumba en la Provincia de Zamora Chinchipe cerca de la frontera Ecuador-Perú. De un total de 126 individuos colectados en la primera zona de estudio, se separaron y usaron 46 hembras para este análisis; en la segunda zona de estudio se colectaron 114 individuos y se separaron 108 hembras para este estudio filogenético.

Para los análisis moleculares se realizó la extracción de ADN de individuos de cada zona de estudio, se amplificó el material genético de la región conservada del gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa I (COI) mediante PCR y se procedió a secuenciar.

El análisis de la secuenciación reveló por medio de un árbol filogenético con Inferencia Bayesiana, que el grupo de *Pintomyia serrana* del Ecuador se agrupa separado tanto de *Pintomyia serrana* de Colombia como de *Pintomyia robusta* de la frontera Ecuador-Perú, lo que sugiere un evento de posible especiación o especiación incipiente. Se presentan hallazgos preliminares que deben ser profundizados y estudiados en más detalle en el futuro. Se recomienda incluir especímenes de otras localidades y estudios filogenéticos con otros genes.

Palabras clave: *Pintomyia*, Citocromo c oxidasa, COI, especies crípticas, Ecuador, Zamora Chinchipe, Toachi Pilatón.

ABSTRACT

Sand flies (Diptera:Psychodidae) are tiny flying insects that measure between 1.5-3.5 mm, are crepuscular or nocturnal, and inhabit warm tropical or subtropical areas. Females characterize by their hematophagous behavior (blood feeding). Pathogens such as the parasite *Leishmania* spp. and/or the bacteria *Bartonella bacilliformis* could be ingested together with the blood during a female's blood meal and subsequently could be transmitted in the next bite to a human being producing important diseases such as leishmaniasis and/or bartonellosis.

The objective of this study was to use molecular techniques to investigate the phylogeny of *Pintomyia serrana* and *Pi robusta*, sand fly species that possibly play a role as vectors of disease in Ecuador. The females of these species are cryptic and cannot be sorted based exclusively on morphological characters such as the shape and size of the spermatheca and the cibarium.

Sand flies were collected for this study using CDC light traps, the Mosquito Magnet trap, and protected human bait. The specimens were collected in forested areas close to the town of "Praderas de Toachi" in the vicinity of the Toachi-Pilatón hydroelectric dam that is currently under construction, and in the surroundings of the city of Zumba located in the Province of Zamora Chinchipe close to the Ecuador-Peru border. From a total of 126 individuals collected in the first study site, 46 females were sorted out and used for the analysis; similarly, from 114 specimens collected in Zumba, 108 females were used for this study.

For the phylogenetic analysis, DNA was extracted from each individual and amplified through PCR using specific primers to the conserved region of the Cytochrome c Oxidase I (COI) mitochondrial gene; PCR products were subsequently sequenced and analyzed.

A phylogenetic tree with Bayesian Inference was constructed and revealed that the *Pintomyia serrana* specimens from Ecuador cluster as a separate group from *Pintomyia serrana* from Colombia and from *Pintomyia. robusta* from Southern Ecuador at the Ecuador-Peru border. These preliminary results suggest a possible process of speciation or incipient speciation that needs a more detailed investigation. Future studies would need to include specimens from these species from other localities and phylogenetic analysis using other genes.

Key words: *Pintomyia*, Cytochrome c oxidase I, COI, cryptic species, Ecuador, Zamora Chinchipe, Toachi Pilatón.

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	Flebótomos.....	1
2.	Clasificación.....	2
3.	Flebótomos como vectores.....	3
3.1.	Leishmaniasis.....	3
3.2.	Bartonelosis.....	4
4.	Epidemiología de los focos de transmisión en los sitios de estudio	6
4.1.	Toachi- Pilatón.....	6
4.2.	Zumba.....	7
4.3.	Importancia y problema.....	7
5.	Relevancia de los marcadores moleculares en la filogenética de flebótomos.....	7
II.	METODOLOGÍA	9
1.	Área de estudio.....	9
2.	Colecta de especímenes.....	9
3.	Montaje y clasificación con claves.....	9
4.	Extracción de ADN y reacción de cadena polimerasa (PCR).....	10
5.	Cuantificación de ADN.....	11
6.	Secuenciación.....	11
7.	Análisis de datos	11
III.	RESULTADOS.....	13
1.	Colecta e identificación de especímenes.....	13
2.	Extracción y cuantificación de ADN	13
3.	Reacción de cadena polimerasa (PCR) y Secuenciación	13
4.	Análisis de datos	14
IV.	DISCUSIÓN	16
V.	CONCLUSIÓN.....	21
VI.	REFERENCIAS.....	22
VII.	ANEXOS.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.1. Hembras sin alimentar, identificadas en Toachi- Pilatón.....	30
Tabla No. 2 cuantificación 32 muestras de ADN extraído de muestras de Toachi- Pilatón (<i>Pi. serrana</i>). Códigos de muestra, concentración (ng/μl), relación 260/280 y 260/230.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 1 amplificación de gen Citocromo c oxidasa I en gel de agarosa de muestras de <i>Pi. serrana</i> y <i>Pi. robusta</i> (gel 1)	32
Figura No. 2 amplificación de gen Citocromo c oxidasa I en gel de agarosa de muestras de <i>Pi. serrana</i> y <i>Pi. robusta</i> (gel 2)	33
Figura No. 3 comparación de secuencias de estudio con secuencia referencia FJ437280.1 de NCBI.....	34
Figura No. 4 árbol filogenético de <i>Pintomyia serrana</i> y <i>Pintomyia robusta</i>	36
Figura No. 5 red de haplotipos de <i>Pintomyia serrana</i> y <i>Pintomyia robusta</i>	37

I. INTRODUCCIÓN

1. Flebótomos

Los flebótomos (Díptera: Psychodidae: Phlebotominae) son pequeños insectos voladores que miden entre 1.5-3.5mm, tienen su cuerpo de color pálido (característica por la que ordinariamente se los conoce como “manta blanca”), presentan abundantes vellosidades en todo el cuerpo y alas erectas; sus patas son largas, delgadas y las antenas filamentosas (Boelaert y Sundar, 2014). Son insectos holometábolos, es decir, que pasan por estadios de huevo, larva pupa y adulto. Después de aparearse y alimentarse de sangre, las hembras adultas ovopositan sus huevos, individualmente en la hojarasca. Después de 4 a 10 días, los mismos eclosionan en pequeñas larvas que durante un periodo de 4 a 8 semanas se desarrollan hasta larvas de cuarto estadio; después de un periodo corto de pupación, emergen en adultos en 4-6 días dependiendo de las condiciones ambientales y las especies. La etapa adulta es relativamente corta, y no suele durar más de 3 semanas; en este tiempo y después del apareamiento, la mayoría del tiempo se invierte en la búsqueda del sitio para realizar la ovoposición (Munstermann, 2004). Las hembras son hematófagas, es decir se alimentan de sangre, esto les ayuda para la maduración de los huevos; (Boelaert y Sundar, 2014). Los machos giran sus genitales 180° y se vuelven sexualmente maduros y localizan a las hembras mediante feromonas para aparearse.

Debido a los hábitos alimenticios de sangre de las hembras, estas se pueden infectar con microorganismos patógenos como *Leishmania* spp. o *Bartonella bacilliformis* y convertirse en vectores de enfermedades (Costa y Souza, 2018).

Los flebótomos habitan zonas boscosas y húmedas en regiones cálidas tropicales o subtropicales, estas ofrecen un sitio adecuado para su ciclo de vida. Sin embargo, en áreas

deforestadas en donde el ambiente se altera, los adultos pueden acostumbrarse a vivir cerca del ser humano y volverse peridomésticos (Munstermann, 2004).

2. Clasificación

El Suborden Nematóceras de los dípteros, se caracterizan por presentar antenas largas y segmentadas. Dentro de Nematóceras se incluyen a familias taxonómicas como Culicidae (mosquitos), Simuliidae (moscas negras), Ceratopogonidae (arenillas) y otros grupos. En total, 35 familias y 7 infraórdenes. El infraorden Psychodomorpha incluye a la familia Psychodidae de los flebótomos (Borrór, DeLong y Triplehorn, 1976). En 1977, Lewis y colaboradores proponen que el Océano Atlántico sea la barrera que separe a los flebótomos del “Viejo Mundo” (géneros *Phlebotomus* y *Sergentomyia*) de los del “Nuevo Mundo” (géneros *Brumptomyia*, *Warileya* y *Lutzomyia*) (Shimabukuro, Andrade y Galati, 2017). En los años 90s se propone una nueva clasificación, basada en las características morfológicas, que incluye a siete subgéneros (*Lutzomyia*, *Pintomyia*, *viannamyia*, *Nyssomyia*, *Trichophoromyia*, *Psychodopygus* y *Helcocyrtomyia*) dentro del género *Lutzomyia* (Young y Duncan, 1994) del “Nuevo Mundo”. Más tarde, en base a estudios moleculares y filogenéticos, Galati propone en 1995, una nueva clasificación en donde los subgéneros dentro de *Lutzomyia* se elevan a géneros. Aquí, los flebótomos se clasifican dentro de la tribu Phlebotomini, que consta de dos subtribus (Psychodopygina y Lutzomyina). Dentro de la subtribu Psychodopygina se ubican los géneros *Viannamyia*, *Psychodopygus*, *Nyssomyia*, *Bichromomyia* y *Trichophoromyia*, y por otro lado la subtribu Lutzomyina incluye a los géneros *Lutzomyia*, *Pintomyia*, *Migonemyia* y *Evandromyia*. Se conoce alrededor de 1000 especies de flebótomos en el mundo, de estas alrededor de 530 se encuentran en América (Shimabukuro, Andrade y Galati, 2017).

A pesar de que la clasificación de Young y Duncan aún se usa en determinadas ocasiones, para el presente estudio se adoptó la clasificación de Galati por ser la más

aceptada a pesar de su evidente complejidad. Las especies, objeto de este estudio según la clasificación de Galati serán *Pintomyia serrana* y *Pintomyia robusta*.

3. Flebótomos como vectores

Los flebótomos han sido incriminados como vectores de varios patógenos que incluyen al protozoario del género *Leishmania*, agente etiológico de las Leishmaniasis; a la bacteria *Bartonella bacilliformis* responsable de la Bartonelosis humana también llamada como enfermedad de Carrion, fiebre de Oroya o Verruga Peruana; y a varios arbovirus entre ellos Chandipura, Changuinola y el virus de la fiebre de los flebótomos (Sandfly fever virus). De las más de 1000 especies descritas de flebótomos, el 10% son considerados potenciales vectores (de Aguiar y Vieira, 2018). Recientemente, en el Ecuador, se aisló de *Nyssomyia trapidoi*, el virus denominado “Paraíso Escondido”, el primer virus de la familia Flaviviridae aislado de flebótomos (Alkan et al., 2015). Es posible que muchos otros nuevos arbovirus aún desconocidos habiten en zonas boscosas de la Amazonia y otras áreas vírgenes y salten entre animales reservorios por medio de la picadura de los flebótomos (de Aguiar y Vieira, 2018).

