UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) en zonas cafeteras de la región andina colombiana: taxonomía e importancia médica

MARÍA ANGÉLICA CONTRERAS GUTIÉRREZ B.Sc.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2013

Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) en zonas cafeteras de la región andina colombiana: taxonomía e importancia médica

MARÍA ANGÉLICA CONTRERAS GUTIÉRREZ B.Sc.

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Entomología

Directora:

Ph.D., MSc., Ingeniera Agrónoma. Sandra Inés Uribe Soto

Codirectores:

Ph.D., MSc., Médico. Iván Darío Vélez Bernal
Ph.D., MSc., Charles Porter

Línea de Investigación:

Entomología médica, sistemática molecular

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Sistemática Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia2013

Dedicatoria

Dios.

Por su infinita bendición, bondad y amor.

A mi padres María Gutiérrez y Jorge Contreras

A mis hermanos Katya, Andrea, Javier, Jorge Andrés, Juan Carlos

A mi hermana prima Ella Cecilia

A mis tías Amparo y Rosa Iris

A mis sobrinos Abraham David e Isabella Sofía

A mi Ángel

Quienes han sido y son mi motivación, inspiración y felicidad. Por brindarme todo el apoyo y confianza en todo lo necesario para cumplir mis objetivos, además por el ejemplo de perseverancia y constancia

"La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar". Thomas Chalmers

Agradecimientos

A Dios

A la Dra. Sandra Uribe Soto, directora de tesis, por sus conocimientos y orientación. Ellos fueron fundamentales para lograr este cometido.

Al Dr. Iván Darío Vélez y Dr. Charles Porter, por su valiosa asesoría y el tiempo dedicado, adicionalmente por permitir el desarrollo experimental de este proyecto de investigación en los laboratorios del PECET y del CDC.

A los Dr. David Young y Eduar Bejarano enseñanzas y asesorías que aportaron para la realización de este proyecto de investigación.

A mis amigos PECET: Sandro Jovany Barajas, Raúl Leonardo Rocha, Libertad Ochoa, Ana María Gonzales, Evencio Mosquera, Xiomara Mosquera, Karina Ríos y Johana por su generosa colaboración en el campo laboral y personal.

A mis amigos UNAL: Richard Hoyos, Diego Carrero, Catalina Camargo, Lorena García, Isabel Cadavid, Doris Rosero, Luis Paternina, Lina María, Jibram León por su constante apoyo académico y emocional.

A mis compañeros del Grupo de Investigación en Sistemática Molecular – Universidad Nacional de Colombia y Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales - PECET

Al personal de las seccionales de salud y habitantes de los municipios visitados (Alcalá, Jardín, Jericó, Chinchiná, Salamina, Samaná, Victoria, Quimbaya, Pueblo Rico,

Al Centro Nacional de Investigaciones de Café – Cenicafé.

Universidad Nacional de Colombia por la formación académica que me otorgó

Al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET y Centers for Disease Control and Prevention – CDC, por la financiación del proyecto.

Resumen

En Colombia, la leishmaniasis es una enfermedad endémica con un promedio anual de casos reportados de 9.087 (2005 - 2011). Durante los últimos años se ha incrementado los registros de la enfermedad, particular en la región Andina, con 3.291 casos para el 2008, 12.574 casos para el 2009 y 12.187 casos para el 2010. Los datos parciales para el 2012 corresponden a 6.085.

La región Andina colombiana es un sistema de montañas que representa el 21,4% del territorio nacional y alberga alrededor del 50% de la población humana nacional. Esta región es de gran importancia económica ya que ofrece ambientes y condiciones climáticas y edáficas propicias para la producción agrícola a gran escala, siendo el café el producto comercializado de mayor importancia de la región y el país. Esta actividad económica se presenta principalmente, con mayor área cultivada en el eje cafetero (Caldas, Risaralda, Quindío) y en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Huila, Santander, Tolima, Norte de Santander y Valle del Cauca, y donde se registran en mayor cantidad brotes de leishmaniasis cutánea, una de las formas más comunes de la enfermedad.

La ecorregión eje cafetero es considerada un corredor biológico que alberga gran diversidad de especies, ofreciendo condiciones favorables para el desarrollo y establecimiento de los flebotomíneos (subfamilia Phlebotominae) vectores de la leishmaniasis, cuyo agente causal son protozoos del género *Leishmania*. El monitoreo de la fauna de insectos vectores en las áreas cafeteras es primordial, ya que es el vector quien delimita los focos de transmisión y es un blanco importante para la interrupción de ciclo de la enfermedad.

En el presente estudio se elabora una lista de las especies de flebotomíneos en zonas cafeteras de Colombia además de proporcionar nuevos registros sobre la distribución de las especies de importancia médica con base en un muestreo intensivo. Se revisa el

estado actual de conocimiento sobre la taxonomía morfológica disponible en la literatura para estas especies la cual es escasa y se presentan diagnosis construyendo una guía taxonómica que reúne las claves disponibles y observaciones del estudio. Los aspectos taxonómicos se complementan con el uso de secuencias de ADN y en particular la secuencia propuesta como código genético de barras para especies animales. El estudio se desarrolló en 9 municipios de los departamentos de Antioquia, Caldas, Quindío, Risaralda y Valle del Cauca.

Un total de 1630 ejemplares fueron colectados entre 2009 y 2012, correspondiendo a 23 especies del género *Lutzomyia, Lutzomyia pia* fue la especie colectada en mayor cantidad (n=526) seguida de *Lutzomyia carrerai thula* (n=211), *Lutzomyia trapidoi* (n=179), *Lutzomyia yuilli* (n=109) y *Lutzomyia youngi* (n=102). Se discute la presencia de especies asociadas con la trasmisión de *Leishmania* spp. Para la revisión taxonómica de las especies de importancia médica se utilizaron descripciones, redescripciones, revisiones y consultas con especialistas.

La lista actualizada incluyó 48 especies de flebotomíneos y se realizó con los datos resultantes del muestreo y se incluyeron los registros publicados previamente, además se contó con la información del material de la Colección de Vectores y Hospedadores Intermediarios de Enfermedades Tropicales-VHET del PECET que corresponde a estudios de foco realizados durante 3 años en municipios de zona cafetera de los departamentos de Antioquia y Tolima. Adicionalmente, las especies que presentaron dificultades en la determinación taxonómica basada en caracteres morfológicos se tipificaron con base en el fragmento 5´ del gen COI basada en los protocolos por la iniciativa código de barras de ADN y se evaluó si utilidad para separarlas en comparación con la morfología. El análisis de secuencias nucleotídicas complementado con información que relaciona los patrones morfológicos, facilitó la identificación de flebotomíneos de los géneros *Lutzomyia, Brumptomyia y Warileya* y específicamente de importancia médica. Los resultados validan la utilidad de la región código de barras de ADN como una herramienta diagnóstica complementaria a la taxonomía alfa en Phlebotominae presente en zona cafetera.

Palabras clave: Flebotomíneos, Leishmaniasis, Región Andina, zona cafetera, Citocromo Oxidasa I, Código de barras, Phlebotominae, Taxonomía, Colombia.

Contenido

PÁG.

RESUMEN V

LISTA DE FIGURAS IX

LISTA DE TABLAS XI

INTRODUCCIÓN 1

1. MARCO TEÓRICO 5
1.1 Generalidades sobre los flebotomíneos 5
1.1.1 Taxonomía y Distribución 5
1.1.2 Biología y Ecología 6
1.1.3 Ciclo de vida 8
1.2 Estructuras morfológicas relevantes en la identificación de estados inmaduros y adultos 12
1.2.1 Estados inmaduros 12
1.2.2 Estado adulto 15
1.2.2.1. Cabeza 15
1.2.2.2. Tórax 16
1.3 Identificación molecular 19
1.4 Importancia médica 23
1.4.1 La leishmaniasis en Colombia 27
1.5 Estado de conocimiento sobre los Phlebotominae en Colombia 29
1.5.1 Phlebotominae en zonas cafeteras 29

2. OBJETIVOS 33
2.1 Objetivo general 33
2.2 Objetivos específicos 33

3. METODOLOGÍA 35
3.1 Colecta de flebotomíneos 35
3.1.1 Área de estudio 35
3.1.1. Área de estudio ..... **¡Error! Marcador no definido.**
3.1.2 Métodos de Colecta 39

3.2 Procesamiento **43**
3.3 Identificación taxonómica y especies presentes en la zona de estudio **44**
3.4 Guía taxonómica: Diagnosis taxonómicas de las especies *Lutzomyia* de importancia médica encontradas en el área de estudio con base en la revisión de la información disponible y las observaciones del presente estudio **44**
3.5 Identificación molecular de adultos colectados en la zona de estudio **45**
3.5.1 Extracción de ADN total 45
3.5.2 Amplificación del fragmento 5`del gen Citocromo Oxidasa I (COI) mediante la técnica de PCR 46
3.5.3 Visualización, purificación y secuenciación de los productos de PCR 46
3.5.4 Edición, alineamiento y análisis molecular de las secuencias 47
3.6 Actualización sobre el conocimiento de presencia y distribución de Phlebotominae en zonas cafeteras con base en la literatura y los resultados del presente estudio **48**

4. RESULTADOS **49**
4.1 Identificación taxonómica y especies presentes en la zona de estudio **49**
4.1.1 Especies por ecotopo cafetero muestreado 55
4.2 Guía taxonómica: Diagnosis taxonómicas de las especies *Lutzomyia* de importancia médica encontradas en el área de estudio con base en la revisión de la información disponible y las observaciones del presente estudio **64**
4.2.1 *Lutzomyia columbiana* (Ristorcelli y Van Ty, 1941) 64
4.2.2 *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931) 66
4.2.3 *Lutzomyia hartmanni* (Fairchild & Hertig, 1957) 68
4.2.4 *Lutzomyia nuneztovari* (Fairchild & Hertig, 1957) 70
4.2.5 *Lutzomyia panamensis* (Shannon, 1926) 72
4.2.6 *Lutzomyia pia* (Fairchild & Hertig, 1961) 73
4.2.7 *Lutzomyia shannoni* (Dyar, 1929) 75
4.2.8 *Lutzomyia trapidoi* (Fairchild & Hertig, 1952) 76
4.2.9 *Lutzomyia youngi* Feliciangeli & Murillo, 1987 78
4.2.10 *Lutzomyia yuilli yuilli* (Young & Porter, 1972) 80
4.3 Identificación molecular de adultos colectados en la zona de estudio **82**
4.3.1 Alineamiento, composición y divergencia nucleotídica 86
4.3.2 Dendograma 111
4.4 Actualización sobre el conocimiento relacionado con la presencia y distribución de Phlebotominae en zonas cafeteras con base en la literatura y los resultados del presente estudio **117**

5. DISCUSIÓN **123**

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS **141**
6.1 Conclusiones **141**
6.2 Perspectivas **142**

BIBLIOGRAFÍA **145**

Lista de figuras

Figura 1-1: Hembra de *Lutzomyia longipalpis* picando a un humano. 8
Figura 1-2: Ciclo de vida de los flebotomíneos. 10
Figura 1-3: Morfología externa de flebotomíneos. 11
Figura 1-4: Modelo de la larva de cuarto estadío de *Lutzomyia flaviscutellata.* 13
Figura 1-5: Estructuras anatómicas de interés taxonómico en adultos de flebotomíneos. Cabeza....17
Figura 1-6: Estructuras anatómicas de interés taxonómico en adultos de de flebotomíneos. Tórax....18
Figura 1- 7: Estructuras anatómicas de interés taxonómico en adultos de flebotomíneos. Abdomen....19
Figura 1-8: Representación esquemática de la posición en el gen COI del código genético de barras de ADN. 23
Figura 1-9: Morfología de *Leishmania* spp....25
Figura 1-10: Representación esquemática de la transmisión de *Leishmania* spp. a hospedero vertebrado. 26
Figura 1-11: Distribución de casos de Leishmaniasis Cutánea, hasta SE 40,2012. 28
Figura 3-12: Ubicación geográfica de los sitios de muestreo. 37
Ilustración 3-13: Ecotopos cafeteros....38
Figura 3-14: Paisajes cafeteros escogidos para la colecta de flebotomíneos 39
Figura 3-15: Método de colecta para adultos de flebotomíneos. 40
Figura 3-16: Método de colecta para adultos de flebotomíneos. 41
Figura 3-17: Método de colecta para adultos de flebotomíneos. Trampa tipo shannon ...41
Figura 3-18: Hembra de *Lutzomyia longipalpis* fragmentada. 43
Figura 4-19: *Brumptomyia beaupertuyi* (Ortiz, 1954). 50
Figura 4-20: *Brumptomyia guimaraesi* (Coutinho & Barretto, 1941)....51
Figura 4-21: *Brumptomyia* sp. 51
Figura 4-22: *Lutzomyia carpenteri* (Fairchild & Hertig, 1953)....52
Figura 4-23: *Lutzomyia carrerai thula* (Young, 1979)....52
Figura 4-24: *Lutzomyia columbiana* (Ristorcelli & Van Ty, 1941)....52
Figura 4-25: *Lutzomyia dasymera* (Fairchild & Hertig, 1961) 52
Figura 4-26: *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931)....52
Figura 4-27: *Lutzomyia hartmanni* (Fairchild & Hertig, 1957)....52
Figura 4-28: *Lutzomyia nuneztovari* (Ortiz, 1954)....52
Figura 4-29: *Lutzomyia panamensis* (Shannon, 1926)....53
Figura 4-30: *Lutzomyia pia* (Fairchild & Hertig, 1961)....53
Figura 4-31: *Lutzomyia shannoni* (Dyar, 1929)....53

Figura 4- 32: *Lutzomyia scorzai* (Ortiz, 1965)..... 53
Figura 4-33: *Lutzomyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927) 53
Figura 4-34: *Lutzomyia* sp. de baduel (Floch & Abonnenc, 1945) 53
Figura 4-35: *Lutzomyia trapidoi* (Fairchild & Hertig, 1952)..... 53
Figura 4-36: *Lutzomyia triramula* (Fairchild & Hertig, 1952)..... 54
Figura 4-37: *Lutzomyia youngi* (Feliciangeli & Murillo, 1985)..... 54
Figura 4-38: *Lutzomyia walkeri* (Newstead, 1914)..... 54
Figura 4-39: *Lutzomyia yuilli yuilli* (Young & Porter, 1972) 54
Figura 4-40: *Lutzomyia* (*Helcocyrtomyia*) sp. 1 54
Figura 4-41: *Lutzomyia* (*Helcocyrtomyia*) sp. 2 54
Figura 4-42: *Warileya rotundipennis* Fairchild & Hertig, 1951..... 55
Figura 4-43: Gel de agarosa TE 0.8% con los productos amplificados de COI para los flebotomíneos colectados en zona cafetera. 82
Figura 4-44: Gráfica de entropía de la secuencia de nucleótidos dentro de la región código de barras del gen Citocromo oxidasa I. 87
Figura 4-45: Alineamiento múltiple de 711 nucleótidos del extremo 5’ del gen Citocromo oxidasa I, para 24 especies de flebotomíneos colectadas en áreas de influencia cafetera. 88
Figura 4- 46: Gráfica de distribución de frecuencias de las divergencias genética intraespecífica e interespecífica en Phlebotominae 110
Figura 4-47: Dendograma consenso Neighbor-Joining 112
Figura 4-47: (Continuación)..... 113
Figura 4-48: Dendograma consenso Neighbor-Joining 114
Figura 4-48: (Continuación)..... 115
Figura 4-48: (Continuación)..... 116

Lista de tablas

Tabla 1-1: Patrón del esculpido coriónico de los huevos 14
Tabla 3-2: Sitios de colecta flebotomíneos durante los años 2010 a 2012.....42
Tabla 4-3: Número de individuos por géneros de Phlebotominae encontrados en cada uno de los municipios incluidos en el área de estudio. 57
Tabla 4-4: Número de individuos por especie de Phlebotominae encontrados en cada uno de los municipios incluidos en el área de estudio. 58
Tabla 4-5: Número de individuos por especie de Phlebotominae colectados en los ecotopos cafeteros 1B, 2A y 2B, en áreas de influencia cafetera, Colombia....60
Tabla 4-6: Número de individuos por especie de Phlebotominae en los ecotopos cafeteros 1B, 2A y 2B, por municipio en áreas de influencia cafetera, Colombia. 62
Tabla 4-7: Especímenes utilizados para obtención y análisis de secuencias COI. 83
Tabla 4-8: Detalles de colecta y códigos de secuencias de los especímenes para los cuales se obtuvieron secuencias COI.....84
Tabla 4-9: Número de haplotipos con secuencias COI para los flebotomíneos en el presente estudio.....105
Tabla 4-10: Rango de divergencia intraespecífica bajo el modelo Kimura 2 parámetros, entre secuencias nucleotídicas parciales del gen Citocromo Oxidasa I, de flebotomíneos colectados en zona cafetera.....107
Tabla 4-11: Distancias genéticas K2P. Nótese los valores de divergencia entre los haplotipos MA66, MA67, MA68, MA69 Y MA89 para el marcador COI, comparados con los demás haplotipos de *Lutzomyia panamensis* de genbank y BOLD. 108
Tabla 4-12: Distancias genéticas K2P. Nótese los valores de divergencia entre los haplotipos MA33, MA34, MA35, MA36 Y MA97 para el marcador COI, comparados con los demás haplotipos de *Lutzomyia gomezi* de genbank y BOLD. 109
Tabla 4-13: Valores de distancia genética a nivel interespecífico según el modelo K2P, entre secuencias nucleotídicas parciales del gen Citocromo Oxidasa I, de flebotomíneos colectados en zona cafetera.....111
Tabla 4-14: Lista actualizada de especies de flebotomíneos presentes en áreas de influencia cafetera 118
Tabla 5-15: Importancia médica de las especies de *Lutzomyia* colectadas en el estudio 128
Tabla 5-16: Presencia y ausencia de de las especies de *Lutzomyia* de importancia médica colectadas en el estudio.....132

Introducción

En la introducción, el autor presenta y señala la importancia, el origen (los antecedentes La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria y es endémica en las regiones tropicales del mundo, con aproximadamente dos millones de nuevos casos humanos reportados cada año (CDC, 2008; Gramiccia y Gradoni, 2005). Al menos, 21 especies y subespecies de parásitos que pertenecen al género Leishmania Ross, 1903, son las responsables de diversas manifestaciones clínicas entre las que se destacan la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral (Alvar, 2001; Munstermann 2004; OMS, 2007).

