



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**“Identificación Molecular de las Preferencias Tróficas de flebótomos  
colectados en 5 provincias ecuatorianas”**

**Estefania Lizzette Palacios Cevallos**

**Sonia Zapata, Ph.D., Directora de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Procesos  
Biotecnológicos

Quito, mayo de 2015

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**“Identificación Molecular de las Preferencias Tróficas de flebótomos  
colectados en 5 provincias ecuatorianas”**

**Estefania Lizzette Palacios Cevallos**

Sonia Zapata Mena, Ph.D.

Directora de Tesis

-----

Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

-----

Gabriel Trueba, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

-----

Stella de la Torre, Ph.D.

-----

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, mayo de 2015

## © 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: Estefania Lizzette Palacios Cevallos

C. I.: 1716151996

Fecha: Quito, mayo de 2015

## **DEDICATORIA**

A mis padres por su apoyo incondicional en todo momento y siempre estar cuando más lo he necesitado. Gracias Juan y Jacky por los valores inculcados durante mi vida, por mi formación académica pero sobre por el Amor de Hogar que me han brindado, los amo.

A mi hermana por enseñarme a luchar por lo que quiero, estar conmigo en las buenas y en las malas pero sobre todo por ser esa persona que esta dispuesta a escucharme en todo momento y sacarme una sonrisa.

A Gustavo Salvador por enseñarme a crecer como persona, ser mi apoyo incondicional en todo momento y ser mi compañero de vida, de viajes y salidas de campo. Gracias por todo tu apoyo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y amigos por estar conmigo en todo momento, ser mi guía a lo largo de mi vida.

Por estar a mi lado cuando lo he necesitado, aconsejarme para superar los diferentes obstáculos que se han presentado. Gracias.

Mi especial agradecimiento a Sonia Zapata, Gabriel Trueba, Lourdes Torres, Lorena Mejía, Venancio Arahana, Gabriela Vasco, Sofía Ayala, Daniela Castillo y Cristina Chávez por su guía y apoyo en la realización de este proyecto.

A Moises Gualapuro, Ángel Cecaíra y Marco Antonio por ayudarme en las colectas de campo.

## RESUMEN

La leishmaniasis es considerada una enfermedad re-emergente y en expansión, a causa de los constantes cambios ambientales y poblacionales. Es causada por un protozoo del género *Leishmania* y transmitido por la picadura de un vector de la subfamilia Phlebotominae. En Ecuador está presente únicamente la forma tegumentaria (cutánea y mucocutánea) y es endémica en 22 de 24 provincias. Al ser una enfermedad zoonótica, algunos animales silvestres juegan un rol crucial en la transmisión del parásito, los mismos que son considerados reservorios. Con el propósito de identificar posibles reservorios se realizó colectas entomológicas entre los años 2012 y 2014 en 5 provincias del Ecuador (Bolívar, Esmeraldas, Orellana, Manabí y Pichincha) donde la leishmaniasis es endémica. Se colectó un total de 3103 especímenes, de los cuales el 11.5% fueron hembras con ingesta de sangre, pertenecientes a 10 especies que incluyen vectores de *Leishmania*. A través de la amplificación del gen nuclear *PNO*C, se identificó la fuente de alimentación de 50 especímenes. Los reservorios identificados en este estudio fueron: *Choloepus hoffmanni*, *Potos flavus*, *Bos taurus*, *Pecari tajacu*, *Capra hircus*, *Equus caballus*, *Cebus capucinus*, *Tapirus terrestris* y *Homo sapiens*. De estos, los dos primeros ya han sido reportados como reservorios y se sospecha de *Cebus capucinus*. Los resultados de esta investigación contribuyen a entender el ciclo de transmisión de *Leishmania* e identificar posibles nuevos sitios de transmisión debido a la presencia del vector, reservorio y Ser Humano que permita tomar medidas de control de esta enfermedad. Finalmente, estos datos podrían extrapolarse a otras zonas de similares condiciones ambientales, donde el ciclo de vida del parásito sea posible y aún no se ha identificado.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is considered a re-emerging and expanding disease, in response to the constant environmental changes and population displacement. It is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of a vector belonging to Phlebotominae subfamily. In Ecuador, leishmaniasis is endemic in 22 of 24 provinces, in which, is only present the tegumentary form (cutaneous and mucocutaneous). As a zoonotic disease, some wild animals play a crucial role in parasite transmission, these are considered as reservoirs. In order to identify potential reservoirs, an entomological collection was performed between 2012 and 2014 in 5 provinces endemic for leishmaniasis in Ecuador (Bolívar, Esmeraldas, Orellana, Manabí y Pichincha). A total of 3103 specimens was collected, of which 11.5% were engorged females belonging to 10 species including *Leishmania* vectors. Amplification of PNO nuclear gene was performed in order to identify the source of blood meal from 50 specimens. The reservoirs identified in this study were: *Choloepus hoffmanni*, *Potos flavus*, *Bos taurus*, *Pecari tajacu*, *Capra hircus*, *Equus caballus*, *Cebus capucinus*, *Tapirus terrestris* and *Homo sapiens*. Of these, the first two had already been reported as reservoirs, while *Cebus capucinus* is suspected of being a reservoir. The results of this investigation contributes to understanding the transmission cycle of *Leishmania* and identifying potential new sites of transmission; due to the presence of vector, reservoir and human that allow to take control measures for this disease. Finally, our results could be extrapolated in others areas with similar environmental conditions where life cycle of the parasite can be completed, however it has not been identified yet.



## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>13</b>
1.1 Leishmaniasis.....	13
1.2 Leishmaniasis en Ecuador .....	15
1.3 El vector.....	16
1.3.1 Ciclo de Vida.....	16
1.3.2 Clasificación .....	17
1.4 Reservorios .....	19
1.5 Preferencias tróficas de flebótomos.....	19
<b>2. Justificación</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Área de Estudio</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Objetivos:</b> .....	<b>23</b>
4.1 General.....	23
4.2 Específicos.....	23
<b>5. Materiales</b> .....	<b>23</b>
5.1 Colección y separación de especímenes .....	23
5.2 Identificación de especímenes .....	23
5.3 Extracción de ADN.....	24
5.4 Amplificación ADN.....	24
5.5 Electroforesis en Gel de Agarosa.....	25
5.6 Secuenciamiento .....	25
5.7 Análisis de secuencias.....	25
<b>6. Métodos</b> .....	<b>26</b>
<b>6.1 Colección entomológica</b> .....	<b>26</b>
6.1.1 Colección de especímenes .....	26
6.1.2 Separación de especímenes .....	26
6.1.3 Montaje en placa.....	27
6.1.4 Identificación de especímenes.....	27
<b>6.2 Análisis molecular</b> .....	<b>27</b>
6.2.1 Extracción de ADN.....	27
6.2.2 Extracción de ADN .....	29
6.2.3. Amplificación del gen <i>PNOC</i> .....	29
6.2.4 Electroforesis en gel de agarosa .....	30
6.2.5 Secuenciamiento.....	30
6.2.6 Análisis secuencias.....	30
<b>7. Resultados</b> .....	<b>31</b>
7.1 Colección entomológica.....	31

7.2	Análisis molecular de las preferencias tróficas .....	32
<b>8.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>33</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>43</b>
<b>10.</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>45</b>
<b>11.</b>	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>46</b>
<b>12.</b>	<b>Tablas .....</b>	<b>55</b>
<b>13.</b>	<b>Figuras.....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Tipos de <i>Leishmania</i> en el viejo mundo y los vectores incriminados y/o sospechosos.....	55
<b>TABLA 2.</b> Tipos de <i>Leishmania</i> en el nuevo mundo y los vectores incriminados y/o sospechosos.....	56
<b>TABLA 3.</b> Datos reportados por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador sobre la incidencia de Leishmaniasis en las diferentes provincias del país desde el año 2005-2013 (MSP, 2014). .....	58
<b>TABLA 4.</b> Lista de especies de mamíferos infectados con <i>Leishmania</i> en las Américas .....	59
<b>TABLA 5.</b> Ubicación geográfica de los sitios de colección de flebótomos. ....	60
<b>TABLA 6.</b> Reacción de PCR para la amplificación del gen PNOC .....	60
<b>TABLA 7.</b> Condiciones utilizadas para la amplificación del gen PNOC tomado de Haouas et al 2007.....	61
<b>TABLA 8.</b> Total de especímenes colectados y porcentaje de hembras con ingesta de sangre en las provincias de estudio.....	62
<b>TABLA 9.</b> Total de hembras con ingesta de sangre y porcentaje de las mismas por provincias.....	62
<b>TABLA 10.</b> Total de hembras con ingesta de sangres extraídas y amplificadas en el estudio.....	63
<b>TABLA 11.</b> Distribución de especies de flebótomos colectadas en provincias de estudio. ....	63
<b>TABLA 12.</b> Identificación de las preferencias tróficas de flebótomos en las provincias de estudio. ....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Mapa de distribución mundial de Leishmaniasis cutánea en el año 2012 (OMS, 2015).....	65
<b>FIGURA 2.</b> Clasificación de la subfamilia Phlebotominae en trius y subtribus de acuerdo a los parámetros de Galati (Galati, 2010). .....	66
<b>FIGURA 3.</b> Sitios donde se realizaron las colectas entomológicas en las cinco provincias de estudio. ....	67
<b>FIGURA 4.</b> Características morfológicas de <i>Psy. panamensis</i> de acuerdo a su taxonomía.....	68
<b>FIGURA 5.</b> Morfología externa de una hembra (Cabrera <i>et al.</i> , 2009).....	69
<b>FIGURA 6.</b> Ciclo de vida del parásito (CDC, 2013).....	69

## 1. Introducción

### 1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica considerada como una de las seis enfermedades infecciosas más importantes de la salud pública en el mundo. Es causada por un protozoo parásito del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de dípteros (hembras) de la subfamilia Phlebotominae (OMS, 2015; Rey, 2012). Es considerada una enfermedad endémica con expansión en 98 países y alrededor de 350 millones de personas están en riesgo de contraer la infección. Las poblaciones más susceptibles son aquellas de bajos recursos económicos (PAHO, 2014). Mientras que los principales factores de la presencia y expansión de la leishmaniasis son: las condiciones socioeconómicas, ambientes precarios, malnutrición, desplazamientos de la población, cambios climáticos, etc. (OMS, 2015).

La leishmaniasis puede manifestarse de 3 formas clínicas: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) (OMS, 2015). En LC el parásito no migra a otras zonas del cuerpo y conforme transcurre el tiempo puede llegar a producir úlceras en el sitio de la picadura; la LMC genera destrucción crónica del tejido y mucosas. Mientras, la LV es la forma más grave debido a que afecta de forma sistemática a varios órganos como hígado, bazo o médula ósea (Fernández, 2012; WHO, 2010).

Se estima que más de 12 millones de personas están infectadas a nivel mundial y la mayor parte de casos reportados corresponden a leishmaniasis cutánea. La leishmaniasis cutánea se encuentra distribuida en áreas tropicales y subtropicales a nivel mundial (CDC, 2013). En el continente americano se reporta esta enfermedad en: Brasil, Colombia, Perú y Nicaragua (OMS, 2015; PAHO, 2014) (Ver Figura 1).

Existen más de 900 especies de flebótomos distribuidas alrededor del mundo, de las cuales solo 40 son vectores confirmados de *Leishmania*. Estos vectores presentan un tipo de relación específica con el parásito en la naturaleza. Esta enfermedad depende de varios factores que

permiten que el parásito infecte, sobreviva y se multiplique en el intestino del vector. El vector debe ser capaz de transmitir el parásito a un vertebrado, para lo cual es necesario la participación de una hembra, quien a través de una picadura ingiere la sangre y a su vez deposita el parásito en el hospedador (Ramalho-Oritago *et al.*, 2010; Sacks & Kamhawi, 2001).

La propagación de *Leishmania* se debe al apareamiento e intervención de insectos alados, los mismos que permitieron el desarrollo del linaje de flebótomos (Killick-Kendrick, 1999). Por otro lado, con el desplazamiento de Pangea y el origen de Gondwana se permitió la evolución del vector en dos géneros, por un lado *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo. Se denomina Gondwana a la gran masa de tierra del sur originada por la división del supercontinente Pangea hace aproximadamente 250 millones de años. Hoy en día se conoce que África, América del Sur, India, Australia forman parte de Gondwana (DPIWE, 2006).

El género *Leishmania* está dividido en dos subgéneros. Los miembros del subgénero *Leishmania* se desarrollan en el intestino medio y anterior del vector, y los de *Viannia* se desarrollan en el intestino medio y posterior. La forma clínica de la leishmaniasis está relacionada con el tipo de especie de *Leishmania* y el vector que la transmite (Berriman *et al.*, 2005; Ivens, 2005).

La leishmaniasis visceral en el viejo mundo es causada por *L. donovani* y *L. infantum*, aunque se tiene ciertos reportes de *L. tropica* en pacientes inmunodeprimidos en coinfecciones con VIH. La mayoría de las infecciones son asintomáticas y en sitios endémicos es crónica. Mientras que en el nuevo mundo, la leishmaniasis visceral es endémica o esporádica, causada por *L. infantum* (WHO, 2010) (Tabla 1).

La leishmaniasis cutánea en el viejo mundo es causada por *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* y *L. donovani* (Tabla 1). Entretanto, las especies causantes de este tipo en el nuevo mundo son *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana*

y *L. (V.) guyanensis*. En América los casos reportados se encuentran distribuidos desde Texas hasta Argentina (WHO, 2010) (Tabla 2).

La leishmaniasis mucocutánea es endémica del continente americano, causada por especies del subgénero *Viannia* como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y en ocasiones por *L. (V.) guyanensis* y *L. (L.) amazonensis* (CDC, 2014). Los países que reportan casos de LMC son: Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana, Ecuador y Perú (Ronet *et al.*, 2010; WHO, 2010).

## 1.2 Leishmaniasis en Ecuador

En Ecuador hasta el momento no se conoce ningún caso reportado de la forma visceral. Los datos proporcionados por el Ministerio de Salud Pública manifiestan que el número de casos ha disminuido desde el año 2009 (Tabla 3) (MSP, 2014). Sin embargo, la tasa de leishmaniasis de acuerdo a la distribución por regiones es mayor en la Amazonía, estos datos no permiten saber con exactitud el tipo de población más vulnerable de contraer la enfermedad, lo que sí se conoce es que las personas que trabajan en el campo (por lo general género masculino) son más susceptibles de adquirir la enfermedad. Por ejemplo, en Pedro Vicente Maldonado se determinó que los hombres dedicados a las actividades agropecuarias son más propensos a infectarse debido al mayor tiempo de exposición al vector (Ampudia, 2014).

La leishmaniasis en Ecuador se encuentra ampliamente distribuida en áreas subtropicales de la región Amazónica, zonas tropicales de la región Costa y en algunos valles de la región Sierra. Por lo tanto, la leishmaniasis es endémica en el país debido a que está presente en 22 de las 24 provincias y los sectores de bajos recursos económicos son los más vulnerables (Kato *et al.*, 2013; Zapata *et al.*, 2012).

De acuerdo con los últimos registros en Ecuador existirían 76 especies de flebótomos pertenecientes a 17 subgéneros. De los cuales se conoce que *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia tortura* y *Lutzomyia ayacuchensis* son vectores (Calvopiña *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2013; Zapata *et al.*, 2012).

Mientras que otras especies como *Bichromomyia olmeca bicolor*, *Bichromomyia flaviscutellata* y *Psychodopygus carrerai carrerai* podrían ser considerados como vectores. Por otro lado, *Psychodopygus panamensis* está presente en zonas endémicas de leishmaniasis cutánea de la costa ecuatoriana y es vector comprobado de *L. panamensis* y *L. braziliensis* en Colombia y Panamá. De tal manera, que la evidencia epidemiológica sugiere que *Psychodopygus panamensis* podría ser un posible vector de LC en Ecuador (Cabrera *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2000).

### **1.3 El vector**

#### **1.3.1 Ciclo de Vida**

Se lo conoce comúnmente como “Manta Blanca”. Es un díptero de tamaño pequeño comprendido de 1,5 a 2 mm, la característica que lo diferencia de otros insectos es que su cuerpo está cubierto de bastantes pelos y sus alas son erectas en forma de “V” cuando reposa. El alcance de su vuelo puede ser de hasta 200 metros, sin embargo por la acción del viento pueden recorrer mayores distancias. El vuelo en la mayoría de los casos es silencioso y la trayectoria de desplazamiento es a manera de brincos (Ampuero, 2000) (Figura 5).