3.1. Leishmaniasis.

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por el protozoario *Leishmania*, y se transmite por las picadura de hembras de flebótomo infectadas. Cuando el parásito ingresa por medio de la picadura de un flebótomo a un hospedero vertebrado, se encuentra en su forma flagelada (promastigote), esta evita la acción del complemento en el torrente sanguíneo e ingresa en las células fagocíticas (macrófagos), una vez dentro el parásito cambia de forma a una sin flagelo (amastigote) la cual evade la cascada de oxígeno y otros mecanismos de la célula huésped, el macrófago se rompe y varios amastigotes se liberan infectando a otros macrófagos (Alvar y Arana, 2018). En una próxima picadura al reservorio, el flebótomo adquiere los amastigotes junto con la sangre ingerida y estos

pasan por varias fases en el vector hasta que transmite el patógeno en la siguiente alimentación de sangre.

3.1.1. *Leishmaniasis en Ecuador*

Se estima que la leishmaniasis ha sido endémica en Ecuador desde épocas Precolombinas en base a hallazgos de cerámicas arqueológicas que muestran lesiones compatibles con la enfermedad. Las revisiones históricas sugieren que el primer caso se reportó en 1920, y desde entonces, se han descrito y estudiado infinidad de reportes. En los años cincuenta, varios investigadores estudiaron las leishmaniasis, su evolución, patologías y tratamientos, mientras que otros abordaron el ciclo natural del parásito incluyendo a flebótomos vectores y posibles reservorios. Se considera una enfermedad desconocida y desatendida de acuerdo con la OMS. En el Ecuador, se han reportado casos de transmisión local en 23/24 provincias (Hashiguchi, 2016), y casos importados en Galápagos (León et al., 2019). La transmisión por lo usual ocurre en áreas por debajo de los 2700 metros de altura en provincias como Esmeraldas, Pichincha, Bolívar, Manabí, Los Ríos, Guayas, Cañar, El Oro, Loja, Napo, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. Sin embargo, se ha reportado transmisión en zonas de altura, en Paute (2300-2500m), Alausí (2300-2700m) y en Huigra (1200-1500m) (Calvopina, Armijos y Hashiguchi, 2004). La leishmaniasis más frecuente es la leishmaniasis tegumentaria o también denominada cutánea, aunque se ha descrito casos en el pasado de leishmaniasis mucocutánea, patología que ya no es tan frecuente. Las especies de flebótomos que han sido incriminadas como posibles vectores son *Lutzomyia trapidoi*, *Lu. olmeca*, *Lu. serrana*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. shannoni*, *Lu. spathotrichia*, *Lu. robusta* (Berger, 2020), referencia que mantiene aún la clasificación de Young y Duncan (1994).

3.2. Bartonelosis.

La bartonelosis también conocida como fiebre de Oroya, fiebre de Guitara, enfermedad de Carrión o verruga peruana, tiene una distribución focal, entre altitudes de 800 y 3000m, en las pendientes de los Andes en Colombia, Perú y Ecuador (Scott, 2008). En el siglo XIX se realizó el descubrimiento de esta enfermedad debido a que fallecieron 7000 trabajadores cuando se realizaba la construcción de la vía ferroviaria Callao - La Oroya, en Perú y por eso se denominó fiebre de Oroya. En 1885, un estudiante de medicina peruano, Daniel Carrión, hijo de un médico ecuatoriano, para demostrar que la fiebre de oroya y verruga peruana correspondían a las fase aguda y crónica de la misma enfermedad, se autoinoculó con sangre de verruga y después de 21 días desarrollo síntomas de fiebre y la enfermedad aguda y murió demostrando su hipótesis descrita anteriormente. Finalmente, en 1913 se atribuyó la infección al agente *Bartonella bacilliformis* (Márquez, García, León y Rosiles, 2014). El vector implicado en la transmisión de *B. bacilliformis* es la hembra del flebótomo (*Lutzomyia* spp.) y esto se demostró con el experimento de Battistini, en donde se mantuvo a un macaco de la India en contacto con veinte y tres flebótomos. Después de 18 días de exposición, los exámenes de sangre del animal dieron positivo para *B. bacilliformis* comprobándose la forma de transmisión de la enfermedad. Sin embargo, no se llegó a determinar las especies de flebótomos involucradas.

El ciclo epidemiológico empieza cuando *Lutzomyia* spp. al picar al humano le transmite la bacteria. Las infecciones primarias tienden a ser asintomáticas, pero en personas susceptibles, la bacteria invade los eritrocitos y después de una incubación de tres semanas, se manifiestan los síntomas (fiebre leve, dolor de cabeza y malestar); una vez que se invaden el 80% de los eritrocitos se produce una hemólisis masiva que tiene como consecuencia anemia hemolítica; la fiebre de Oroya corresponde a la fase hemática de la enfermedad. Después de esta manifestación, algunos pacientes desarrollan en 1 o 2

meses una enfermedad cutánea eruptiva denominada “verruca peruana”. Ésta se caracteriza por la aparición de lesiones nodulares pleomorfas en los brazos, piernas, cara y tronco (Angelakis y Raoult, 2009).

3.2.1. Bartonelosis en Ecuador.

Estudios sugieren que la bartonelosis en la frontera sur de Ecuador podría ser transmitida por *Lu. robusta* y/o *Lu. maranonensis* por su presencia en esta zona y frecuencia de captura dentro de las viviendas. Sin embargo, la epidemiología no ha sido estudiada a profundidad, y no se conoce la prevalencia actual de casos; varios casos no han podido ser detectados por lo cual es necesaria la investigación de la prevalencia, patogénesis, epidemiología e impacto de la enfermedad en el Ecuador (Lydy et al., 2018).

4. Epidemiología de los focos de transmisión en los sitios de estudio

4.1. Toachi- Pilatón.

La represa hidroeléctrica Toachi-Pilatón se encuentra ubicada al Suroeste de Quito, al pie del eje vial Quito-Guayaquil. La obras se encuentra entre las provincias de Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y Cotopaxi y consiste en la construcción de dos represas llamadas Pilatón - Sarapullo y Toachi - Alluriquín en las subcuencas hidrográficas de los ríos Pilatón y Toachi, en la vertiente occidental de la Cordillera de los Andes. Lleva en contrato su construcción desde el año 1994 y después de varios cambios esta ahora bajo responsabilidad la Corporación Eléctrica del Ecuador (CELEC EP - HIDROTOAPI). La operación se prevé se inicie para el 2021 (El Telégrafo, 2019). La zona se encuentra a una altitud de 1350 msnm y el clima es cálido y húmedo (IGM, 2013). Según el Ministerio de Salud, en el año 2019, se reportaron a nivel nacional 544 casos de leishmaniasis en Pichincha 109, en Sto. Domingo de los Tsáchilas 65 y en Cotopaxi 8 casos (Gaceta Vectorial SE_23, MSP 2019). Y de manera más concreta en el área de Toachi Pilatón cerca de la represa hidroeléctrica se reporto 2 casos. Estudios de

la fauna de flebótomos del lugar en el 2014 reportan la presencia de las siguientes: *Lutzomyia serrana*, *Lu. hartmanni*, *Lu. aclydifera*, *Lu. trapidoi*, *Lu. dreishbachi*, *Lu. camposi* y *Lu. shannoni*. Nuevas estudios en el 2016 reportan colecciones de *Lutzomyia serrana*, *Lu. hartmanni*, *Lu. trapidoi*, *Lu. aclydifera*, *Lu. camposi* y *Lu. abonnenci* (Carrasco et al., 2019).

4.2. Zumba.

Zumba se encuentra en la provincia de Zamora Chinchipe, en la frontera Ecuador-Perú, a una altitud de 680 msnm, y tiene un clima tropical subhúmedo (Lozano, 2018). Se ha encontrado especies como *Lu. robusta* y *Lu. maranonensis*, como posibles vectores de leishmaniasis y bartonelosis. En Zumba, se ha reportado 39 casos de bartonelosis desde 1995 a 2005, y la razón por la que no se ha reportado casos en los últimos años puede ser debido a casos no detectados o confusión de los síntomas de la fiebre de Oroya (fase de bartonelosis) con la fiebre común (Carrasco, 2017).

4.3. Importancia y problema.

Estudios anteriores han señalado a *Pintomyia robusta* como posible vector de bartonelosis en la zona fronteriza Perú-Ecuador (Lydy, 2018). Sin embargo, su filogenia no ha sido bien esclarecida con respecto a otra especie morfológicamente similar, *Pi. serrana*, que se encuentra presente en otras regiones de la costa y Amazonia del Ecuador. Se ha sugerido que *Pi. serrana* de la costa podría corresponder a una *Pi. robusta* de menor tamaño (Dujardin, Le Pont y Martínez, 2004). En el presente estudio se procede a analizar molecularmente especímenes de ambas especies de dos lugares de colección para esclarecer la identificación y la filogenia de estas especies.

5. Relevancia de los marcadores moleculares en la filogenética de flebótomos

Un marcador molecular es una característica molecular que puede ser vista o medida, directa o indirectamente usando herramientas que brinden información genética, que

permita diferenciar, clasificar, monitorear y establecer relaciones filogenéticas y genealógicas; estos se clasifican en bioquímicos o genéticos y se usan dependiendo del objetivo del estudio (Walker y Rapley, 2000). En los últimos 30 años, los estudios se han enriquecido a través del uso de marcadores moleculares, como isoenzimas y marcadores de ADN, permitiendo a los investigadores ir más allá de las limitaciones morfológicas y los estudios clásicos de ecología, abriendo nuevos conocimientos en taxonomía y sistemática de grupos. El estudio de la sistemática y filogenia de flebótomos no es la excepción y en la actualidad es cada vez más frecuente el uso de técnicas moleculares (Arrivillaga et al., 1995). Se evidencia más de 100 artículos científicos sobre flebótomos en PUBMED en donde se usan marcadores moleculares; más de 4500 secuencias de ADN publicadas en NCBI que aportan con información de diferente índole, características, datos útiles para separar poblaciones, especies, grupos o géneros (Benson et al., 2005). Sin embargo, el uso de marcadores moleculares no garantiza resultados robustos. Al ser el genoma tan complejo y limitadamente conocido, es importante una evaluación profunda para seleccionar un marcador molecular adecuado que permita tener resultados consistentes. El estudio molecular de los flebótomos se dificulta por su tamaño diminuto y tejido limitado lo que restringe la cantidad de muestra para poder aislar el ADN (Golczer y Arrivillaga, 2015). En varios estudios se ha utilizado secuencias de ADN mitocondriales y nucleares entre estos el DNA barcoding del gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa I (COI) que ha demostrado ser muy útil (Erisoz et al., 2019); tiene dos importantes ventajas: la primera es que los primers universales para este gen son bastante robustos, y segundo posee un mayor rango de señal filogenética que cualquier otro gen mitocondrial. Está claro que el genoma mitocondrial es mejor para análisis que el genoma nuclear debido a la falta de intrones, su forma de herencia haploide y su falta de recombinación (Hebert et al., 2003).

II. METODOLOGÍA

1. Área de estudio

El estudio se llevó a partir de especímenes colectados en: (1) la población de Praderas del Toachi y sus alrededores localizados en la zona de impacto de la represa hidroeléctrica Toachi-Pilatón en el 2014 y, (2) la población de Zumba y sus alrededores en la provincia de Zamora Chinchipe en el 2016.

2. Colecta de especímenes

En Zumba, las colecciones entomológicas se realizaron tanto en el peridomicilio, en el exterior e interior de viviendas de adobe y de tablón, como en el bosque. Se utilizaron trampas de luz CDC, que se operaban por 12 horas desde las 6 pm y se recogían temprano al siguiente día. La trampa Mosquito Magnet fue usada para el peridomicilio y operaba en los mismos horarios. Se utilizó también cebo humano protegido en caso de que las colecciones con los otros dos métodos fueran poco exitosas.