En América, los patógenos causales de la leishmaniasis son transmitidos por la picadura de especies de insectos de la subfamilia Phlebotominae Rondani, 1840 (Diptera: Psychodidae) del género Lutzomyia França, 1924 y es mantenida en la naturaleza por al menos 100 especies de mamíferos que actúan como potenciales reservorios del parásito (Ashford, 1996; Killick-Kendrick, 1999; Alvar 2001, Vélez et al. 200; OMS, 2007).

En centro y Suramérica, la transmisión de la leishmaniasis está restringida a los hábitats selváticos donde los humanos son expuestos al parásito durante las actividades laborales (Vélez et al. 2001; Desjeux 2004; Gramiccia y Gradoni, 2005). Sin embargo, se ha informado el cambio en el patrón epidemiológico dado por la aparición de nuevos casos, el proceso creciente de domiciliación y urbanización del ciclo de transmisión. Así también, el cambio en el uso del suelo como consecuencia de la expansión de la frontera agrícola y el crecimiento demográfico, lo cual es evidente en el caso del cultivo del café, han facilitado la rápida dispersión de especies de vectores y mamíferos silvestres a hábitats no selváticos y por ende en un cambio en las dinámicas de la transmisión (focos urbanos y rurales) (Ashford, 2000;; Vélez et al. 2001; Travi et al. 2002; Agudelo et al. 2002).

En Colombia, la leishmaniasis es una enfermedad endémica y la forma clínica más frecuente es la leishmaniasis cutánea (LC) con el 95% de los casos de los cuales

muchos ocurren en zona cafetera. Durante los últimos años, se ha evidenciado un incremento en los casos de leishmaniasis cutánea, 12.232 casos para el 2009, 14.654 casos para el 2010 y para el año 2011 el número de casos registrados de leishmaniasis fue de 9.241, de los cuales 98,07% (9.063) corresponden a la forma cutánea, 1,7% (165) a la forma mucocutánea, y el 0,14% (13) a la forma visceral (Boletín notificación obligatoria, SIVIGILA. 2011). Diversos factores pueden ser atribuidos a la constante aparición de casos de LC en el país: en primer lugar, factores sociales tales como: el desplazamiento forzado, el conflicto armado, la deforestación y la expansión de la frontera agraria ejemplo caso café y ganadería, los cuales constituyen importantes factores de riesgo para la transmisión de la enfermedad (Vélez et al. 2001); en segundo lugar está el comportamiento patogénico específico de cada especie de Leishmania (Davies et al. 2000), y en tercer lugar y tomándose como principal factor de enlace de la triada epidemiológica, está el vector, que varía en especies, distribución geográfica y comportamiento, de acuerdo al ambiente que habite (Travi et al. 1996; Davies et al. 2000); este último factor, puede ser influenciado por variables ambientales como la temperatura y precipitación, logrando impactar directamente en la abundancia del vector, y así mismo en la transmisión de la enfermedad (Travi et al. 1996, Molina et al. 2008).

Tradicionalmente, los departamentos que constituyen la región Andina son donde se registran el 51.9% de los casos de leishmaniasis cutánea (4.793 casos, Boletín notificación obligatoria, SIVIGILA. 2011). En dicha región la principal actividad agrícola es el cultivo de café (Coffea arabica Linneo 1737) distribuido en el Eje Cafetero (departamentos de Caldas, Risaralda y Quindío) y los departamentos de Antioquia, Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander, Tolima, Norte de Santander y Valle del Cauca (Arango, 2008; Salazar, 2010, DANE, 2012).

El alto registro de casos de leishmaniasis cutánea en la región se relaciona con el incremento de los factores de riesgo de la transmisión. En ese sentido, los cambios en el ambiente y los factores climáticos durante los últimos años en el paisaje cafetero, como los cambios climáticos, las prácticas agronómicas para el mejoramiento del cultivo de café (agricultura biodinámica, cultivos de café orgánico) y la agroforestería (Guhl, 2004; Jaramillo y Arcila, 2009), se correlacionan fuertemente con la dinámica de la leishmaniasis (Haydon et al. 2002; Chaves y Pascual, 2006; Cárdenas et al. 2006).

La Región Andina es reconocida por tener una alta variedad de biotopos en relación a su complejidad topográfica, lo que determina una alta diversidad de especies y presencia de

endemismos (Perfecto et al, 1996; Etter y Van Wyngaarden, 2000). Ésto aplica también para los insectos flebotomíneos (Alexander et al. 1992, Alexander et al. 2001), en donde se han realizado estudios enfocados principalmente a conocer la flebotofauna existente asociada a zonas de transmisión de LC (Montoya-Lerma et al. 1990, Warburg et al. 1991; Vélez et al. 1991, Alexander et al. 1995, Alexander et al. 2001).

La zona cafetera ofrece condiciones favorables para el desarrollo y establecimiento de los flebotomíneos. En este sentido los sitios ricos en materia orgánica pueden constituir microambientes para la cría de estos insectos. Así mismo, se encuentran lugares adecuados para el reposo diurno de los adultos como la hojarasca, los troncos y las raíces de los arboles usados como sombrío. En términos de alimentación hay disponibilidad de fuentes naturales de azúcar y de ingesta sanguínea que incluyen animales silvestres, aves, ganado, animales domésticos y los residentes humanos, que viven cerca o dentro de los cultivos del café. (Alexander y Usma, 1994; Moore et al. 1987). Es sabido que los cultivos cafeteros pueden ser refugio de mamíferos silvestres, como roedores y zarigüeyas, los cuales aparecen como reservorios potenciales de Leishmania, los cuales son necesarios para que la transmisión de la enfermedad pueda presentarse en un área determinada (Alexander et al. 1998).

Teniendo en cuenta tanto el comportamiento endémico y el panorama de aumento de casos e importancia de la enfermedad, así también las condiciones favorables para el desarrollo y establecimiento de los flebotomíneos que ofrece la zona cafetera del país y y ante los escasos y ocasionales estudios que completen y actualizen el conocimiento sobre el vector, se hace necesaria la realización de estudios básicos de presencia de los insectos vectores, ya que éste, constituye el principal factor de riesgo para la transmisión (Travi et al. 1996; Davies et al. 2000), asi también, se hace necesario enfatizar en la taxonomía e importancia médica de las especies presentes. En este sentido, el validar una técnica de diagnóstico molecular para distinguir las especies de flebotomíneos, como apoyo a la taxonomía, será especialmente útil en los casos en los cuales la morfología presenta limitaciones (Rangel, 1996; Dujardin., 1999; Uribe, 1999). La actualización del listado de especiesde flebotomíneos puede ser, a futuro, información contrastable con la dinámica de la transmisión y su aporte fundamental será sumar información a los escasos y aislado estudios realizados en la región, también será información el área de taxonomía y para confrontar con estudios epidemiológicos.

1. Marco Teórico

1.1 Generalidades sobre los flebotomíneos

1.1.1 Taxonomía y Distribución

Los flebotomíneos (del griego *phlebos*, vena y *tomos*, cortar) son pequeños insectos categorizados taxonómicamente dentro del orden Diptera, suborden Nematocera, familia Psychodidae Newman, 1834, subfamilia Phlebotominae Rondani, 1856.

La clasificación de Phlebotominae es controversial, ésto se debe principalmente al hecho que para la mayoría de las especies que integran la subfamilia solamente se conoce uno de los sexos y se desconocen las formas inmaduras (larvas y pupas). Diferentes esquemas de clasificación han sido documentados con respecto a la subfamilia Phlebotominae, entre éstos se destaca el reconocimiento de dos tribus Phlebotomini (Quate, 1999; Quate y Brown, 2004) y Hertigiini (Galati, 2003). Otras propuestas aceptadas son las realizadas por Barretto (1961) y Duckhouse (1973), en sus estudios sistemáticos de las subfamilias y géneros americanos. En relación a los esquemas de clasificación a nivel de género estos han sido propuestos por distintos autores: Theodor (1948, 1965), Barretto (1955, 1962), Forattini (1973), Young y Fairchild (1974), Lewis *et al.* (1977), Martins *et al.* (1978), Ready *et al.* (1980), Abonnenc y Léger (1986), Artemiev (1991), Young y Duncan (1994) y Galati (1995). La hetereogeneidad también se mantiene a nivel de subgéneros y grupos de especies. A pesar que recientemente, Galati (1995) y Rispail y Léger (1998) realizaron una aproximación a la clasificación basadas en conceptos evolutivos a través de la comparación y análisis del mayor número de caracteres por métodos numéricos, la propuesta de Lewis *et al.*(1997) sigue siendo la más aceptada, en ésta considera la existencia de cinco géneros en la subfamilia Phlebotominae: *Phlebotomus* Rondani y Berté 1840, *Sergentomyia* Rondani y Berté 1920, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* França y Parrot 1921, *Warileya* Hertig 1948.

Posteriormente, Leng (1987) incluye el género monoespecífico *Chinius* y actualmente Galati (2003) considera al género *Hertigia* Fairchild 1949 dentro de la subfamilia Phlebotominae.

En general, se consideran 7 géneros descritos dentro de la subfamilia Phlebotominae y cerca de 900 especies, las cuales tiene una amplia distribución mundial en áreas tropicales y subtropicales, desde bajas altitudes a nivel del mar, hasta los 3.200 msnm aproximadamente (Young y Duncan, 1994; Montoya-Lerma y Ferro, 1999)

En América ocurren los géneros *Brumptomyia, Warileya, Hertigia* y *Lutzomyia* (Young y Duncan 1994; Bejarano 2006; Galati 2003; Galati 2010). El género *Brumptomyia* lo conforman 26 especies asociadas con ecosistemas conservados (Berrett *et al.* 1996; Bejarano, 2006) y se distribuyen desde el sur de México hasta el norte de Argentina (Young y Duncan, 1994; Ibáñez, 1999; Ibáñez *et al.* 2006). El género *Warileya* agrupa ocho especies distribuidas desde Costa Rica hasta Bolivia (Young y Duncan 1994; Galati 2010) y el género *Hertigia* es considerado monotípico registrado solo para Costa Rica y Panamá (Lewis *et al.* 1977; Galati, 2003, 2010). Las especies de estos tres géneros no son hematófagas y no presentan implicación alguna en la trasmisión de agentes patógenos que afecten al humano (Young y Duncan, 1994; Mustermann. 2004). Por el contrario, en el género *Lutzomyia* se ubican todas las especies de interés en salud pública.

Las revisiones realizadas por Martins, Williams y Falcâo (1979) y Young y Duncan (1994), así como la documentación electrónica producida por el grupo CIPA (Computer-aided Identification of Phlebotomine sandlies of America) (http://cipa.snv.jussieu.fr/) constituyen documentos imprescindibles en el estudio de la sistemática, taxonomía y distribución geográfica de este grupo de insectos en América.

1.1.2 Biología y Ecología

Los flebotomíneos son insectos con metamorfosis completa (holometábolos) (Young y Duncan, 1994; Killick-Kendrick 1999; Munstermann, 2004). Los huevos son depositados en lugares ricos en materia orgánica donde los estadios larvarios crecen y se alimentan (Young y Duncan, 1994; Munstermann, 2005). Los adultos de ambos sexos se alimentan

de los azúcares producidos por las plantas, áfidos y/o coccidios (Lucientes *et al.* 2005). Las hembras también son hematófagas, condición necesaria para la maduración de los huevos (Zhioua y Chelbi, 2005) (Figura 1-1). Las fuentes sanguíneas están representadas por hospederos vertebrados endotérmicos (ganado, perros, roedores y hombre) y los vertebrados exotérmicos, como los reptiles y anfibios (Depaquit y Léger, 2007).

En cuanto a la forma de alimentación, los flebotomíneos son considerados telmófagos, es decir que la hembra para alimentarse debe cortar con su aparato bucal la piel y producir la ruptura de los vasos sanguíneos y luego de la formación de una acumulación de sangre, la hembra se alimenta (Lucientes *et al.* 2005; Munstermann, 2004; Depaquit y Léger, 2007). Algunas especies de flebotomíneos son autógenas por ejemplo, *Lu. lichyi* (Floch y Abonnenc, 1950), cuyas hembras no requieren de la ingesta de sangre para producir un pequeño número de huevos por lo menos durante el ciclo de la primera oviposición (Zhioua y Chelbi, 2005). Sin embargo, la liberación de esperma de espermatóforo y el movimiento hacia la espermateca por lo general ocurre sólo en las hembras que se alimentan de sangre, permitiendo precisar un criterio de paridad o nulíparidad en las hembras (AFPMB 2001; Ilango 2005). Es esta necesidad de alimentarse, la que conduce a desempeñar el papel como vector demostrado, natural y experimentalmente, de diversos agentes patógenos para los seres humanos (Killick-Kendrick, 1999; Munstermann, 2004).

Los flebotomíneos se caracterizan por tener un vuelo corto y silencioso, y se conocen como voladores débiles (Killick-Kendrick, 1999; Munstermann, 2004). A pesar de esto, se ha indicado que pueden volar hasta 280 m y para algunas especies se ha reportado llegar hasta 2 km (Killick-Kendrick *et al.* 1984). En zonas boscosas en América, la dispersión es más limitada y comprende un rango entre 50 m y 200 m (Chaniotis *et al.*1982; Cáceres 1993).

Las especies al interior de Phlebotominae presentan fototropismo positivo, tienen actividad crepuscular y nocturna (Desde las 16:00 hasta las 07:00 horas del día siguiente), momento en que la temperatura disminuye y aumenta la humedad, aunque también están activas durante el día (Alexander, 2000; Casanova, 2001). En áreas tropicales los flebotomíneos exhiben características temporales y patrones biotópicos

definidos, aumentando sus poblaciones, por ejemplo, inmediatamente después de la época de lluvia (King *et al.* 2004; Davies *et al.* 2000).

Figura 1-1: Hembra de *Lutzomyia longipalpis* picando a un humano.

Fuente: Tomado de http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/ /2009-05-20_JS8Q8663-Lu_longipalpis.jpg

1.1.3 Ciclo de vida

El desarrollo de los flebotomíneos ocurre a lo largo de varios estados de desarrollo: huevo, larva (4 instares larvales), pupa y adulto (Young y Duncan, 1994) (Figura 1-2).

Las crías en colonias de flebotomíneos bajo condiciones de laboratorio han permitido evidenciar la duración y características del ciclo biológico, principalmente de las especies que se han relacionado con la transmisión de la leishmanisis e incluyen especies de registro en zona cafetera, principalmente del grupo *verrucarum* (Morales *et al.* 1984; Ferro *et al.* 1998; Montoya *et al* 1998; Neira *et al.* 1998; Cabrera *et al.* 1999; Cabrera *et al.* 2000; Escovar *et al.* 2004, Morales *et al.* 2005).

El desarrollo óptimo de los flebotomíneos ocurre en un rango de temperaturas entre 17ºC y 31ºC. Temperaturas superiores a 40ºC pueden causar daño a los huevos y las larvas, mientras que temperaturas inferiores a -10ºC puede causar retraso del desarrollo. La exigencia de humedad es muy alta, sin embargo, los suelos permanentemente húmedos no son buenos criaderos (Lucientes *et al.* 2005).

Después de la ingesta sanguínea comienza el desarrollo de los huevos, proceso que tarda entre 6 y 9 días. Aproximadamente 30-70 huevos son depositados por postura. Durante la oviposición, las glándulas accesorias de la hembra segregan una sustancia pegajosa para anclar los huevos depositados de forma aislada o en masa sobre sustratos ricos en materia orgánica, que por lo general presentan alta humedad relativa (Alexander, 1994; Feliciangeli, 2004; Mascari, 2008).

Los huevos son fusiformes, de aspecto elíptico, coloración que varía de castaño claro a oscuro (Figura 1-2), longitud entre 300 a 500 µm, y protuberancias o crestas sobre el esculpido coriónico, el cual es útil para la diferenciación intra e interespecífica (Feliciangeli *et al.* 1993; Young y Duncan, 1994; Sierra *et al.* 2000; Oviedo y Feliciangeli, 2007). La ornamentación del corion también conocido como surcos, probablemente funciona como plastrón, es decir, la superficie por donde ocurre el intercambio de gases (Montoya y Ferro, 1999).

Posterior al tiempo de incubación de los huevos (4-20 días) ocurre la eclosión el primer estadío larval (Figura 1-2). El tiempo de maduración de los estadios larvales comprende un período de 18-31 días.