Su ciclo de vida consiste en 4 estadios: huevos, larvas, pupas y adultos. Las hembras toman sangre para madurar sus huevos, los mismos que en cantidad pueden llegar a ser cientos. Los huevos son depositados en lugares húmedos y oscuros. El vuelo de la hembra se limita a tener el reservorio cerca para realizar la ingesta de sangre y a su vez, que no esté lejos de la vegetación para el descanso y oviposición. También, se tiene el caso de las hembras que son autógenas, es decir, aquellas que no requieren de la ingesta de sangre (Mencke *et al.* 2003) (Figura 6). La actividad de los flebótomos es en horas de la tarde y se los puede encontrar en una amplia diversidad de climas desde zonas templadas hasta desiertos (Gama *et al.*, 2010).

El ciclo biológico del parásito se inicia con la ingesta de sangre por parte del vector, para lo cual debe realizar una salivación previa que contiene anticoagulantes y vasodilatadores que causan hemorragia (Rodríguez, 2012; Valenzuela *et al.* 2001). Posteriormente, la hembra



hematófaga inyecta en la sangre promastigotes, estos son fagocitados por células fagocitarias y se convierten en amastigotes.

Los amastigotes se multiplican en las células infectadas y comienzan a generar daños en los tejidos, lo cual va a depender de la especie de *Leishmania*. El ciclo se completa cuando el vector ingiere sangre de un vertebrado infectado (macrófagos infectados con amastigotes) (Ryan & Ray, 2004) y en el intestino del vector este protozoo se diferencia en promastigotes en un periodo de 24 a 48 horas. Luego, se reproduce mediante mitosis y los promastigotes migran a la probóscide del vector, para que en caso de realizar una nueva picadura los promastigotes pasen a un nuevo hospedador (De Gopugui & Ruiz, 2003; Ryan & Ray, 2004; Uribarren, 2014).

### 1.3.2 Clasificación

Al momento existen 2 clasificaciones de flebótomos neotropicales que se contraponen.

Por un lado Young & Duncan (1994) reconocen la existencia de 3 géneros, los mismos que son: *Warileya*, *Brumptomyia* y *Lutzomyia* este último de importancia médica pues incluye especies vectoras de Leishmaniasis y Bartonellosis. A su vez, el género *Lutzomyia* está dividido en 15 subgéneros y 11 grupos de especies (Young & Duncan, 1994).

Por el otro, Galati (2010) realizó la clasificación taxonómica basándose en la relación evolutiva de las especies del Nuevo Mundo, por medio de un análisis cladístico de 88 caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos. Los resultados obtenidos tuvieron similitud a los de Artemiev (1991). De esta manera con la clasificación de Galati (2010) la subfamilia Phlebotominae se divide en 2 tribus (Hertigini y Phlebotomini) y 8 sub tribus.

La tribu Hertigini se divide en 2 sub tribus Hertigiina e Idiophlebotomina mientras que Phlebotomini incluye a las sub tribus: Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina y Psychodopygina (Figura 2).

Las subtribus Phlebotomina, Australophlebotomina e Idiophlebotomina incluyen a 5 géneros del viejo mundo. Dentro de la sub tribu Hertigiina, se encuentra el género *Warileya* presente en el Nuevo Mundo y las subtribus *Brumptomiina*, *Sergentomyiina*, *Lutzomyiina* y

*Psychodopygina* que albergan un total de 28 géneros todos presentes en el nuevo mundo (Contreras, 2013; Galati, 2010). Las subtribus *Lutzomyiina* y *Psychodopygina* incluyen especies vectoras de leishmaniasis (Kato *et al.* 2010).

En el nuevo Mundo según la revisión de Maroli *et al.*, (2012) y Ready, (2013) los vectores sospechosos de transmitir *Leishmania* son: *Lutzomyia cruzi* (*L. (L.) infantum*); *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Lutzomyia gomezi*, *Psychodopygus complexa*, *Migonemyia migonei*, *Psychodopygus panamensis* (*L. (V.) braziliensis*); *Nyssomyia whitmani*, *Lutzomyia ayacuchensis*, *Pintomyia longiflocosa*, *Nyssomyia shawi*, *Nyssomyia anduzei* (*L. (V.) guyanensis*); *Lutzomyia hartmanni* (*L. (V.) colombiensis*); *Psychodopygus ayrozai* (*L. (V.) naiffi*), etc. (Tabla 2).

Para que una especie sea considerada como vector natural, esta debe cumplir los siguientes criterios propuestos por (Ready, 2013):

- a) Los promastigotes aislados y/o descritos inequívocamente por otros, fueron identificados en una hembra sin ingesta reciente de sangre.
- b) Las formas infectivas de *Leishmania* deben estar en el intestino medio anterior y en la válvula estomogdeal de hembras infectadas naturalmente.
- c) Las especies de flebótomos son atraídos y pican al ser humano o cualquier reservorio.
- d) Una asociación ecológica incluyendo la estacionalidad entre flebótomos, humanos y otro reservorio.
- e) La transmisión experimental será exitosa cuando se logré infectar a hembras silvestres.
- f) El modelo matemático demuestre que el vector es esencial para mantener la transmisión con o sin la participación de otros vectores.
- g) El modelo matemático basado en un programa de control demuestre que la incidencia de la enfermedad se reduce significativamente después de una disminución en la densidad de picaduras de un vector específico.

## 1.4 Reservorios

Los reservorios son especies de vertebrados que tienen la responsabilidad de mantener el parásito en la naturaleza de manera directa o indirecta (Ashford, 1997; Haydon, 2002; Jansen & Roque, 2010).

Las especies que son seleccionadas como reservorios deben cumplir con un patrón ecológico conocido como la regla 20/80, la misma que determina que solo una minoría de un cierto grupo de especies debe ser infectadas por el parásito (Miller & Hupper, 2013; Woolhouse *et al.* 1997).

Hasta el momento no se conoce con exactitud todas las especies que actúan como reservorios en la naturaleza, sin embargo en el estudio realizado por Roque & Jansen (2014) se proporciona una lista de especies que son o se sospecha que son reservorios. Estos hospedadores pertenecen a los siguientes órdenes: *Didelphimorphia*, *Pilosa*, *Cingulata*, *Rodentia*, *Carnivora*, *Primata* y *Chiroptera* (Tabla 4).

En Ecuador los reservorios hasta el momento reportados son: *Choloepus hoffmanni*, *Choloepus didactylus*; *Tamandua tetradactyla*; *Sciurus granatensis*; *Potos flavus* (Grimaldi, 1992; Kreutzer *et al.*, 1991; Mimori *et al.*, 1989; Roque & Jansen. 2014). En la tabla 4 se detalla las especies de *Leishmania* encontradas en dichos reservorios.

## 1.5 Preferencias tróficas de flebótomos

Diferentes países tanto en el viejo como en el nuevo mundo, han realizado investigaciones con la finalidad de identificar los animales silvestres o domésticos como posibles reservorios de leishmaniasis. Diversas técnicas como: análisis serológico de la sangre por precipitina, ELISA y pruebas de biología molecular han sido utilizadas con este fin (Nery *et al.*, 2004; Tesh *et al.*, 1972).

En Irán, en una zona endémica de leishmaniasis visceral transmitida por *L. infantum*, se empleó la técnica PCR-RFLP para determinar las preferencias tróficas. Las especies que se identificaron fueron humanos, vacas y perros (Ravasan *et al.*, 2009). Asimismo, el gen mitocondrial citocromo b (*cyt b*) ha sido utilizado para determinar el origen de la fuente de alimentación de estos dípteros. Aunque la principal limitante de dicho gen, es la amplificación del ADN del artrópodo (Parson, 2000). Finalmente, Valinsky *et al.*, (2014) logró identificar a través del gen mitocondrial 12S y 16S los reservorios que en su mayoría resultaron ser mamíferos silvestres y domésticos.

Por otra parte, en el nuevo mundo las investigaciones sobre preferencias tróficas han empleado genes como *cyt b* y *PNOC*. El gen prepronociceptina (*PNOC*) es un gen nuclear, que codifica una copia única de nociceptina y otros péptidos que continene una secuencia conservada entre especies murinas y en seres humanos. Además, se conoce que *PNOC* es altamente conservado en ganado bovino, porcino y en el ser humano. De igual manera, dicho gen es de importancia neurofisiológica debido a que se expresa en el hipotálamo, tálamo, médula espinal (Mollereau *et al.* 1996; Mucio *et al.* 2001). Por lo tanto, debido a estas características se convierte en un marcador que permite determinar las preferencias tróficas con una identificación del 100% por medio del secuenciamiento, hasta el momento las secuencias depositadas en el GenBank son de 64 especies de mamíferos (Haoaus *et al.* 2007; Ninio *et al.* 2011).

Por lo tal se lo ha empleado en la identificación de las preferencias tróficas de flebótomos y culicoides. Rocha *et al.*, (2014) empleó la técnica PCR-RFLP, con lo que identificó las fuentes de alimentación de *Lutzomyia longipalpis* como *Homo sapiens*, *Bos taurus* y *Equus caballus* con porcentajes de similitud entre 98 a 100%. Por su parte, los resultados obtenidos por Marassá *et al.*, (2013) acerca de las preferencias tróficas de *Nyssomyia intermedia* y *Nyssomyia neivai* determinó que son especies con alimentación muy ecléctica entre animales silvestres y domésticos, lo cual podría deberse a que tienen un comportamiento oportunista.

De igual manera, el estudio publicado por Baum *et al.*, (2014) a través del gen nuclear *PNOC*, se determinó la fuente de alimentación de artrópodos hematófagos en el estado de Paraná, los

mismos que son animales domésticos como: *Sus scrofa*, *Canis lupus familiaris* y *Equus caballus*.

El objetivo de este trabajo fue identificar a nivel molecular los posibles vertebrados que directa e indirectamente participan en el ciclo de vida del parásito, en 5 provincias ecuatorianas (Bolívar, Esmeraldas, Manabí, Orellana y Pichincha) donde la transmisión de leishmaniasis es significativa, según los datos proporcionados por el Ministerio de Salud Pública en los años 2012 y 2013. Para este estudio se utilizó el gen nuclear *PNO*C, el investigar esta zoonosis en el país permitiría dar el seguimiento a la expansión de los vectores y sus preferencias tróficas en la que el ser humano participa de manera accidental.

## **2. Justificación**

La leishmaniasis es una enfermedad emergente y en expansión, se encuentra distribuida en 22 de las 24 provincias del Ecuador. De acuerdo al anuario de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Salud Pública, el número de casos reportados desde el 2009 ha disminuido. Sin embargo, la región donde existe la mayor tasa de leishmaniasis es la Amazonía, zona donde aún se desconoce las especies de vector implicadas en la transmisión.

La leishmaniasis afecta principalmente a niños, personas inmunodeprimidas y adultos mayores y la incidencia de la misma depende del número de vectores infectados y la presencia de reservorios (Romera & Sánchez, 2007).

Las diversas actividades antropogénicas como caza, deforestación, desplazamientos de la población y el cambio climático; conlleva a que los vectores modifiquen sus preferencias tróficas y a su vez el ser humano se convierta en blanco fácil, lo que implicaría un riesgo para la salud del mismo, debido a que tendría una interacción más directa entre vector y ser humano.

El identificar los reservorios (animales silvestres o domésticos) que interactúen en el ciclo de vida del parásito y vector, podría evidenciar el nivel de eclecticismo de ciertas especies y a la

vez determinar que especies se han adaptado a nuevos reservorios debido a la intervención antropogénica.

En el país se ha identificado un pequeño número de reservorios (*Choloepus hoffmanni*, *Potos flavus*, *Amandua tetradactyla*, *Sciurus vulgaris* y *Sciurus granatensis*) aunque se sospecha de otras especies que en países vecinos como Colombia, Perú y Brasil ya son reconocidos como reservorios de diferentes especies de *Leishmania*.

Por lo tanto, la identificación molecular de las preferencias tróficas de flebótomos a través del gen (*PNO*C) podría proporcionar información sobre los patrones de alimentación en ambientes naturales o en aquellos que han sido alterados. Además, se podría alertar a las autoridades de salud para tomar medidas de control y proporcionar tratamientos a nuevos casos. Este trabajo es pionero en el estudio molecular de preferencias tróficas de vectores de leishmaniasis en el Ecuador.

### **3. Área de Estudio**

Entre los años 2012 y 2014 se realizaron algunas colectas entomológicas en diferentes épocas en las provincias de Bolívar, Esmeraldas, Orellana, Manabí y Pichincha (Figura 3).

Las condiciones de la vegetación como los sitios de colecta se especifican en la tabla 5.

Las muestras colectadas se transportaron al Laboratorio de Parasitología y Virología de la Universidad San Francisco de Quito donde se efectuó la parte entomológica mientras que la parte molecular se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

## 4. Objetivos:

### 4.1 General

Identificar a nivel molecular las preferencias tróficas de flebótomos colectados en 5 provincias ecuatorianas.

### 4.2 Específicos

- Identificar las especies de flebótomos capturados con ingesta de sangre en el abdomen en zonas endémicas de leishmaniasis.
- Determinar la fuente de alimentación de los especímenes seleccionados, a través del análisis de las secuencias del gen *PNOC*.
- Identificar posibles vectores de leishmaniasis a través de la amplificación del gen *PNOC*.

## 5. Materiales

### 5.1 Colección y separación de especímenes

- Baterías 6 V (TOYO USP™)
- Trampas tipo CDC (Centers for Disease Control) de luz blanca
- Cargador de baterías GEXX (Battery Charger for 6 V or 12V lead acid)
- Mallas entomológicas
- Frascos estériles
- Alcohol al 70%
- Linterna luz blanca (Energizer)

### 5.2 Identificación de especímenes

- Porta objetos

- Cubre objetos
- Goma cloral (Hidrato de cloral 40%, Goma arábica 20% y glicerina 13%)
- Solución Marc André (hidrato de cloral 40% y ácido acético 30%)
- Pinzas entomológicas
- Agujas estériles
- Alcohol al 70%
- Estereo microscopio (LEICA EZ4)
- Microscopio (LEICA DME)

### **5.3 Extracción de ADN**

- Kit Qiagen (Qiagen, 2006, DNeasy® Blood & Tissue Handbook)
- Etanol absoluto
- Baño María SL (Shel Lab)
- Tubos de 1,5mL
- Microcentrífuga Eppendorf®
- Vórtex (SMENSMAURO LAB MIXER)
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio “CTAB” (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8)
- Buffer fosfato salino “PBS 1X” (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>· 7H<sub>2</sub>O, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7)
- Proteinasa K
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)
- Etanol 70%
- Buffer TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA)

### **5.4 Amplificación ADN**

- Agua de PCR
- Buffer 5X (Promega)
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega)
- dNTPs 2mM (Gustavo Venegas)



- Primer *PNO C F*: GCATCCTTGAGTGTGAAGAGAA
- Primer *PNO C R*: TGCCTCATAAACTCACTGAACC
- Taq Polimerasa (Promega)
- ADN de Flebótomos
- Termociclador Bio RAD T100™
- Termociclador Mastercycler Personal Eppendorf

### 5.5 Electroforesis en Gel de Agarosa

- Cámara de electroforesis horizontal (C.B.S Scientific CO)
- Agarosa LE
- Bromuro de etidio (Molecular SIGMA Biology)
- TBE 1X
  - 54g de TRIS Base (Promega)
  - 27.5g de ácido bórico (Acros Organics)
  - 20mL de EDTA pH8 [0.5M]
  - 5000mL agua destilada estéril
- Amplicones flebótomos (*PNO C F*, *PNO C R*)
- Micropipetas (Labnet)
- Balanza analítica (ae ADAM AQT)
- Parafilm
- Blue juice 10X Loading buffer (Invitrogen)
- Microondas (Panasonic USP)

### 5.6 Secuenciamiento

- Amplicones *PNO C* (333 pb)
- La secuenciación se realizó en Functional Biosciences en la ciudad de Madison en Estados Unidos.

### 5.7 Análisis de secuencias

- Software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6)
- Software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI

- Secuencias GenBank

## **6. Métodos**

### **6.1 Colección entomológica**

#### **6.1.1 Colección de especímenes**

Para la colecta entomológica se utilizó trampas tipo CDC (Centers of Disease Control) de luz clara, las cuales se instalaron a un metro de altura desde el suelo en senderos de bosques húmedos secundarios y bosque primario. Las trampas fueron colocadas desde las cinco de la tarde hasta las seis de la mañana del día siguiente.