En Toachi Pilatón, las colecciones entomológicas se realizaron en áreas cercanas a la represa y en el peridomicilio de viviendas de la población del Praderas del Toachi. Se utilizaron igualmente trampas de luz CDC y la trampa Mosquito Magnet.

3. Montaje y clasificación con claves

Los muestras de campo fueron inmediatamente colocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una congeladora para sacrificar a los especímenes y trasladadas a envases con Etanol al 70%. En el LEMMT, los especímenes fueron almacenados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una refrigeradora hasta su procesamiento. Las muestras fueron examinadas con ayuda de un estereomicroscopio, y los flebótomos separados; se clasificaron en machos y hembras y se colocaron en tubos Eppendorf (1.5 ml) con Etanol al 70%.

Para este estudio se consideraron solamente las hembras de flebótomos las mismas que fueron montadas de la siguiente manera: Se colocó el espécimen en una gota de alcohol y se disectó cabeza, alas, y los tres últimos segmentos abdominales bajo el estereomicroscopio y con la ayuda de agujas estériles. El resto del cuerpo se almacenó en Etanol al 70%. Se colocó las partes disectadas en una gota de solución Marc André (40g de hidrato de cloral, 30ml de ácido acético glacial y 30 ml de agua destilada) y se dejó reposar por 5 minutos. Se sometió el portaobjetos al calor por medio de la llama de un mechero por pocos segundos sin dejar que se evapore la gota de solución, para permitir la clarificación de las estructuras anatómicas. En un portaobjetos limpio se puso una gota de goma cloral, se trasladó y acomodó las estructuras anatómicas clarificadas y se procedió a colocar encima un cubreobjetos para terminar el montaje. La identificación se realizó por medio la clave dicotómicas de Galati 1995, que permite la identificación de las hembras de cada especie de acuerdo con la forma y características de la espermoteca, el cibario, y otras características.

4. Extracción de ADN y reacción de cadena polimerasa (PCR)

La extracción del ADN total para cada individuo se realizó con el kit de Qiagen □ DNeasy Blood and Tissue Mini Spin Column, para obtener de cada extracción un volumen de 50µl. según el protocolo para insectos establecido por el mismo kit.

Para la amplificación, se seleccionó en base a la bibliografía, la región del gen mitocondrial COI con los primers universales LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (658pb) (Folmer et al., 1994); la PCR fue estandarizada a partir del protocolo de Romero, Lastre y Pérez 2016 para DNA barcoding de flebótomos calculada para un volumen final de 25µl que incluyen PCR buffer 1X Green GoTaq® Reaction Buffer, 1.5mM de MgCl₂, 100 µM de dNTPs, 0.3

μM de cada primer, 1 unidad de GoTaq® DNA Polymerase y 2 μL de ADN extraído. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador BioRad bajo las condiciones térmicas descritas por Herbet et al., (2003) que se describen a continuación: un ciclo a 94°C por 1 minuto, cinco ciclos a 94°C por 1 minuto, 45°C por 1.5 minutos y 72°C; 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 50°C por 1.5 minutos y 72°C por un minuto; y un ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2%, a 80 voltios por 45 minutos y el gel se observó en un Transiluminador FastGene de luz azul LED. El tamaño del amplicon se determinó por medio del TrackIt™ 100 bp DNA Ladder de Invitrogen.

5. Cuantificación de ADN

Para medir la concentración y la calidad de ADN, se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 2000™. Se activó el programa correspondiente, se añadió 2 μl de agua libre de nucleasas, se limpió; como blanco se añadió 2 μl de buffer de elución AE, se limpió y se añadió 2 μl de la muestra; este proceso se realizó para todas las muestras de Toachi-Pilatón.

6. Secuenciación

Se seleccionaron 13 muestras amplificadas de cada localidad, y de éstas se tomó 15 μl de cada amplicon y se prepararon para ser enviados para la secuenciación Sanger mediante la empresa en Macrogen.

7. Análisis de datos

Inicialmente las secuencias enviadas por Macrogen fueron alineadas y limpiadas mediante el programa MEGA 7 (Kumar et al., 2015). De las secuencias consenso que se generaron se procedió a realizar una búsqueda BLAST (NCBI, 1998) con el propósito de determinar la identidad de las muestras. Mediante inferencia bayesiana se corrieron

2000000 generaciones utilizando el programa BEAUTI Y BEAST (Bouckaert et al., 2019). Mediante Tracer se verificó que las cadenas MCMC converjan. Los árboles generados fueron condensados en el software TreeAnnotator para que el mejor árbol elegido por el programa mediante la condensación sea visualizado en FigTree.

Se escogió a una secuencia del género *Warileya* como “Outgroup”. *Warileya* es un flebótomo, probablemente más antiguo en relación con *Pintomyia*, que no es considerado como vector y que tiene las suficientes diferencias anatómicas y fisiológicas para ser usado como control en el análisis filogenético.

Para poder visualizar las relaciones genealógicas a nivel intraespecífico, se utilizó el software PopART para la construcción de red de haplotipos (Leigh y Bryant, 2015).

III. RESULTADOS

1. Colecta e identificación de especímenes

En Zumba (Zamora Chinchipe) se recolectaron 310 especímenes de flebótomos, de estos 295(95.2%) fueron hembras y 15 (4.8%) machos; de las hembras 127 estaban alimentadas de sangre y 168 en ayunas. De las hembras no alimentadas se identificó un total de 3 especies: 108(94,74%) de *Pintomyia robusta*, 5 (4,38%) de *Pintomyia maranonensis* y 1 (0.88%) de *Lutzomyia castanea*.

En Toachi- Pilatón se recolectaron 126 flebótomos, de estos 108 (85.7%) fueron hembras y 18 (14.3%) machos; de las hembras 12 hembras estaban alimentadas y 96 hembras estaban en ayunas.

Se identificó 83 hembras sin alimentar de estas :52 (63,7%) de *Pintomyia serrana*, 15(18,1%) de *Lutzomyia hartmanni*, 11(13,3%) *Nyssomyia trapidoi*, 2 (2,4%) por identificar y 1 (1,2%) de *Psathyromyia abonnenci*, *Nyssomyia umbratilis* y *Pressatia* spp. (Tabla No. 1).

2. Extracción y cuantificación de ADN

Se realizaron extracciones de ADN total (50 μ L) de 46 pools de 1 individuo de *Pi. robusta* provenientes de Zumba (Carrasco, 2017) y de 34 pools de 1 individuo de *Pi. serrana* de Toachi-Pilatón. En la tabla No.2 se detallan los datos obtenidos de la cuantificación de ADN extraído de las muestras de Toachi- Pilatón. De un total de 32 muestras, las concentraciones van desde 1 a 14,3 ng/ μ L, y los rangos de 260/280 van desde -80 a 44,74.

En cuanto a la cuantificación de *Pi. robusta* “Todas las muestras presentan concentraciones superiores a 3 ng/ μ l, así como rangos 260/280 en general superiores a 1.” (Carrasco, 2017)

3. Reacción de cadena polimerasa (PCR) y Secuenciación

Se examinaron 28 pools totales de DNA de flebótomos, 14 de Zumba identificados como *Pi. robusta* y 15 de Toachi- Pilatón identificados como *Pi. serrana*. Se amplificaron 9 de 14 muestras de *Pi. robusta* etiquetadas como: (A.37, A.38, A.49, A.40, A.41, A.42, A.43, A.44, A. 45) y para *Pi. serrana* 15 de 15 muestras etiquetadas como: (C.11, D.1, E.3, E.4, E.9, E.11, E.24, E.15, E.18, E.21, E.14, G.2, J.7, J.8, J.11), Las bandas amplificadas tienen un tamaño de 658pb (Figura No. 1 y No. 2). Se uso un Ladder de (100pb) como referencia. Para tener más muestras tanto de Zumba como de Toachi- Pilatón, se amplificaron 4 muestras más de *Pi. robusta* (A.51, A.55, A.56, A.57) teniendo un producto de 658 -700pb. Se enviaron a secuenciar 13 productos del PCR de las muestras de *Pi. robusta* y 13 de *Pi. serrana*. La purificación y secuenciación Sanger de los productos del PCR se realizaron en Corea por medio de la empresa MACROGEN.

4. Análisis de datos

Las secuencias obtenidas se limpiaron y alinearon en el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2015) generando a su vez secuencias consenso las que permitieron realizar una búsqueda en BLAST. Se evidenció que las muestras A37, A38, A42, A43, A44, A49, A51, A55, A56, A57 de *Pi. robusta* tenían 100% de solapamiento con la secuencia reportada de *Pi. robusta* (FJ437280.1) correspondiente a una muestra de *Pi. robusta* del Perú. (Cohnstaedt *et al.*, 2011) (Figura No.3(A)). La muestra A.41 tenía 99% de solapamiento con la secuencia FJ437280.1 y el 1% representa 1 mutación que se indica en la Figura No.3(B) Las muestras A.40 y A.45 tienen 99% de solapamiento con la secuencia reportada FJ437280.1, el 1% representan a 7 mutaciones indicadas en la Figura No.3 (C)

Por otro lado, para *Pi. serrana* todas las muestras analizadas tuvieron un solapamiento del 99% con la secuencia FJ437280 y el 1% de variación corresponde a 7 mutaciones que se observan en la Figura No.3 (D)

El árbol filogenético con inferencia bayesiana (Figura No.4) se construyó con las secuencias obtenidas de este estudio y secuencias de *Pintomyia* spp., *Pintomyia serrana* y *Pi. robusta* disponibles en la base de datos NCBI. El árbol evidencia que el grupo de *Pi. serrana* de Toachi-Pilatón del Ecuador esta filogenéticamente separado de *Pi. robusta* y del grupo de *Pi. serrana* de Colombia. Respecto a *Pi. robusta* de Zumba, los individuos se encuentran agrupados con *Pi. robusta* del Perú, pero, se observa subvariación dentro de este grupo.

El análisis de la red de haplotipos (Figura No.5) nos permite identificar los eventos mutacionales y agrupar a los individuos para diferenciarlos genéticamente. Todas las secuencias de *Pi. serrana* de Ecuador se encuentran agrupadas (color celeste) mientras que las de Colombia presentan dos grupos (color verde) separados por un evento mutacional. Entre *Pi. serrana* de Ecuador y *Pi. serrana* de Colombia (color verde) se evidencia un ancestro común (color rojo) y 16 eventos mutacionales. Por otro lado, respecto a *Pi. robusta*, se evidencian cuatro grupos diferentes que parten de un ancestro común (color lila). En todos los grupos (color amarillo). se encuentran tanto secuencias de *Pi. robusta* de Ecuador como secuencias de *Pi. robusta* del Perú. En la agrupación que incluye la secuencia A37 y *Pi. serrana* de Ecuador existe un total de 6 eventos mutacionales.