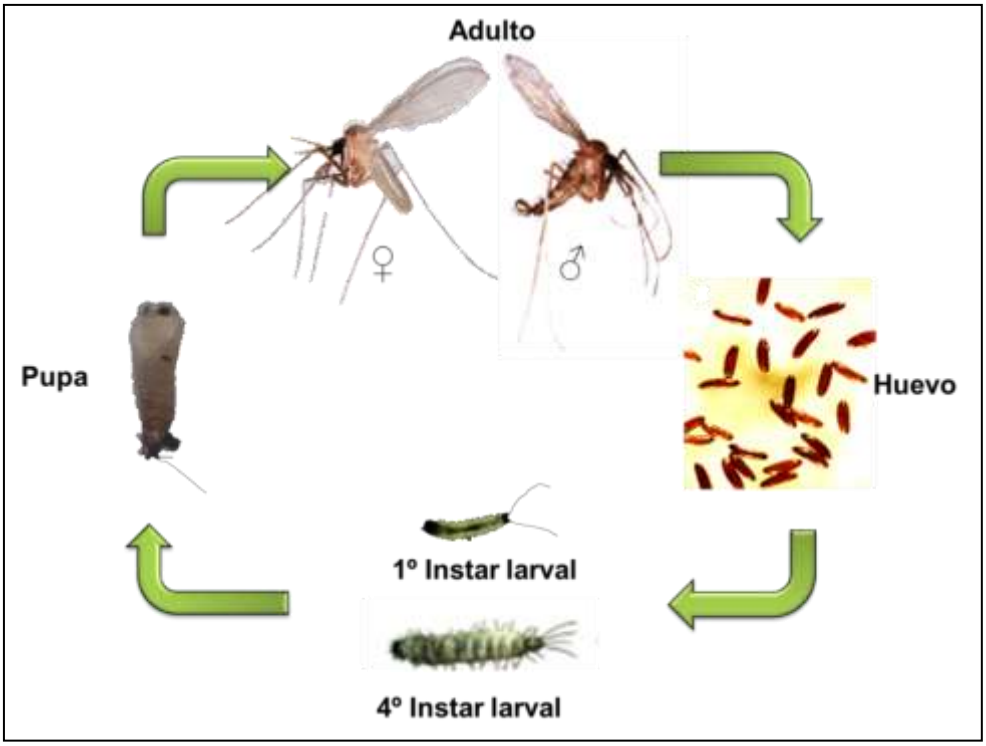
Las larvas son vermiformes, con cuerpo alargado cubierto con protuberancias y ventralmente aplanado, formado por 12 segmentos: tres torácicos y 9 abdominales (Alexander, 1994; Montoya y Ferro, 1999).y poseen un aparato bucal masticador para la alimentación de materia orgánica. El cuerpo de las larvas está divido en 12 segmentos (tres torácicos y 9 abdominales). La larva de primer estadío es de color blancuzco, de tamaño pequeño, con una cápsula cefálica esclerotizada diferenciada del resto del cuerpo, y tiene un par de setas caudales delicadas (Figura 1-4) (Ward 1985; Alexander, 1994; Young y Duncan, 1994; Nieves y Ribeiro, 1997; Montoya y Ferro, 1999). Las larvas de segundo, tercero y cuarto instar presentan dos pares de setas caudales en el género *Lutzomyia* (Figura 1-2). En los géneros *Brumptomyia* y *Phlebotomus*, las larvas

presentan un solo par de setas en los diferentes instares larvales (Alexander, 1994; Young y Duncan, 1994). La larva del cuarto estadío se diferencia por tener un esclerito oscuro, en el dorso del octavo segmento abdominal (Figura 1-2) (Alexander, 1994; Montoya y Ferro, 1999).

El último estadío larval tiene el tórax abultado y deja de alimentarse para refugiarse en un lugar apropiado donde se convierte en pupa (Figura 1-2). La pupa se diferencia por presentar color dorado o pardo, tamaño de 2-4 mm, algo alargada, vermiforme, casi descubierta de cerdas y está anclada al sustrato por medio del último segmento abdominal del cuarto estadío larval, que le permite conservar una posición erecta (Young y Duncan 1994).

El desarrollo de la pupa tarda entre 10 a 20 días, en condiciones óptimas, y cuando está lista para la emergencia, el adulto completamente formado en el interior de la pupa, rompe la envoltura mediante movimientos constantes en la parte inferior, abandonando así la exuvia (Young y Duncan, 1994; Montoya y Ferro, 1999).

Figura 1-2: Ciclo de vida de los flebotomíneos.

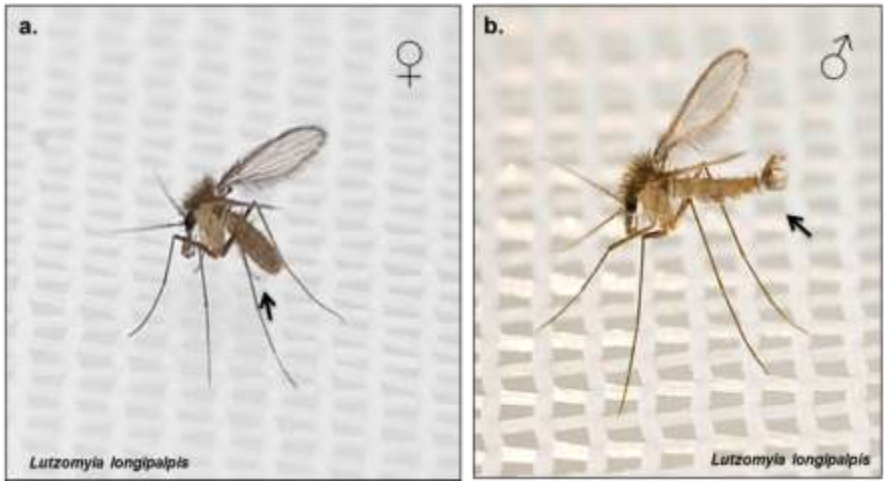


Fuente: Fátima Amaro, Michelle Maroli, María Contreras, 2011

El adulto flebotomíneo es pequeño (2 a 3mm de longitud) y el color puede variar de amarillo o gris plateado pálido a casi negro (Figura 1-3). Generalmente en un mismo lote de huevos, los machos adultos emergen antes que las hembras, y alcanzan la madurez sexual después de 24 horas, una vez rotan su genitalia (180º), momento en el cual están aptos para copular (Alexander, 1994; Ferro *et al.* 1997). Los adultos se caracterizan por tres pares de patas largas, alas lanceoladas, tórax giboso, cuerpo revestido de cerdas largas y finas que le confieren aspecto hirsuto (Figura 1-3) (Young y Duncan, 1994; Montoya y Ferro, 1999; Ibáñez, 1999; Galati, 2003). La cabeza es pequeña, presenta ojos compuestos (ocelos ausentes), y antenas largas, con 16 segmentos, iguales en machos y hembras (Young y Duncan, 1994). La cabeza forma un ángulo casi recto con el tórax. El abdomen posee diez segmentos, los tres últimos modificados que constituyen la genitalia. En la hembra los últimos segmentos abdominales constituyen dos lóbulos laterales y dos cercos, que se aprecian como estructuras redondeadas (Figura 1-3), mientras que en el macho existe una armadura genital conformada por apéndices pareados, de gran utilidad durante la copula (Young y Duncan, 1994; Galati, 2003) (Figura 1-3).

El estado adulto de los flebotomíneos es el más conocido debido a la dificultad de encontrar en la naturaleza los criaderos naturales y estados inmaduros.

Figura 1-3: Morfología externa de flebotomíneos.



Dimorfismo sexual de a. hembra de *Lutzomyia longipalpis* y b. macho de *Lu. longipalpis*.
Fuente: Fotografía PECET

1.2 Estructuras morfológicas relevantes en la identificación de estados inmaduros y adultos

1.2.1 Estados inmaduros

En la determinación taxonómica de inmaduros de flebotomíneos, existe un desconocimiento casi absoluto generado por la dificultad de hallar los criaderos naturales (Feliciangeli, 2004). Grassi y Bhatthacharya (1907), hicieron el primer registro de los inmaduros de *Phlebotomus papatasi.* Posteriormente, Belcour (1928), Hanson (1968) y Forattini (1973) han realizado diferentes aportes al estudio de las fases inmaduras de flebotomíneos. En lo que respecta a la caracterización de estados inmaduros de flebotomíneos a partir de especímenes de colonia, en América, existen algunas descripciones de huevos a partir de la ultraestructura del corión que fueron útiles para diferenciar especies del género *Lutzomyia*. Estos patrones se agrupan en ocho categorías morfológicas denominadas: poligonal (pentagonal rectangular hexagonales), columna paralela conectada columna paralela no conectada, volcánico, reticular, verrucosa, dispersa y elíptica (Endris *et al.* 1987; Feliciangeli *et al.* 1993; Pérez y Ogusuku, 1997; Bejarano *et al.* 2003, Sierra *et al.* 2000) (Tabla 1-1).

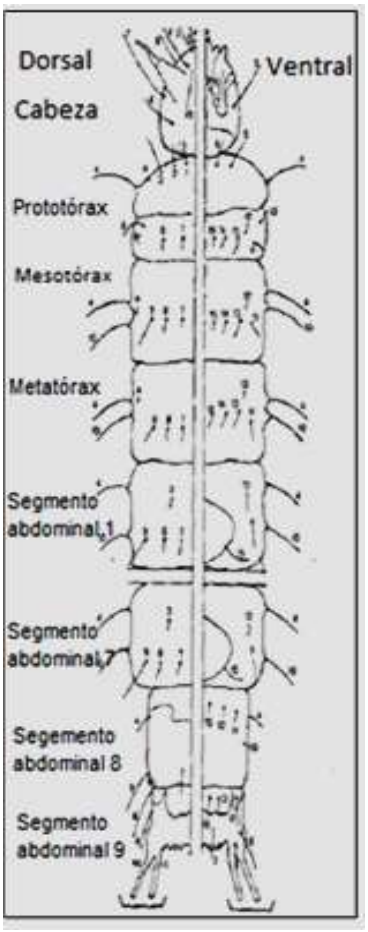
En larva, los pocos estudios sugieren el uso de los patrones morfológicos de quetotaxia, nomenclatura y numeración de las setas de la larva de cuarto instar, lo cual en la actualidad es difícil debido que no existe una uniformidad nomenclatorial y mucho menos claves dicotómicas que permitan la identificación taxonómica. Ward (1976), estudió y propuso un sistema considerando la quetotaxia larval para en el grupo Intermedia de *Lutzomyia* (subgénero *Nyssomyia* sensu) (Young y Duncan, 1994) (Figura 1-4), el cual ha sido poco usado.

Arrivillaga *et al.* (1999) propone un sistema de nomenclatura y numeración de setas ubicadas en subregiones cefálicas (labro-epifaringe, mandíbula, maxila, postmento y lígula) del cuarto estadio larval en especies de *Lutzomyia*.

Fausto *et al.* (2001), informaron la presencia de dos pares de espiráculos ubicados en tórax y abdomen y un número de papilas en los espiráculos de seis hasta ocho y de 10 a 14 a nivel abdominal en larvas de cuarto estadio.

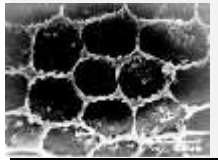
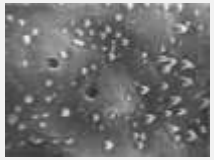
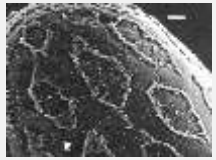
A pesar de estas descripciones, no se dispone hasta la fecha de claves taxonómicas para la identificación de estados inmaduros, lo que en parte debe atribuirse a la dificultad que existe para encontrarlos en la naturaleza.

Figura 1-4: Modelo de la larva de cuarto estadío de *Lutzomyia flaviscutellata*.



Fuente: Ward 1976.

Tabla 1-1: Patrón del esculpido coriónico de los huevos

Poligonal	Columna paralela conectada	Columna paralela no conectada	Volcánico	Reticular	Verrucosa	Dispersa	Elíptica
							
Lu. antunesi	*Lu. anthophora*	*Lu. alphabetica*	*Lu. complexa*	*Lu. pereuensis*	*Lu. noguchii*	*Lu. tejadei*	*Lu. venezuelensis*
Lu. bahiensis	*Lu. arthuri*	*Lu. diabolica*	*Lu. davisi* *	*Lu. verrucarum*			
Lu. caballeroi	*Lu. cruciata*	*Lu. cruzi*	*Lu. flaviscutellata*	*Lu. longiflocosa**			
*Lu. columbiana**	*Lu. intermedia*	*Lu. intermedia*	*Lu. lainsoni*				
Lu. dendrophyla	*Lu. migonei*	*Lu. lanei*	*Lu. parensis*				
*Lu. evansi**	*Lu. pestanai*	*Lu. longipalpis**					
Lu. evandroi		*Lu. neivai*					
Lu. fischeri		*Lu. whitmani*					
*Lu. gomezi**							
Lu. guimaraisi							
Lu. lenti							
Lu. limai							
Lu. monticula							
*Lu. ovallesi**							
Lu. pessoai							
Lu. renei							
Lu. sanguinaria							
*Lu. shannoni**							
*Lu. trapidoi**							
Lu. ylephiletor							
*Lu. youngi**							

*Especies presentes en zona cafetera. Adaptado de, Endris *et al.* 1987; Feliciangeli *et al.* 1993; Pérez y Ogusuku, 1997; Sierra *et al.* 2000, Bejarano *et al.* 2003.

1.2.2 Estado adulto

El estado adulto en flebotomíneos ha sido muy bien descrito en su estructura externa y en su anatomía interna (Young y Duncan, 1994; Munstermann, 2004; Galati, 2010).

La base de la identificación taxonómica en flebotomíneos está en los caracteres del estado adulto, asociados a la cabeza (Figura 1-5) (palpómeros, flagelómeros, ascoides y cibario), tórax (Figura 1-6) (longitud de venas alares, posición de venas alares, longitud y espinas de fémur, quetotaxia y setas en pleuritos) y abdomen (Figura 1-7) (genitalia masculina y femenina) (Theodor, 1965; Young y Duncan, 1994; Galati, 2010).

La determinación taxonómica de especies de flebotomíneos es una labor indispensable tanto para estudios biológicos y bionómicos, así como de control vectorial de la leishmaniasis (Alvar, 2001). Sin embargo, en la actualidad persisten las controversias con respecto a la existencia de dos esquemas de clasificación taxonómica (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010).

1.2.2.1. Cabeza

Presenta ojos compuestos generalmente, con una distancia inter-ocular característica en algunas especies, además están separados por una sutura interocular (sio) que puede ser incompleta (*Lutzomyia*) o completa (*Brumptomyia* y *Warileya*) (Figura 1-6a). En la parte posterior de la cabeza se observa la faringe (fa) que en la parte superior pueden estar presentes estrías (es) o espinas, denominándose faringe armada o desarmada. La faringe se conecta al cibario por el puente posterior (pup) y la protuberancia posterior (pp). El cibario (cc) presenta dientes horizontales (dhpost) y verticales (dvant) cuyo número, disposición y forma son característicos y diagnósticos de cada especie; otros carácteres importantes en el cibario son la presencia de áreas pigmentadas (ap) y un arco cibarial (arco) que puede estar completo, incompleto o ausente (Figura 1-8b) (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010).

El palpo maxilar se encuentra dividido por cinco segmentos, estando parcialmente fusionados el primero y segundo; la longitud y relación métrica entre palpos está relacionada con la separación de grupos y subgéneros (fórmulas pálpales pueden ayudar a identificar especies) (Figura 1-5a y c), para la determinación de géneros o subgéneros es importante la presencia y disposición de la cicatriz cerda caduca (cic) y las escama de

Newstead (eN). Las antenas están compuestas por el escapo (es), el pedicelo (pd) y 14 flagelómeros (AIII - AIX), revistiendo especial interés los ascoides del flagelómero II (asext, asint) en cuanto a longitud y disposición (Figura 1-5a y d), también la presencia de cerda caduca (cc) y cerdas simples (cs). La probóscide está compuesta por labro-epifaringe, hipofaringe y labio, en la parte distal de esta última, aparecen las labelas y suturas longitudinales mediales que originan la división labial que en algunos grupos de especies pueden o no unirse (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010).

1.2.2.2. Tórax

Está conformado por pronoto, mesonoto y metanoto, al igual que en otras familias del orden Diptera, estos segmentos pueden dividirse en pleuritos por el paso de una sutura longitudinal en episterno, epimero y mesotórax, para la determinación de especies son útiles la presencia y número de cerdas presentes en esta estructura (Figura 1-6a) En cuanto a las alas ubicadas en el tórax, de especial interés en la determinación de especie es la venación y en particular la disposición de las venas radiales (M1, M2, M3, M4, R1, R2, R3, R4, R5, y rb) y la longitud de segmentos (α, β, γ, δ y π) (Figura 1-6b) (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010).

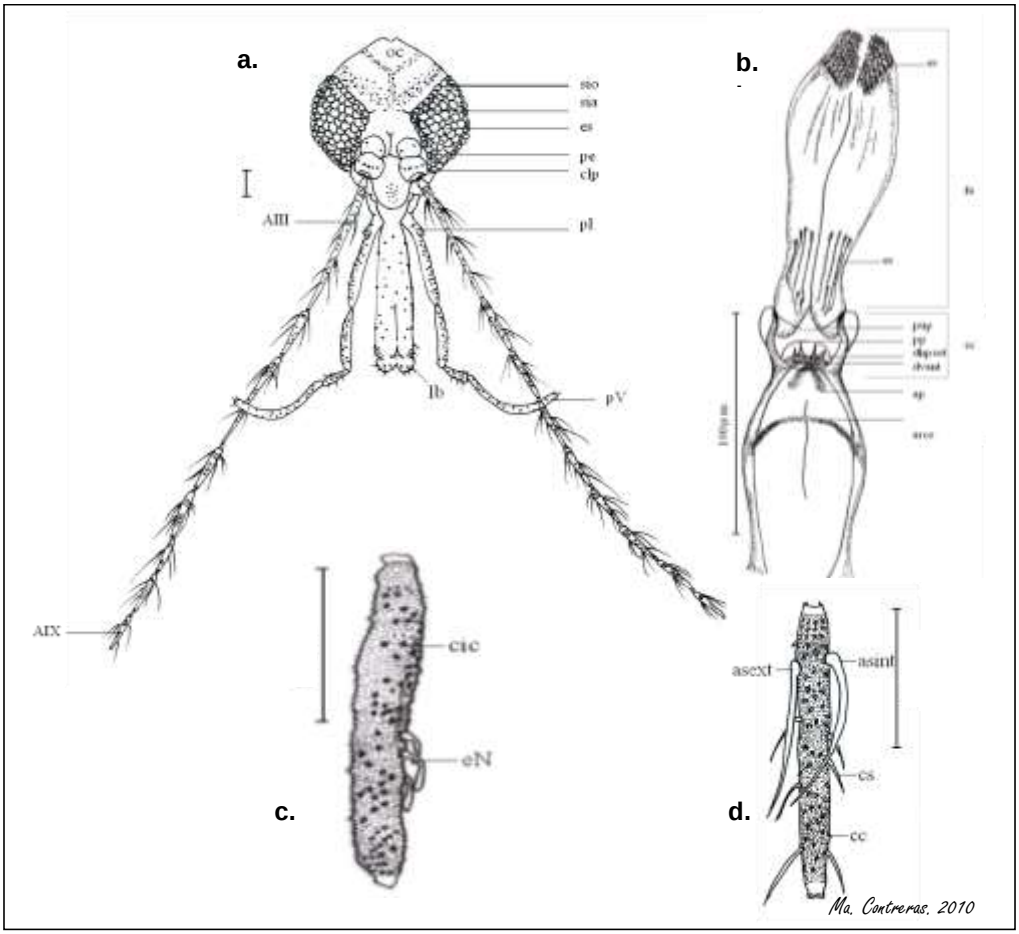
1.2.2.3. Abdomen

Se encuentra constituido por diez segmentos, los tres últimos modificados para constituir la genitalia. En la genitalia masculina está compuesta externamente por: gonocoxito (que varía en cuanto a forma y presencia de tufos de setas); gonoestilo que soporta un número variable de espinas accesorias (esp. ext. Inf; esp. ext. sup.; espinas apicales, espina interna). Los parámeros, pueden tener un patrón de inserción de setas, presentar tubérculos o espinas; otras estructuras que proporcionan carácteres taxonómicos son los lóbulos laterales y los cercos que varían en cuanto a longitud y forma (Figura 1-10a). La genitalia masculina en su anatomía interna, presenta una bomba eyaculadora y unos filamentos genitales de forma y tamaño variable (Figura 1-7a) (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010).