A la mañana siguiente, se retiró las trampas y fundas entomológicas. Las fundas entomológicas se guardaron en congelación (-20°C) o dentro de una funda plástica saturada con CO<sub>2</sub>, con la finalidad de dormir a los insectos que se encontraban en su interior para poder transferirlos a frascos estériles con etanol al 70% y de esta manera se transportó los insectos al laboratorio de Parasitología y Virología de la Universidad San Francisco de Quito.

#### **6.1.2 Separación de especímenes**

La separación de especímenes se realizó a través de un estereomicroscopio (LEICA EZ4), los parámetros considerados para distinguir flebótomos fueron: alas ovaladas, cuerpos rodeados de pelos, patas alargadas, antenas largas y delgadas, probóscide más larga que la cabeza dónde se encuentra un par de ojos grandes.

Una vez separados los especímenes de interés para este estudio, se seleccionó visualmente las hembras con ingesta de sangre en el abdomen, las mismas que fueron clasificadas de acuerdo a la coloración de la sangre en: sangre reciente (roja viva) y sangre en proceso de digestión (sangre café) para finalmente ser almacenadas en tubos estériles de 1.5mL con alcohol a -20 °C.

### **6.1.3 Montaje en placa**

Cada espécimen se colocó sobre un portaobjetos y se le adicionó 2 gotas de alcohol al 70% para evitar la desecación. En un microscopio óptico (LEICA EZ4) con agujas estériles se procedió a separar la cabeza, una ala y los tres últimos segmentos del abdomen.

Posteriormente, sobre estas estructuras se colocó dos gotas de la solución Marc André (Hidrato de cloral 40% y Ácido acético 30%) con la finalidad de aclararlas. Luego, se colocó dos gotas de Goma Cloral (Hidrato de cloral 30%, Goma arábica 20% y Glicerina 13%) sobre las estructuras y se acomodó a las mismas de la siguiente manera: la cabeza con los ojos hacia abajo y las antenas hacia el investigador; el ala paralela y el abdomen con la parte ventral hacia el investigador. Una vez establecida esta posición se colocó con cuidado el cubreobjetos. El resto del cuerpo (tórax, abdomen, patas y ala) se guardó en un tubo de 1.5 mL estéril a -20°C, hasta ser utilizados en el proceso de extracción de ADN.

### **6.1.4 Identificación de especímenes**

La identificación de especímenes se realizó a través del uso de claves taxonómicas basadas en los caracteres morfológicos de Galati (2010). Se observó las placas en el microscopio óptico (LEICA DME) en 40X y se dio más atención a las estructuras de interés taxonómico como cibario, relación palpal (cabeza) y longitud de ductos, número de anillos, furca genital (espermateca) (Figura 4).

## **6.2 Análisis molecular**

### **6.2.1 Extracción de ADN**

Previo la extracción de ADN se reguló la temperatura del baño maría a 56°C. El proceso de extracción se realizó con el kit Quiagen, para lo cual se utilizó una Mini Spin Column (columna de extracción), dos tubos (kit) y un tubo de 1.5 mL, los mismos que fueron rotulados.

Se agregó 20 µl de buffer ATL en el tubo de 1.5 mL donde se encontraba el cuerpo del espécimen y con un pilón estéril se trituró por completo el insecto. El ATL es un buffer de lisis para tejidos y se usa en la purificación de ácidos nucleicos. Se adicionó 160 µl de buffer ATL, 20 µl de proteinasa K y se incubó el tubo de 1.5mL por una hora a 56°C. Transcurrido este tiempo, se retiró el tubo de 1.5mL del baño maría, se agregó 200 µl de buffer AL, se homogenizó en un vórtex por 15 segundos y se incubó a 70°C por 10 minutos (tiempo exacto). El AL es un buffer de lisis que rompe las células abiertas y permite aislar el ADN (Qiagen, 2015).

Luego se agregó 200 µl de etanol absoluto y se homogenizó en el vórtex, el sobrenadante del tubo de 1.5 mL se transfirió hacia la columna que se encontraba en el tubo colector y se centrifugó a 8.700xg por minuto.

Se desechó el tubo y se trasladó la columna a un nuevo tubo; donde se agregó 500 µl del buffer AW1, se centrifugó a 8.700xg por minuto; se descartó el tubo recolector y se transfirió a un nuevo tubo. AW1 es una solución tampón que contiene cloruro de guanidinio, dicho buffer se utiliza para desnaturalizar el ADN.

Se adicionó 500 µl del buffer AW2 sobre la columna, se centrifugó a 14.000xg por minuto y se descartó el tubo colector. AW2 es un tampón conformado por 70% etanol, el cual es utilizado para eliminar las sales de la columna y purificar el ADN (Qiagen, 2015).

Posteriormente, la columna se transfirió hacia un nuevo tubo de 1.5 mL, donde se agregó 100 µl del buffer AE directamente en la membrana de la columna y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. AE es un tampón de elución para ADN, que garantiza una óptima recuperación y estabilidad del ADN eluído (Qiagen, 2015).

Finalmente, se centrifugó a 8.700xg por minuto para eluir el ADN, se descartó la columna y se conservó el tubo de 1.5mL a -20°C.

### 6.2.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN a partir del abdomen con ingesta de sangre de las hembras a través del uso del detergente CTAB (Kieleczawa, 2006).

Previa la extracción de ADN, se calentó el baño maría a 65°C. Posteriormente, se colocó 500 µl de PBS 1X en el tubo de 1.5mL que contenía la muestra y se realizó el lavado. Luego se descartó el PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7) y se colocó 200 µl de buffer CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1.4M, EDTA 20Mm pH 8, HCl 100Mm pH 8), con ayuda de un pilón estéril se trituró por completo el insecto. Una vez, triturado el insecto se colocó 500 µl de CTAB, 20 µl de Proteinasa K y se incubó por 2 horas a 65°C.

Finalizado el tiempo de incubación se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente y se agregó 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se invirtió los tubos vigorosamente hasta formar emulsión. Se centrifugó por 5 minutos a 1561xg, con lo cual se obtuvo 2 fases; la superior que contiene el ADN en suspensión y la inferior. Se transfirió 400 µl de la fase superior a un nuevo tubo, previamente rotulado, se procuró no tocar la fase intermedia. Se agregó 1000 µl de etanol al 100% a -20°C, se lo mezcló por inversión y se dejó a -20°C toda la noche.

Al día siguiente, se retiró las muestras del congelador, se centrifugó a 1561xg por 10 minutos y se descartó cuidadosamente el sobrenadante. Se lavó el pellet de ADN con etanol al 70% y se invirtió el tubo de 1.5 mL. Luego se centrifugó el tubo de 1.5 mL a 1561xg por 10 minutos, se descartó el sobrenadante verificando que el pellet de ADN no se desprenda; posterior a esto sobre una superficie plana y limpia se puso papel absorbente y encima de este se colocó los tubos de 1.5 mL boca abajo por 20 minutos. Finalmente, se resuspendió el ADN en 50 µl de TE (10mM Tris-HCl, pH 8, 0.1mM EDTA) y se conservó a -20°C.

### 6.2.3. Amplificación del gen *PNO*

Con el ADN extraído, se procedió a amplificar una parte del gen prepronociceptin *PNO* de 333 pb.

Los primers para amplificar el gen fueron: *PNO C F* GCATCCTTGAGTGTGAAGAGA y *PNO C R* TGCCTCATAAACTCACTGAACC. El volumen final de la reacción fue de 10  $\mu$ l y 2  $\mu$ l de ADN (Tabla 6), las condiciones de la PCR se encuentran descritas en la Tabla 7.

#### **6.2.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Para visualizar los resultados de la amplificación del gen *PNO C* se utilizó un gel de Agarosa al 1.5% con bromuro de etidio. La electroforesis requirió primero de armar la cámara horizontal. Luego, se pesó 1,5g de agarosa y se colocó en un Erlenmeyer. Posteriormente, se adicionó 100 mL de buffer TBE 1X en el Erlenmeyer y se disolvió la mezcla en el microondas. Con la mezcla homogenizada, se retiró del microondas y se dejó enfriar hasta que el Erlenmeyer sea tolerable al tacto. Después se agregó 1  $\mu$ l de bromuro de etidio, se mezcló levemente el Erlenmeyer y se vertió el frasco sobre el molde de la cámara de electroforesis. Posteriormente se retiró el peine, se colocó TBE 1X hasta que el gel quede cubierto por completo. Se cargó 3  $\mu$ l de amplicón en el gel y se colocó un ladder de 100pb.

Las condiciones de la electroforesis fueron: 85V por 60 minutos.

#### **6.2.5 Secuenciamiento**

Los amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar en sentido forward, en el Instituto Functional Biosciences Inc en la ciudad de Madison en Estados Unidos.

#### **6.2.6 Análisis secuencias**

Los productos del secuenciamiento se limpiaron y analizaron con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.* 2015).

Una vez obtenida la secuencia limpia se realizó el alineamiento con BLAST, donde se comparó esta secuencia con una ya registrada en el GenBank. Los porcentajes para que sea considerada óptima fue de 98 a 100% de homología con la registrada en el GenBank, de esta manera se identificó las especies de vertebrados que sirvieron como fuente de sangre a las hembras hematófagas.

## 7. Resultados

### 7.1 Colección entomológica

De las colectas realizadas se obtuvo un total de 3103 especímenes entre machos y hembras pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae en 7 sitios de colección Paraíso Escondido en Pichincha; Echeandía y Caluma en Bolívar; Estación de Biodiversidad Tiputini en Orellana; Chone y Junín en Manabí y Santo Domingo de Onzole en Esmeraldas.

De la colección entomológica el 52,6% de especímenes correspondió a hembras y el 47,4% a machos. De acuerdo a la abundancia de especímenes por provincia la que tuvo mayor cantidad fue Orellana 45,12%, seguida de Manabí 22,66%, Pichincha 16,90%, Bolívar 9,09% y Esmeraldas 6,25% (Tabla 9).

De 1635 hembras colectadas, 126 presentaron ingesta de sangre reciente o en proceso de digestión, esto corresponde al 8%. La provincia que presentó mayor número de hembras con ingesta de sangre reciente fue Orellana (81,1%) y Esmeraldas presentó el menor número (9.1%) (Tabla 9). En Bolívar se encontró hembras con ingesta de sangre solo en la localidad de Echeandía.

En este estudio se identificó 15 especies de flebótomos pertenecientes a las subtribus *Lutzomyiina* y *Psychodopygina* distribuidas en las 5 provincias de estudio, según los parámetros de Galati (2010). Las especie más abundante en todas las provincias a excepción de Orellana fue *Psychodopygus panamensis* seguido de *Nyssomyia trapidoi*. También se encontró especies que se distribuyeron en al menos dos provincias como: *Pressatia dysponeta* en Bolívar y Manabí y *Lutzomyia hartmanni* en Bolívar y Pichincha (Tabla 11).

Las colectas se realizaron en cinco provincias del país, las cuales se caracterizaron por tener zonas tropicales y subtropicales. Las especies que se encontraron en estas zonas son *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus panamensis*, *Pressatia dysponeta*, *Lutzomyia gomezi*, *Psychodopygus carrerai thula*, *Lutzomyia hartmanni*, *Pintomyia serrana* y *Psathyromyia abbonenci*. Mientras que en la Amazonía se colectó *Psychodopygus carrerai carrerai*,

*Nyssomyia richardwardi*, *Psathyromyia aclydifera*, *Psychodopygus amazonensis*, *Psychodopygus geniculata*, *Psychodopygus hirsutus hirsutus* y *Lutzomyia tortura* (Tabla 11).

Las especies de flebótomos de las cuales se identificó las preferencias tróficas fueron: *Nyssomyia trapidoi*, *Nyssomyia richardwardi*, *Psychodopygus panamensis*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Psychodopygus carrerai thula*, *Psychodopygus amazonensis*, *Psychodopygus geniculata*, *Lutzomyia hartmanni*, *Lutzomyia tortura* y *Pintomyia serrana*. La distribución geográfica de estas especies se especifica en la Tabla 11.

De las especies anteriormente mencionadas se conoce que *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia hartmanni* y *Lutzomyia tortura* son vectores de leishmaniasis en el Ecuador y se sospecha de *Psychodopygus carrerai carrerai* y *Psychodopygus panamensis* como posibles vectores (Tabla 11).

## 7.2 Análisis molecular de las preferencias tróficas

126 hembras de las 188 colectadas en los 7 sitios de colección cumplieron con el criterio de tener el abdomen de sangre roja (reciente) o sangre café (proceso de digestión), las mismas que fueron incluidas en el estudio (Tabla 10). Los 62 flebótomos restantes no se analizó debido a la presencia de huevos en su interior al momento de realizar la disección. La presencia de huevos en el interior del abdomen de la hembra determina que la misma esta lista para realizar el proceso de oviposición y depositar los huevos en un lugar húmedo (Badano & Regidor, 2002). Se logró amplificar el gen *PNO*C en 69 de 126 muestras y 50 secuencias presentaron homología en el BLAST (Tabla 10).

Finalmente, se determinó que la fuente de sangre de los especímenes en estudio corresponde a 9 especies de vertebrados *Homo sapiens* (46%), *Choloepus hoffmanni* (22%), *Bos taurus* (8%), *Pecari tajacu* (8%); *Capra hircus* (6%), *Equus caballus* (4 %) y 2% para *Cebus capucinus*; *Tapirus terrestres* y *Potos flavus* (Tabla 12).



Las especies antropofílicas en el estudio fueron *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus carrerai thula*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Lutzomyia hartmanni*, *Pintomyia serrana*, *Psychodopygus panamensis* y *Psychodopygus geniculata*.

Las especies que se alimentaron de animales domésticos fueron *Psychodopygus panamensis* y *Pintomyia serrana*, las que se alimentaron de animales silvestres fueron *Psychodopygus carrerai thula*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Psychodopygus amazonensis*, *Psychodopygus panamensis* y *Lutzomyia tortura* (Tabla 12).

## 8. Discusión

### *Colección entomológica*

Del total de la colección entomológica el 52,6% correspondió a hembras y 47,4% a machos (Tabla 8). Estos porcentajes corroboran con otros estudios realizados en dípteros (Baum *et al.*, 2014; Zapata *et al.*, 2012). La presencia mayoritaria de hembras es un indicador ecológico, de que el crecimiento y la eficacia biológica se mantiene estable principalmente porque esta población depende del número de hembras (Valderrama *et al.*, 2011).

De acuerdo a la cantidad de especímenes colectados por provincia se obtuvo en orden descendente: Orellana > Manabí > Pichincha > Bolívar > Esmeraldas. Y de acuerdo a la diversidad de especies la prevalencia fue Orellana > Pichincha > Manabí > Bolívar > Esmeraldas (Tabla 8). La colección entomológica en la provincia de Orellana presentó mayor número y diversidad de especímenes. Esto puede deberse a que es una zona de bosque primario conservado y de alta biodiversidad (Bass *et al.*, 2010). Un sitio que se caracteriza por tener una cobertura boscosa, siempre verde, especies de gran tamaño y densidad, estratos de vegetación baja, especies leñosas, etc. (Rodríguez & Castillo, 2005). Otros estudios coinciden en que la Amazonía ecuatoriana acoge una gran biodiversidad de dípteros. Por ejemplo, el estudio llevado a cabo por Veijalainen *et al.*, (2012) determinó que en el orden Hymenoptera, de los 1549 individuos recolectados en Centro América y Ecuador, 1078 provenían de la Amazonía ecuatoriana (Parque Yasuní), es decir el 69,6% de todos los individuos colectados.

De igual forma, en este mismo estudio, en tan solo dos hectáreas se encontró 95 morfo especies de avispas (Erwin *et al.*, 2005; Veijalainen *et al.*, 2012<sup>b</sup>). Otros estudios también han evidenciado que en una hectárea de bosque había 100.000 especies de insectos, de esta manera se confirma que esta región es uno de los sitios más diversos a nivel mundial (Erwin *et al.*, 2005; Heyer *et al.*, 1999; Pitman *et al.*, 2001).

En Manabí se obtuvo un alto número de especímenes capturados en las dos localidades de estudio (Cantones Chone y Junín), sin embargo no se tuvo mucha diversidad ya que solo se identificó 4 especies lo cual podría deberse a los cambios ambientales generados por la actividad humana, tal es el caso del alto índice de deforestación. En el cantón Chone la deforestación ha ocasionado que de la superficie total de este cantón el 53.4% esta ocupado por pastos cultivados como cacao (13,3%), asociación cacao-mandarina (4,14%) o maíz (2,36%). De tal manera, como resultado de la actividad humana se tiene que solamente el 4.32% corresponde a la cobertura vegetal del bosque húmedo (MAGAP, 2013). Por otro lado, las colectas se realizaron en sitios geográficamente separados, sin embargo se encontró la misma distribución de flebotomos, lo cual podría deberse a que tanto Chone como Junín presentan condiciones ambientales parecidas como humedad o temperatura (INIAP, 2012) las mismas que favorecen la prevalencia de dichas especies.