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio, la colecta de especímenes de flebótomos tanto en Toachi-Pilatón como en Zumba muestra una mayor proporción de hembras colectadas en relación con los machos. En Zumba, 95% de hembras versus 5 % de machos mientras que en Toachi- Pilatón, 85% de hembras y 15% de machos. Algunos estudios, en Brasil, han reportado mayor proporción de machos en las colectas entomológicas con trampas de luz (Antonini, Fernandes y Barata 2017). Otros estudios, al contrario, han reportado cantidades equivalentes de hembras y machos, (52,34 y 47,66% respectivamente) lo que sugiere que las proporciones de colectas pueden variar dependiendo de varios factores. Es importante considerar que las hembras al ser vectores representan un potencial peligro cuando estas se encuentren en mayor proporción en un sitio de colecta, especialmente si están cerca del ser humano, así como en áreas peridomésticas (Thies et al., 2016). De igual manera en las colectas se obtuvo una gran proporción de hembras alimentadas, lo que implica un mayor riesgo pues pueden haberse alimentado del ser humano y ser potenciales vectores de patógenos. Es por esto importante también los estudios que determinan las fuentes de alimentación sanguínea pues pueden aportar con información valiosa sobre las preferencias alimenticias de los flebótomos y detalles de ciclo natural de los patógenos.

Los estudios de la fauna de flebótomos pueden optar por seguir la clasificación propuesta por Young y Duncan o la clasificación de Galati. Se escogió para este trabajo la nomenclatura de Galati, 1995, pues se basa en estudios moleculares que han mostrado ser más útiles que la taxonomía clásica basada en morfología y también porque se consideró es la clasificación más aceptada actualmente. Por ejemplo, se llevo a cabo un análisis de la filogenia del género *Pintomyia* mediante genes nucleares, mitocondriales y

ribosomales (ARNr12s y ARNr28S) en individuos de Perú y Colombia, y se mostró resultados que concuerdan y apoyan la clasificación de Galati ((Beati et al., 2004).

En las colectas realizadas en Zumba cerca de la frontera ecuatoriana-peruana, se ha colectado especímenes tanto de *Pi. robusta* como de *Pi. maranonensis*. Sin embargo, la primera especie es mucho más abundante (Datos no mostrados, parte de otro trabajo, Carrasco, 2017); ambas especies ya han sido previamente reportadas en tierras bajas y en la Amazonía como posibles vectores de bartonelosis (Caceres et al., 1997); estos estudios permiten corroborar la circulación de estas especies en la frontera y su posible rol como vectores. Por otro lado, en Toachi- Pilatón *Pi. serrana* ha sido colectada con frecuencia (León et al., 2014) y por ende puede tener un rol en la transmisión de leishmaniasis en esta zona, que, al ser parte de las estribaciones occidentales de los Andes, es endémica también para esta enfermedad.

Respecto a la parte molecular del estudio, las extracciones de ADN de muestras provenientes de Zumba fueron realizadas en el 2017 y almacenadas a -20°C hasta su extracción, lo que causó que muchas muestras se perdieran porque el ADN se encontraba degradado. Se recomienda que si se tiene que guardar muestra de ADN se lo realice a -80°C especialmente si es por largos periodos de tiempo. (Oxford Gene Technology, 2011); las extracciones de muestras provenientes de Toachi-Pilatón fueron, al contrario, realizadas en el 2020 y se esperaba obtener cantidades aceptables de ADN. Sin embargo, la cuantificación de estas en el espectrofotómetro mostró concentraciones de ADN en un rango de 0.5 a 14.3 ng/ μl , que para un PCR convencional no es ideal. (Concentraciones óptimas están en los rangos de 50-100ng para 20 μl de reacción). Es importante tomar en cuenta que, en flebotomos, debido al tamaño diminuto del cuerpo es aceptable tener bajo rendimiento en las extracciones (Caligiuri et al., 2018). En cuanto a la calidad del ADN lo óptimo es tener una relación 260/280 de 1.8-2; las muestras extraídas que tienen

valores menores a 1 posiblemente están contaminadas con compuestos aromáticos como fenoles y proteínas; los valores mayores a 2.1 indican contaminación con ARN; la medición de la relación 260/230 que refleja la pureza del ADN, debe arrojar valores óptimos de 1.5-2-2; las muestras extraídas con valores menores a 1 indican contaminación con fenoles, carbohidratos y sales (Koetsier y Cantor, 2019); Se debe tomar en cuenta que la cuantificación de ADN que realizamos fue del ADN total y el ADN de interés era el ADN mitocondrial. A pesar de que no se obtuvo una extracción ideal en las muestras del estudio, el ADN pudo ser secuenciado con éxito y servir para nuestros análisis filogenéticos.

Para este estudio, se utilizaron los cebadores (primers) universales LCO1490 y HCO2198, estos fueron diseñados para reconocer regiones altamente conservadas del gen de la subunidad I de la enzima citocromo c Oxidasa mitocondrial. Estos cebadores han demostrado tener gran éxito en la amplificación dando un fragmento de aproximadamente 710pb en más de 80 especies de invertebrados y 15 taxones, entre ellos los flebótomos (Sharma y Kobayashi, 2014). Se han utilizado estos cebadores en alrededor de 300 estudios, incluyendo de flebótomos, a nivel mundial para “DNA Barcoding” (método taxonómico que usa marcadores genéticos para identificar especies (Miller, Vandome y McBrewster, 2009)), con el fin de esclarecer discrepancias taxonómicas y aportar en el conocimiento de la filogenia. En este estudio, mostraron ser eficientes en amplificaciones de la región del gen COI en las muestras como se muestra la Figura No.1 y No2 evidenciándose bandas bien marcadas de 650-700pb en la electroforesis en gel de agarosa. Se probaron un total de 3 protocolos de PCR para la elaboración del MasterMix y se tuvo éxito usando el protocolo establecido por Romero et al., 2016 utilizado en “DNA Barcoding” de flebótomos en Colombia y con las condiciones termales de Hebert et al., 2003.

El análisis de las secuencias obtenidas y búsqueda BLAST de identidad con otras secuencias publicadas confirma la amplificación de la región mitocondrial Citocromo C Oxidasa I. Las secuencias de *Pi. serrana* de Toachi- Pilatón no mostraron variación entre las mismas y dieron un 99% de identidad con las secuencias de *Pi. robusta* de Cajamarca (Perú) con 6 mutaciones; y 96% de identidad con secuencias de *Pi. serrana* de Colombia en la provincia de Boyacá (Cohnstaedt et al., 2011). Con esta información se evidencia que las secuencias de *Pi. serrana* de Ecuador son mas similares con las *Pi. robusta* de Perú que con secuencias de *Pi. serrana* de Colombia.

De las 13 secuencias de Zumba, 10 fueron 100% idénticas a secuencias reportadas de *Pi. robusta* en dos estudios en Perú en la provincia de Cajamarca en el distrito de San José de Lourdes (Nzulu et al., 2015; Cohnstaedt et al., 2011). Se debe tomar en cuenta que Zumba en Ecuador se encuentra a 502km de Cajamarca que es parte de Perú; 2 muestras tienen 99% de identidad con la secuencia de Cajamarca y con 7 mutaciones y 1 muestra tiene 99% de identidad con la secuencia de Cajamarca y 1 mutación.

El árbol filogenético con inferencia bayesiana (Figura No. 4) que se construyó, evidencia que el grupo de *Pi. serrana* se encuentra separado del grupo *Pi. serrana* de Colombia y de *Pi. robusta* de Ecuador y Perú lo que no corrobora los hallazgos de Dujardin y otros (2004) que sugieren que *Pi. serrana* de la costa del Ecuador corresponde a una variación de menor tamaño de *Pi. robusta* de la Amazonía. Los resultados obtenidos sugieren que en el grupo *Pi. serrana* del Ecuador podría estar ocurriendo un proceso de especiación, que debe ser estudiado con más profundidad, así como también sus posibles efectos en la epidemiología de estas enfermedades y en la incriminación de vectores. *Pintomyia. serrana* de Colombia ha sido incluida en otros estudios en donde se realizó DNA Barcoding para identificar especies de flebotomos en focos de leishmaniasis (Romero et al., 2016), sin embargo, no ha sido comparada con especímenes fuera de ese

país. *Pintomyia. robusta* es una especie del sur del Ecuador y del Perú y la identificación de los especímenes de *Pi. robusta* del Ecuador se confirma en este estudio, sin embargo, se observa variación genética y al menos tres subgrupos que incluyen tanto especímenes provenientes del Ecuador como del Perú.

En la red de haplotipos (Figura No.5) se observa que entre las dos especies *Pi. serrana* de Ecuador y *Pi. robusta* de Ecuador y Perú hay menos eventos mutacionales, que con las *Pi. serrana* de Colombia lo que sugeriría que están más cerca filogenéticamente de *Pi. robusta* que de *Pi. serrana*. Estos hallazgos también pueden sugerir procesos de especiación incipiente tanto en la una como en la otra especie.

V. CONCLUSIÓN

Este trabajo de investigación que utilizó como marcador molecular a un gen mitocondrial (COI) para estudiar especímenes de *Pintomyia serrana* colectados de las estribaciones occidentales de los Andes de Ecuador (Toachi- Pilatón) y especímenes de *Pi. robusta* provenientes de la frontera hacia el lado Amazónico (Zumba) evidencia que *Pi. serrana* de Ecuador se agrupa separado tanto de *Pi. serrana* de Colombia como de *Pi. robusta*. Aporta con datos preliminares que sugieren un posible proceso de especiación o especiación incipiente que debe ser estudiado más a profundidad. De igual manera, se evidencia subdivisiones dentro de la estructura genética de *Pi. robusta* que debe ser estudiada en mayor detalle. Se sugiere que nuevos estudios incluyan especímenes de *Pintomyia serrana* de otras localidades, por ejemplo, de la región Amazónica de Ecuador y en lo posible de otros países que reportan esta especie, al igual que especímenes de *Pi. robusta* del Perú. Para un análisis filogenético más robusto también se sugiere el uso de otros marcadores moleculares.

Estudios futuros son necesarios también para clarificar la situación y epidemiología de la bartonelosis en el Ecuador y de la leishmaniasis en zonas fronterizas con el Perú y de los riesgos de la población ante estos patógenos que puede estar circulando en especies de flebótomos de la zona, que a la vez puedan tener o adquirir hábitos antropofágicos y/o antropofílicos y un rol como vectores de estas enfermedades.

El análisis filogenético de las secuencias COI ha permitido obtener datos de utilidad acerca de la filogenia de estas dos especies crípticas *Pintomyia serrana* y *Pi robusta*.

VI. REFERENCIAS

- Alkan, C., Zapata, S., Bichaud, L., Moureau, G., Lemey, P., Firth, A. E., ... Charrel, R. N. (2015). Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus *Flavivirus*. *Journal of Virology*, 89(23), 11773–11785. doi:10.1128/jvi.01543-15
- Alvar, J., y Arana, B. (2018). Leishmaniasis, Impact and Therapeutic Needs. In: Rivas, L., y Gil, C. (eds) *Drug Discovery for Leishmaniasis*. The Royal Society of Chemistry. pp: 3-21.
- Angelakis, E., Raoult, D. (2009). Bartonellosis, Cat-scratch Disease, Trench Fever, Human Ehrlichiosis. In: Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D., White, N. (eds) *Manson's Tropical Diseases*. ELSEVIER SAUNDERS
- Antonini, Y., Fernandes, W. y Barata, R. (2017). Distribution of the assemblage of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) along an environmental gradient. *Biota Neotropica*, 17(2), e20160253. Epub julio 06, 2017. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2016-0253>
- Arrivillaga J., Hamilton J., Ward R., y Maingon R. (1995). RAPD-PCR to distinguish between sandfly populations (*Lutzomyia longipalpis*). *British Society for Parasitology*. Trypanosomiasis and Leishmaniasis Proceedings of the Seminar at the Meeting of the British Society for Parasitology, University of Glasgow, Glasgow, UK. 1: 32.
- Beati, L., Cáceres, A. G., Lee, J. A., y Munstermann, L. E. (2004). Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences.