La genitalia femenina, está conformada por un par de espermatecas, presentando estructuras forma de saco (ce) que se conectan por medio de ductos individuales (di) a

un ducto común (dc) y adyacente se encuentra una estructura fuertemente esclerotizada conocida como furca genital (ta). La morfología y longitud de las espermatecas son de importancia taxonómica a nivel de especie y algunas características permiten las agrupaciones en subgéneros y grupos. La longitud, segmentación y relación de los ductos individuales con respecto al ducto común son de relevancia en la separación taxonómica (Figura 1-7b) (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010).

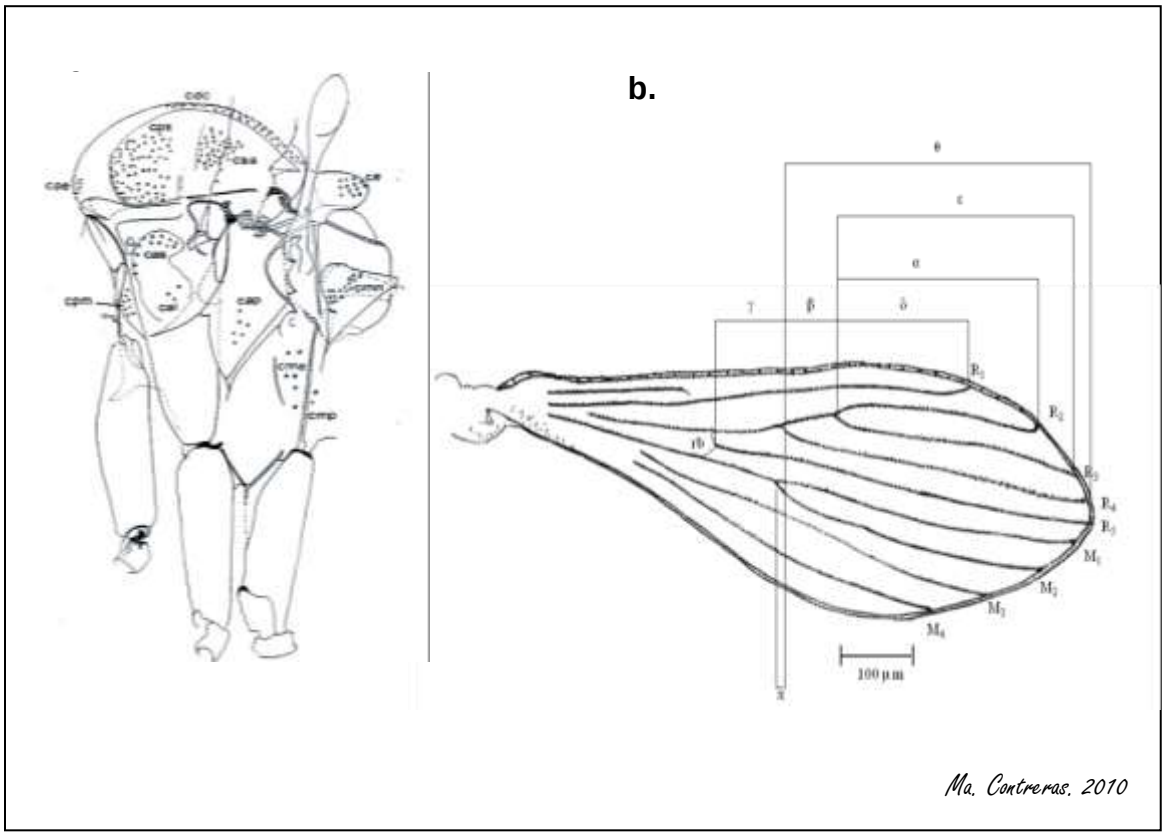
Figura 1-5: Estructuras anatómicas de interés taxonómico en adultos de flebotomíneos. Cabeza



a. Cabeza de hembra de *Lu. erwindonaldoi* en vista dorsal: AIII – segmento 3° de la antena o flagelómero 1; clp – clipeo; es – escapo; lb – labela; oc – occipcio; pe – pedicelo; pl – palpómero; sia – sutura interantenal; sio – sutura interocular. Bar = 100 µm, aumento 4X. **b.** Faringe y cibario de hembra de *Lutzomyia erwindonaldoi* en vista dorsal: ap – área pigmentada; arco – arco cibarial; dhpost – dientes horizontales posteriores; dvant – dientes verticales anteriores; es – estrias; fa – faringe; pp – protuberancia posterior; pup – puente posterior. Bar = 100 µm, aumento 20X. **c.** Palpo maxilar III en vista dorsal: cic – cicatriz cerda caduca; eN – escama de Newstead. Bar = 100 µm,

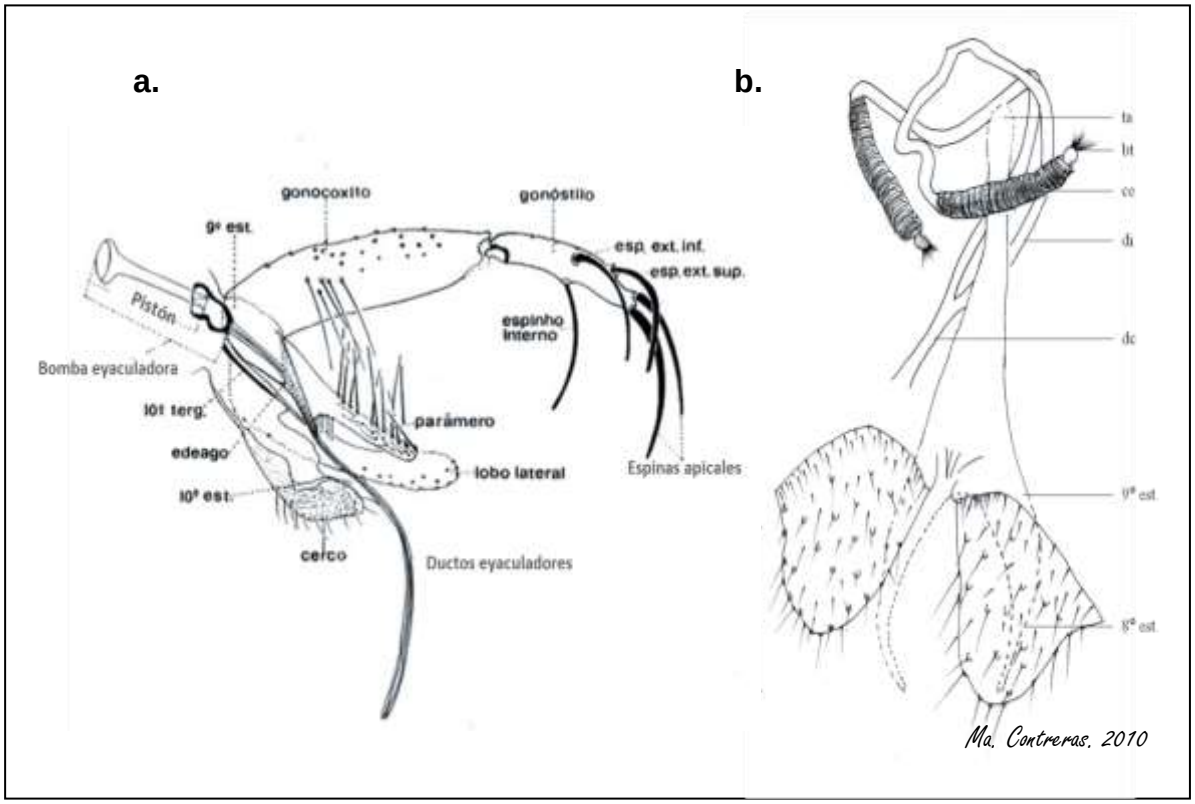
aumento 20X. **d.** Segmento 3° de la antena ó flagelómero 1° en vista dorsal: asint – ascoide interno; asext – ascoide externo; cc – cerda caduca; cs – cerda simple. Bar = 100 µm., aumento 20X. Ilustración: María Angélica Contreras, 2010.

Figura 1-6: Estructuras anatómicas de interés taxonómico en adultos de flebotomíneos. Tórax.



a. Quetotaxia del tórax de Phlebotominae en vista lateral: cai – cerdas anepisternales inferiores; cap – cerda anepimerales; cas - cerdas anepisternales superiores;cdc – cerdad dorsocentrales; ce – cerdas escutelares; cme – cerdas metapisternales, cmn, cerdas matanotales; cmp – cerdas metaepimerales; cpr – cerdas pre-escutelares; cpm – cerdas proepimerales-, cps – cerdas pre-suturales; csa – cerdas supraalares. Tomado de Galati 2010. **b.** Ala y venación en vista dorsal: c – vena costal; M1 – vena medial 1; M2 – vena medial 2; M3 – vena medial 3; M4 – vena medial 4; R1 – vena radial 1; R2 – vena radial 2; R3 – vena radial 3; R4 – vena radial 4; R5 – vena radial 5; rb - celda radial-basal; α – medida del ala alfa, longitud de la venas R2; β – medida del ala beta, longitud de la vena R2+3; γ – medida del ala gama, longitud de la vena R2+3+4;δ - medida del ala delta longitud de la distancia entre el punto de bifurcación de R2R3 y el extremo de R1; π – medida del ala pi, longitud de la distancia entre los puntos de bifurcación de R2+3R R4 y el M 1M2. Bar = 100 µm, aumento 4X. Ilustración: María Angélica Contreras, 2010.

Figura 1- 7: Estructuras anatómicas de interés taxonómico en adultos de flebotomíneos. Abdomen



a. Genitalia masculina de Phlebotominae en vista lateral: 9° est. – noveno esternito abdominal; 10° est. – decimo esternito abdominal; 10° terg – decimo tergito abdominal; esp. ext. inf – espina externo inferior; esp. ext. sup– espina externo superior. Fuente: Tomado de Galati 2010. **b.** Espermatecas de la hembra de Phlebotominae. en vista ventral: bt – botón terminal; ce – cuerpo de la espermateca; dc – ducto común; di – ducto individual; ta – tallo de la furca; 9° est. – noveno esternito abdominal o furca; 8° est. – octavo esternito abdominal. Bar = 100 µm, aumento 40x. Ilustración: María Angélica Contreras, 2010.

1.3 Identificación molecular

En la determinación taxonómica de las especies flebotomíneas se recurre generalmente al uso de caracteres morfológicos del adulto (Young y Duncan, 1994, Galati, 2010), sin embargo, ésta no es suficiente para diferenciar la totalidad de especies en este grupo de insectos. Así mismo, la taxonomía de los flebotomíneos presenta algunas limitaciones, en el caso del género *Lutzomyia,* la existencia de especies hermanas o complejos de especies, como las especies dentro del grupo *verrucarum* y el subgénero *Helcocyrtomyia*, dificulta grandemente la identificación morfológica, por su difícil

identificación con sólo aplicar el criterio de la morfología externa comparada(Rangel, 1996; Dujardin *et al.*1999; Uribe, 1999), sumado a que requiere una considerable inversión de tiempo y el trabajo de personal especializado y que en algunos casos la bibliografía puede ofrecer descripciones insuficientes para algunos grupos de especies (Dedet *et al.* 2003)

Ante estas limitaciones, una aproximación molecular es de gran utilidad (Beati *et al.* 2004) en el caso de los insectos y en particular de aquellos de importancia médica, como los flebotomíneos, objeto del presente estudio, se considera ventajoso el hecho que las moléculas apoyan la identificación de especímenes en cualquiera de sus estados, e incluso de partes de ellos (Lanteri *et al.* 2002).

Muchas son las razones del por qué el uso de datos moleculares, en particular las secuencias de ADN. En primer lugar, las secuencias de ADN son caracteres heredados, con respecto a ciertos caracteres morfológicos que pueden ser influencia de factores ambientales. En segundo lugar, la descripción de los caracteres moleculares y los estados de caracteres (triple codón) no son subjetivos. Las descripciones morfológicas presentan frecuentes expresiones ambiguas como "reducido" o "ligeramente alargado". Algunos datos moleculares se pueden utilizar para reconstruir las relaciones evolutivas lo cual es deseable.

Actualmente, los marcadores moleculares y en particular las secuencias de ADN, son ampliamente utilizados en la entomología médica (Berlocher, 1984; Caterino *et al.* 2000; Lanteri *et al.* 2002). Los principales avances involucran aspectos de taxonomía molecular y filogenia y precisión en aspectos como diversidad genética y flujo de genes y recientemente la taxonomía integrativa (Caterino *et al.* 2000; Lanteri *et al.* 2002; Padial *et al.* 2009). Adicionalmente, mediante el uso de marcadores moleculares es posible identificar haplotipos y postular la historia natural de las especies, aspectos de gran importancia en entomología médica. Con base en datos moleculares también es posible diferenciar especies simpátricas, alopátricas y parapátricas, así mismo, obtener estimativos relevantes para entender la dinámica y la estructura de las poblaciones naturales o estudiar aspectos como la resistencia a insecticidas y la relación parásito vector (Berlocher, 1984; Caterino *et al.* 2000; Lanteri *et al.* 2002; Besansky, 2003).

Entre los marcadores moleculares, las secuencias de genes mitocondriales son ampliamente utilizadas en la actualidad, para realizar estudios de taxonomía y de filogenia de poblaciones o especies próximas (Avise, 2000; Galtier *et al.* 2009), pues su tasa de mutación es elevada con respecto a la de otros genes (nucleares) y por lo tanto adecuada a los niveles específico e intraespecífico (Avise, 2000; Galtier *et al.* 2009)

Los genes mitocondriales Citocromo B, NAD deshidrogenasa 1 y 4, ARN de transferencia para serina y subunidad pequeña ribosomal han sido evaluados como marcadores moleculares para estudiar las relaciones filogenéticas y la taxonomía de especies de flebotomíneos (Beati *et al.* 2004; Vivero *et al.* 2007; Vivero *et al.* 2009), también han sido de gran utilidad cuando se sospecha la existencia de complejos de especies (Uribe *et al.* 2001; Arrivillaga *et al.* 2002).

Actualmente, el fragmento 5´ del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) ha sido propuesto como Código de barras del ADN por Hebert *et al.* (2003), propuesta que hace parte de la iniciativa internacional llamada consorcio para el código de barras de la vida (CBOL: Consortium for the Barcode of Life; http://www.barcoding.si.edu/) como un método universal para facilitar la identificación de especies, agrupando individuos desconocidos con entidades taxonómicas definidas *a priori* (caracteres morfológicos), basadas en la similitud de secuencias (Hebert *et al.* 2003; CBOL, 2005). Ésta aparece como una excelente herramienta en el caso de insectos de importancia médica, donde se requiere saber de forma rápida y acertada cuales son las especies presentes en un área de transmisión (Besansky *et al.* 2003; Azpurua *et al.* 2010; Cohnstaedt *et al.* 2011; Jinbo, 2011).

El uso del fragmento 5`del gen COI ha permitido evaluar el grado de variación interespecífica (*i.e.*, entre especies cercanamente relacionadas) y la intraespecífica (*i.e.*, dentro de la misma especie). De lo anterior, se genera el concepto de -*barcoding gap*-, que es la diferencia que existe entre la variación interespecífica e intraespecífica. Cuanto mayor sea la diferencia entre éstas la discriminación específica será más acertada (Meyer y Paulay, 2005), permitiendo una correspondencia entre la identificación molecular y la identificación basada en caracteres morfológicos de las especies (Hebert *et al.* 2003; Hebert *et al.* 2005; Ward *et al.* 2005).