En Pichincha se realizó 4 colectas en la localidad de Paraíso Escondido en época lluviosa (Noviembre a Diciembre), esto corresponde al 16,9% de especímenes capturados. Este porcentaje podría deberse al nivel de precipitaciones de la época (INAMHI, 2014). Debido a que este factor disminuye la población de las especies con actividad crepuscular (Vasquez, 2011).

En Bolívar las colectas se realizaron en época lluviosa. Por lo tanto, la densidad poblacional de los flebotomos e insectos en general fue baja. Como se mencionó anteriormente la presencia de precipitaciones incide en el número de especies con actividad crepuscular. En los cantones Echeandía y Caluma se realizaron colectas entomológicas, en donde se encontró la misma diversidad de especies. De este modo, por la proximidad geográfica se podría afirmar

que las condiciones ambientales son similares entre los lugares de colecta, lo que ocasiona que la diversidad de flebotomos en esta provincia sea semejante (INIAP, 2012). La poca diversidad encontrada en estos cantones podría deberse al cambio climático y a la pérdida de hábitat (Franco *et al.* 2006) lo que ocasiona baja dispersión y redistribución de las especies (Root *et al.* 2003; Travis, 2003).

Finalmente en Esmeraldas, la colecta se realizó en Santo Domingo de Onzole, sitio dónde se se obtuvo una baja cantidad de especímenes capturados. Las posibles razones por las que se obtuvo este número se debería a las precipitaciones de la época, cambio climático o a la pérdida de hábitat de las especies en la localidad (Franco *et al.* 2006, Ministerio Ambiente, 2011).

Todas las colectas se realizaron en bosques secundarios siempre verde, a excepción de la provincia de Orellana donde se evidenció que los lugares aún no intervenidos por el ser humano presentan mayor diversidad y abundancia de flebotomos.

Por ejemplo, el estudio llevado a cabo en Brasil por Rodríguez *et al.*, (2014) determinó que el 49% de la fauna de flebotomos existente se concentraba en la Amazonía. Asimismo, en el 2013 se reportó 113 nuevas especies de flebotomos, de estas 67 en el estado de Manaus y sus alrededores (Alves *et al.*, 2012; Castellón, 2009; Oliviera *et al.*, 2013).

En Ecuador, el estudio llevado a cabo por Jones *et al.*, (2010) reportó cinco nuevos registros de flebotomos en la región amazónica, de igual forma otros autores como León *et al.*, (2009) y Zapata *et al.*, (2012) también han descrito nuevas especies. Lo que confirma que en ecosistemas naturales prístinos la diversidad y cantidad de flebotomos sería mayor (Nieves *et al.*, 2014).

En este estudio se identificó 15 especies de flebotomos distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales de la Costa-Sierra ecuatoriana y en la región Amazónica ya reportados en estudios anteriores (Galati, 2010). De las cuales *Lutzomyia tortura*, *Nyssomyia richardwardi*, *Psychodopygus amazonensis*, *Psychodopygus carrerai carrerai* y *Psychodopygus geniculata* están presentes en la Amazonía (Azevedo *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2013;

Navarro *et al.*, 2005). Además en países vecinos también se ha reportado que la mayoría de flebótomos localizados en la región amazónica pertenecen al subgénero *Psychodopygus*, lo cual podría deberse a que estas especies se encuentran distribuidas en áreas boscosas y poco intervenidas por el ser humano (Cabrera *et al.*, 2009).

Por su parte, *Lutzomyia hartmanni*, *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus panamensis*, *Psychodopygus carrerai thula* y *Pintomyia serrana* solo se encontraron en las regiones tropicales y subtropicales de la costa y sierra ecuatoriana (Gómez *et al.*, 2014; Ovallos *et al.*, 2013). Esto podría deberse a la cordillera de los Andes que atraviesa el país de Norte a Sur y genera diferentes pisos altitudinales, barreras geográficas entre Este y Oeste, corredores biológicos como hoyas, nudos, etc. (Burneo, 2011). Esta condición geográfica es una barrera que separa la región occidental de la oriental y podría haber generado un tipo de especiación alopatrica de los flebótomos luego de la formación de los Andes.

Ejemplo de esto son las subespecies *Psychodopygus carrerai carrerai* y *Psychodopygus carrerai thula* que en un inicio se creía que eran iguales de acuerdo a caracteres morfológicos. En la actualidad en base a sus condiciones geográficas, características morfológicas y un análisis de ADN se determinó que son dos subespecies distintas (Dujardin & Le Pont, 2000; Jones *et al.*, 2010).

Por otro lado, es evidente que la fragmentación de ambientes influye en la diversidad de flebótomos y permite que las especies desarrollen capacidades para adaptarse a nuevos microclimas (Valderrama *et al.* 2011).

Un caso concreto, son *Nyssomyia umbratilis* y *Nyssomyia anduzei* vectores de *L. (V.) guyanensis*, las mismas que se adaptaron a ambientes domiciliarios como jardines o árboles frutales. Estas especies se encontraban hace 30 años solo en bosques primarios según lo reportado por Rodríguez *et al.*, (2014). Además, especies como *Lutzomyia longipalpis* y *Bichoromyia flaviscutellata* han colonizado ambientes fragmentados en Brasil (Lainson, 1989; Souza *et al.*, 1999).

Otras especies como *Lutzomyia gomezi*, *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus panamensis* y

*Evandromyia walkeri* se adaptaron a ambientes antropogénicos como cultivos de café, plantaciones de cacao o ambientes con escasa vegetación; lo que les permitiría invadir casas y afectar a humanos. No obstante, se tiene el caso de especies que no se han adaptado a ambientes intervenidos como *Pintomyia ovallesi* (Nieves *et al.*, 2014).

En Ecuador, las especies que ya han sido reportadas como vectores son: *Nyssomyia trapedoi*, *Lutzomyia hartmanni* transmisoras de *L. (V.) panamensis* y *Lutzomyia tortura* transmisora de *L. (V.) naiffi* (Jones *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2013; Zapata *et al.*, 2012). De estas especies se conoce que las dos primeras anteriormente mencionadas pueden encontrarse en plantaciones de café o cacao. Según lo reportado por Baum *et al.* (2013<sup>a</sup>) y Rodríguez *et al.*, (2014) se sospecharía que el sub género *Nyssomyia* estaría adaptándose sin problema a ambientes antropogénicos, como domésticos y/o peridomésticos.

#### *Análisis molecular*

El 8 % de hembras colectadas presentó ingesta de sangre en el abdomen, porcentaje alto, en comparación con otros estudios realizados en flebotomos. Por ejemplo, en el estudio de Baum *et al.*, (2014) se reportó 3,26% de hembras con ingesta de sangre, mientras que Romera & Martínez (2000) 0,9%. Igualmente, si se compara con colectas de estudios en otros dípteros, el porcentaje es mayor a lo presentado por Garros (2010) 2,38%. Sin embargo, en este estudio también se colectó hembras con sangre negra en el abdomen asociado a un estado de gravidez y fueron excluidas del análisis molecular.

La posible razón para tener hembras grávidas, se debería a que los sitios de captura coincidieron con los lugares que sirven de protección ante los posibles depredadores, presión ambiental como lluvia, viento; o a su vez lugares ricos en materia orgánica para realizar el proceso de oviposición (Freire de Melo *et al.*, 1999; McCall & Cameron , 1995).

En lo que respecta a la colecta de hembras con ingesta de sangre reciente, el porcentaje relativamente bajo encontrado en este estudio podría deberse a que los sitios donde se colocaron las trampas no coincidieron con los sitios de reposo de hembras hematófagas

(Macedo-Silva *et al.*, 2014).

En lo que respecta a la cantidad de hembras con ingesta de sangre en orden descendente se tuvo a Orellana > Pichincha > Manabí > Bolívar > Esmeraldas (Tabla 9). Las posibles razones de este orden se deberían a que las colectas se realizaron en época lluviosa, lo cual incidió en el número de especímenes capturados o que las trampas no estuvieron cerca de los sitios de reposo de las hembras, debido a que estas requieren de al menos una ingesta de sangre para proporcionar proteínas indispensables para madurar los huevos. Por lo tanto, para tener una colección exitosa es necesario conocer los sitios de reposo y utilizar trampas tipo Shanon o aspiradores mecánicos (Macedo-Silva *et al.*, 2014; Valinsky *et al.*, 2014). Las trampas utilizadas en el estudio fueron del tipo CDC.

En este trabajo se utilizó la clasificación propuesta por Haouas *et al.*, (2007) y Svobodová *et al.*, (2003). Dichos autores propusieron clasificar a los flebótomos en este tipo de estudios en dos categorías, la primera con respecto al tamaño del abdomen y la segunda de acuerdo al grado de digestión de la sangre (roja-café y negra). En este estudio se consideró solo la segunda categoría de la siguiente manera: sangre roja (sangre reciente) y sangre café (proceso de digestión).

Un total de 126 especímenes cumplieron el criterio de presentar sangre reciente o en proceso de digestión, de todos estos especímenes se extrajo el ADN y como porcentaje de efectividad se obtuvo 54.7%, un resultado bajo si se lo compara con otros estudios como el Haouas *et al.*, (2007) que reportó 79% y el de Abbassi *et al.*, (2009) con 76% en flebótomos.

La posible razón de haber obtenido una baja efectividad de PCR podría deberse al tiempo de digestión de la sangre, por parte de las proteasas del intestino del flebótomo (Jochim *et al.* 2008). En el estudio de Haouas *et al.*, (2007) se confirmó que la eficiencia de la amplificación del gen *PNOC* va a ser alta, siempre y cuando la ingesta de sangre tenga menos de 24 horas en el abdomen. Conforme transcurra el tiempo la efectividad disminuirá. A modo de ejemplo, se reporta que si la sangre provendría de *Homo sapiens*, solo se podrá amplificar hasta luego de 24 horas de ingestión. Debido a que, si se intentará amplificar sangre con más de 48 horas no se tendrá ningún resultado, por la razón de que el ADN estaría degradado (Boakye, *et al.*,

1999; Kent & Norris, 2005; Kirstein *et al.*, 1996).

La sensibilidad de la amplificación también dependerá de la cantidad de ADN que provenga del reservorio. Hasta el momento, se conoce que el volumen de sangre en el abdomen del flebótomo puede variar entre 0,1 a 1  $\mu$ L. Dicha cantidad de ingesta de sangre es baja, si se la compara con otros dípteros hematófagos como la mosca Tsé-Tsé que puede ingerir hasta 37  $\mu$ L. Por lo tanto, la cantidad que exista en el abdomen de la hembra interferirá en la eficiencia de la amplificación, debido a que si se tiene mayor cantidad de sangre se podrá tener mayor cantidad de ADN para ser estudiado (Abbasi *et al.*, 2009; Daba *et al.*, 2004).

Resumiendo, las posibles causas por las que no se pudo amplificar el ADN de 57 especímenes podrían ser que la sangre tenía más de 24 horas en el abdomen y estaba en proceso de digestión, a una mala extracción del ADN (contaminación), a la cantidad de sangre en el abdomen del flebótomo o la sangre provenía de animales que no eran mamíferos tal como aves o anfibios (Baum *et al.*, 2013<sup>b</sup>; Marassá *et al.*, 2013).

#### *Identificación de preferencias tróficas y posibles vectores*

Las especies antropofílicas de este estudio fueron: *Nyssomyia trapidoi* (Esmeraldas y Pichincha); *Psychodopygus panamensis* (Bolívar, Manabí y Pichincha); *Psychodopygus carrerai thula* (Pichincha); *Pintomyia serrana* (Pichincha), *Lutzomyia hartmanni* (Pichincha); *Nyssomyia richardwardi*, *Psychodopygus geniculata*, *Psychodopygus carrerai carrerai* (Orellana). De estas especies se conoce que *Nyssomyia trapidoi*, *Psychodopygus panamensis*, *Psychodopygus carrerai carrerai*, *Lutzomyia hartmanni*, *Pintomyia serrana* y *Psychodopygus carrerai thula* son reportadas como vectores de diferentes especies de *Leishmania* en países vecinos (Dutari *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2013; Zapata *et al.*, 2012).

En este estudio se reporta por primera vez a *Pintomyia serrana* (Pichincha), *Psychodopygus geniculata* (Orellana) y *Nyssomyia richardwardi* (Orellana) como especies antropofílicas. Tanto, *Psychodopygus geniculata* como *Nyssomyia richardwardi* se encuentran distribuidas en la Amazonía donde se desconoce el o los vectores de leishmaniasis, además si se considera la escasa población humana existente en esta región este hallazgo demuestra la especificidad de

estas especies por el humano como fuente de alimentación. Por lo tanto, dichas especies podrían ser consideradas como vectores, debido a que cumplen uno de los criterios que Ready (2013) plantea para que una especie de flebótomo sea considerada como vector. Sin embargo, *Psychodopygus geniculata* y *Nyssomyia richardwardi* aún no han sido reportadas como vectores. Por lo que, para determinar el rol de estas especies en la transmisión de *Leishmania* es crucial realizar un estudio más amplio en diferentes épocas del año.

La especificidad de las preferencias tróficas va a depender de diversos factores. En un estudio de laboratorio, se utilizó la especie *Pintomyia ovallesi* y se obtuvo que la sangre ingerida proveniente de gallina presentó una digestión más rápida y un mayor tiempo de oviposición por parte de los flebótomos, a diferencia de la sangre proveniente de otros animales como caballos (Noguera *et al.*, 2006). De tal manera, que un flebótomo será atraído hacia aquellos animales que primero se encuentren cerca de su rango de vuelo o hábitat, y segundo que le permita tener mayor número de oviposiciones.

Otras especies reportadas como vectores en países de la región, a excepción de Ecuador son: *Pintomyia serrana* de *L. (V.) peruviana* en Perú (Davies *et al.*, 1993), *Psychodopygus carrerai thula* de *L. (V.) panamensis* en Panamá (Dutari *et al.*, 2014), *Psychodopygus carrerai carrerai* de *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* en Bolivia, Brasil, Colombia, Perú y Venezuela (Grimaldi *et al.*, 1989; Ryan *et al.*, 1987); *Psychodopygus panamensis* de *L. (V.) panamensis* en Colombia y Venezuela (Kreutzer *et al.*, 1991). Por lo tanto, el que países vecinos reporten estas especies como vectores, en Ecuador se sospecharía que dichas especies presenten el mismo comportamiento.

En este estudio *Nyssomyia trapidoi* y *Pintomyia serrana* presentaron como fuente de alimentación a reservorios de *Leishmania* confirmados como *Choloepus hoffmanni* (*L. (V.) panamensis*) y *Potos flavus* (*L. (V.) guyanensis*) (Roque & Jansen, 2014) (Tabla 13). Por lo que, tanto vector como reservorio presentarían una interacción óptima con el parásito en dicho ambiente, lo que estaría permitiendo que el ciclo biológico se lleve de manera adecuada y esto coincide con la prevalencia de casos de leishmaniasis en la zona de Paraíso Escondido.



Además, *Nyssomyia trapidoi* es considerada el principal vector de *L. panamensis* y *L. guyanensis* en la costa ecuatoriana.

En cuanto a *Psychodopygus panamensis*, esta especie fue la única que presentó mayor eclecticismo. Esto podría corresponder a que es una especie bien adaptada a ambientes antropogénicos y ecosistemas fragmentados, lo que le permitiría obtener sangre de una amplia variedad de animales ya sean silvestres o domésticos (Bongiorno *et al.*, 2003; Morrison *et al.*, 1993; Quinzel *et al.*, 1992). En otros países como Panamá también se ha reportado como una especie muy ecléctica (Valderrama *et al.*, 2011). Las fuentes de sangre de *Psy. panamensis* en este estudio fueron *Bos taurus*, *Equus caballus* y *Capra hircus*. Con estos resultados, es evidente que los animales domésticos participan directamente en el ciclo de vida de los flebótomos, a pesar de aquello la literatura aún no los ha reportado. Sin embargo, *Psy. panamensis* tampoco ha sido identificada aún como vector de leishmaniasis en Ecuador a pesar de que la evidencia epidemiológica indica la presencia de la enfermedad y el vector en la misma zona. Por consiguiente, se sugiere realizar más estudios de especies que ya han sido reportadas como vectores en países vecinos para de esta manera tomar medidas pertinentes en lo que respecta la transmisión de la enfermedad.