International Journal for Parasitology, 34(2), 225–234. doi:
10.1016/j.ijpara.2003.10.012

Benson D., Karsch-Mizrachi I., Lipman D., Ostell J., y Wheeler D. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Research*. 33: 34-38.

Berger, S. (2020). *Infectious Diseases of Ecuador*. S.l.: GIDEON INFORMATICS, INC.

Boelaert, M., Sundar, S. (2014). Leishmaniasis. In: Farrar, J., Hotez, P., Junghanss, T., Kang, G., Lalloo, D., White, N. (eds) *Manson's Tropical Diseases*. ELSEVIER SAUNDERS

Borror, D. J., DeLong, D. M. y Triplehorn, C. A. (1976). *An introduction to the study of insects*. Holt, Rinehart and Winston. New York, Chicago.

Bouckaert R., Vaughan T.G., Barido-Sottani J., Duchêne S., Fourment M.

Gavryushkina A., et al. (2019) BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650.

Caceres, A., Galati, E., Le Pont, F, Y Velasquez, C. (1997). Possible Role of *Lutzomyia Maranonensis* And *Lutzomyia Robusta* (Diptera: Psychodidae) As Vectors of Human Bartonellosis In Three Provinces of Region nor Oriental Del Marañon, Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39(1), 51-52.
<https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000100011>

Caligiuri, L., Sandoval, A., Miranda, J., Pessoa, F., Santini, M., Salomón, O., Secundino, N y McCarthy, C. (2018). Optimisation of DNA Extraction from Individual Sand Flies for PCR Amplification. 10.20944/preprints201812.0189.v1.

Calvopina, M., Armijos, R., y Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7), 663-672. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000700001>

- Carrasco, A. (2017). *Detección molecular de Bartonella bacilliformis en flebótomos (Diptera: Psychodidae) en la zona fronteriza Ecuatoriana-Peruana*. (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito. Quito.
- Carrasco, A., Caranqui, K., Ilivichuzca, F., Jativa, J. y León, R. (2019). Baseline sand fly data and monitoring of cutaneous leishmaniasis in an endemic area close to the Toachi-Pilatón hydroelectric dam: Joint initiative between HIDROTOAPI and LEMMT-USFQ. *10th International Symposium on Phlebotomine Sandflies*. Julio 2019. San Cristobal, Galápagos.
- Cohnstaedt, L. W., Caceres, A. G., Munstermann, L. E., Ferro, C., y Beati, L. (2011). Phylogenetics of the Phlebotomine Sand Fly Group Verrucarum (Diptera: Psychodidae: Lutzomyia). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(6), 913–922. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0040
- Cooper, P., Guderiam, R., Paredes, W., Daniels, R., Perera, D., Espinel, M., Valdez, M., Griffin, G. (1996). Bartonellosis in Zamora Chinchipe province in Ecuador. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 90, pp 241-243
- Costa, W., Souza, N. (2018). *Sand Flies: Medical Importance*. Springer.
- de Aguiar G.M., Vieira V.R. (2018) Regional Distribution and Habitats of Brazilian Phlebotomine Species. In: Rangel E., Shaw J. (eds) *Brazilian Sand Flies*. Springer, Cham
- Dujardin, J. P., Le pont F., y Maritnez, E. (2004). Is *Lutzomyia serrana* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) present in Ecuador? *Parasite*, 11(2), 211–217. doi:10.1051/parasite/2004112211
- El telégrafo. (2019). La operación de Toachi-Pilatón se prevé para 2021. Recuperado el 12 de abril de 2019 de <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/toachi-pilatton-para-2021>.

- Erisoz, O., Linton, Y.-M., Karakus, M., Ozbel, Y., y Alten, B. (2019). Revision of the species composition and distribution of Turkish sand flies using DNA barcodes. *Parasites & Vectors*, 12(1). doi:10.1186/s13071-019-3669-3
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- Gaceta Vectorial. Ministerio de Salud Pública. Subsecretaria de Vigilancia de la Salud Pública. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. SUBSISTEMA DE VIGILANCIA SIVE- ALERTA ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES, ECUADOR, SE 1-23 / 2019
- Galati, E.A.B. (1995). Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. Saneamient. Ambient.* 35: 133-142.
- Golczer G. y Arrivillaga J. (2008). Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para especies pequeñas de flebotómicos (Phlebotominae: Lutzomyia). *Rev. Colomb. Entomol.* 34: 199-202.
- Hashiguchi, Y., Gómez, E.A.L., Kato, H., Martini-Robles, L., Velez, L.N., y Uezato, H. (2016). Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: – cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop. Med. Health* 44, 2, <http://dx.doi.org/10.1186/s41182-016-0002-0>.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., y deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218
- IGM. (2013). *Mapa De Ubicación De La Comunidad Praderas Del Toachi Del Cantón Sigchos*. Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal Del Cantón Sigchos.

- Koetsier, G., y Cantor, E. (2019). *A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers*. New England Biolabs. (Technical note)
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Leigh, JW y Bryant D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.
- León, R. Ortega, L., Gualapuro, M., Morales, F., Rojas, M.I. y Espinel, M. (2014). Identificación de Dípteros Nematóceros de interés médico en zonas aledañas a la construcción de la Represa Hidroeléctrica Toachi Pilatón. *Avances en Ciencias e Ingenierías* 6(2): B13-B19
- León, R., Carrasco, A., Guevara, D., Zorrilla, V., Fárez, H., Espada, L., Lozano, L., Stoops, M., Fisher, C., Vásquez, G. (2019). Species diversity, blood feeding preference and Leishmania and Bartonella natural infection Screening of sand flies (Diptera: Psychodidae) from Southern Ecuador close to the Ecuador- Peru border. *Medicina Tropical MedTrop*. 28-31 julio 2019. Belorizonte, Brasil
- Lewis D., Young D., Fairchild G., Minter D. (1977). Proposals for a stable classification of phlebotomine sandflies. *Systematic Entomology* 2: 319–332. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1977.tb00381.x>
- Lozano, J. (2018). Diseño Arquitectónico De Un Centro De Integración Cultural Y Educativo, En La Parroquia Zumba Para El Cantón Chinchipe De La Provincia Zamora Chinchipe. (Tesis de grado). Universidad Internacional del Ecuador. Loja.
- Lydy, S. L., Lascano, M. S., Garcia-Perez, J. E., Williams-Newkirk, A. J., & Grijalva, M. J. (2018). *Seroprevalence and risk factors for infection with Bartonella*

- bacilliformis* in Loja province, Ecuador. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1). doi:10.1038/s41426-018-0110-5
- Márquez, C., García, R., León, J., Rosiles, R. (2014). Enfermedad de Carrión. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. 61(4). Pp. 246-252
- Miller, F., Vandome, A., y McBrewster, J. (2009). *DNA Barcoding: Taxonomy, Species, Molecular Phylogenetics, Consortium for the Barcode of Life, Identification (biology), Eukaryote, Mitochondrion*. VDM Publishing.
- Munstermann, L. (2004). *Phlebotomine sand flies. The Psychodidae*. In Marquart, W. (ed.). *Biology of diseases vectors*. Elsevier Academic Press. Burlington, pp. 141-151
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 29]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nei M. y Kumar S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Nzelu, C. O., Cáceres, A. G., Arrunátegui-Jiménez, M. J., Lañas-Rosas, M. F., Yañez-Trujillano, H. H., Luna-Caipó, D. V., ... Kato, H. (2015). DNA barcoding for identification of sand fly species (Diptera: Psychodidae) from leishmaniasis-endemic areas of Peru. *Acta Tropica*, 145, 45–51. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.02.003
- Oxford Gene Technology. (2011). DNA Storage and Quality. Recuperado el 25 de abril de 2020 de https://www.ogt.com/resources/literature/403_dna_storage_and_quality

- Porter T., Gibson J., Shokralla S., Baird D., Golding G. y Hajibabaei M. (2014). Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier. *Mol. Ecol. Resour.* 14: 929-942.
- Romero, L., Lastre, N., Pérez, A., y Bejarano, E. (2016). DNA barcoding to identify species of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) in the mixed leishmaniasis focus of the Colombian Caribbean. *Acta Tropica*, 159, 125–131. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.03.017
- Scott, G. (2008). *Bartonellosis, Cat-scratch Disease, Trench Fever, Human Ehrlichiosis*. In Cook, G., y Zulma, A.(ed.). *Manson's Tropical Diseases*. Sanders Elsevier, pp. 1091-1102
- Sharma, P., Kobayashi, T. Are “universal” DNA primers really universal? *J Appl Genetics* 55, 485–496 (2014). <https://doi.org/10.1007/s13353-014-0218-9>
- Shimabukuro, P., Andrade, A., Galati E. (2017). Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys* 660: 67-106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>
- Thies, F., Bronzoni, R., Espinosa, M., Souza, C., Ribeiro, A., Santos, E., Dias, E., y Damazo, A. (2016). Frequency and diversity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Sinop, State of Mato Grosso, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49(5), 544-552. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0251-2016>
- Walker J. y Rapley R. (2000). *Molecular biology and biotechnology*. Royal Society of Chemistry.
- WHO. (23 de agosto, 2018). *Ecuador*. Recuperado el 21 de marzo de 2020, de https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Leishmaniasis_Ecuador/en/

Young, D y Duncan, M. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 54: 1–881.

VII. ANEXOS

ANEXO A

Tabla No.1. Hembras sin alimentar, identificadas en Toachi- Pilatón

ESPECIES	CANTIDAD	PORCENTAJE (%)
<i>Lu. hartmanni</i>	15	18,1
<i>Pi. serrana</i>	52	62,7
<i>P. abonnenci</i>	1	1,2
<i>Ny. trapedoi</i>	11	13,3
<i>Ny. Umbratilis</i>	1	1,2
<i>Pressatia spp.</i>	1	1,2
Por identificar	2	2,4
TOTAL	83	100,0

Fuente: (LEMMT-USFQ)

ANEXO B:

Tabla No. 2 cuantificación 32 muestras de ADN extraído de muestras de Toachi-Pilatón (*Pi. serrana*). Códigos de muestra, concentración (ng/μl), relación 260/280 y 260/230