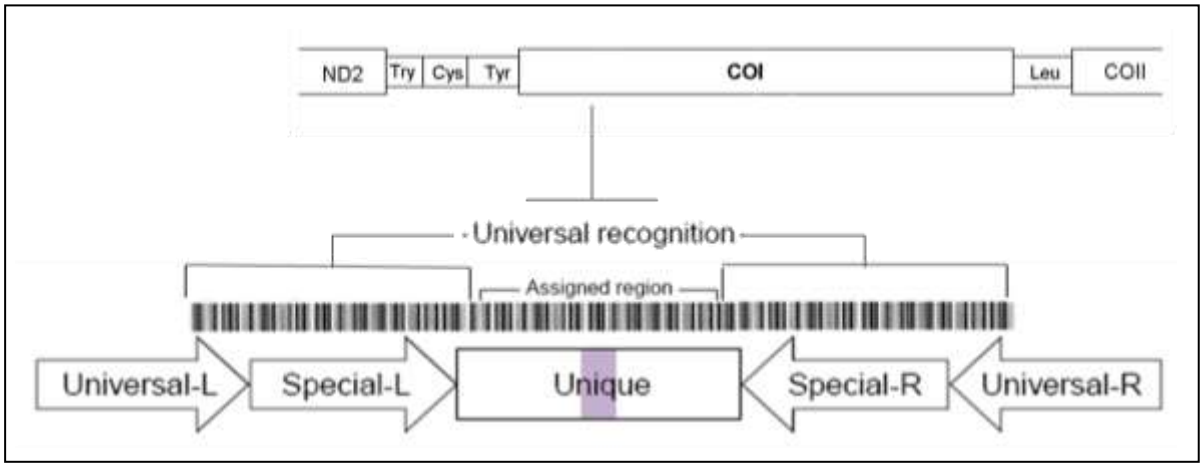
Algunas desventajas en el uso del gen COI han sido expresadas, entre ellas la presencia de secuencias nucleares de origen mitocondrial (NUMTs) y endosimbiontes, así como la necesidad de estandarización metodológica en el grupo de estudio, también han generado controversias por el uso de un solo marcador para la taxonomía de un amplio rango de taxa (Moritz y Cicero, 2004; Hajibabaei *et al.* 2005; Meier *et al.* 2006; Song *et al.* 2008; Casiraghi *et al.* 2010). Todos éstos constituyen aspectos a evaluar cuidadosamente, previa recomendación del uso en un grupo taxonómico particular. También se debe considerar el solapamiento de la variación intraespecífica e interespecífica que puede aumentar cuando se realizan muestreos con un mayor número de taxa emparentados (Moritz y Cicero, 2004; Meyer y Paulay, 2005)

El desarrollo de códigos de barra de ADN no pretende funcionar como un sistema taxonómico, tampoco sustituir la taxonomía alfa, por el contrario, se presenta como una herramienta complementaria basada en técnicas de biología molecular para la correcta identificación de las especies (Padial y De la Riva, 2007). Así, la iniciativa "barcode" ha tenido gran acogida por la conectividad y el lenguaje común de las secuencias de ADN que permite a los investigadores de diferentes partes del mundo avanzar en estudios de taxonomía y sistemática de diversos grupos de organismos y en este caso particular de insectos vectores de enfermedades.

En el presente estudio se evaluó la secuencia propuesta por el CBOL como código de barras de ADN el cual es un fragmento de ~ 700 bp del extremo 5' del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI), secuencia ADN variable. Esta región seleccionada se caracteriza por estar flanqueada por sitios de reconocimiento universales; ser altamente conservada y de fácil aislamiento y análisis de la secuencia nucleotídica (Hebert *et al.* 2003; Ratnasingham y Hebert, 2007) (Figura 1-8).

El código genético de barras de ADN aparece como una alternativa para complementar la taxonomía de los flebotomíneos. Con base en los haplotipos se evaluará la aplicabilidad del método molecular como una forma rápida y eficiente para diferenciar especies de *Lutzomyia* comparado con la taxonomía.

Figura 1-8: Representación esquemática de la posición en el gen COI del código genético de barras de ADN.



Fuente: Adaptado de Gressel y Ehrlich, 2002.

1.4 Importancia médica

El género *Lutzomyia* (*Lu.*) incluye una gran diversidad de especies, aproximadamente 450 y, además, es considerado un género de gran relevancia en salud pública y veterinaria dado que las hembras de ciertas especies presentan hábitos antropofílicos y zoofílicos (Figura 1-1), adicionalmente, pueden ocasionar picaduras dolorosas y llegar a generar reacciones alérgicas en el humano, (Young y Duncan, 1994; Alvar, 2001; Zambrano, 2009). Los agentes patógenos que algunas especies del género *Lutzomyia* pueden transmitir por la picadura se encuentran: virus, bacterias y protozoos (Young y Duncan, 1994).

Entre los agentes virales transmitidos por especies del género *Lutzomyia* se destacan tres familias de virus de importancia médica: Bunyaviridae, Rhabdoviridae y Reoviridae. Dentro de la familia Bunyaviridae el género más relevante en América es *Phlebovirus*, ya que incluye algunos virus de importancia en salud pública como el virus Punta Toro (Fangling *et al.* 2007; Mascari, 2008; Acevedo y Arrivillaga, 2008). En la familia Rhabdoviridae se destaca el virus de la estomatitis vesicular, el cual es considerado de importancia veterinaria (Comer y Tesh, 1991). En la familia Reoviridae sobresale el género *Orbivirus* en el que se encuentra el virus Changuinola (Polly, 2007). La mayoría de las infecciones causadas por estos arbovirus se caracterizan por una variedad de síndromes clínicos aparentemente no diferenciados, que van desde un breve cuadro

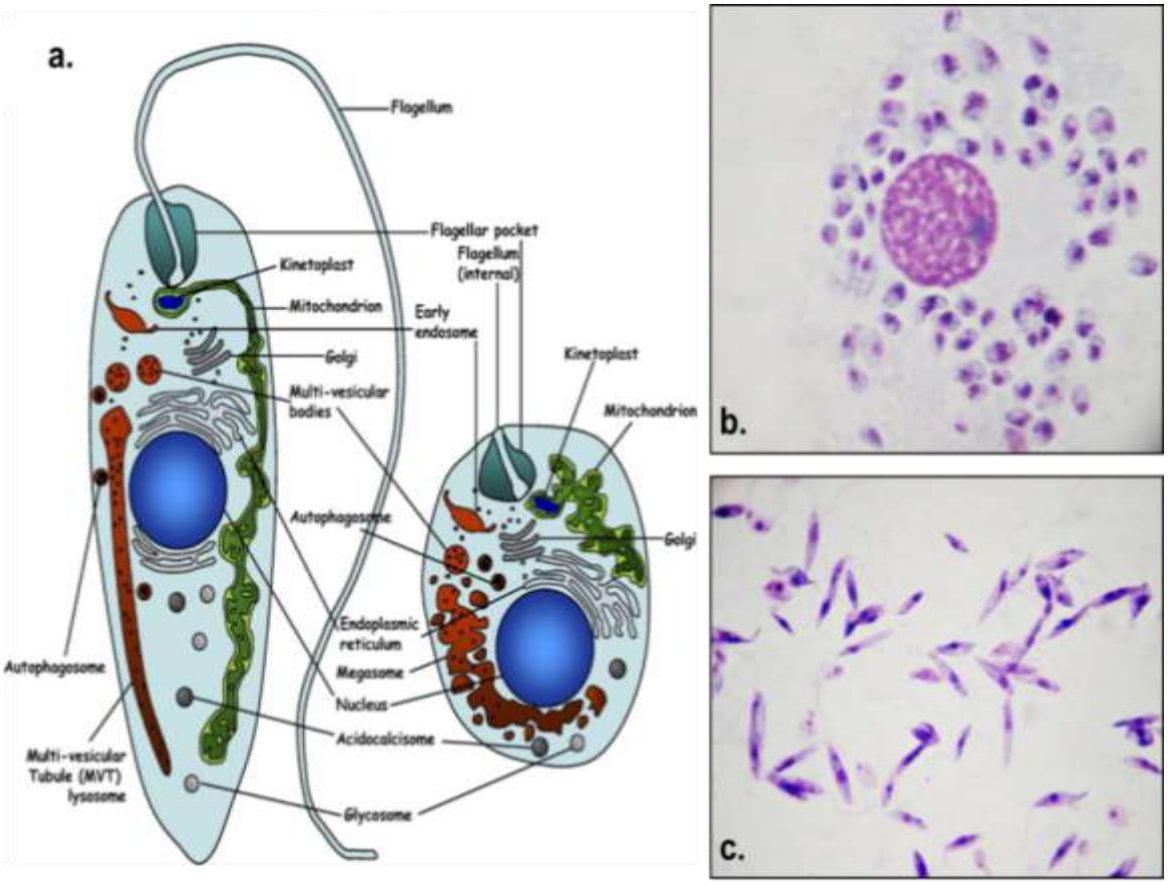
febril y cefalea hasta la aparición de síndromes neurológicos como el desarrollo de meningoencefalitis en humanos (Deubel y Georges-Courbot, 2002).

Con relación a infecciones bacterianas, la bartonelosis es una enfermedad producida por *Bartonella bacilliformis* Barton, 1909 (Orden: Rickettsiale*,* familia Bartonellaceae), la cual es transmitida por algunas especies del género *Lutzomyia* (Xu y Chai, 2002; Huarcaya *et al.* 2004). La bartonelosis, enfermedad endémica en Perú y ciertas regiones del Ecuador y Colombia (Ferro y Morales, 1998), con recurrentes manifestaciones clínicas, caracterizadas por dos fases: una fase inicial anémica y posteriormente una fase eruptiva apreciable como lesiones nodulares (Breitschwerdt *et al.* 2010).

Finalmente, los insectos del género *Lutzomyia* se destacan como vectores biológicos de protozoarios digenéticos del género *Leishmania* (*Le*.) Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Estos parásitos son transmitidos a diferentes hospederos vertebrados, incluyendo al hombre por la picadura de diversas especies de un flebotomíneo hembra.

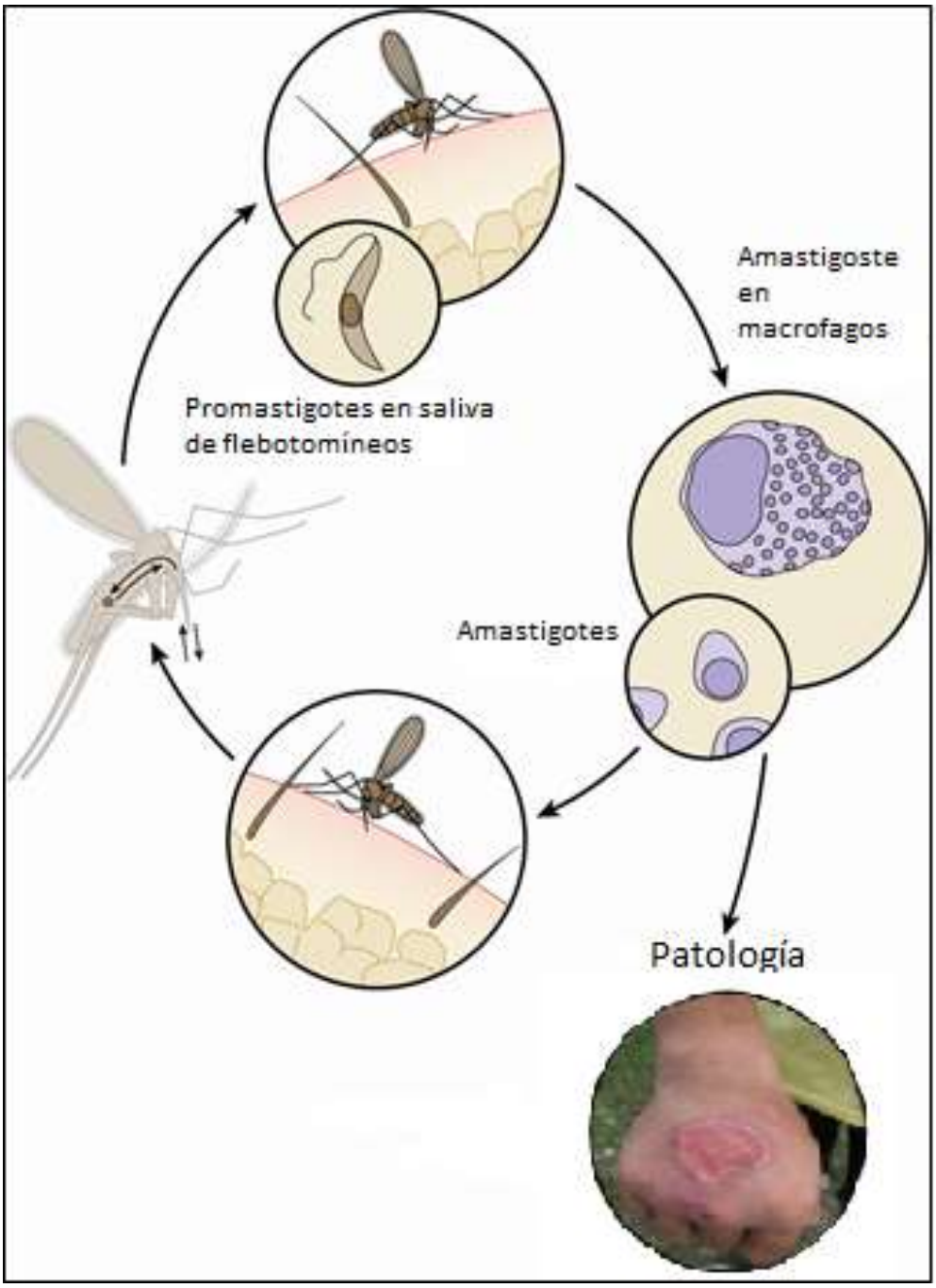
En su ciclo de vida los tripanosomátidos adoptan dos formas: 1) amastigotes, hallados en los huéspedes vertebrados o en los humanos, donde se reproducen por división binaria, principalmente dentro de macrófagos tisulares, ocasionando la lisis de éstas células y generando una lesión en el área afectada (Figura 1-9a y b). 2) promastigotes, la otra forma existente en la naturaleza, es flagelada, móvil y se localiza en el intestino de las hembras hematófagas, que succionan macrófagos infectados con parásitos, cuando realizan su ingesta sanguínea (Figura 1-9a y c). En el intestino de los flebotomíneos, los amastigotes intracelulares son liberados en el tubo digestivo y rápidamente se transforman en promastigotes, éstos también se reproducen asexualmente *por fisión binaria*. Los promastigotes migran a las glándulas salivales del insecto, en donde podrán ser inoculados junto con la saliva a un nuevo hospedador durante una ingesta sanguínea (De Almedia *et al.* 2003; Awasthi *et al.* 2004; Desjeux, 2004) (Figura 1-10).

Figura 1-9: Morfología de *Leishmania* spp.



a. Representación esquemática de las organelas intracelulares principales de *Leishmania* en forma de promastigote (izquierda) o amastigote (derecha). Fuente: Tomado de [http://ars.sciencedirect.com/content/image/1-s2.0-S0020751907001038-gr1.jpg].
Cambios en la forma de *Leishmania* durante su ciclo de vida. **b.** promastigotes de *Leishmania* Fuente: Fotografía PECET; **c.** Amastigotes de *Leishmania* dentro de macrófago. Fuente: Fotografía PECET.

Figura 1-10: Representación esquemática de la transmisión de *Leishmania* spp. a hospedero vertebrado.



Adaptado de [http://www.ppdictionary.com/parasites/l_major.jpg].

1.4.1 La leishmaniasis en Colombia

Las parasitosis transmitidas por vectores biológicos son consideradas de gran importancia y relevancia por la Organización Mundial de la Salud (WHO 2000). En su conjunto, las diversas formas clínicas de la leishmaniasis constituyen un serio problema de salud pública en el mundo y es clasificada en la categoría I como una enfermedad emergente sin control (CDC 2008). Según las estadísticas de la OMS, la leishmaniasis está presente al menos en 88 países a nivel mundial, en 32 de los cuales es de notificación obligatoria y se estima que 350 millones de personas están en riego de contraer la enfermedad. Existen actualmente, en el mundo, cerca de 12 millones de personas infectadas y cada año se presentan aproximadamente, 2 millones de casos nuevos de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis (WHO 2007, CDC 2008).

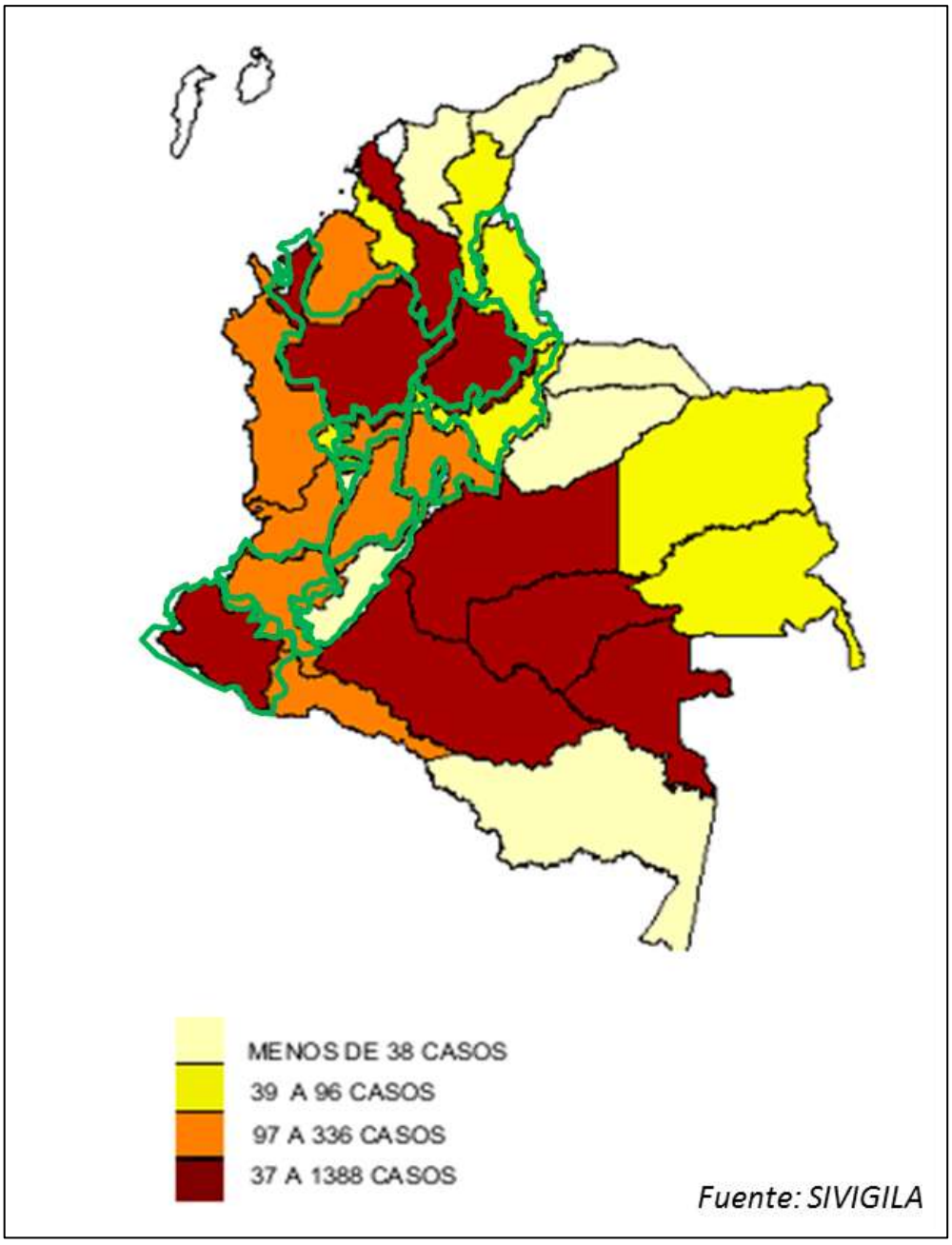
En Colombia la leishmaniasis es endémica en el 91% de todo el territorio (Isaza *et al.* 1999; Romero y Sánchez, 2007). Después de Brasil, es el país con mayor incidencia de leishmaniasis en América (OPS, 2007; Reithinger *et al.* 2007; Selma *et al* 2011). La forma clínica más frecuente es la leishmaniasis cutánea (LC) con el 95% de los casos (Boletín notificación obligatoria, SIVIGILA. 2012), donde el 51,9% de los casos de LC se concentran en la región Andina colombiana (Boletín notificación obligatoria, SIVIGILA. 2012) (Figura 1-11). Para Colombia prevalecen las cepas que producen las formas patológicas cutánea y mucosa, como *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (Lainson y Shaw, 1972)*, Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Vianna, 1911) y *Le*. (*Viannia*) *guyanensis* (Floch, 1954) (Grimaldi *et al.* 1989, Saravia *et al.* 2002; Ovalle *et al.* 2006; Romero y Sánchez 2007; Zambrano, 2009).