En cambio, *Psychodopygus carrerai carrerai* presentó un comportamiento antropofílico y zoofílico, el comportamiento antropofílico podría deberse a que es un vector confirmado en otros países. Las fuentes de alimentación fueron *Pecari tajacu* y *Tapirus terrestres*, los mismos que aún no han sido reportados como reservorios por la literatura. No obstante, *Psy. carrerai carrerai* podría ser considerado un posible vector de *L. braziliensis* en la región amazónica.

*Psychodopygus carrerai thula* fue colectada en la localidad de Paraíso Escondido y presentó una alimentación antropofílica y zoofílica hacia *Choloepus hoffmanni* (reservorio confirmado) (Roque & Jansen, 2014) y *Pecari tajacu*. Con estos resultados se sospecharía que *Psy. carrerai thula* podría ser vector de la enfermedad en esta localidad, debido a la interacción óptima entre vector y reservorio lo que permitiría que el ciclo biológico del parásito se lleve a cabo. En el caso de *Pecari tajacu* dicha especie actuó solo como fuente de alimentación.

Las especies que se alimentaron únicamente de animales silvestres fueron *Psychodopygus amazonensis* y *Lutzomyia tortura*, ambas especies son transmisoras de *Le. (V.) naiffi* (Maroli *et al.*, 2012) y presentes solo en la Amazonía. Estas especies se alimentaron de *Pecari tajacu*, especie que aún no ha sido reportada como reservorio. Posiblemente, el tamaño corporal grande o que la población sea abundante es lo que atrae a los flebótomos (Morrison *et al.*, 1993; Quinzel *et al.*, 1992).

En el caso de *Nyssomyia richardwardi* la fuente de alimentación fue *Cebus capucinus*. Esta especie pertenece al orden Primata y aún no ha sido reportada como reservorio. A pesar que, especies del mismo orden como *Cebus apella* y *Cebus xanthosternus*, están reportadas como reservorios de *Leishmania* en Brasil (Laison, 1989; Malta, 2010). Por consiguiente, no se descarta que *Cebus capucinus* podría ser reservorio de *Leishmania* en la Amazonía.

También, se debe enfatizar que otras especies como *Rattus rattus*, *Canis familiaris*, *Sciurus granatensis*, *Sylvilagus brasiliensis*, *Dasypus novemcinctus*, *Coendou bicolor* ya han sido reportadas como reservorios de *Leishmania* en Ecuador (Hashiguchi *et al.*, 1985; Hashiguchi, 2004). Sin embargo, en este estudio no fueron identificados quizás por la pequeña muestra de especímenes (50) analizados.

A través de la identificación molecular mediante el gen *PNOG* se determinó que en las preferencias tróficas de los flebótomos de 5 provincias de estudio participan animales domésticos como *Equus caballus*, *Capra hircus*, *Bos taurus*; animales silvestres como *Choloepus hoffmanni*, *Pecari tajacu*, *Potos flavus*, *Cebus capucinus*, *Tapirus terrestris*; y el ser humano.

El análisis de un limitado número de especímenes no permite saber con exactitud las preferencias tróficas de los flebótomos en las zonas de estudio. Además, la base bioquímica de la atracción de los dípteros hacia sus fuentes de alimentación en la mayoría de los casos aún no se ha determinado, probablemente los olores excretados por ciertos vertebrados sean percibidos como mensajes químicos sobre el sexo, estado reproductivo, estado de salud etc. (Kalinova *et al.*, 2001; Spiegel *et al.*, 2005; Vogt, 2003). Por ejemplo, se conoce que los refugios de armadillos son sitios preferidos por las hembras, para atraer a los machos al

proceso de apareamiento, a través de una comunicación auditiva, visual o sensorial (Ward *et al.*, 1988).

Asimismo, el estudio llevado a cabo por Logan *et al.*, (2010) evidenció que la población más susceptible a la picadura de dípteros son los hombres. Lo que podría deberse a que el sudor, olor, exhalación de anhídrido carbónico o factores hormonales y/o bioquímicos lo convierte en un hotspot atractivo para el insecto. Por otro lado, también se determinó que el género masculino es el grupo más vulnerable de ser picado por estos dípteros, debido a las actividades agrícolas o ganaderas que realiza en el campo (Ampudia, 2013).

Finalmente, este estudio provee información importante sobre las preferencias tróficas de flebótomos en zonas de transmisión de *Leishmania*, identificación de posibles nuevos reservorios y especies de flebótomos antropofílicos que justifica el desarrollo de estudios futuros en otras zonas geográficas que incluyan un mayor número de especímenes y colectas en diferentes épocas del año.

## 9. Conclusiones

1. En el presente estudio se identificó como especies antropofílicas a *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia hartmanni*, *Psychodopygus panamensis*, *Psychodopygus carrerai thula*, *Pintomyia serrana*, *Nyssomyia richardwardi*, *Psychodopygus geniculata*, *Psychodopygus carrerai carrerai*. De estas solamente *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia hartmanni* son reconocidos como vectores de leishmaniasis en Ecuador mientras tanto *Psychodopygus panamensis*, *Psychodopygus carrerai thula*, *Pintomyia serrana* y *Psychodopygus carrerai carrerai* son consideradas vectores en otros países de Latinoamérica.
2. En la localidad de Paraíso Escondido se confirmó que *Nyssomyia trapidoi* y *Lutzomyia hartmanni* son vectores de leishmaniasis y los resultados de este estudio sugieren que *Pintomyia serrana* y *Psychodopygus carrerai thula* podrían estar actuando como posibles vectores debido a que las preferencias tróficas identificadas corresponden a reservorios del parásito.

3. Las preferencias tróficas de *Psychodopygus carrerai carrerai* demuestran que podría jugar un rol importante en la transmisión de leishmaniasis en la Amazonía ecuatoriana donde se desconoce hasta el momento el o los vectores.
4. Se reporta por primera vez que *Psychodopygus geniculata* y *Nyssomyia richardwardi* son especies antropofílicas en la Amazonía donde la población humana es escasa y se requiere más estudios para establecer el rol de estas especies en la transmisión de leishmaniasis.
5. Finalmente, *Psychodopygus panamensis* fue la especie que presentó mayor diversidad de preferencias tróficas dentro de los cuales se incluye animales domésticos, lo cual puede estar relacionado al éxito que tiene por adaptarse a ambientes antropogénicos.

## **10. Recomendaciones**

Realizar colectas en diferentes zonas geográficas y épocas del año para lograr atrapar más cantidad y diversidad de hembras con ingesta de sangre reciente.

En lo posible realizar colectas por aspiración, en sitios donde las hembras hematófagas reposan. De esta forma, se garantiza captar más hembras con ingesta de sangre reciente, lo que permitiría la amplificación molecular de las preferencias tróficas empleando cualquier gen.

Luego de la experiencia obtenida, es aconsejable realizar la separación de frascos en el lugar de colecta. Puesto que, sí se tiene bajas cantidades de dípteros se puede optar por cambiar las trampas a otros sitios. En el caso de tener hembras con sangre se puede realizar el montaje en placa y conservar el abdomen a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  lo que evitaría que la sangre se degrade.

Se sugeriría la continuidad de los estudios acerca de las preferencias tróficas con el fin de estimar el impacto que ha ocasionado el ser humano, al introducir tanto flora como fauna a ecosistemas silvestres, considerando aspectos de comportamiento, dispersión y fisiología de estos dípteros.

## 11. Referencias bibliográficas

- Abbasi, I., Cunio, R., Warburg, A. (2009). Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting . *Vector-Borne Zoonotic Dis.* .
- Alves, V. F. (2012). Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Central Amazonia and four new records for the Amazonas State. Brazil . *Rev. Bras. Entomol.* , 220-227.
- Ampudia, M. (2014). Prevalencia de Leishmaniasis cutánea en el Cantón de Pedro Vicente Maldonado en el periodo de tiempo 2012 y 2013. *Universidad San Francisco de Quito* .
- Ampuero, J. (2000). *Ministerio de Salud Pública del Perú*. Recuperado el Julio de 2014, de Leishmaniasis : <http://www.bio-nica.info/biblioteca/ampuero2000leishmaniasis.pdf>
- Artemiev, M. (1991). A classification of the subfamily Phlebotominae. . *Parassitologia* , 69-78.
- Ashford, R. (1997). What it takes to be a reservoir host. *Belg. J. Zool.* , 85-90.
- Azevedo, A., Costa, S., Pinto, M., Souza, J., Cruz, H., Vidal, J., y otros. (2008). Studies on the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from transmission areas of American Cutaneous Leishmaniasis in state of Acre, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , 760-767.
- Badano, E., & Regidor, H. (2002). Selección de hábitat de oviposición en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mediante estímulos físicos. *Ecología austral*.
- Bass, M., Finer, M., Jenkins, C. (2010). Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuní National Park. *PLoS ONE* .
- Baum, M. R. (2013)<sup>b</sup>. Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, state of Paraná, Brazil. . *Revista Sociedade Brasileira Med. Trop* .
- Baum, M., Alcântara de Castro, E., Pinto, M., Marchi Goulart, T., Baura, W., Klisiowicz, D., y otros. (2013)<sup>a</sup>. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Paraná State, Brazil . *Acta Tropica* .
- Baum, M., Castro, E., Pinto, M., Goulartb, T., Baura, W., Klisiowicz, D., y otros. (2014). *The PNOC gene as a tool for detection of blood meal source of sandflies*. México: 13th International Congress of Parasitology.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B. et al. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422.
- Boakye, D., Tang, J., Truc, P., Merriweather, A., & Unnasch, T. (1999). Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. . *Med Vet Entomol* , 282-287.
- Bongiorno G, Habluetzel, A., Maroli, M. (2003). Host preference of phlebotomine sandflies at a

- hyperendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. . *J Acta Trop* , 109-116.
- Burneo, S. (2011). *Flacso*. Obtenido de Megadiversidad :  
[https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CCsQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.flacsoandes.edu.ec%2Fweb%2FimagesFTP%2F1240522090.2.\\_Megadiversidad\\_\\_Santiago\\_Burneo.doc&ei=YK3vVOWhNomcgwSK84H4Bw&usg=AFQjCNG5yNireDWGD1SSyF1It1AeSIrQfw&sig2=El3yHK15tB9VE1PiOqj25w&bvm=bv.86956481,d.eXY&cad=rja](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CCsQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.flacsoandes.edu.ec%2Fweb%2FimagesFTP%2F1240522090.2._Megadiversidad__Santiago_Burneo.doc&ei=YK3vVOWhNomcgwSK84H4Bw&usg=AFQjCNG5yNireDWGD1SSyF1It1AeSIrQfw&sig2=El3yHK15tB9VE1PiOqj25w&bvm=bv.86956481,d.eXY&cad=rja)
- Cabrera, O., Mosquera, L., Santamaría, E., & Ferro, C. (2009). Flebótomos (Diptera: Psychodidae) del departamento de Guaviare, Colombia, con nuevos registros para el país . *Biomédica* .
- Calvopiña, M., Armijos, R., & Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge -- a review. *M. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* , 663-672.
- Castellón, E. (2009). Lutzomyia sand flies in the Brazil Amazon basin (Diptera: Psychodidae). . *Editora INPA, Manaus Amazonas* , 202.
- Centers for Disease Control and Prevention . (2013). *Parasites - Leishmaniasis*. Obtenido de Parasites Home : <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>
- Contreras, M. (2013). Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) en zonas cafeteras de la región andina colombiana: taxonomía e importancia médica. *Universidad Nacional de Colombia* .
- Daba, S., Daba, A., Shehata, M., & El Sawaf, B. (2004). A simple micro-assay method for estimating blood meal size of the sand- fly, *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae) . *J Egypt Soc Parasitol* .
- Davies, C., Fernandez, M., Paz, L., Roncal, N., & Llanos-Cuentas, A. (1993). Lutzomyia verrucarum can transmit *Leishmania peruviana*, the aetiological agent of Andean cutaneous leishmaniasis. . *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993 , 603-606.
- Davies, C., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R., & Rodriguez, N. (2000). The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries . *Cad. Saúde Pública* , .
- De Gopugui, M., & Ruiz, R. (2003). Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *Int. J. Dermatol* (37), 801-814.
- DPIWE. (2006). *Gondwana The great supercontinent*. Obtenido de Parks and Wildlife Service Tasmania: <http://dpipwe.tas.gov.au/Documents/Gondwana.pdf>
- Dujardin, J., Le Pont, F.(2000). Morphometrics of a neotropical sandfly species, *Lutzomyia carrerai thula* . *Comptes Rendus de l'Academie des sciences Series III* , 273-279.
- Dutari, L., & Loaiza, J. (2014). American Cutaneous Leishmaniasis in Panama: a historical review of entomological studies on anthrophilic Lutzomyia sand fly species. *Parasites & Vectors* .
- Erwin, T., Pimienta, M., Murillo, O., & Aschero, V. (2005). Mapping patterns of  $\beta$ -diversity for beetles

- across the Western Amazon Basin: a preliminary case for improving inventory methods and conservation strategies. *Proc. Natl Acad. Sci.* , 72-85.
- Fernández, M. (2012). Eco-epidemiología de vectores de *Leishmania* spp. en el noreste de la Argentina (Provincia de Misiones). *Universidad de Buenos Aires* .
- Franco, A., Hill, J., Kitchke, C., Collingham, Y., Roy, D., Fox, R., y otros. (2006). Impacts of climate warming and habitat loss on extinction at species' low-latitude range boundaries . *Global Change Biology* , 1545-1553.
- Freire de Melo, M., De Souza, M., & Castellón, E. (1999). Density of Sand Flies (Diptera: Psychodidae) in Domestic and Wild Animal Shelters in an Area of Visceral Leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* , 427-432.
- Galati, E. (2010). Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) Classificação, Morfologia, Terminologia e Identificação de Adultos. Apostila Disciplina HEP 5752 Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Vol. I. *Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil.*
- Gama, J., Alves de Freitas, R., Melo, J., & Araujo, M. (2010). Fauna flebotomínica (Diptera: Psychodidae) da Serra do Tepequém, Município de Amajari, Estado de Roraima, Brasil. *Rev. Pan-Amoz. Saude* , 131-136.
- Garros, C. G. (2010). Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in Culicoides (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses . *Infection, Genetics and Evolution* .
- Gómez, E., Kato, H., & Hashiguchi, Y. (2014). Man-biting sand fly species and natural infection with the *Leishmania* promastigote in leishmaniasis-endemic areas of Ecuador . *Acta Tropica* , 41-49.
- Grimaldi, G. J., & McMahon-Pratt, D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *J. Trop. Med. Hyg.* .
- Grimaldi, G. J. (1992). Description of *Leishmania equatorensis* sp. n (Kinetoplastida: trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , 221-228.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J., Babba, H., Ravel, C. (2007). Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. . *Am J Trop Med Hyg* , 1054-1059.
- Hashiguchi, Y., Gomez, E., De Coronel, V., Mimori, T., & Kawabata, M. (1985). *Leishmania* Isolated from Wild Mammals Caught in Endemic Areas of Leishmaniasis in Ecuador . *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 120-121.
- Hashiguchi, Y. (2004). Studies on New and Old World Leishmaniasis and their Transmission, with Particular Reference to Ecuador, Argentina and Pakistan . *Research Report Series No. 7* .
- Haydon, D. C. (2002). Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg.*