Sample ID	User name	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
E16	Laboratorio de Biotecnolo	3,6	ng/μl	0,072	0,033	2,15	0,67	DNA	50
E14	Laboratorio de Biotecnolo	3	ng/μl	0,061	0,028	2,16	0,19	DNA	50
E3	Laboratorio de Biotecnolo	3,2	ng/μl	0,064	0,014	4,77	0,1	DNA	50
E26	Laboratorio de Biotecnolo	4,4	ng/μl	0,088	0,027	3,24	0,12	DNA	50
E5	Laboratorio de Biotecnolo	3,7	ng/μl	0,074	0,025	2,94	0,13	DNA	50
D1	Laboratorio de Biotecnolo	3	ng/μl	0,06	0,021	2,88	0,08	DNA	50
E5	Laboratorio de Biotecnolo	3	ng/μl	0,061	0,028	2,19	0,71	DNA	50
E18	Laboratorio de Biotecnolo	2,8	ng/μl	0,055	0,014	3,84	0,09	DNA	50
G22	Laboratorio de Biotecnolo	4	ng/μl	0,08	0,019	4,11	0,12	DNA	50
E15	Laboratorio de Biotecnolo	8,3	ng/μl	0,166	0,055	3,04	0,21	DNA	50
G1	Laboratorio de Biotecnolo	2,1	ng/μl	0,042	-0,001	-80,57	0,09	DNA	50
E11	Laboratorio de Biotecnolo	2	ng/μl	0,041	-0,009	-4,63	0,09	DNA	50
E9	Laboratorio de Biotecnolo	2,6	ng/μl	0,052	0,003	20,64	0,12	DNA	50
E23	Laboratorio de Biotecnolo	4,9	ng/μl	0,097	0,018	5,3	0,18	DNA	50
E7	Laboratorio de Biotecnolo	4,2	ng/μl	0,084	0,012	6,96	0,11	DNA	50
E10	Laboratorio de Biotecnolo	1	ng/μl	0,02	-0,006	-3,09	-0,21	DNA	50
E8	Laboratorio de Biotecnolo	3	ng/μl	0,06	0,003	17,51	0,12	DNA	50
E25	Laboratorio de Biotecnolo	14,3	ng/μl	0,286	0,164	1,75	0,29	DNA	50
E21	Laboratorio de Biotecnolo	5,3	ng/μl	0,106	0,035	3,07	0,13	DNA	50
E17	Laboratorio de Biotecnolo	5,6	ng/μl	0,111	0,039	2,86	0,21	DNA	50
C11	Laboratorio de Biotecnolo	2,3	ng/μl	0,046	0,001	44,54	0,14	DNA	50
E4	Laboratorio de Biotecnolo	3,5	ng/μl	0,07	0,009	7,81	0,1	DNA	50
E24	Laboratorio de Biotecnolo	1,7	ng/μl	0,035	-0,027	-1,3	0,07	DNA	50
E19	Laboratorio de Biotecnolo	5,5	ng/μl	0,111	0,028	3,98	0,61	DNA	50
I.3	Laboratorio de Biotecnolo	5,3	ng/μl	0,107	0,042	2,56	0,17	DNA	50
I.2	Laboratorio de Biotecnolo	0,5	ng/μl	0,011	-0,028	-0,39	0,02	DNA	50
J.10	Laboratorio de Biotecnolo	0,6	ng/μl	0,013	-0,021	-0,6	0,03	DNA	50
E.27	Laboratorio de Biotecnolo	1,9	ng/μl	0,038	-0,023	-1,65	0,05	DNA	50
F.1	Laboratorio de Biotecnolo	1,3	ng/μl	0,026	-0,014	-1,89	0,05	DNA	50
J.13	Laboratorio de Biotecnolo	1	ng/μl	0,02	-0,023	-0,87	0,04	DNA	50
J.9	Laboratorio de Biotecnolo	1,2	ng/μl	0,023	-0,018	-1,29	0,05	DNA	50
C.4	Laboratorio de Biotecnolo	1,3	ng/μl	0,027	-0,018	-1,47	0,06	DNA	50

ANEXO C

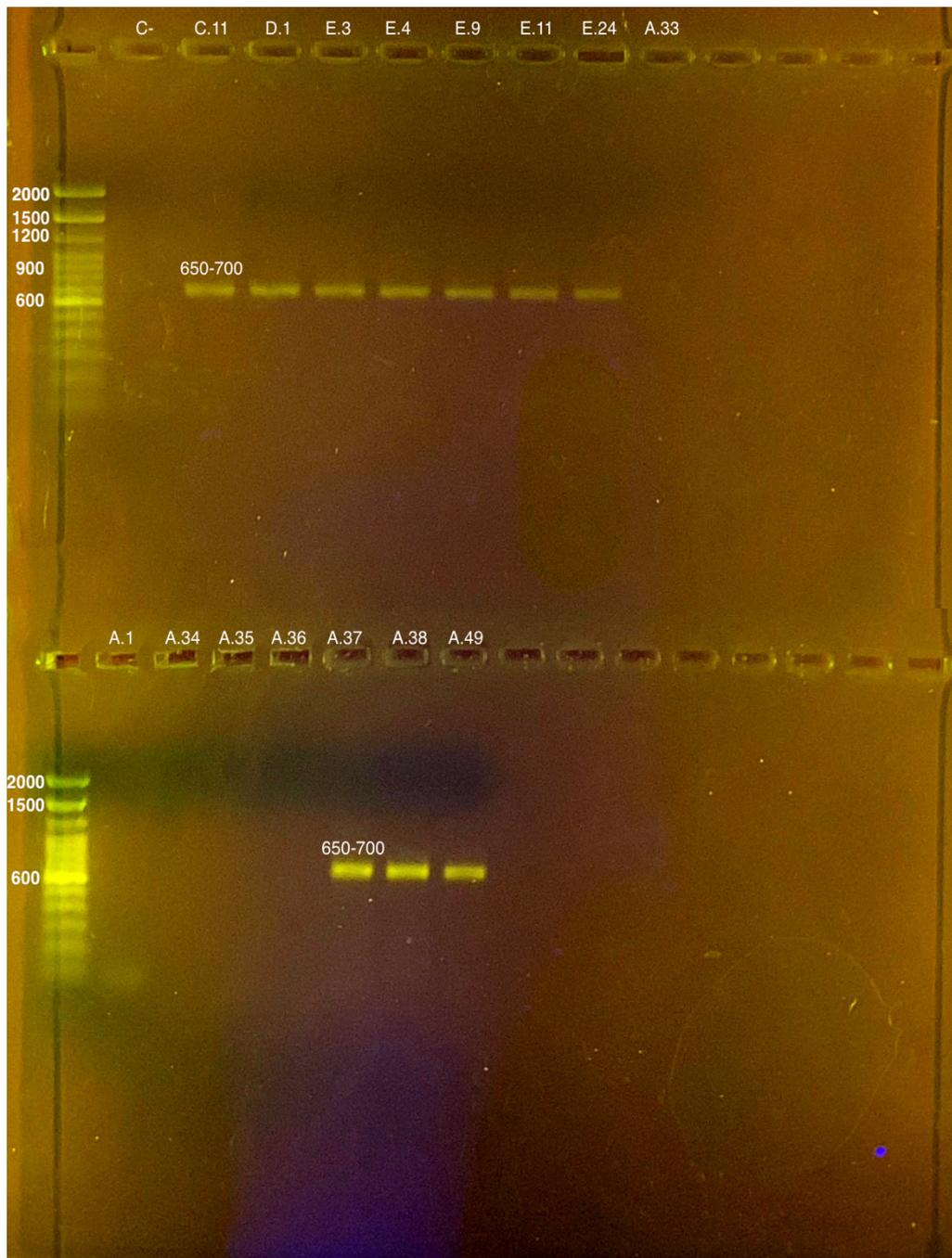


Figura No. 1 amplificación de gen Citocromo c oxidasa I en gel de agarosa de muestras de *Pi. serrana* y *Pi. robusta* (gel 1). De izquierda a derecha se observa en la parte superior el Ladder de 100pb Invitrogen, control negativo, muestras amplificadas de Toachi- Pilatón (C.11, D.1, E.3, E.3, E.9, E.11, E.24) y muestra de Zumba (A.33). parte inferior se observa ladder 100pb Invitrogen, control negativo, muestras de Zumba (A.1, A.34, A.35, A.36, A.37, A.38, A.49).

ANEXO D

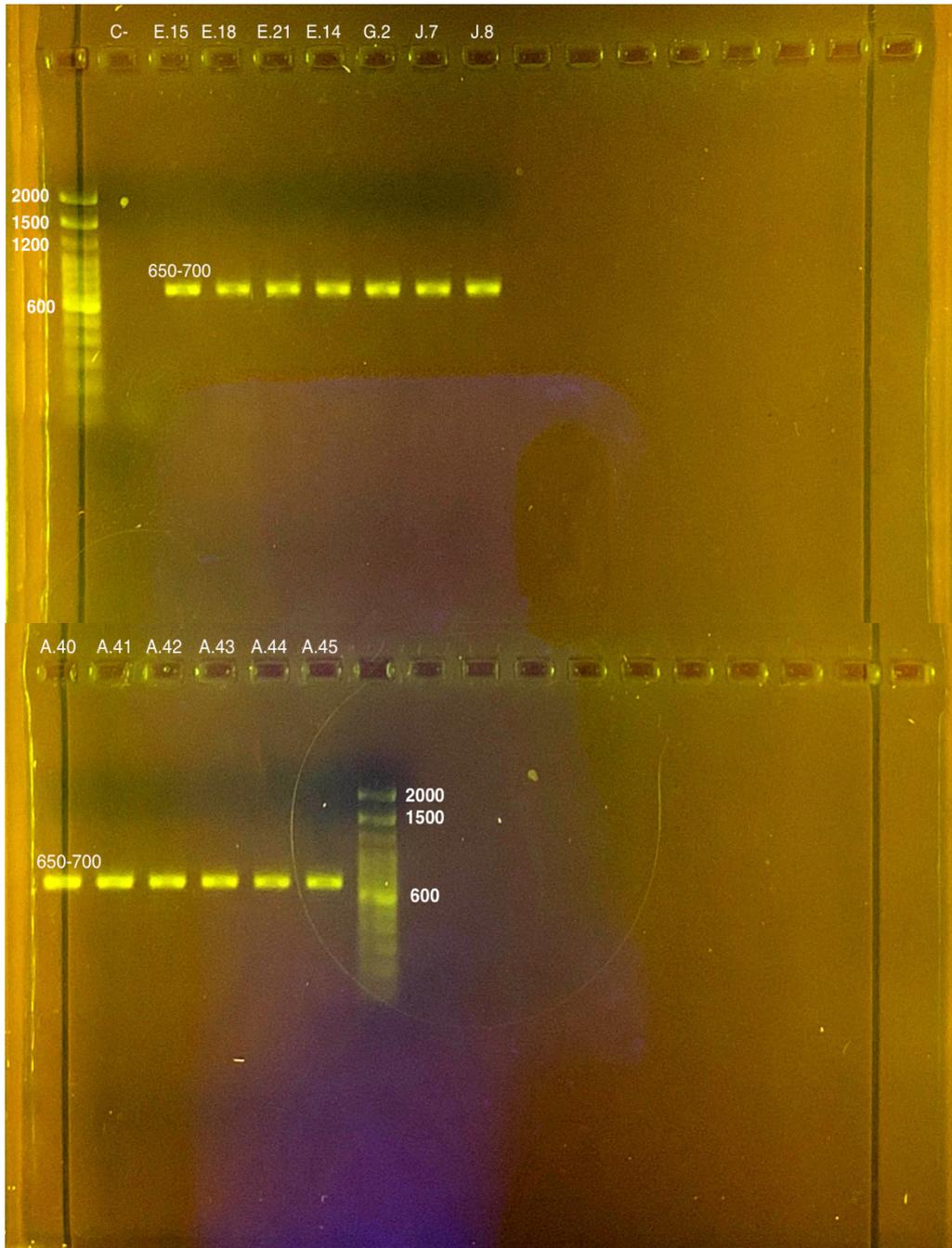


Figura No. 2 amplificación de gen Citocromo c oxidasa I en gel de agarosa de muestras de *Pi. serrana* y *Pi. robusta* (gel 2). De izquierda a derecha se observa en la parte superior el Ladder de 100pb Invitrogen, control negativo, muestras amplificadas de Toachi- Pilatón (E.15, E.18, E.21, E.14, G.2, J.7, J.8); parte inferior se observa ladder 100pb Invitrogen, control negativo, muestras de Zumba (A.40, A.41, A.42, A.43, A.44, A.45).