1.4.1.1. La leishmaniasis cutánea en zonas cafeteras

En muchos países de Latinoamérica la leishmaniasis cutánea se ha convertido en un grave problema de salud pública (OPS, 2007). En Colombia, Venezuela y Brasil se presentan las condiciones óptimas para el cultivo de café, el cual se produce en zonas montañosas entre 1000 a 2100 msnm, donde los casos de leishmaniasis cutánea se encuentran generalmente asociados con los complejos *Le*. *braziliensis* y *Le*. *mexicana*, y con las especies *Le. guyanensis* y *Le. panamensis* (Montoya-Lerma, 1990; Montoya-Lerma *et al.* 1990; Saravia *et al.* 2002; Rodríguez-Barraquer *et al.* 2008). La relación entre el cultivo del café y la transmisión de *Leishmania* fue descrita por primera vez en

Venezuela por Scorza *et al.* (1985), posteriormente en Colombia por Montoya-Lerma (1990) y Warburg *et al.* (1991).

Figura 1-11: Distribución de casos de Leishmaniasis Cutánea, hasta SE 40,2012.



En línea verde se distinguen los departamentos integrantes de la región Andina.

1.5 Estado de conocimiento sobre los Phlebotominae en Colombia

En América, han sido registradas 460 especies de *Lutzomyia* de las cuales 30 están incriminadas como vectores de la leishmaniasis (Desjeux 1991, Young & Duncan 1994). En la primera mitad del siglo XX, Antunes (1937) publicó la primera notificación sobre flebotomíneos en Colombia. Posteriormente, se han realizado numerosos trabajos de colecta y recopilación de los registros sobre la presencia de flebotomíneos en el país (Ferro y Morales, 1988; Ferro y Morales 1998; Montoya-Lerma y Ferro 1999; Osorno-Mesa *et al.* 1972, Young, 1979). Bejarano (2006) publicó la última lista completa de psicódidos colombianos. Actualmente con base en registros adicionales se habla de 162 especies flebotomíneas para Colombia (152 de *Lutzomyia*, 8 de *Brumptomyia* y 2 de *Warileya*) (Marín *et al.* 2008, Cabrera *et al.* 2009, Bejarano *et al.* 2010, Contreras *et al.* 2012). Estas especies se encuentran distribuidas en diversos ecosistemas del país, incluyendo desde bosque muy húmedo tropical (bmh-T) hasta bosque seco tropical (BsT), en ambientes de influencia antrópica como los sistemas agropecuarios y ambientes urbanos (Corredor *et al.* 1990; Tesh y Guzmán, 1996).

1.5.1 Phlebotominae en zonas cafeteras

En Colombia, el cultivo de café presenta el segundo renglón generador de divisas para el país, cerca de un tercio de todo el café todavía se cultiva en plantaciones relativamente pequeñas a la sombra, usan bajas densidades de siembra (<2000 arboles/ha), emplean variedades tradicionales (Borbón, Típica) y sombrío. Estos contrastan con el 70% de los cultivos de café que se consideran intensivos (tecnificados), es decir, usan hasta 10.000 plantas/ha, en especial de las variedades caturra y Colombia, con amplio uso de insumos químicos y poco o ningún sombrío tradicional (Viña *et al.* 2004; Perfecto y Vandermeer, 2008).

Las plantaciones de café, en particular las que continúan bajo el sistema tradicional de cultivo, en el país, constituyen un corredor biológico significativo, ya que éstas, se distribuyen a lo largo de un rango altitudinal, en diferentes relieves con variedad de condiciones climáticas y edáficas que favorecen la biodiversidad en términos de flora y

fauna, ecosistemas y unidades geomorfológicas, constituyéndose este tipo de cultivo en un modelo de sostenibilidad ambiental (Perfecto *et al.* 1997; Cifuentes, 2001).

Entre las condiciones favorables que ofrece el paisaje cafetero que posiblemente, incrementan la presencia y reproducción de especies de *Lutzomyia*, e influyen también en los cambios en la distribución de éstas, se encuentran las especies arbóreas utilizadas como doble propósito en cafetal tradicional (guamos, carboneros y mezclas con otros cultivos como plátanos y cítricos), que pierden sus hojas durante la estación seca, permitiendo el aumento de la capa de hojarasca y generando un sustrato orgánico (capa gruesa) para el crecimiento de hongos y otros microorganismos. En términos de alimentación, la disponibilidad de fuentes naturales de azúcar para *Lutzomyia* spp., que incluyen el fruto maduro del cafeto y el guamo (*Inga edulis*), que pueden facilitar el desarrollo de parásitos de *Leishmania* spp. en los vectores (Scorza & Spooner, 1982; Scorza *et al.* 1985; Alexander y Usma, 1994). Así mismo, las fuentes de ingesta sanguínea de los flebotomíneos pueden incluir mamíferos y roedores silvestres (*Micoureus demerarae y Microryzomys minutus*), animales domésticos y los residentes humanos, que viven cerca o dentro de los cultivos del café. (Alexander y Usma, 1994; Moore *et al.* 1987). Desde el punto de vista epidemiológico, los paisajes cafeteros son un escenario propicio para la transmisión de *Leishmania* spp. (Scorza, 1985; Montoya 1990; Montoya *et al.* 1990; Alexander *et al.* 1998, Alexander *et al.* 2001).

Con relación a las especies vectores de *Leishmania* spp. en zonas cafeteras, los pocos y dispersos estudios realizados a la fecha, indican la presencia especies del grupo *verrucarum* Theodor, 1965 de la serie *townsendi* Galati, 1995, *Lutzomyia spinicrassa* (Morales, Osorno-Mesa, Osorno, Muñoz, 1969), *Lutzomyia longiflocosa* Osorno, Morales Osorno y Muñoz, 1970; *Lutzomyia youngi* Feliciangeli y Murillo, 1987; *Lutzomyia torvida* Young y Morales, 1994; *L. quasitownsendi* Osorno, Osorno y Morales, 1972 y *Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959), asociadas frecuentemente a focos de leishmaniasis cutánea, causados por *Le.braziliensis*, *Le. guyanensis* y *Le. panamensis* (Montoya-Lerma,1990; Warburg *et al.* 1991; Alexander *et al.* 1995; Rodríguez-Barraquer *et al.* 2008). Generalmente, en zonas cafeteras se observa co-ocurrencia con otras especies de los subgéneros *Helcocyrtomyia* Barreto, 1962, *Psathyromyia* Barretto, 1962 y *Micropygomyia* Barretto, 1962 y ocasionalmente se registra *Lutzomyia sordelli* (Shannon y Del Ponte, 1927) y especies del grupo *Lutzomyia* França, 1924 y del subgénero *Nyssomyia* Barretto,

1962 (Young *et al.* 1987; Montoya-Lerma *et al.* 1990; Vélez *et al.* 1991; Warburg *et al.* 1991; Alexander *et al.* 1992; Young y Duncan, 1994; Alexander *et al.* 1995; Pardo *et al.* 1996; Alexander *et al.* 1998; Cárdenas *et al.* 1999; Pardo *et al.* 1999; Alexander *et al.* 2001; Bejarano *et al.* 2003; Marín *et al.* 2008; Contreras *et al.* 2012).

A la fecha, estudios que evidencien la fauna flebotomínea presente en ecosistemas cafeteros son relativamente escasos y dispersos. Los trabajos al respecto cobran importancia si se considera que las alteraciones en la ecorregión eje cafetero influenciadas por el calentamiento global, los cambios climáticos regionales, las disposiciones y políticas en agricultura y la dinámica de prácticas agronómicas, posiblemente inciden sobre las fluctuaciones de las poblaciones de los insectos vectores y los vertebrados hospederos y por ende en la dinámica de la transmisión de la leishmanisis (Chaves y Pascual, 2006).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Realizar el listado actual de las especies de flebotomíneos en zonas cafeteras (región Andina) de Colombia con énfasis en la taxonomía morfológica y molecular de las especies de importancia médica.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar las especies de flebotomíneos presentes en la zona de estudio y precisar aquellas de importancia médica.

- Revisar para las especies de importancia médica, el estado actual de conocimiento taxonómico con base en morfología y la disponibilidad de carácteres diagnósticos de especie.

- Evaluar la utilidad del gen mitocondrial COI (propuesto como código de identificación genética de animales) como herramienta diagnóstica de las especies de importancia médica en comparación con los caracteres morfológicos.

3. Metodología

Todos los trabajos de laboratorio fueron realizados en el laboratorio de Entomología Médica y Molecular del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET, y el laboratorio de Taxonomía Molecular y Filogenia del Grupo de Investigación en Sistemática Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y Division of Parasitic Diseases, National Center of Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) en Estados Unidos.

3.1 Colecta de flebotomíneos

3.1.1 Área de estudio

La selección de los sitios de muestreo se estableció considerando las condiciones de acceso y seguridad, entendidas como orden público, teniendo en cuenta la práctica agrícola de la caficultura y con base en la información suministrada por el Sistema de Información Cafetera (SICA), que permite conocer los aspectos relacionados con todas las fincas cafeteras y variedades o plantaciones que se encuentran en la zona cafetera Colombiana. Adicionalmente, los datos sobre los reportes de casos de leishmaniasis durante los últimos tres años, a partir de información disponible en el Instituto Nacional de Salud (INS 2010) ó servicios locales de salud (Dirección Seccional de Salud de Antioquia, Dirección Territorial de Salud de Caldas, Instituto Seccional de Salud del Quindío y Servicio Seccional de Salud de Risaralda) (Tabla 3-2). También se consideró incluir entre los sitios de colecta, algunos donde anteriormente, fue reportada la presencia de especies del género *Lutzomyia* así como, localidades que se caracterizan por su actividad turística en relación con los cultivos de café (Tabla 3-2).

Los sitios de muestreo incluyen nueve municipios, Jardín y Jericó en el departamento de Antioquia, Chinchiná, Salamina, Samaná y Victoria en el departamento de Caldas. Quimbaya en Quindío, Pueblo Rico en Risaralda y Alcalá en Valle del Cauca (Figura 3-

12.). Los municipios incluidos en el estudio, se encuentran entre 970 (La Victoria) y 2376 msnm (Jardín) (Tabla 4-4) (Figura 3-12).

El Centro Nacional de Investigación del Café – Cenicafé realizó una zonificación del área cafetera en el país llamada “ecotopos cafeteros”; por definición el ecotopo es una región agro-ecológica delimitada geográficamente, teniendo en cuenta condiciones predominantes de clima, suelo y relieve donde se obtiene una respuesta biológica similar del cultivo del café (FEDERACAFÉ, 1993) (Figura 3-13), así, los sitios de muestreo escogidos están ubicados en los ecotopos 1B, 2A y 2B, así: 1B Cordillera Occidental - Vertiente Oriental (Jardín y Jericó):Son zonas cultivadas casi en su totalidad con café. El clima predominante es templado húmedo, son las zonas con temperaturas entre 17,5 y 21°C, lluvias anuales entre 2.300 y 2800 mm, localizadas entre los 1.300 y 1.900 msnm de altitud (FEDERACAFÉ 1993); 2A Cordillera Central - Vertiente Occidental (Pueblo Rico, Salamina, Chinchiná , Alcalá y Quimbaya) se caracterizan por un clima frío húmedo: Son las zonas de temperatura entre 15° y 17,5°C, lluvias entre 1.500 y 2.000 mm, y altitud entre 2.000 y 2.500 msnm (FEDERACAFÉ,1993) y 2B, Cordillera Central; vertiente oriental (Victoria y Samaná), clima templado superhúmedo, son las zonas cuya temperatura oscila entre 17,5 grados y 23 grados, con lluvia mayor de 3.000 mm. al año y con altitud entre 1.000 y 2.000 msnm (FEDERACAFÉ, 1993).

Las colectas de flebotomíneos se realizaron en plantaciones de café, bosques de galería cerca a los cafetales y domicilios próximos a este tipo de cultivos (Figura 3-14).

Las variedades de los cultivos cafeteros predominantes en los municipios de muestreo corresponden a cafeto arábigo (*Coffea arabica*) variedad Caturra y Castillo, esta última antes conocida como variedad Colombia, posee un elevado potencial productivo que le permite alcanzar producciones similares a las obtenidas con Caturra; (Informe anual de la disciplina de mejoramiento genético y Biotecnología). Generalmente estos cultivos están acompañados con sombríos transitorios como las plantaciones de plátano. En las plantaciones de café muestreadas de los municipios de Salamina, Chinchiná y Quimbaya se observó el sombrío permanente, con presencia de Guamos (*Inga* spp.), y el Matarratón (*Gliricidia sepium*) (Figura 3-14).

Figura 3-12: Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.