- Infect. Dis* , 1468-1473.
- Heyer, W., Coddington, J., Kress, W., Acevedo-Rodriguez, P., Cole, D., Erwin, T., y otros. (1999). Amazonian biotic data and conservation decisions. *Ciência e Cultura* , 372-385.
- INAMHI. (2014). Cambio climático . Obtenido de Detección de Cambio Climático en el Ecuador: : <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/cambio-climatico/>
- INIAP. (2012). *INFORME PAIS*. Obtenido de SITUACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS FORESTALES EN ECUADOR: [www.iniap.gob.ec/-iniapgob/nsite/images/sotries/descargas/informe\\_pas\\_rfg\\_ecuador\\_final\\_.pdf](http://www.iniap.gob.ec/-iniapgob/nsite/images/sotries/descargas/informe_pas_rfg_ecuador_final_.pdf)
- Ivens, A. (2005 ). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* , 436-442.
- Jansen, A., Roque, A. (2010). Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. *Elsevier, London* , 249-276.
- Jochim, R., Teixeira, C., Laughinghouse, A., Mu, J., Oliveira, F., Gomes, R., y otros. (2008). The midgut transcriptome of *Lutzomyia longipalpis*: comparative analysis of cDNA libraries from sugar-fed, blood-fed, post-digested and *Leishmania infantum* chagasi-infected sand flies. . *BMC Genomics* . , 9-15.
- Jones, L., Cohnstaedt, L., Beati, L., Terán, R., León, R., & Munstermann, L. (2010). New Records Of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From Ecuador . *National Institute of Health* .
- Kalinova B, H. M. (2001). Detection of sex pheromone components in *Manduca sexta* (L). . *Chem Senses* . , 1175-86.
- Kato, H., Gomez, E., Cáceres, A., Uezato, H., Mimori, T., Hasiguchi, Y. (2010). Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *Int J Environ Res Public Health*
- Kato, H., Calvopiña, M., Criollo, H., & Hashiguchi, Y. (2013). First human cases of *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species . *Acta Tropica*
- Kent, R., & Norris, E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b . *Am J Trop Med Hyg* , 336-342.
- Kieleczawa, J. *DNA Sequencing II Optimizing Preparation and Cleanup*. Ontario: Jones and Bartlett Publishers.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies . *Clin Dermatol* , 279-289.
- Kreutzer R.D., Corredor A., Grimaldi G., Jr., Grogl M., Rowton E.D., Young D.G. (1991). Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida:trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg* , 662-675.
- Kirstein, F., & Gray, J. (1996). A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of

- Lyme Borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. . *Appl Environ Microbiol* 6 , 4060-4065.
- Lainson, R. (1989). Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniasis, . *Demography and Vector-Borne Diseases*, , 106.
- León, R., Mollinedo, S., & Le Pont, F. (2009). Phlébotomes d'Equateur et de Bolivie: descriptions de *Psathyromyia castilloi* n. sp. et *Psychodopygus luisleoni* n. sp. (Diptera, Psychodidae). *Bull. Soc. Entomol.* , 83-89.
- Logan, J., Cook, J., Stanczy, N., Weeks, I., Welham, E., Mordue, S. (2010). To bite or not to bite. A questionnaire-based survey assessing why some people are bitten more than others by midges. *BMC Public Health*.
- Macedo-Silva, V., Martins, D., Souza de Queiroz, P., Pinheiro, P., Freire, C., Queiroz, J., y otros. (2014). Feeding Preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the Sand Fly Vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) . *J. Med. Entomol* , 237-244.
- MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Agricultura y Pesca) . (2013). *Memoria Técnica* . Obtenido de "GENERACIÓN DE GEOINFORMACIÓN PARA LA GESTIÓN DEL TERRITORIO A NIVEL NACIONAL ESCALA 1: 25 000": [http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/ZONA4/NIVEL\\_DEL\\_PDOT\\_CANTONAL/MANABI/CHONE/IEE/MEMORIAS\\_TECNICAS/mt\\_chone\\_sistemas\\_productivos.pdf](http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/ZONA4/NIVEL_DEL_PDOT_CANTONAL/MANABI/CHONE/IEE/MEMORIAS_TECNICAS/mt_chone_sistemas_productivos.pdf)
- Malta, M. T. (2010). Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. . *Vet. Parasitol* .
- Marassá, A., Bianchi, E., Pimentel, D., Aschenbrenner, C. (2013). Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo Brazil. . *Revista Sociedade Brasileira Med. Trop* .
- Maroli, M.; Feliciangeli, M.; Bichaud, L.; Charrel, R.; Gradoni, L (2012). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*.
- McCall P., Cameron, M. (1995). Oviposition pheromones in insect vectors. *Parasitol Today* , 352-355.
- Mencke, N., Volf, P., Volfova, V., & Stanneck, D. (2003). Repellent Efficacy of a Combination Containing Imidacloprid and Permethrin against Sand Flies (*Phlebotomus papatasi*) on Dogs. *Parasitol Res* , 108-111.
- Miller, E. Hupper, A. (2013). The effects of host diversity on vector-borne disease: the conditions under which diversity will amplify or dilute the disease risk. *PLoS ONE* .
- Ministerio del Ambiente. (2011). *Plan de Manejo Refugio de Vida Silvestre El Pambilar*. Obtenido de Ministerio del Ambiente: [http://alfresco.ambiente.gob.ec:8096/alfresco/d/d/workspace/SpacesStore/a0cab3d3-832e-4585-8172-63a5718c7076/PM\\_Pambilar.pdf](http://alfresco.ambiente.gob.ec:8096/alfresco/d/d/workspace/SpacesStore/a0cab3d3-832e-4585-8172-63a5718c7076/PM_Pambilar.pdf)

- Mimori T., Grimaldi G., Jr., Kreutzer R.D., Gomez E.A., Mahon-Pratt D., Tesh R.B. (1989). Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. . *Am. J. Tropical* .
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador . (2014). *Enfermedades de la Piel* . Obtenido de Anuario de Vigilancia Epidemiológica 1994-2013 : <https://public.tableausoftware.com/profile/manco.suxio#!/vizhome/delapiel/ANUARIO>
- Mollereau, C., Simons, J., Soularue, P., Liners, F., Vassart, G., Meunier, J., y otros. (1996). Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 8666-8670.
- Morrison, A., Ferro, C., Tesh, R. (1993). Host preferences of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. . *Am J Trop Med Hyg* , 68-75
- Mucio, M., Miller, C., Sanchez, E., & Leon, M. (2001). El Receptor ORL-1 y su peptido endogeno, La nociceptina/orfanina FQ: nuevos miembros de la familia de los opioides . *Salud mental* , 43-54.
- Navarro, F., Castellanos, H., & Vélez, I. (2005). Phlebotomine fauna in the Imataca Forest Reserve, State of Bolivar, and report of new species for Venezuela. *Revista COPÉRNICO 2005* , 264-268.
- Nery, L., Lorosa, E., Franco, A. (2004). Feeding preference of the sand flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an urban forest patch in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* , 571-574.
- Nieves, E. O., Rondón, Y., Sánchez, M., Sánchez, Y., Rojas, M., Rondón, M., y otros. (2014). Effect of Environmental Disturbance on the Population of Sandflies and *Leishmania* Transmission in an Endemic Area of Venezuela . *Journal of Tropical Medicine* .
- Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J., Dufour, B., & Depaquit, J. (2011). Contribution to the knowledge of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. . *Parasitol Res.* , 657-663.
- Noguera, P., Rondón, M., & Nieves, E. (2006). Effect of blood source on the survival and fecundity of the sandfly *Lutzomyia ovallesi* Ortiz (Diptera: Psychodidae), vector of *Leishmania* . *Biomédica* .
- Oliveira, A. (2013). New records of Phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) in the Amanã sustainable development reserve, Amazonas, Brazil. . *UAKARI* , 1-6.
- OMS. (2015). *Leishmaniasis*. Obtenido de Datos y Cifras: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Ovallos, F., Espinosa, Y., Fernandez, N., Gutierrez, R., Bianchi, E., & Sandoval, C. (2013). The sandfly fauna, anthropophily and the seasonal activities of *Pintomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a focus of cutaneous leishmaniasis in northeastern Colombia. *MEM INST OSWALDO CRUZ* ,

- PAHO. (2014). *Leishmaniasis*. Obtenido de <http://www.paho.org/world-health-day-2014/wp-content/uploads/2014/02/Leishmaniasis-esp.pdf>
- Parson W, P. K. (2000). Species identification by means of the cytochrome b gene. . *Int J Legal Med.* , 23-28.
- Pitman, N. C., Terborgh, J. W., Silman, M. R., Núñez, V. P., Neill, D. A., Cerón, C. E., y otros. (2001). Dominance and distribution of tree species in upper Amazonian terra firme forests. . *Ecology* , 2101-2117.
- Qiagen. (2015). *Products*. Obtenido de Buffers: <https://www.qiagen.com/es/search.aspx?q=buffer%20ATL#&&pg=1>
- Quinnel, R., Dye, C., Shaw, J. (1992). Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomol* , 195-200.
- Ramalho-Ortigao, M., Saraiva, E., & Traub-Csekö, Y. (2010). Sand Fly-Leishmania Interactions: Long Relationships are Not Necessarily Easy . *The Open Parasitology Journal* , .
- Ravasan, N., Oshaghi, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., & Mohtarami, F. (2009). Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays . *Iranian J Arthropod-Borne Dis* , 8-18.
- Ready, P. (2013). Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. *Annu. Rev. Entomol* , 227-250.
- Rey, J. (2012). *University of Florida* . Recuperado el Julio de 2014, de La Leishmaniosis : <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN72400.pdf>
- Rocha, V., Da Silva, J., Ribiero da Silva, K., Pires, M., Dantas, M., Martins, P., y otros. (2014). Identification of blood meal sources of *Lutzomyia longipalpis* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the cytochrome B gene . *Mem Inst Oswaldo Cruz* .
- Rodríguez, C., & Castillo, M. (2005). Analisis De Los Sistemas De Produccion En El Territorio De Seis Comunidades Kichwas Asentadas En La Zona Noroccidental Del Parque Nacional Yasuni, Rio Napo Orellana - Ecuador. *Biodiversity & Sustainable Forestry (BIOFOR) IQC*.
- Rodríguez, W., Fernandes, J., Rebouças, G., Ríos-Velásquez, C., Marialva, E., Desmouliérec, S., y otros. (2014). Anthropoc effects on sand fly (Diptera: Psychodidae) abundance and diversity in an Amazonian rural settlement, Brazil . *Acta Tropica* , 44-52.
- Rodríguez, J. (2012). *Caracterización preliminar de las proteínas activas de las glándulas salivales de lutzomyia trapidoi y lutzomyia gomezi, vectores de leishmaniasis cutanea*. Recuperado el 20 de Octubre de 2013, de Repositorio Institucional UIS (RIUIS): <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/handle/123456789/350>
- Root, T., Price, J., Hall, K., Schneider, S., Rosenzweig, C., & Pounds, A. (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* , 57-60.

- Romera, E., & Martínez, E. (2000). Datos preliminares sobre el ciclo nictimeral de *phlebotomus perniciosus newstead*, 1911 y *phlebotomus sergenti parrot*, 1917 (diptera, psychodidae). *Anales de Biología* .
- Romera, M., & Sánchez, J. (2007). Una mirada a la epidemiología y al control de la leishmaniasis zoonótica en Colombia. *BioSalud* , 99-111.
- Ronet C., Ives A., Bourreau E., Fasel N., Launois P., Masina S. (2010). . Immune responses to *Leishmania guyanensis* infection in humans and animal models, in *Immune Response to Parasitic Infection*. *Bentham Science Publishers* , 165-175.
- Roque, A., & Jansen, A. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* , 251-262.
- Ryan, K., & Ray, C. (2004). *Sherris Medical Microbiology*. McGraw Hill.
- Ryan, L., Lainson, R., Shaw, J., Braga, R., & Ishikawa, E. (1987). Leishmaniasis in Brazil. XXV. Sandfly vectors of *Leishmania* in Pará State, Brazil. . *Medical and Veterinary Entomology* .
- Sacks D, Kamhawi S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* , 453-483
- Souza, R., Lima, J., Souza, F., Gadelha, A., & Braga, V. (1999). Establecimiento de um criadouro natural de *Lutzomyia longipalpis*, . *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* , 214-215.
- Spiegel CN, J. P. (2005). (1S, 3S, 7R)-3-methyl- $\alpha$ - himachalene from the male sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) induces neurophysiological responses and attracts both males and females. . *J Insect Physiol.* , 1-10.
- Svobodova, M, Sadlova, J, Chang, KP, Volf, P. (2003). Short report: distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *Am J Trop Med Hyg*, 68:6-9.
- Tesh, R., Chaniotis, B. Carrera, B., Johnson, K. (1972). Further studies on the natural host preferences of Panamanian phlebotomine sandflies. *Am J Epidemiol.* , 88-93.
- Travis, J. (2003). Climatic change and habitat destruction: a deadly anthropogenic cocktail . *Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences* , 467-473.
- Uribarren, T. (2014). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Recuperado el Julio de 2014, de Leishmaniosis o Leishmaniasis: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>
- 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* .
- Valenzuela, J., Belkaid, Y., Garfield, M., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E., y otros. (2001).

- Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. . *J Exp Med.* , 331-42.
- Valinsky, L., Ettinger, G., Bar-Gal, G., & Orshan, L. (2014). Molecular Identification of Bloodmeals From Sand Flies and Mosquitoes Collected in Israel . *Entomological Society of America* .
- 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*.
- Veijalainen, A., Wahlberg, N., Broad, G., Erwin, T., Longino, J., & Sääksjärvi, I. (2012). Unprecedented ichneumonid parasitoid wasp diversity in tropical forests . *Proc. R. Soc. B* , 4694-4698.
- Veijalainen, A., Ilari, E., Sääksjärvi, Erwin, T., Gómez, I., & Longino, J.<sup>b</sup> (2012). Subfamily composition of Ichneumonidae (Hymenoptera) from western Amazonia: Insights into diversity of tropical parasitoid wasps. *Insect Conservation and Diversity* , 28-37.
- Vogt, R. (2003). *Biochemical Diversity of Odor Detection: OBPs, ODEs and SNMPs*. . London: Elsevier Academic Press.
- Ward, R., Phillips, A., Burnet, B., & Marcondes, C. (1988). he *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution,. *Biosystematics of Haematophagous Insects* , 257-269
- WHO. (2010). Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. *WHO technical report series* .
- Woolhouse, M., Dye C., Etard, F., Smith T., Charlwood J.D. (1997). Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A* , 338-342.
- Young, D., & Duncan, M. (1994). Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae) . *Associated-Publishers-American Entomological Institute*
- Zapata, S., Mejía, L. Le Pont, F., León, R., Pesson, B., Ravel, C., Bichaud, L., Charrel, L., Cruaud, C., Trueba, G., Depaquit, J. (2012). A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador . *Parasites & Vectors*

## 12. Tablas

**TABLA 1.** Tipos de *Leishmania* en el viejo mundo y los vectores incriminados y/o sospechosos

<b>Parásito Leishmania</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Regiones o Países</b>	<b>Vectores incriminados</b>	<b>Vectores sospechosos</b>
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>donovani</i>	Visceral	India Nepal Bangladesh	<i>Phlebotomus</i> ( <i>Euphlebotomus</i> ) <i>argentipes</i>	<i>Phlebotomus</i> ( <i>Paraphlebotomus</i> ) <i>Alexandri</i>
<i>Le. (Le.) donovani</i>	Visceral	China	Ninguno	<i>P. (Adlerius)</i> <i>chinensis</i>
<i>Le. (Le.) donovani</i>	Mucocutánea	Sudan Etiopia Yemen	<i>P. (Larroussius)</i> <i>orientalis</i>	Ninguno
<i>Le. (Le.) donovani</i>	Visceral	Sudán Etiopia Kenya Uganda	<i>P.</i> ( <i>Synphlebotomus</i> ) <i>Martini s.l.</i>	<i>P.</i> ( <i>Synphlebotomus</i> ) <i>celiae</i> <i>P. (Sy.)</i> <i>vansomerenae</i>
<i>Le. (Le.) infantum</i>	Visceral Cutánea	Europa mediterránea Norte de África China	<i>P. (La.) ariasi</i> <i>P. (La.)</i> <i>perniciosus</i>	<i>P. (La.) kandelakii</i> <i>P. (La.) langeroni</i> <i>P. (La.) longicuspis</i> <i>P. (La.) major</i> <i>P. (La.) tobbi</i>
<i>Le. (Le.) major</i>	Cutánea	África sub- sahariana	<i>P. (Phlebotomus)</i> <i>duboscqi</i>	<i>Sergentomyia</i> <i>garnhami</i>
<i>Le. (Le.) arabica</i>	Cutánea	Norte de África	<i>P. (P.) papatasi</i>	Ninguno
<i>Le. (Le.) turanica</i>	Cutánea	Irán Pakistán Noreste de la India	<i>P. (P.) papatasi</i>	<i>P. (Phlebotomus)</i> <i>salebi</i>
<i>Le. (Le.) tropica</i>	Cutánea	Norte de África Irán Afganistán	<i>P.</i> ( <i>Paraphlebotomus</i> ) <i>sergenti</i>	<i>Phlebotomus (Pa.)</i> <i>similis</i>
<i>Le. (Le.) aethiopica</i>	Cutánea Mucocutánea	Etiopía Kenia	<i>P. (La.) longipes</i> <i>P. (La.) pedifer</i>	<i>P. (La.) aculeatus</i> <i>P. (Pa.) species</i>