ANEXO E

(A) *Lutzomyia robusta* isolate Lrobusta cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: [FJ437280.1](#) Length: 642 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1186 bits(642)	0.0	642/642(100%)	0/642(0%)	Plus/Plus
Query 9	AACATTATATTTATTTTGGAGCCTGATCGGAATAATTTGGTACTTCCTTAAGAATTC	68		
Sbjct 1	AACATTATATTTATTTTGGAGCCTGATCGGAATAATTTGGTACTTCCTTAAGAATTC	60		
Query 69	TATTCGAGCAGAATTAGGACATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAAATTCACAAATG	128		
Sbjct 61	TATTCGAGCAGAATTAGGACATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAAATTCACAAATG	120		
Query 129	AATTGTAACCTGCTCATGCCCTTGTATAAATTTTTATAGTAATACCTATATAATTTGG	188		
Sbjct 121	AATTGTAACCTGCTCATGCCCTTGTATAAATTTTTATAGTAATACCTATATAATTTGG	180		
Query 189	AGGATTTGGAACTGACTTGTCCCTTATATAGGGGCTCCCGATATAGCCTTCCCTCG	248		
Sbjct 181	AGGATTTGGAACTGACTTGTCCCTTATATAGGGGCTCCCGATATAGCCTTCCCTCG	240		
Query 249	AATAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCCCTCTTTAACTCTATATAAAGTAAAG	308		
Sbjct 241	AATAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCCCTCTTTAACTCTATATAAAGTAAAG	300		
Query 309	AATAGTTGAAACAGGACGAGAACTGGTGAACCTGTTATCCCCCTTCTAGTAATAT	368		
Sbjct 301	AATAGTTGAAACAGGACGAGAACTGGTGAACCTGTTATCCCCCTTCTAGTAATAT	360		
Query 369	TGCACATAGAGGGGCTCTGTAGATTTAGCAATTTTTCTCTCAATTAGCAGGAATTC	428		
Sbjct 361	TGCACATAGAGGGGCTCTGTAGATTTAGCAATTTTTCTCTCAATTAGCAGGAATTC	420		
Query 429	TTCTATTCGGGTGCAGTAAATTTTATACACAGTATAAATATGCGATCAACAGGAAT	488		
Sbjct 421	TTCTATTCGGGTGCAGTAAATTTTATACACAGTATAAATATGCGATCAACAGGAAT	480		
Query 489	TTCTTTAGATCGAATACCTTTATTTGATGATGCTGTTGATTAAGCTGTTTACTTTT	548		
Sbjct 481	TTCTTTAGATCGAATACCTTTATTTGATGATGCTGTTGATTAAGCTGTTTACTTTT	540		
Query 549	ATTATCCCTACAGTATTAGCTGGAGCTAATTAATCTACTAATTAAGCTGAAATTTAAA	608		
Sbjct 541	ATTATCCCTACAGTATTAGCTGGAGCTAATTAATCTACTAATTAAGCTGAAATTTAAA	600		
Query 609	TACCTCATTTTTGACCTCGAGGAGGAGACCAATTTT 650			
Sbjct 601	TACCTCATTTTTGACCTCGAGGAGGAGACCAATTTT 642			

(B) *Lutzomyia robusta* isolate Lrobusta cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: [FJ437280.1](#) Length: 642 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1181 bits(639)	0.0	641/642(99%)	0/642(0%)	Plus/Plus
Query 8	AACATTATATTTATTTTGGAGCCTGATCGGAATAATTTGGTACTTCCTTAAGAATTC	67		
Sbjct 1	AACATTATATTTATTTTGGAGCCTGATCGGAATAATTTGGTACTTCCTTAAGAATTC	60		
Query 68	TATTCGAGCAGAATTAGGACATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAAATTCACAAATG	127		
Sbjct 61	TATTCGAGCAGAATTAGGACATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAAATTCACAAATG	120		
Query 128	AATTGTAACCTGCTCATGCCCTTGTATAAATTTTTATAGTAATACCTATATAATTTGG	187		
Sbjct 121	AATTGTAACCTGCTCATGCCCTTGTATAAATTTTTATAGTAATACCTATATAATTTGG	180		
Query 188	AGGATTTGGAACTGACTTGTCCCTTATATAGGGGCTCCCGATATAGCCTTCCCTCG	247		
Sbjct 181	AGGATTTGGAACTGACTTGTCCCTTATATAGGGGCTCCCGATATAGCCTTCCCTCG	240		
Query 248	AATAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCCCTCTTTAACTCTATATAAAGTAAAG	307		
Sbjct 241	AATAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCCCTCTTTAACTCTATATAAAGTAAAG	300		
Query 308	AATAGTTGAAACAGGACGAGAACTGGTGAACCTGTTATCCCCCTTCTAGTAATAT	367		
Sbjct 301	AATAGTTGAAACAGGACGAGAACTGGTGAACCTGTTATCCCCCTTCTAGTAATAT	360		
Query 368	TGCACATAGAGGGGCTCTGTAGATTTAGCAATTTTTCTCTCAATTAGCAGGAATTC	427		
Sbjct 361	TGCACATAGAGGGGCTCTGTAGATTTAGCAATTTTTCTCTCAATTAGCAGGAATTC	420		
Query 428	TTCTATTCGGGTGCAGTAAATTTTATACACAGTATAAATATGCGATCAACAGGAAT	487		
Sbjct 421	TTCTATTCGGGTGCAGTAAATTTTATACACAGTATAAATATGCGATCAACAGGAAT	480		
Query 488	TTCTTTAGATCGAATACCTTTATTTGATGATGCTGTTGATTAAGCTGTTTACTTTT	547		
Sbjct 481	TTCTTTAGATCGAATACCTTTATTTGATGATGCTGTTGATTAAGCTGTTTACTTTT	540		
Query 548	ATTATCCCTACAGTATTAGCTGGAGCTAATTAATCTACTAATTAAGCTGAAATTTAAA	607		
Sbjct 541	ATTATCCCTACAGTATTAGCTGGAGCTAATTAATCTACTAATTAAGCTGAAATTTAAA	600		
Query 608	TACCTCATTTTTGACCTCGAGGAGGAGACCAATTTT 649			
Sbjct 601	TACCTCATTTTTGACCTCGAGGAGGAGACCAATTTT 642			

(C)

(D)

Lutzomyia robusta isolate Lrobusta cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: [FJ437280.1](#) Length: 642 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1147 bits(621)	0.0	635/642(99%)	0/642(0%)	Plus/Plus
Query 8	AACATTATATTTATTTTGGAGCCTGATCGGAATAATTTGGTACTTCCTTAAGAATTC	67		
Sbjct 1	AACATTATATTTATTTTGGAGCCTGATCGGAATAATTTGGTACTTCCTTAAGAATTC	60		
Query 68	TATTCGAGCAGAATTAGGACATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAAATTCACAAATG	127		
Sbjct 61	TATTCGAGCAGAATTAGGACATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAAATTCACAAATG	120		
Query 128	AATTGTAACCTGCTCATGCCCTTGTATAAATTTTTATAGTAATACCTATATAATTTGG	187		
Sbjct 121	AATTGTAACCTGCTCATGCCCTTGTATAAATTTTTATAGTAATACCTATATAATTTGG	180		
Query 188	AGGATTTGGAACTGACTTGTCCCTTATATAGGGGCTCCCGATATAGCCTTCCCTCG	247		
Sbjct 181	AGGATTTGGAACTGACTTGTCCCTTATATAGGGGCTCCCGATATAGCCTTCCCTCG	240		
Query 248	AATAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCCCTCTTTAACTCTATATAAAGTAAAG	307		
Sbjct 241	AATAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCCCTCTTTAACTCTATATAAAGTAAAG	300		
Query 308	AATAGTTGAAACAGGACGAGAACTGGTGAACCTGTTATCCCCCTTCTAGTAATAT	367		
Sbjct 301	AATAGTTGAAACAGGACGAGAACTGGTGAACCTGTTATCCCCCTTCTAGTAATAT	360		
Query 368	TGCACATAGAGGGGCTCTGTAGATTTAGCAATTTTTCTCTCAATTAGCAGGAATTC	427		
Sbjct 361	TGCACATAGAGGGGCTCTGTAGATTTAGCAATTTTTCTCTCAATTAGCAGGAATTC	420		
Query 428	TTCTATTCGGGTGCAGTAAATTTTATACACAGTATAAATATGCGATCAACAGGAAT	487		
Sbjct 421	TTCTATTCGGGTGCAGTAAATTTTATACACAGTATAAATATGCGATCAACAGGAAT	480		
Query 488	TTCTTTAGATCGAATACCTTTATTTGATGATGCTGTTGATTAAGCTGTTTACTTTT	547		
Sbjct 481	TTCTTTAGATCGAATACCTTTATTTGATGATGCTGTTGATTAAGCTGTTTACTTTT	540		
Query 548	ATTATCCCTACAGTATTAGCTGGAGCTAATTAATCTACTAATTAAGCTGAAATTTAAA	607		
Sbjct 541	ATTATCCCTACAGTATTAGCTGGAGCTAATTAATCTACTAATTAAGCTGAAATTTAAA	600		
Query 608	TACCTCATTTTTGACCTCGAGGAGGAGACCAATTTT 649			
Sbjct 601	TACCTCATTTTTGACCTCGAGGAGGAGACCAATTTT 642			

Lutzomyia robusta isolate Lrobusta cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gene, partial cds; mitochondrial

Sequence ID: [FJ437280.1](#) Length: 642 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1114 bits(603)	0.0	617/624(99%)	0/624(0%)	Plus/Plus
Query 17	AACATTATATTTATTTTGGAGCCTGATCGGAATAATTTGGTACTTCCTTAAGAATTC	76		
Sbjct 1	AACATTATATTTATTTTGGAGCCTGATCGGAATAATTTGGTACTTCCTTAAGAATTC	60		
Query 77	TATTCGAGCAGAATTAGGACATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAAATTCACAAATG	136		
Sbjct 61	TATTCGAGCAGAATTAGGACATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAAATTCACAAATG	120		
Query 137	AATTGTAACCTGCTCATGCCCTTGTATAAATTTTTATAGTAATACCTATATAATTTGG	196		
Sbjct 121	AATTGTAACCTGCTCATGCCCTTGTATAAATTTTTATAGTAATACCTATATAATTTGG	180		
Query 197	AGGATTTGGAACTGACTTGTCCCTTATATAGGGGCTCCCGATATAGCCTTCCCTCG	256		
Sbjct 181	AGGATTTGGAACTGACTTGTCCCTTATATAGGGGCTCCCGATATAGCCTTCCCTCG	240		
Query 257	AATAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCCCTCTTTAACTCTATATAAAGTAAAG	316		
Sbjct 241	AATAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCCCTCTTTAACTCTATATAAAGTAAAG	300		
Query 317	AATAGTTGAAACAGGACGAGAACTGGTGAACCTGTTATCCCCCTTCTAGTAATAT	376		
Sbjct 301	AATAGTTGAAACAGGACGAGAACTGGTGAACCTGTTATCCCCCTTCTAGTAATAT	360		
Query 377	TGCACATAGAGGGGCTCTGTAGATTTAGCAATTTTTCTCTCAATTAGCAGGAATTC	436		
Sbjct 361	TGCACATAGAGGGGCTCTGTAGATTTAGCAATTTTTCTCTCAATTAGCAGGAATTC	420		
Query 437	TTCTATTCGGGTGCAGTAAATTTTATACACAGTATAAATATGCGATCAACAGGAAT	496		
Sbjct 421	TTCTATTCGGGTGCAGTAAATTTTATACACAGTATAAATATGCGATCAACAGGAAT	480		
Query 497	TTCTTTAGATCGAATACCTTTATTTGATGATGCTGTTGATTAAGCTGTTTACTTTT	556		
Sbjct 481	TTCTTTAGATCGAATACCTTTATTTGATGATGCTGTTGATTAAGCTGTTTACTTTT	540		
Query 557	ATTATCCCTACAGTATTAGCTGGAGCTAATTAATCTACTAATTAAGCTGAAATTTAAA	616		
Sbjct 541	ATTATCCCTACAGTATTAGCTGGAGCTAATTAATCTACTAATTAAGCTGAAATTTAAA	600		
Query 617	TACCTCATTTTTGACCTCGAGG 640			
Sbjct 601	TACCTCATTTTTGACCTCGAGG 624			