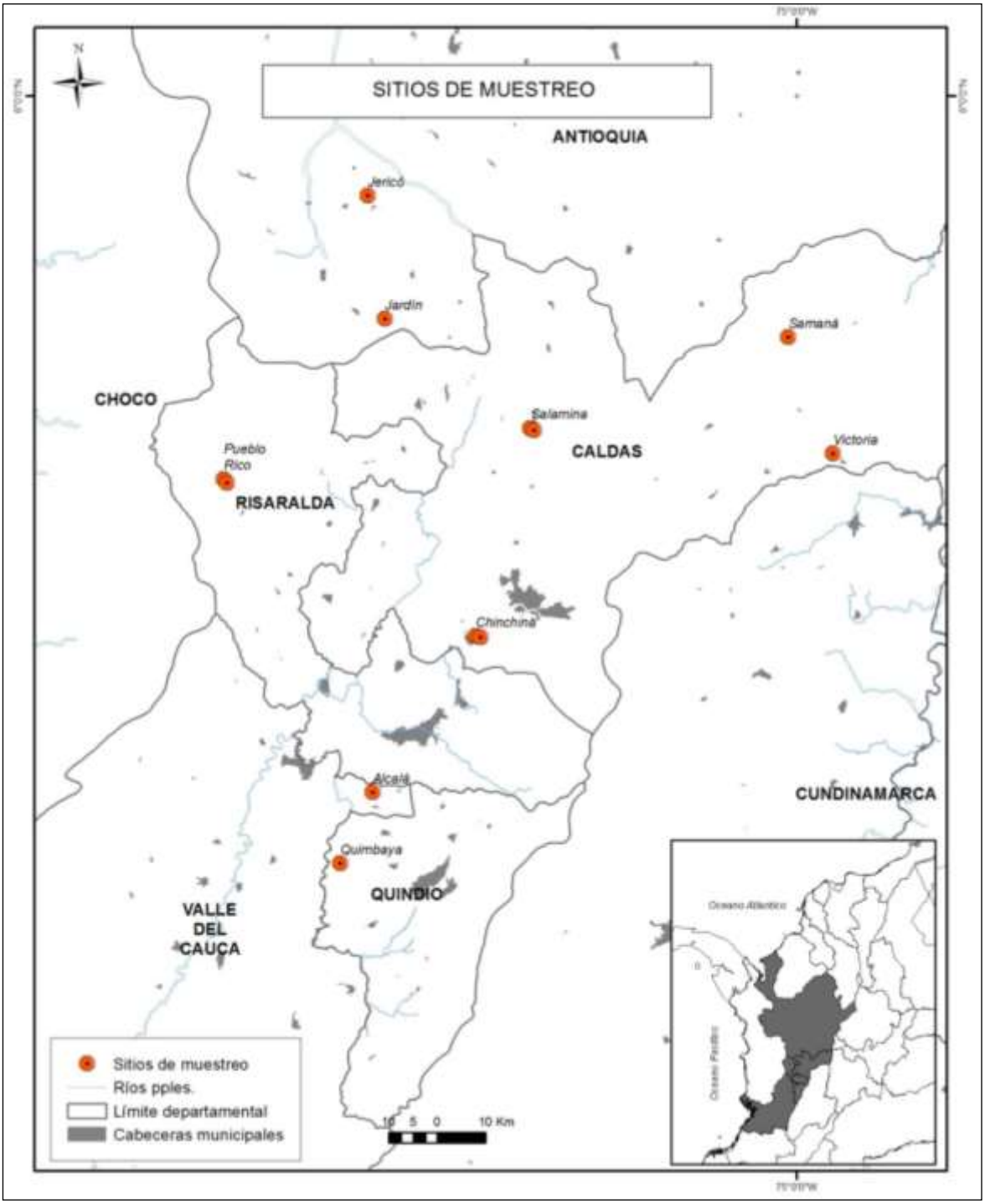
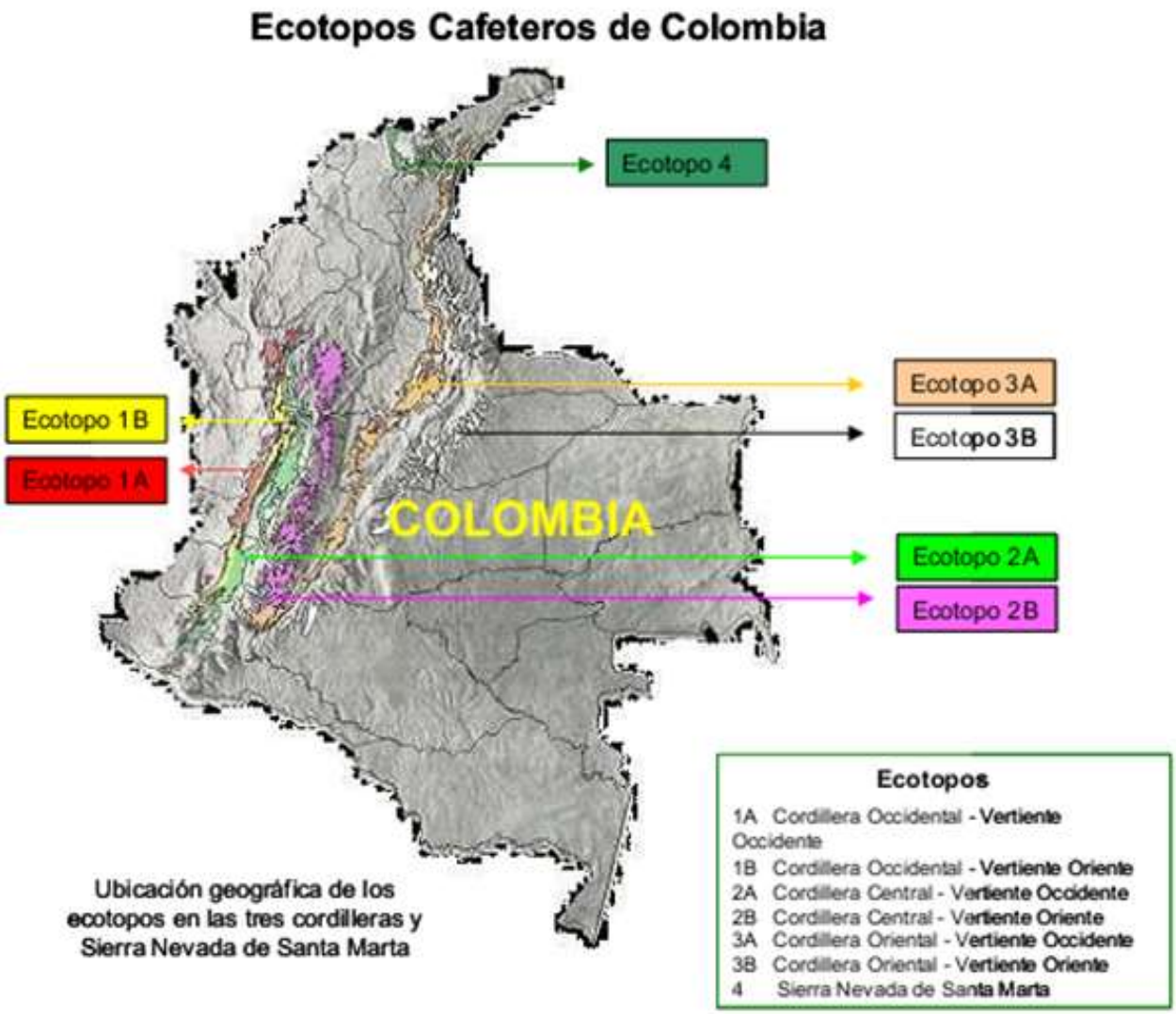


Ilustración 3-13: Ecotopos cafeteros.



Fuente: http://dc314.4shared.com/doc/149Wu6Kq/preview003.png

Figura 3-14: Paisajes cafeteros escogidos para la colecta de flebotomíneos

a. Cultivo de café con sombrío de plátano, Jardín. **b.** Cafetal con sombrío permanente, Chinchiná. **c.** Cafetal con sombrío permanente, Salamina

3.1.2 Métodos de Colecta

Los muestreos entomológicos fueron realizados durante tres días consecutivos entre octubre de 2010 y febrero de 2012. La metodología de muestro empleada fue la documentada para realizar un listado entomológico de los vectores de leishmaniasis (Sandoval *et al.* 2006; Guía para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis). Para *ésto*, se utilizó una combinación de métodos de muestreo, los cuales se describen a continuación:

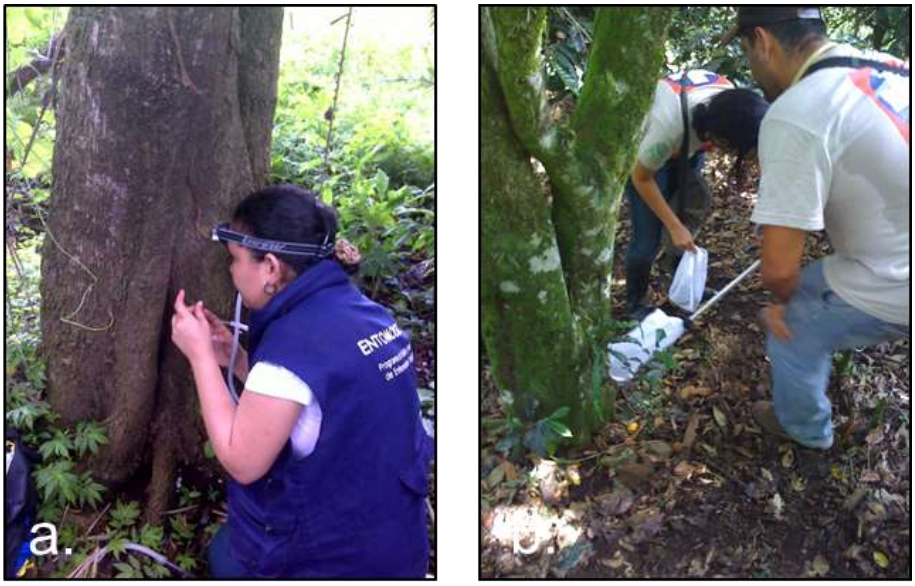
Colectas diurnas en sitios de reposo: Los insectos fueron aspirados durante las horas de luz directamente de los troncos de los árboles de las plantaciones con sombrío y/o se perturbaba la hojarasca y se realizaba succión con capturadores eléctricos de succión, el esfuerzo de muestreo fue de dos recolectores/10-15minutos/sitio de reposo (Figura 3-15a

y b). Estas colectas son un complemento importante a las trampas de luz, ya que también se pueden colectar especies no fototrópicas que pican al hombre implicadas en la transmisión de *Leishmania* sp. y pueden colectarse machos, cuya presencia permite distinguir entre las especies cuyas hembras son morfológicamente idénticas (Alexander 2000).

***Trampas de luz tipo CDC*:** Se emplearon 8 trampas de luz tipo CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) (Figura 3-16a) distanciadas entre sí cada 100 m ubicadas a una altura de 1,30m desde el nivel del suelo y operadas desde las 18:00 hasta las 06:00 horas (hrs)

La ubicación de estas trampas se realizó, teniendo en cuenta la topografía de las zonas de estudio y considerando las características del hábitat que puedan ser atractivas para las especies fototróficas, así: en plantaciones de café las trampas se ubicaron aproximadamente en el centro y en los extremo superior e inferior) (Figura 3-16a), en los domicilios cercanos próximos a las plantaciones fueron instaladas 2 trampas en el intra y peridomicilio (n=2 trampas por ambiente domiciliar/municipio) (Figura 3-16c) y en relictos de bosque cercano a los cultivos fueron ubicadas 2 trampas (ubicada en borde y otra al centro) (Figura 3-16b).

Figura 3-15: Método de colecta para adultos de flebotomíneos.



a. Búsqueda activa manual con aspirador bucal de succión. **b.** Dispositivo Eléctrico de Búsqueda Activa-DEBA.

***Trampas de luz tipo Shannon*:** Se ubicó una por municipio y fueron operadas por dos voluntarios entre las 18:00 y 22:00 hrs (Figura 3-17).

Figura 3-16: Método de colecta para adultos de flebotomíneos.

a. Trampa tipo CDC en cafetal. **b.** Trampa tipo CDC en bosque. **c.** Trampa tipo CDC en Intradomicilio.

Figura 3-17: Método de colecta para adultos de flebotomíneos**.** Trampa tipo shannon

Tabla 4-2: Sitios de colecta flebotomíneos durante los años 2010 a 2012.

ECOTOPO CAFETERO (FEDERECAFÉ 1993)		MES Y AÑO DE COLECTA	MUNICIPIO	DEPARTAMENTO	ELEVACIÓN msnm	COORDENADAS		(P/A)* LC
						Norte	oeste	
1B, Cordillera Occidental; vertiente oriental	E-105B	Marzo 2012	Jardín+	Antioquia	2376	05° 35' 3,8"	75° 46' 5,4"	A
		Abril 2011	Jericó+	Antioquia	1423,8	5º 48` 49,17"	75º 47` 58.141"	A
2A, Cordillera Central; vertiente occidental	E-102A	Enero 2012	Pueblo Rico	Risaralda	817.76	5° 17´08.317"	76° 04´05.019"	P
					1004,35	5° 16´42.135"	76° 3´43.168"	
	E-204A	Junio 2009	Salamina	Caldas	1613,5	5°22´50"	75º 29´ 47"	P
		Octubre 2010			1590,36	5º 22´51"	75º 29´ 48"	
		Febrero 2011			1820	5° 22´34.6"	75° 29´22.81"	
	E-206A	Octubre 2010	Chinchiná	Caldas	1300	4º 59´34"	75° 35´55"	A
		Septiembre 2011			1467,64	4º 59´28"	75° 35´24"	
	E-209A	Abril 2010	Alcalá+	Valle del Cauca	1206,45	4º 42´05"	75° 47´27"	P
	E-210A	Septiembre 2011	Quimbaya+	Quindío	970	4º 34` 08"	75º 51´ 03"	A
2B, Cordillera Central; vertiente oriental	E-205B	Julio 2010	Victoria	Caldas	1054	05° 20'	74° 56'	P
		Octubre 2010	Samaná		1.403	05° 33'	75° 01'	P

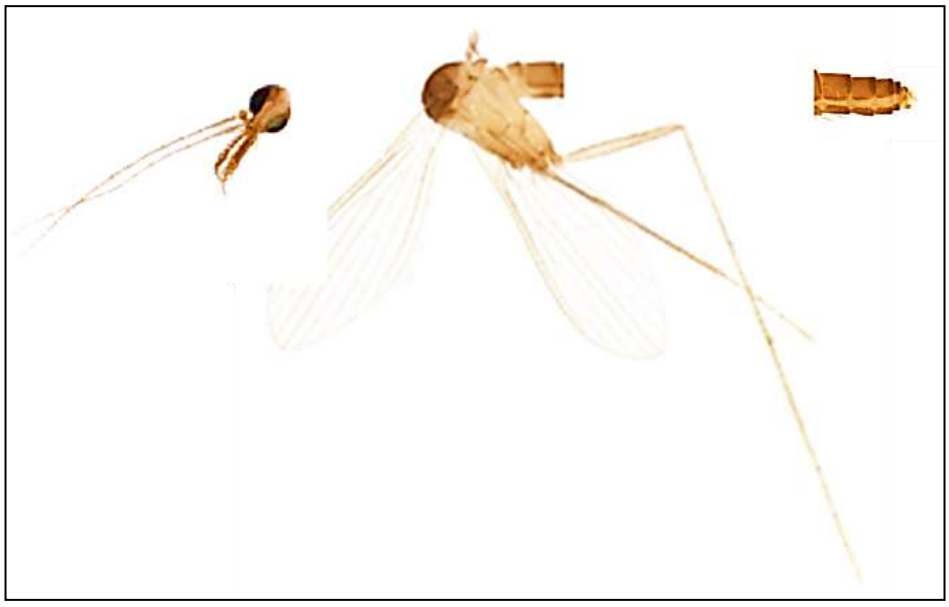
*LC: leishmaniasis cutánea; P: presencia; A: ausencia
+ Localidad turística

3.2 Procesamiento

Una vez colectados los flebotomíneos adultos, se conservaron secos en tubos eppendorf de 1,5 ml, con su respectivo rótulo. Este material se transportó al laboratorio de Entomología Médica y Molecular del PECET, de la Universidad de Antioquia, donde se alamcenó a -20ºC.

Bajo estereomicroscopio, los flebotomíneos fueron fragmentados a nivel de los tres últimos segmentos abdominales y de la cabeza con ayuda de estiletes estériles (Figura 3-18). Posteriormente, estos tres segmentos y la cabeza fueron sometidos a procesos de aclaración, según metodología de Young y Porter (comunicación personal) para remover las setas y permitir la visualización de las estructuras internas esclerotizadas que son determinantes en la identificación taxonómica, mientras que el resto del cuerpo del insecto (tórax y segmentos proximales del abdomen) se almacenaron a -80ºC, hasta ser utilizados en la extracción de ADN total.

Figura 3-18: Hembra de *Lutzomyia longipalpis* fragmentada.



Fuente: Fotografía María Angélica Contreras.

3.3 Identificación taxonómica y especies presentes en la zona de estudio

La identificación de las especies de flebotomíneos se realizaron básicamente mediante morfología externa e interna comparada (Figuras 3-5, 3-6 y 3-7) (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010; Ibáñez- Bernal, 1999), la cual fue realizada con microscopio marca Olympus CX41. La terminología de las estructuras morfológicas (Figuras3- 5, 3-6 y 3-7) y la ubicación de las diversas especies flebotominas en sus respectivos géneros, subgéneros y grupos, se basó primordialmente en criterios dados por Young & Duncan (1994).

El material biológico procesado e identificado se conserva en la Colección de Vectores y Hospedadores Intermediarios de Enfermedades Tropicales (VHET) del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) y con copia al Museo Entomológico Francisco Luis Gallego de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

3.4 Guía taxonómica: Diagnosis taxonómicas de las especies *Lutzomyia* de importancia médica encontradas en el área de estudio con base en la revisión de la información disponible y las observaciones del presente estudio

Luego de la identificación de las especies, se seleccionaron para la revisión del estatus taxonómico, diagnosis y distribución aquellas del género *Lutzomyia* consideradas de importancia médica según incriminación y/o asociación con la transmisión de agentes patógenos, previamente documentadas en el país.

Para la revisión taxonómica se utilizaron descripciones, redescripciones, revisiones y consultas con especialistas en el grupo; así mismo, con la revisión de especímenes de las colecciones de los doctores David Young y Charles Porter, quienes gentilmente accedieron a que éstas fueran revisadas.

3.5 Identificación molecular de adultos colectados en la zona de estudio

La identificación molecular se realizó en aquellos especímenes machos y hembras representantes de las especies colectadas durante el trabajo en campo previamente identificados por taxonomía clásica, con el objetivo para evaluar la utilidad de la secuencia código de barras de ADN en la separación de las especies al compararse las secuencias de adultos obtenidas en este estudio con la previa determinación usando morfología y con las secuencias de códigos de barras de flebotomíneos depositadas en bases de datos (Genbank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ y BolDSystem http://www.barcodinglife.com/). Así también, comparar las secuencias de adultos con las secuencias de los especímenes de identidad desconocida entre ellas considerando la presencia de algunas hembras morfológicamente indistinguibles.

3.5.1 Extracción de ADN total

La extracción de ADN se realizó usando el protocolo de alta concentración de sales descrito por Collins *et al.* (1987), con algunas modificaciones de Rosero *et al.* 2010 descritas a continuación: la maceración mecánica del insecto se realizó con un micropistilo plástico estéril en 100µl del búfer de lisis (0.1M NaCl, 0.1 M Sucrosa, 0.05 M EDTA, 0.5% SDS, 0.1 M Tris-HCL a pH de 9.1), luego se incubó a 65 ºC por 30 minutos, seguida de la adición de 14.5µL de Acetato de Potasio 8M e incubación en hielo durante 60 minutos, posteriormente se realizó una centrifugación a 15.000*rpm*/15min/4ºC. Al sobrenadante obtenido del paso anterior se adicionaron 100 µl de etanol absoluto y luego se realizó una centrifugación a 15.000*rpm*/15min/4ºC y se descartó el sobrenadante, el precipitado obtenido fue lavado con Etanol 70 %. Nuevamente, se adicionaron 100 µl de Etanol Absoluto, seguida de una centrifugación a 15.000*rpm*/15min/4ºC. Posteriormente, se descarta el sobrenadante y el ADN fue resuspendido en 30µL de buffer TE 1X (10mM Tris, 1nM EDTA, pH 7.6). El ADN se conservó a -20C hasta su uso en la amplificación del fragmento “código de barras” del gen mitocondrial COI.

3.5.2 Amplificación del fragmento 5`del gen Citocromo Oxidasa I (COI) mediante la técnica de PCR

Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el fragmento "código de barras" de *COI* (548 pb), fueron LCO1490 - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG (forward) y HCO2198 - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (reverse) (Hebert *et al.* 2003).