**Fuente:** Tabla modificada de los datos de Ready, 2013

**TABLA 2.** Tipos de *Leishmania* en el nuevo mundo y los vectores incriminados y/o sospechosos

<b>Parásito Leishmania</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Regiones o Países</b>	<b>Vectores incriminados</b>	<b>Vectores sospechosos</b>
<i>Leishmania</i> ( <i>Leishmania</i> ) <i>infantum</i>	Cutánea Visceral	Latino América excepto Perú y Guyanas	<i>Lutzomyia</i> ( <i>Lutzomyia</i> ) <i>longipalpis</i>	<i>Lutzomyia</i> ( <i>Lutzomyia</i> ) <i>almerioi</i> <i>L. (L.) cruzi</i> <i>L. (Pifanomyia)</i> <i>evansi</i>
<i>Le. (Viannia.)</i> <i>braziliensis</i>	Cutánea Mucocutánea	Este de los Andes excepto Guyana y Surinan	<i>L.</i> ( <i>Psychodopygus</i> ) <i>wellcomei</i> <i>L. (Nyssomyia)</i> <i>neivai</i> <i>L. (Ny.)</i> <i>whitmani</i>	<i>L. (Nyssomyia)</i> <i>intermedia</i> <i>L. (Migonei)</i> <i>migonei</i> <i>L.</i> ( <i>Psychodopygus</i> ) <i>carrerae</i> <i>L. columbiana</i> <i>L. cruciata</i> <i>L. edwardsi</i> <i>L. tejadai</i> <i>L. trinidanensis</i>
<i>Le. (V.)</i> <i>braziliensis</i>	Cutánea Mucocutánea	Oestes de los Andes Norte Venezuela excepto El Salvador	<i>L. (Pifanomyia)</i>	<i>L. (Pf.)townsendi</i> <i>L.</i> ( <i>Helcocyrtomyia</i> ) <i>pescei</i> <i>L. (Ps.)</i> <i>panamensis</i> <i>L. neivai</i> <i>L. ovallesi</i> <i>L. pescei</i> <i>L. youngi</i> <i>L. paraensis</i> <i>L. townsendi</i>
<i>Le. (V.)</i> <i>peruviana</i>	Cutánea Mucocutánea	Perú	Ninguno	<i>L. (He.) peruensis</i> <i>L. (Pf.)</i> <i>verrucarum s.l</i>
<i>Le. (V.)</i> <i>guyanensis</i>	Cutánea Mucocutánea	Este de los Andes excepto Paraguay	<i>L. (Ny.)</i> <i>umbratilis</i> <i>L. ayacuchensis</i>	<i>L. (Ny.) anduzei</i> <i>L. (Ny.) shawi</i> □ <i>L. (Ny.) whitmani</i> <i>L. migonei</i>
<i>Le. (V.)</i> <i>panamensis</i>	Cutánea Mucocutánea	Oeste de los Andes Norte Venezuela	<i>L. hartmanni</i> <i>Psy. panamensis</i>	<i>L. (Ny.) trapidoi</i> <i>L. (Ny.) ylephiletor</i>



**TABLA 2.** Continuación de los Tipos de *Leishmania* en el nuevo mundo y los vectores incriminados y/o sospechosos

Parásito <i>Leishmania</i>	Enfermedad	Regiones o Países	Vectores incriminados	Vectores sospechosos
		Excepto México, El Salvador		<i>L. (Ny.) edentula</i> <i>L.</i> <i>(tricholateralis)</i> <i>gomezi</i> <i>L. sanguinaria</i> <i>L. ylephiletor</i> <i>L. yuilli</i>
<i>Le. (V.) shawi</i>	Cutánea	Brasil	Ninguno	<i>L. (Ny.) whitmani</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cutánea	Brasil Bolivia Colombia Venezuela	<i>L. flaviscutellata</i>	<i>L. longipalpis</i> <i>L. olmeca</i> <i>reducta</i> <i>L. olmeca nociva</i> <i>L. cruciata</i>
<i>L. (L.) peruviana</i>	Cutánea Mucocutánea	Perú Bolivia	<i>L. ayacuchensis</i> <i>L. peruensis</i> <i>L. verrucarum</i>	<i>L. nuneztovari</i> <i>anglesi</i>
<i>Le. (V.) colombiensis</i>	Cutánea	Panamá Colombia Venezuela	Ninguno	<i>L. (He.) hartmanni</i> <i>Psy. panamensis</i> <i>Lu. gomezi</i>
<i>Le. (V.) naiffi</i>	Cutánea Cutánea	Brasil Panamá Venezuela	Ninguno	<i>L. (Ps.) ayrozai</i> <i>L. (Ny.) trapidoi</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. paraensis</i> <i>L. antunesi</i>

**Fuente:** Tabla modificada de los datos de Maroli *et al.*, 2012 y Ready, 2013

**TABLA 3.** Datos reportados por el Ministerio de Salud Pública del Ecuador sobre la incidencia de Leishmaniasis en las diferentes provincias del país desde el año 2005-2013 (MSP, 2014).

Provincia	2005		2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Azuay	6	0,93	1	0,15	7	1,05	6	0,87	4	0,58	4	0,54	1	0,13	2	0,26	3	0,38
Bolívar	189	1,07	107	60,1	36	20,1	82	45,2	62	34,1	129	67,32	73	37,69	74	37,81	44	22,06
Carchi							6	3,57	7	4,17	3	1,27	5	2,08	3	1,23	1	0,40
Cañar	18	8,23	11	4,98	8	3,58	4	1,75	14	6,12	9	5,24	4	2,31	2	1,14	3	1,70
Chimborazo	15	3,51	15	3,47	20	4,47	12	2,67	2	0,45	1	0,21	12	2,49	14	2,88	13	2,64
Cotopaxi	38	10,1	25	6,5	15	3,83	7	1,71	5	1,22	21	4,95	15	3,48	7	1,60	13	3,06
El Oro	5	0,87	9	1,54	11	1,85	19	3,06	40	6,45	23	3,68	13	2,05	6	0,93	28	4,48
Esmeraldas	446	1,07	217	51,2	125	2,9	241	54	225	50,4	127	23,02	122	21,72	207	36,23	59	10,69
Galápagos																		
Guayas	26	0,74	72	2,03	23	0,64	13	0,38	27	0,8	17	0,45	9	0,23	3	0,08	17	0,45
Imbabura	30	8,06	60	15,8	63	16,2	44	10,8	74	18,2	92	22,24	51	12,15	28	6,57	17	3,93
Loja	1	0,24	10	2,34	2	0,46	1	0,23	1	0,23	2	0,43	1	0,21	5	1,04	2	0,41
Los ríos	59	8,39	55	7,68	63	8,65	8	10,3	33	4,37	110	13,66	35	4,28	47	5,66	24	2,85
Manabí	350	27,6	96	7,49	81	6,24	120	9,01	220	16,5	101	7,11	55	3,83	59	4,06	31	2,11
Morona	107	85,1	156	12,2	183	141	145	109	175	13,1	140	91,41	268	70,1	215	132,76	49	29,46
Napo	39	44	39	42,8	48	51,4	40	40,6	43	43,7	59	55,16	74	67,57	53	47,26	19	16,55
Pastaza	17	24,5	29	40,5	41	55,8	46	59,1	54	69,4	46	53,20	54	60,64	49	53,44	55	58,28
Pichincha	384	14,9	386	14,8	242	9,14	393	16,4	393	16,4	353	13,23	239	8,78	281	10,11	153	5,40
Sucumbios	45	30,6	65	12,6	65	41,3	74	43,9	60	35,6	68	37,51	53	28,48	41	21,48	1	3,57
Tungurahua																		
Zamora	54	65,3	65	77,7	36	42,5	27	31,2	42	48,5	92	96,64	128	31,05	50	49,92	19	18,50
Orellana	96	96,8	118	11,5	116	10,9	121	106	140	1,22	133	96,53	113	80,33	246	171,12	53	36,29
Santo Domingo Colorados									114	34,9	99	26,10	59	15,23			4	1,17
Santa Elena													1	0,31	120	30,37	72	17,86
<b>Total</b>	<b>1925</b>	<b>14,6</b>	<b>1536</b>	<b>11,5</b>	<b>1185</b>	<b>8,71</b>	<b>1479</b>	<b>10,7</b>	<b>1735</b>	<b>12,6</b>	<b>1629</b>	<b>0,85</b>	<b>1385</b>	<b>9,07</b>	<b>1512</b>	<b>9,74</b>	<b>730</b>	<b>4,63</b>

Casos reportados T= tasa de incidencia por 100.000 habitante

**TABLA 4.** Lista de especies de mamíferos infectados con *Leishmania* en las Américas

Orden	Reservorio	Especie de <i>Leishmania</i>	País
<b>Didelphimorphia</b>	<i>Didelphis marsupialis</i>	<i>L. infantum</i>	Colombia, Venezuela
	<i>D. aurita</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>Marmosa sp</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Brasil
	<i>Gracilinanus agilis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Brasil
	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>L. (Viannia) sp.</i>	Brasil
	<i>Marmosa cinerea</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil
<b>Pilosa</b>	<i>Choloepus didactylus</i>	<i>L. guyanensis L. shawi</i>	Guyana francesa, Brasil
	<i>Choloepus hoffmanni</i>	<i>L. colombiensis L. equatoriensis L. panamensis</i>	Ecuador, Panamá
	<i>Bradypus tridactylus</i>	<i>L. shawi</i>	Brasil
	<i>Amandua tetradactyla</i>	<i>L. guyanensis, L. amazonensis, L. infantum</i>	Brasil Ecuador
<b>Rodentia</b>	<i>Proechimys species</i>	<i>L. amazonensis, L. guyanensis</i>	Guyana francesa, Brasil
	<i>Oryzomys melanotis</i>	<i>L. amazonensis</i>	México
	<i>Nectomys squamipes</i>	<i>L. infantum, L. braziliensis</i>	Brasil
	<i>Coendu prehensilis</i>	<i>L. infantum</i>	Bolivia
	<i>Sigmodon hispidus</i>	<i>L. braziliensis, L. mexicana</i>	Venezuela
	<i>Rattus rattus</i>	<i>L. infantum, L. braziliensis, L. mexicana</i>	Brasil Venezuela
	<i>Phyllotis andinum</i>	<i>L. peruviana</i>	Perú
	<i>Peromyscus yucatanicus</i>	<i>L. mexicana</i>	México
	<i>Sciurus vulgaris</i>	<i>L. amazonensis</i>	Ecuador
	<i>Sciurus granatensis</i>	<i>L. equatorensis</i>	Ecuador
	<i>Nyctomys sumichrasti</i>	<i>L. mexicana</i>	Honduras
<b>Carnivora</b>	<i>Cerdocyon thous</i>	<i>L. infantum, L. amazonensis</i>	Brasil
	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>Puma concolor</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>Potos flavus</i>	<i>L. guyanensis, L. amazonensis</i>	Guyana francesa, Ecuador
<b>Primata</b>	<i>Cebus apella</i>	<i>L. shawi</i>	Brasil
	<i>Cebus xanthosternos</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>Aotus azarai</i>	<i>L. (Viannia) spp</i>	Argentina
	<i>Callicebus nigrifrons</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
	<i>Pithecia irrorata</i>	<i>L. infantum</i>	Brasil
<b>Chiroptera</b>	<i>Carollia perspicillata</i>	<i>L. Infantum</i>	Venezuela
	<i>Molossus molossus</i>	<i>L. infantum, L. amazonensis, L. (V.) spp</i>	Brasil
	<i>Eumops glaucinus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil
	<i>Artibeus literatus</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil
	<i>Myotis nigricans</i>	<i>L. amazonensis</i>	Brasil

**Fuente:** Tabla modificada de los datos de (Roque & Jansen, 2014)

**TABLA 5.** Ubicación geográfica de los sitios de colección de flebotomos para este estudio.

<b>Provincia</b>	<b>Cantón</b>	<b>Sitio de colección</b>	<b>Períodos</b>	<b>Tipo de ecosistema</b>
<b>Bolívar</b>	Caluma Echeandía	Caluma Echeandía	Marzo 2013 Agosto 2014	Bosque secundario húmedo tropical, siempre verde
<b>Esmeraldas</b>	Eloy Alfaro	Santo Domingo de Onzole	Febrero 2013	Bosque secundario húmedo tropical, siempre verde
<b>Orellana</b>	Tiputini	Estación de Biodiversidad Tiputini	Octubre 2013	Bosque primario húmedo tropical, siempre verde
<b>Manabí</b>	Junín El Carmen	Chone Junín	Marzo 2013 Julio 2014	Bosque secundario subtropical seco, siempre verde
<b>Pichincha</b>	Puerto Quito	Paraíso Escondido	Noviembre 2012 Enero- Febrero 2014	Bosque secundario húmedo tropical, siempre verde.

Fuente: Palacios, 2015

**TABLA 6.** Reacción de PCR para la amplificación del gen PNOG

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>H<sub>2</sub>O PCR</b>		3,89 $\mu\text{L}$
<b>Buffer</b>	5X	2 $\mu\text{L}$
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25mM	1.4 $\mu\text{L}$
<b>dNTPS</b>	2mM	0,7 $\mu\text{L}$
<b>PNOCF</b>	50mM	0,08 $\mu\text{L}$
<b>PNOCR</b>	50mM	0,08 $\mu\text{L}$
<b>Taq</b>	1.5U	0,05 $\mu\text{L}$
<b>ADN</b>		2 $\mu\text{L}$

Fuente: Palacios, 2015

**TABLA 7.** Condiciones utilizadas para la amplificación del gen PNOG tomado de Haouas *et al* (2007).

	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Denaturación Inicial</b>	96°C	8 minutos	1
<b>Denaturación</b>	96°C	30 segundos	50
<b>Annealing de Primers</b>	56°C	30 segundos	
<b>Extensión</b>	72°C	30 segundos	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 minutos	

Fuente: Palacios, 2015

**TABLA 8.** Total de especímenes colectados y porcentaje de hembras con ingesta de sangre en las provincias de estudio.

Provincia	Total Hembras	Total Machos	Total Colectados	Porcentaje colectados Provincia	Número de especímenes identificados
Bolívar	180	102	282	9,09%	3
Esmeraldas	106	88	194	6,25%	2
Orellana	755	645	1400	45,12%	7
Manabí	316	387	703	22,66%	4
Pichincha	278	246	524	16,90%	6
<b>Total</b>	<b>1635</b>	<b>1468</b>	<b>3103</b>	<b>100%</b>	
<b>Porcentaje</b>	<b>52,56%</b>	<b>47,44%</b>			

Fuente: Palacios, 2015

**TABLA 9.** Total de hembras con ingesta de sangre y porcentaje por provincias.

Provincia	Hembras sangre	Hembras Sangre		Porcentaje Hembras Sangre	
		Roja (Reciente)	(Negra Proceso de digestión)	Roja (Reciente)	(Negra Proceso de digestión )
Bolívar	15	7	8	46,7%	53,3%
Esmeraldas	11	1	10	9,1%	90,9%
Orellana	37	25	12	67,6%	32,4%
Manabí	23	8	15	34,8%	65,2%
Pichincha	102	31	71	30,4%	69,6%
<b>Total</b>	<b>188</b>	<b>72</b>	<b>116</b>		
<b>Porcentaje</b>		<b>38,30%</b>	<b>61,70%</b>		

Fuente: Palacios, 2015

**TABLA 10.** Total de hembras con ingesta de sangre de las que se extrajo ADN y se amplificó el gen *PNOC*

COLOR SANGRE	CANTIDAD	PORCENTAJE	EXTRAIDOS	PORCENTAJE	AMPLIFICACION	PORCENTAJE	LEIDOS
SANGRE ROJA	72	38,3%	72	57,14%	47	68,2%	33
SANGRE SEMIDIGERIDA	116	61,7%	54	42,86%	22	31,8%	17
<b>TOTAL RECOLECTADOS</b>	188		126		69		

Fuente: Palacios, 2015

**TABLA 11.** Distribución de especies de flebótomos colectadas en provincias de estudio.

Género/ Especie	Provincia
<i>Nyssomyia trapidoi</i> *	Esmeraldas Manabí Pichincha
<i>Pressatia dysponeta</i>	Bolívar Manabí
<i>Lutzomyia gomezi</i>	Manabí
<i>Psychodopygus panamensis</i> *	Bolívar Esmeraldas Manabí Pichincha
<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i> *	Orellana
<i>Psychodopygus carrerai thula</i> *	Pichincha
<i>Lutzomyia hartmanni</i> *	Bolívar Pichincha
<i>Nyssomyia richardwardi</i> *	Orellana
<i>Psathyromyia aclydifera</i>	Orellana
<i>Psychodopygus hirsutus hirsutus</i>	Orellana
<i>Psychodopygus amazonensis</i> *	Orellana
<i>Lutzomyia tortura</i> *	Orellana
<i>Psychodopygus geniculata</i> *	Orellana
<i>Pintomyia serrana</i> *	Pichincha
<i>Psathyromyia abonnenci</i>	Pichincha