Figura No. 3 comparación de secuencias de estudio con secuencia referencia

FJ437280.1 de NCBI. (A) se observa la secuencia de la muestra A. 37 de *Pintomyia*

robusta con la secuencia de referencia de la base de datos (NCBI) de Perú para *Pi.*

robusta. Secuencia de estudio (Query) tiene 100% de identidad con secuencia de NCBI

(Subject). (B) se observa la secuencia de la muestra A. 341 de *Pi. robusta* con la secuencia

de referencia de la base de datos (NCBI) de Perú para *Pi. robusta*. Secuencia de estudio (Query) tiene 99% de identidad con secuencia de NCBI (Subject); en círculos rojos se encuentran las mutaciones. (C) se observa la secuencia de la muestra A. 40 de *Pi. robusta* con la secuencia de referencia de la base de datos (NCBI) de Perú para *Pi. robusta*. Secuencia de estudio (Query) tiene 99% de identidad con secuencia de NCBI (Subject); en círculos rojos se encuentra las 7 mutaciones. (D) se observa la secuencia de la muestra C.11 de *Pi. serrana* con la secuencia de referencia de la base de datos (NCBI) de Perú para *Pi. robusta*. Secuencia de estudio (Query) tiene 99% de identidad con secuencia de NCBI (Subject); en círculos rojos se encuentran las 6 mutaciones.

ANEXO F

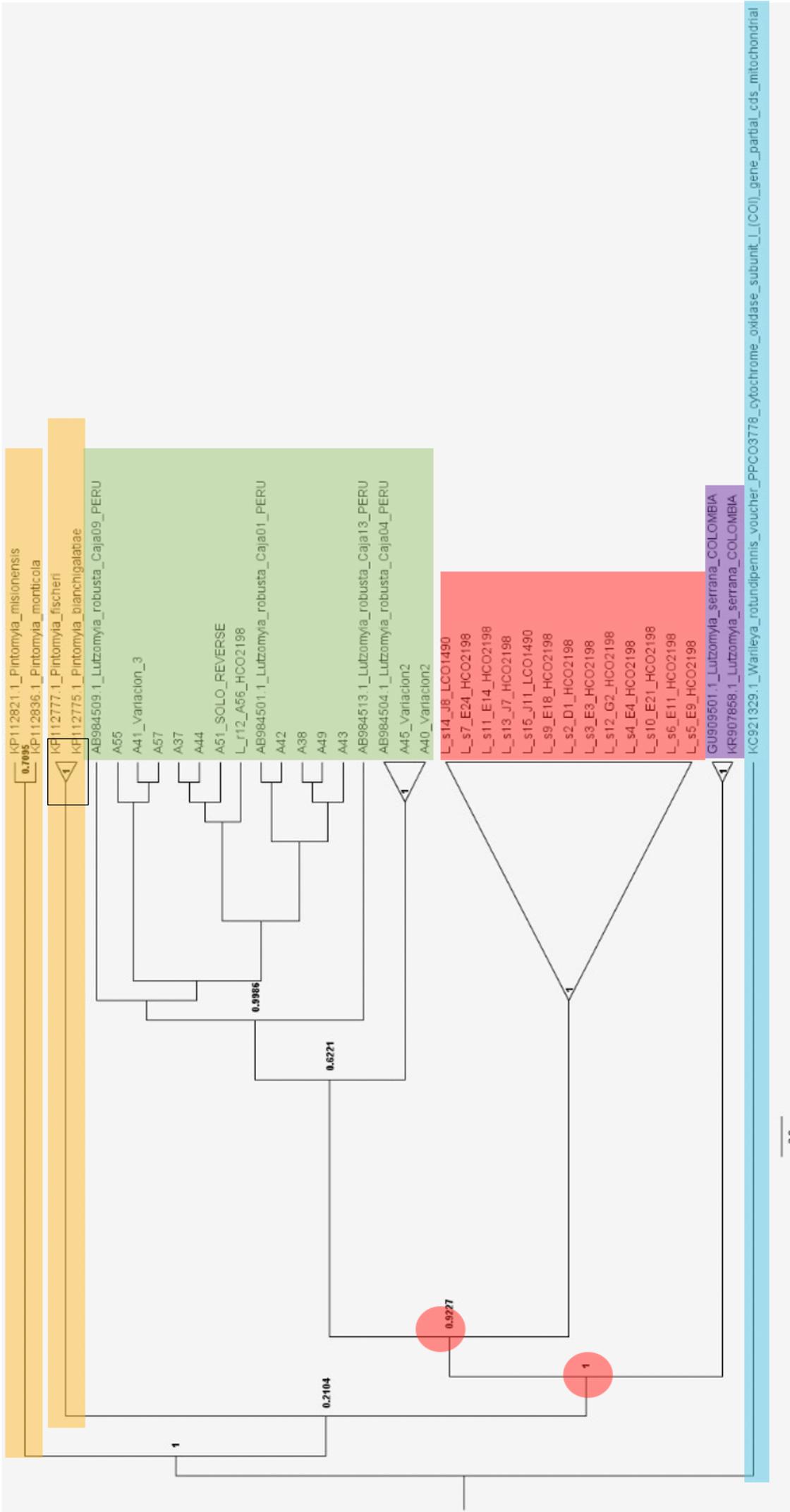


Figura No. 4 árbol filogenético de *Pintomyia serrana* y *Pi. robusta*. En color celeste se encuentra Outgroup del género *Warileya*. En color amarillo están especies del género *Pintomyia* de otros países. En color verde están las *Pintomyia robusta* de Ecuador (estudiadas) y de Perú. En color rojo están las secuencias de *Pintomyia serrana* de Ecuador (estudiadas). Y en color lila están las secuencias de *Pi. serrana* de Colombia. En círculos rojos están los ancestros comunes de las especies.

ANEXO G

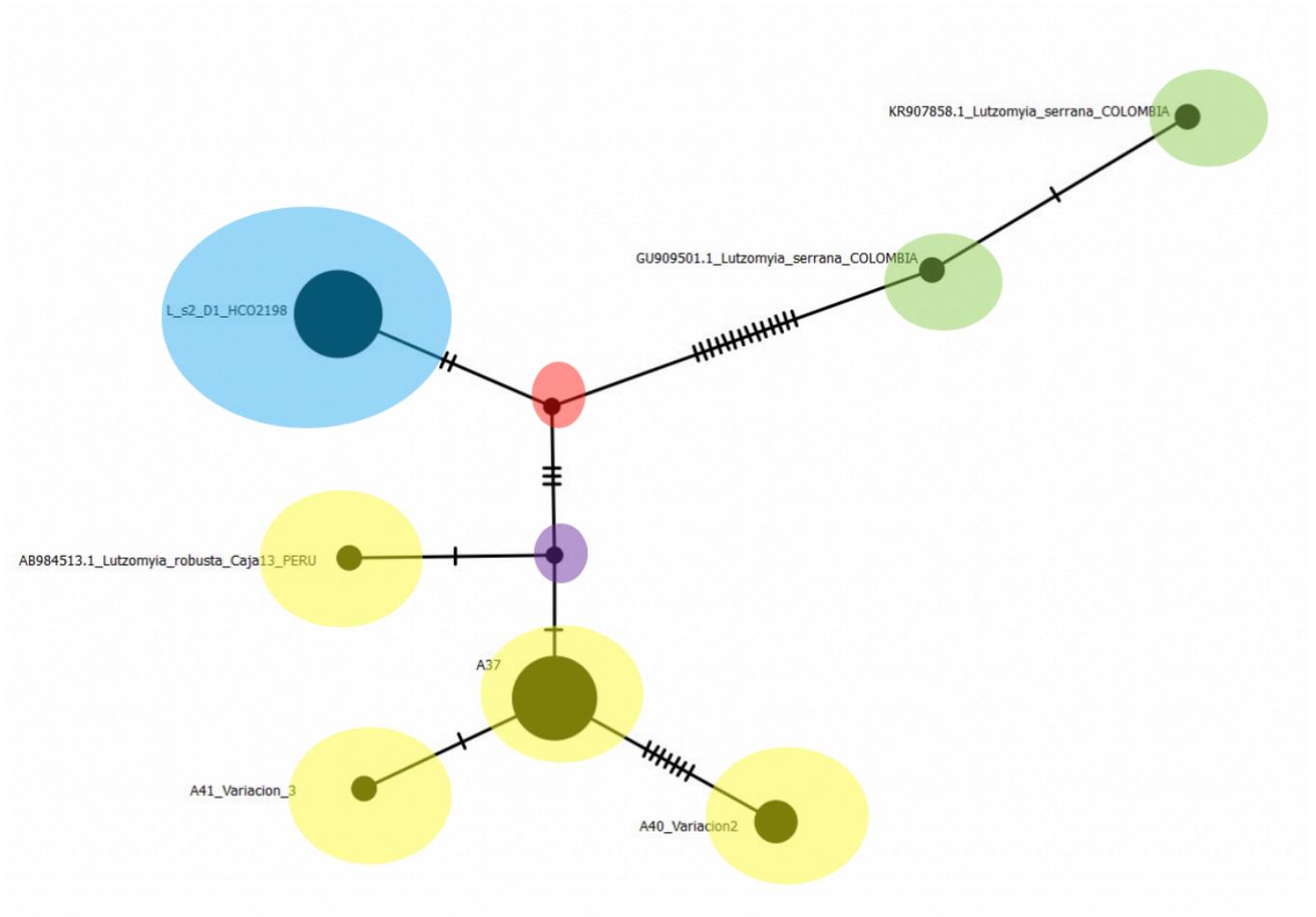


Figura No. 5 red de haplotipos de *Pintomyia serrana* y *Pi. robusta*. El tamaño del círculo determina el número de muestras y las líneas transversales los eventos mutacionales entre grupos. *Pintomyia serrana* de Ecuador (azul), *Pi. serrana* de Colombia (verde), *Pi. robusta* de Ecuador y Perú (amarillo).