\*Especies que fueron utilizadas en el estudio de preferencias tróficas

^Especies confirmadas como vectores en el país

Fuente: Palacios, 2015

**TABLA 12.** Identificación de las preferencias tróficas de flebótomos en las provincias de estudio.

Especie	Reservorios										Total	Porcentaje (spp)
	<i>Homo sapiens</i>	<i>C. hoffmanii</i>	<i>Equus caballus</i>	<i>Capra hircus</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Pecari tajacu</i>	<i>Potos flavus</i>	<i>Cebus capucinus</i>	<i>Tapirus terrestris</i>			
<i>Nyssomyia trapidoi</i>	4	1	3								8	16%
<i>Psychodopygus panamensis</i>	2	1	3	4	2	2	2				18	36%
<i>Psychodopygus carrerai thula</i>	1	1				1					3	6%
<i>Pintomyia serrana</i>	1	3		1			1				6	12%
<i>Lutzomyia hartmanni</i>	2										2	4%
<i>Psychodopygus amazonensis</i>						1					1	2%
<i>Nyssomia richardwardi</i>	2							1			3	6%
<i>Lutzomyia tortura</i>						1					1	2%
<i>Psychodopygus geniculata</i>	1										1	2%
<i>Psychodopygus carrerai carrerai</i>	5					1			1		7	14%
	46%	22%	4%	6%	8%	8%	2 %	2 %	2%			
											50	100%

Fuente: Palacios, 2015

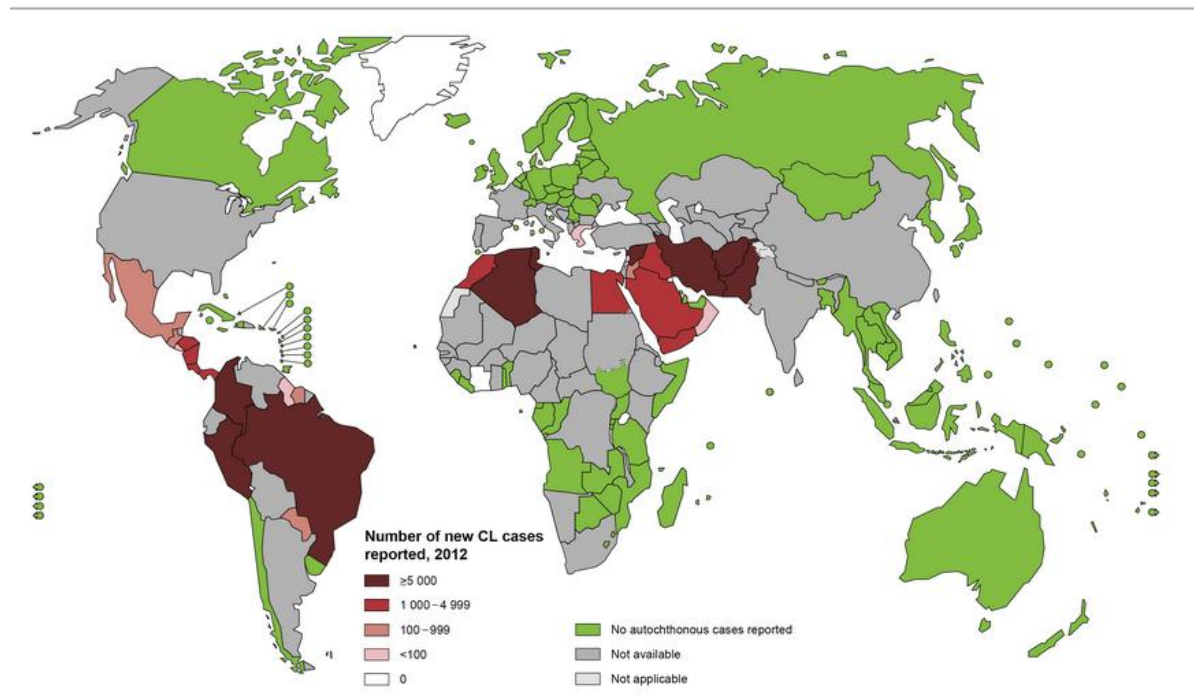
Orellana
Esmeraldas
Pichincha
Manabí
Bolívar



### 13. Figuras

**FIGURA 1.** Mapa de distribución mundial de Leishmaniasis cutánea en el año 2012 (OMS, 2015)

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2012

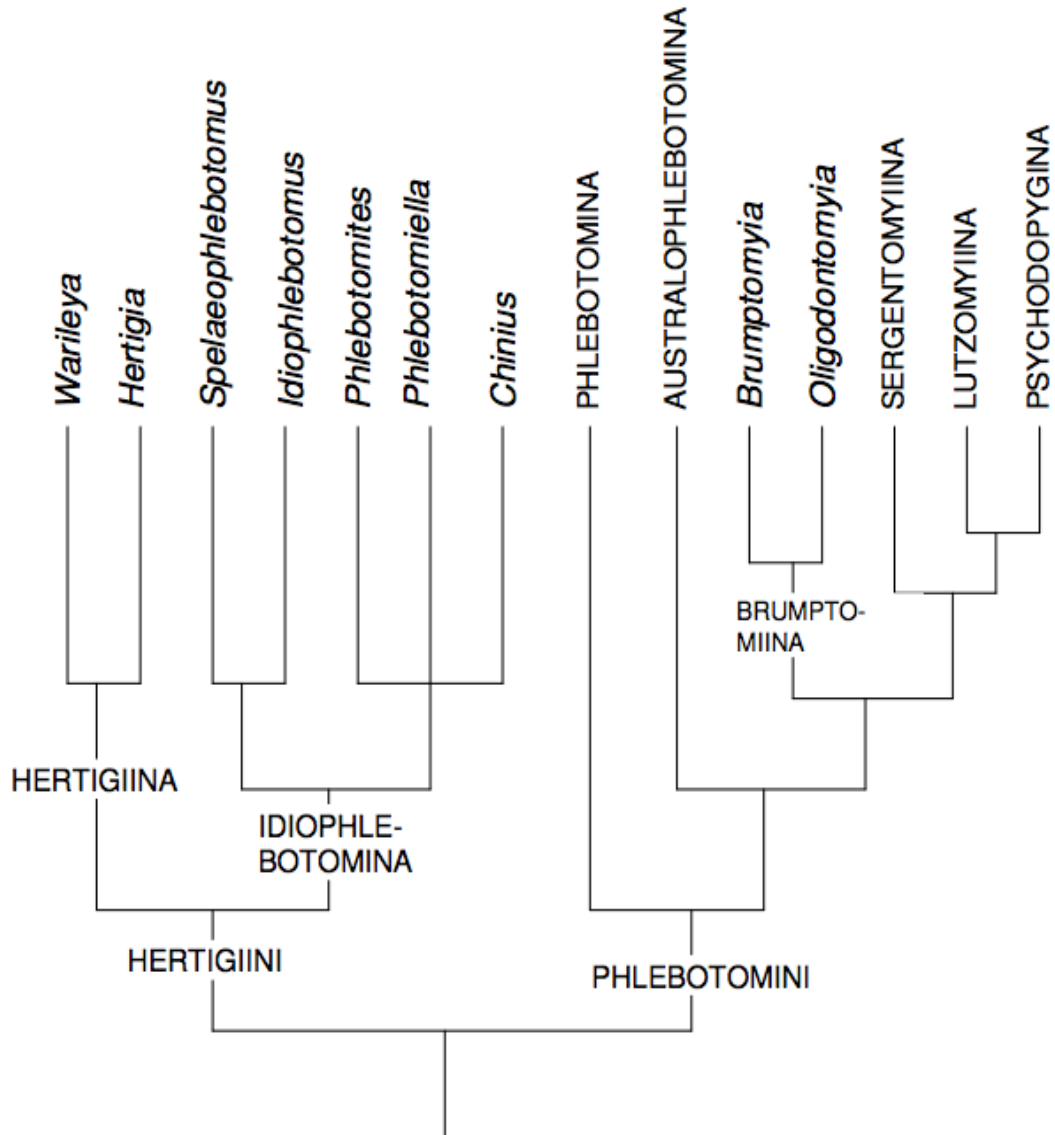


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

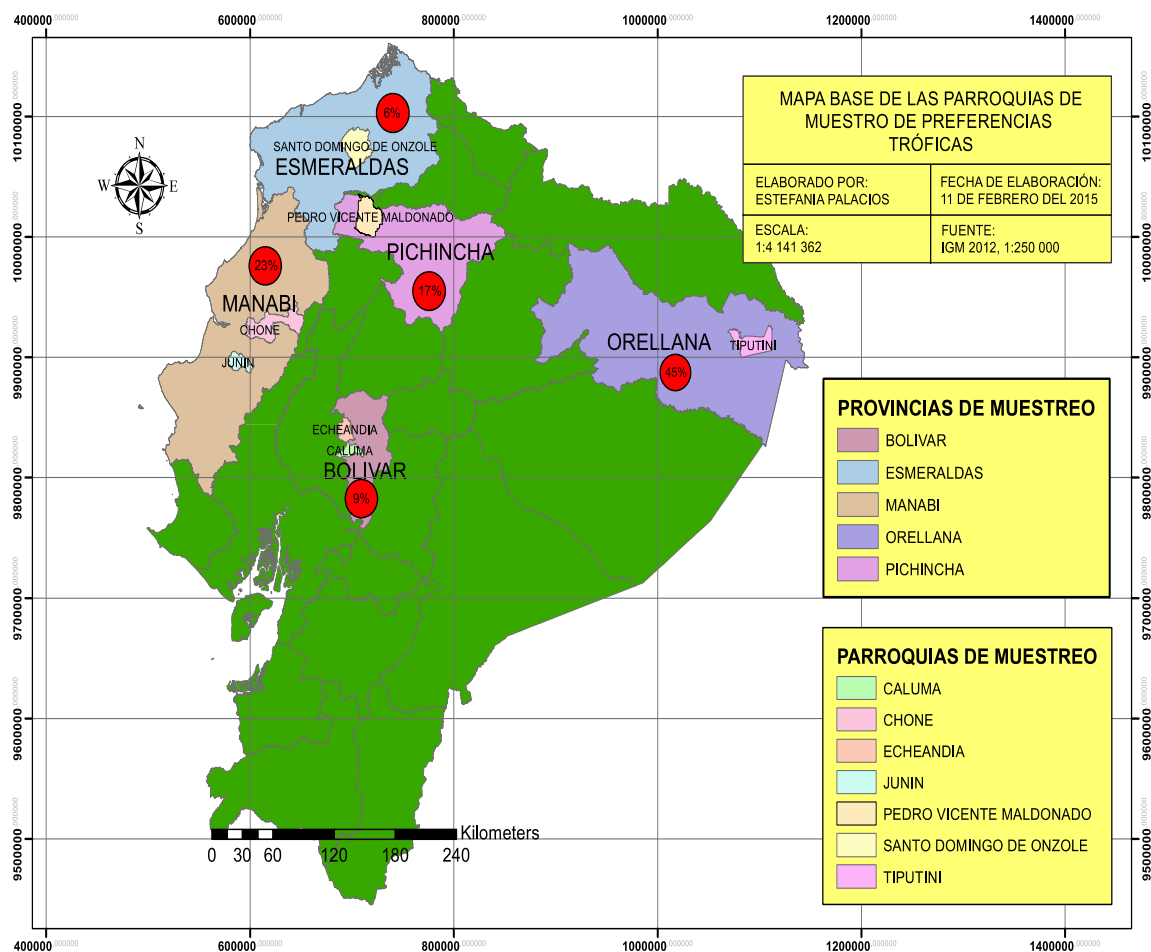
Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



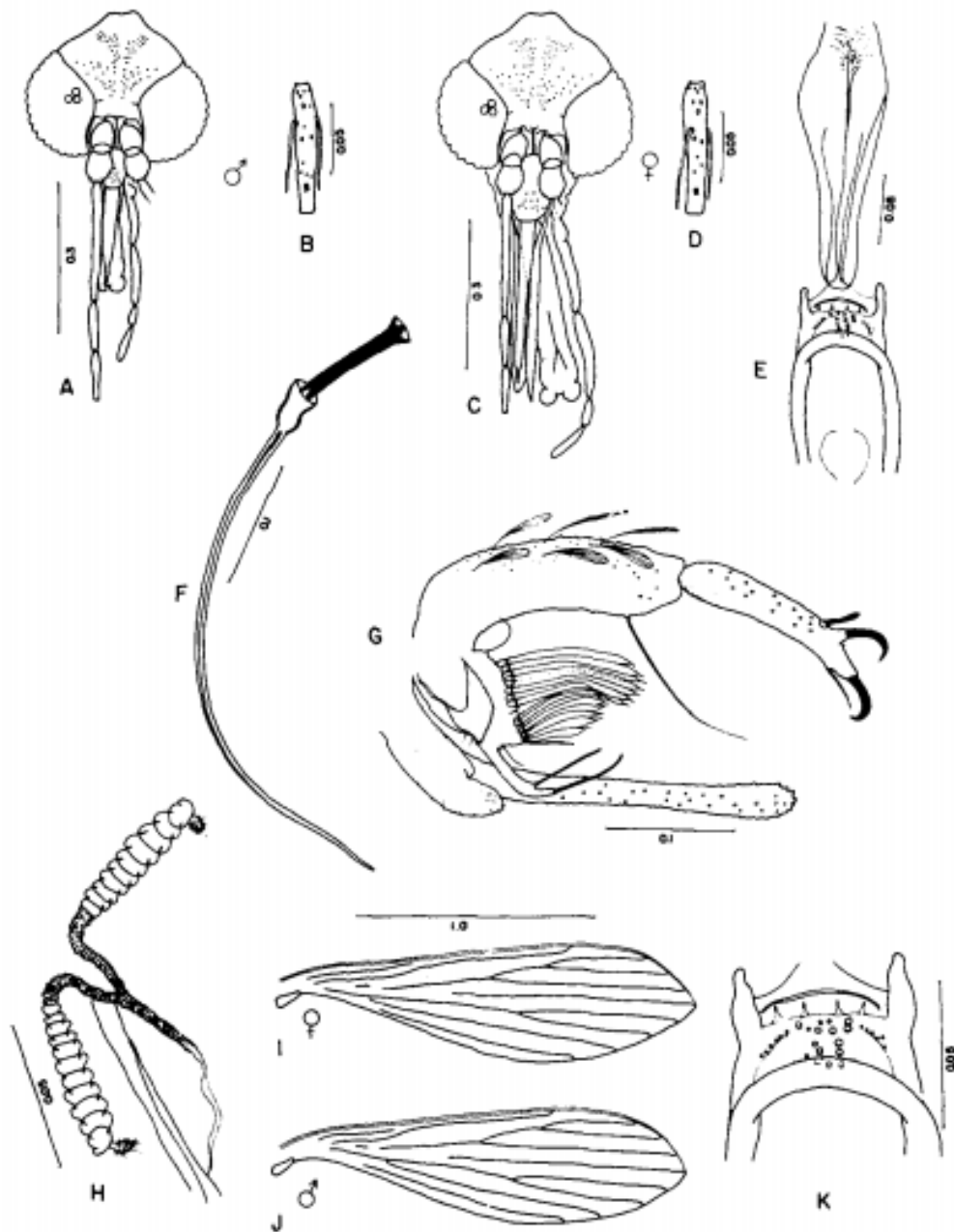
**FIGURA 2.** Clasificación de la subfamilia Phlebotominae en tribus y subtribus de acuerdo a los parámetros de Galati (Galati, 2010).



**FIGURA 3.** Sitios donde se realizaron las colectas entomológicas en las cinco provincias de estudio.



**FIGURA 4.** Características morfológicas de *Psy. panamensis* de acuerdo a su taxonomía



A. Cabeza de macho, B. Flagelómero II de macho C. Cabeza de hembra D. Flagelómero II de hembra E. Cibario femenino F. Bomba y filamentos genitales G. Terminalia masculina H. Espermateca I. Ala femenina J. Ala masculina K. Cibario femenino (Young & Duncan, 1994).

**FIGURA 5.** Morfología externa de una hembra (Cabrera *et al.*, 2009).



**GRÁFICO 6.** Ciclo de vida del parásito (Centers for Disease and Prevention, 2013)