La PCR fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 5 min (94 °C), seguida por 35 ciclos de 94 °C durante 1 min (desnaturalización), 45 °C durante 1min (annealing), 72 °C durante 1 min (extensión), y una extensión final a 72° C durante 10 min. Cada mezcla de PCR con un volumen de reacción final de 50 µl contenía: 5µl de PCR buffer 10X, 2.5 mM MgCl2, 10 mM de la mezcla de *desoxiribonucleótidos trifosfato* (dNTPs), 1.5 U *Taq* ADN polimerasa, 0.3µM de cada oligonucleótido y 5µl de plantilla de la ADN y el volumen restante de ddH2O hasta 50 µl.

3.5.3 Visualización, purificación y secuenciación de los productos de PCR

Los productos de la amplificación obtenidos mediante PCR del fragmento 5`del COI fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, éste con previa adición de la tinción fluorescente para ácidos nucleicos GelStar® (Lonza), para ello 5uL del producto de PCR se mezclaron con 2µL de Azul de Bromofenol y se sometió a electroforesis horizontal en búfer TBE 0.5X a 80 voltios durante 40 minutos. La fotodocumentación de los geles fue realizada con un transiluminador Dark Reader DR88X (Clare Chemical Research) y una cámara fotográfica Cannon A640, los productos de PCR fueron considerados positivos cuando se presentaron bandas del tamaño esperado para el gen evaluado, utilizando como referentes los controles positivos de PCR y un marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Promega, USA).

Los productos de PCR fueron purificados a continuación, utilizando MultiScreen$_{HTS}$ Vacuum Manifold (Millipore). Posteriormente, fueron secuenciados en ambos sentidos de la cadena del ácido nucleico con un equipo de electroforesis capilar 3130XL empleando el servicio de la Compañía Macrogen Inc. en Corea.

3.5.4 Edición, alineamiento y análisis molecular de las secuencias

Los cromatogramas obtenidos fueron editados con BioEdit (Hall, 1999) para generar la secuencia consenso de cada especímen. Las secuencias fueron alineadas inicialmente con genomas mitocondriales de otros insectos usados como referencia usando la herramienta BLAST-N (Altschul *et al.* 1997) para confirmar la identidad de las mismas (región 5' COI).

Durante el análisis para detectar la presencia de NUMTS en las secuencias, según lo sugerido por Song *et al.* (2008), durante los pasos de observación de los cromatogramas, se examinó las ambigüedades, picos dobles y el ruido, entendido como difícil lectura de los picos. Posteriormente, se examinó composición nucleotídica, para detectar sesgos, y se verificó la ausencia de acumulación de mutaciones, codones de parada e indels.

Las secuencias obtenidas (Tabla 4-5) fueron alineadas empleando el algoritmo Clustal *W* incorporado en MEGA 4.1 (Tamura *et al.* 2007) y se evaluó la composición nucleotídica y variabilidad nucleotídica por sitio (entropía). También se realizó la caracterización de mutaciones no informativas (patrón de saturación) mediante el software DAMBE (Xia, 2002). El alineamiento final fue utilizado para calcular distancias métricas usando el modelo biparamétrico de Kimura (K2P) (Nei & Kumar, 2000). Así mismo, se calcularon diferencias nucleotídicas pareadas entre secuencias para haplotipos de las especies para calcular patrones de divergencia intra/interespecífica.

La representación gráfica del patrón de agrupamiento fue construido con el algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei,1987) mediante el software MEGA versión 4.1, teniendo en cuenta una prueba de bootstrapp (1000 réplicas) para evaluar el soporte de las agrupaciones. El análisis de NJ muestra las probabilidades de confianza para una rama determinada, entonces la longitud inferir de esa rama es considerada como estadísticamente significativa (Nei y Kumar 2000). El análisis de los polimorfismos de la secuencia de ADN se realizó con el programa DnaSP 5,10 software (Librado y Rozas, 2009).

3.6 Actualización sobre el conocimiento de presencia y distribución de Phlebotominae en zonas cafeteras con base en la literatura y los resultados del presente estudio

Se realiza la actualización sobre el conocimiento de presencia y distribución de Phlebotominae en zonas cafeteras basados en las especies de flebotomíneos colectadas en este trabajo identificadas con caracteres morfológicos y moleculares, también se incluye la revisión de la literatura disponible en términos de trabajos publicados a la fecha sobre las especies de flebotomíneos colectadas en zona cafetera, además de un examen detallado de los especímenes presentes en la Colección de referencia VHET.

4. Resultados

4.1 Identificación taxonómica y especies presentes en la zona de estudio

En total, se colectaron 1.630 (1.013 ♀ y 617 ♂) especímenes de Phlebotominae de los géneros *Lutzomyia, Brumptomyia* y *Warileya*, en los 9 municipios distribuidos en los cinco departamentos de la región Andina de Colombia incluidos dentro del área de estudio (Tabla 3-2). El género *Lutzomyia* representó el grupo más frecuente dentro de los Phlebotominae colectados en el estudio (95,9%), seguido de los géneros *Warileya* y *Brumptomyia*, (3,0% y 1,1% respectivamente) (Tabla 4-3).

El uso de la morfología externa e interna comparada permitió identificar en total 29 especies representadas en: *i*) 2 especies del género *Brumptomyia* y un morfotipo hembra *Brumptomyia* sp. *ii*) una especie en el género *Warileya*. *iii*) 21 especies y 4 morfoespecies del género *Lutzomyia* pertenecientes a ocho subgéneros: *Helcocyrtomyia* Barreto, 1962, *Lutzomyia* França, 1924, *Nyssomyia* Barreto, 1962, *Pressatia* Mangabeira,1942, *Psathyromyia* Barreto, 1962, *Psychodopygus* Mangabeira, 1941, *Sciopemyia* Barreto, 1962, *Trichopygomyia* Barreto, 1962, y tres grupos de especies, *aragoi* Theodor, 1965, *migonei* Theodor, 1965 y *verrucarum* Theodor, 1965.

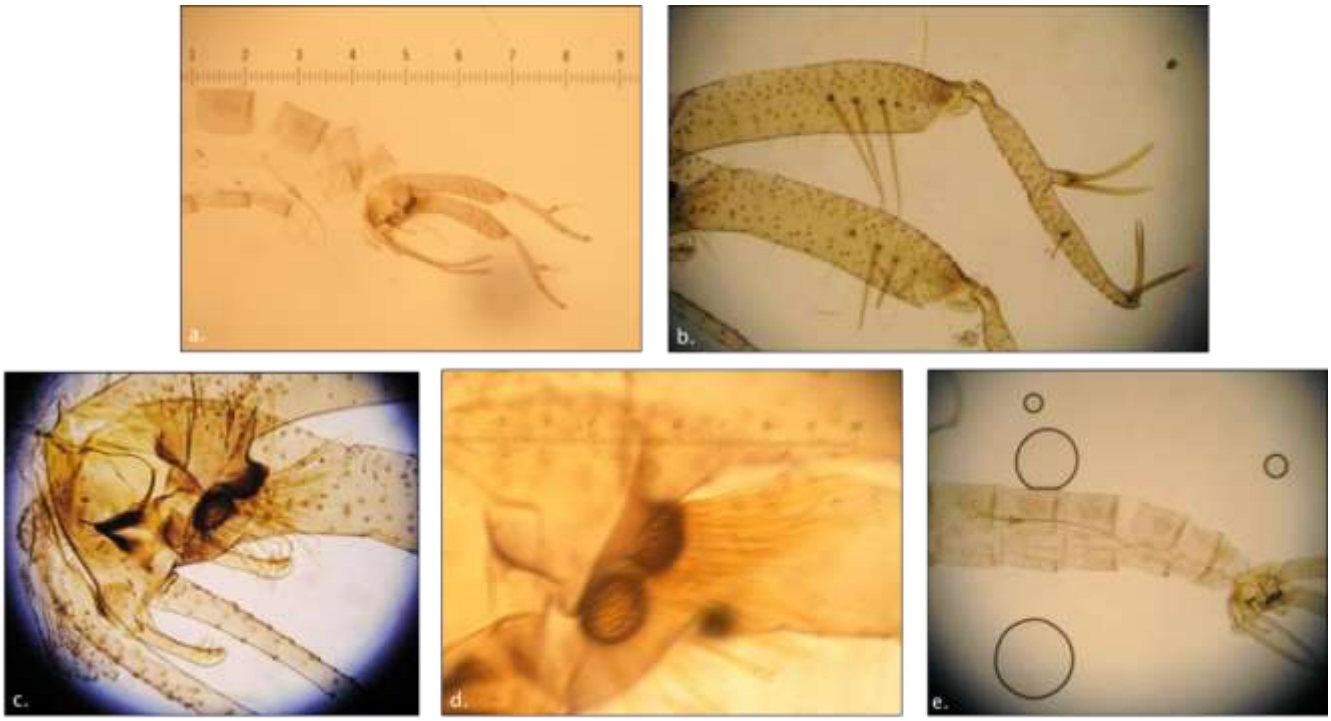
En un total de 5 especímenes no fue posible la identificación a nivel de especie, representados por 3 ejemplares hembra y 2 machos, colectados en trampa lumínica a los 1.613 y 1.820 msnm., estos dos machos presentaron la genitalia deteriorada por lo tanto no fue posible su identificación, así mismo, las hembras. Estos especimenes se registraron como *Lutzomyia* sp. y *Lutzomyia* (*verrucarum*) sp. (Tabla 4-4).

En relación a los 11 especimenes hembra del género *Brumptomyia* colectados en el estudio no fue posible la identificación a nivel de especie por que las hembras son isomórficas y no puedieron ser asociadas geográficamente con un macho, debido a que en una misma localidad del municipio de Chinchiná se registrarón dos especies

Brumptomyia beaupertuyi y *Brumptomyia guimaresi.* De la misma forma, no fue posible la identificación a nivel de especie de 63 ejemplares hembras morfológicamente similares del subgénero *Helcocyrtomyia*, serie *sanguinaria* colectados en trampa lumínica shannon a 2.376 msnm, ya que se encontraron dos especies de macho de la misma serie, *Lutzomyia scorzai* (Ortiz, 1965) y *Lutzomyia* sp. del subgénero *Helcocyrtomyi*a Barretto, 1962. Estas limitaciones en términos de identidad a nivel de especie serán fundamentales al realizar la evaluación de la secuencia código de barras de ADN y la comparación con secuencias de las otras especies colectadas en el presente estudio.

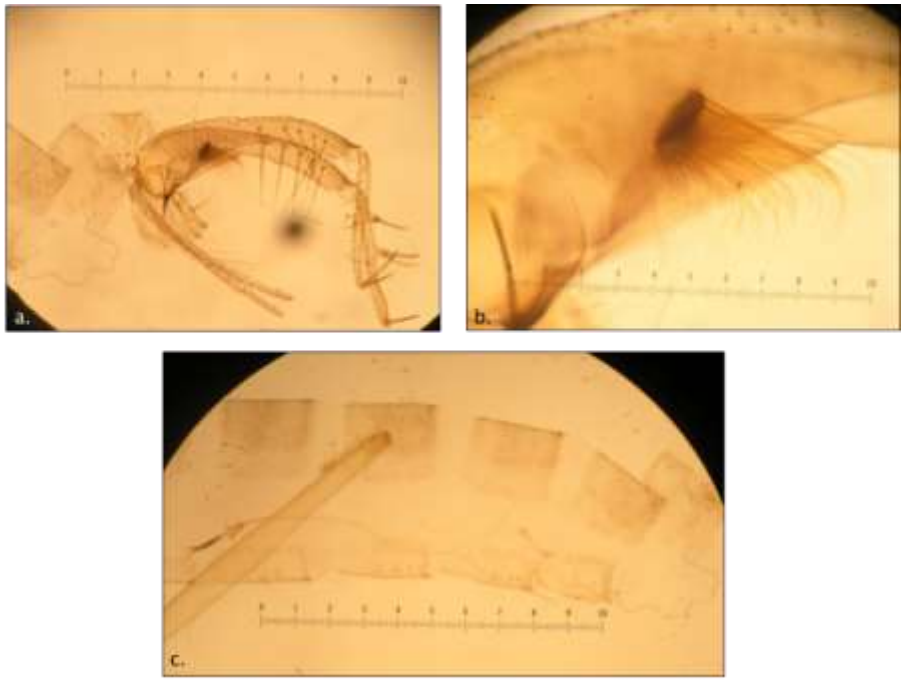
A continuación se enumeran de especies de Phlebotominae colectados en el área de estudio

Figura 4-19: *Brumptomyia beaupertuyi* (Ortiz, 1954).



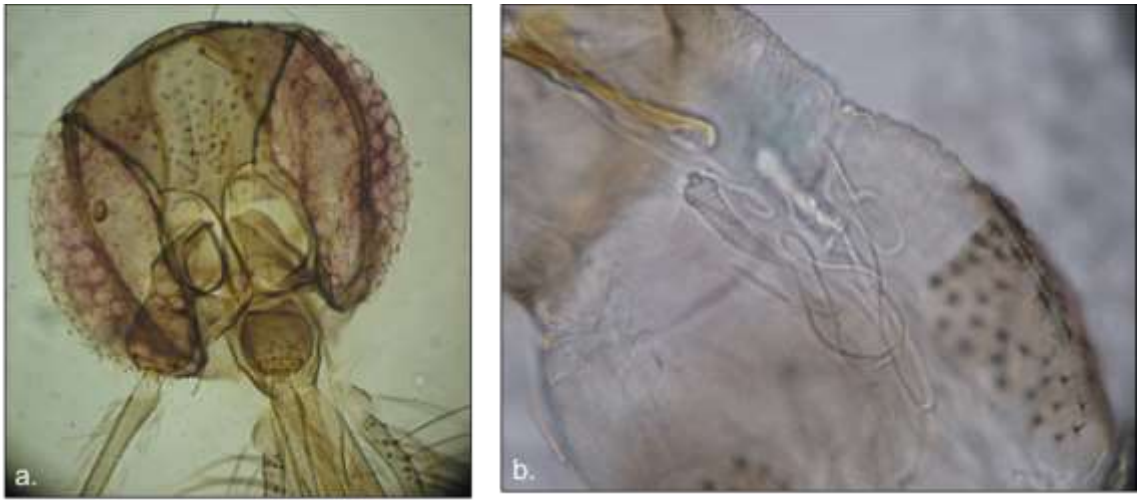
Macho. **a**. Genitalia externa; **b**. Espinas espatuladas en gonoestilo y gonocoxito. **c**. Tufo basal de setas en gonocoxito, parámero y aedeago. **d**. Tufo basal de setas en gonocoxito. **e.** Bomba y filamentos genitales.

Figura 4-20: *Brumptomyia guimaraesi* (Coutinho & Barretto, 1941)



Brumptomyia guimaraesi. Macho. **a**. Genitalia externa; **b**. Tufo basal de setas en gonocoxito. **c**. Bomba y filamentos genitales.

Figura 4-21: *Brumptomyia* sp.



Brumptomyia sp. Hembra. **a**. Cabeza con sutura interocular completa. **b**. genitalia interna, espermateca de aspecto cónico, ductos individuales 10 a 12 veces más lago que el cuerpo.

Figura 4-22: *Lutzomyia carpenteri* (Fairchild & Hertig, 1953)

Lutzomyia carpenteri. Hembra. **a**. Ascoides con prolongaciones superiores en el flagelómero II. **b**. Genitalia interna: espermatecas.

Figura 4-23: *Lutzomyia carrerai thula* (Young, 1979)

Lutzomyia carrerai thula. Hembra. **a**. Cabeza. **b**. Palpómeros. **c**. Tórax. Macho **d.** Genitalia externa del macho. **e.** Genitalia interna: Espermatecas imbricadas.

Figura 4-24: *Lutzomyia columbiana* (Ristorcelli & Van Ty, 1941)

Lutzomyia columbiana, Hembra. **a**. Cabeza. **b**. Genitalia interna: espermatecas. **c.** Detalle de la espermateca. Macho. **d.** Genitalia externa. **e**. Detalle de tuyo de setas en la base del gonocoxito, parámero y ápice de filamentos genitales.

Figura 4-25: *Lutzomyia dasymera* (Fairchild & Hertig, 1961)

Lutzomyia dasymera. Hembra. **a**. Espermatecas. **b**. Ascoides con prolongaciones superiores en el flagelómero II.

Figura 4-26: *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931)

Lutzomyia gomezi, Hembra. **a**. Cibario. **b**. Tórax. **c.** Genitalia interna: espermatecas. **d.** Detalle de la espermateca. Macho. **e.** Genitalia externa. **f**. Detalle de tufo de setas en la base del gonocoxito.

Figura 4-27: *Lutzomyia hartmanni* (Fairchild & Hertig, 1957)

Lutzomyia hartmanni, Hembra. **a**. Cabeza. **b**. cibario. **c.** Genitalia interna: espermatecas. Macho. **d.** Cabeza. **e.** Genitalia externa.

Figura 4-28: *Lutzomyia nuneztovari* (Ortiz, 1954)

Lutzomyia nuneztovari, Hembra. **a**. Cabeza. **b.** Cibario. **c**. Tórax. **d.** Genitalia interna: espermatecas. Macho. **d.** Genitalia externa.

Figura 4-29: *Lutzomyia panamensis* (Shannon, 1926)

Lutzomyia panamensis, Hembra. **a**. Cabeza .**b.** Cibario**. c.** Tórax. Macho: **d.** Genitalia externa. Hembra: **e.** Genitalia interna: espermatecas.

Figura 4-30: *Lutzomyia pia* (Fairchild & Hertig, 1961)

Lutzomyia pia. Hembra. **a**. Cabeza. **b.** Tórax. **c**. Genitalia interna: espermatecas. Macho. **d.** Genitalia externa. **f.** Detalle de la parámero, ápice de los ductos eyaculados y lóbulo lateral. **f.** Disposición de las espinas en el gonoestilo

Figura 4-31*:* *Lutzomyia shannoni* (Dyar, 1929)

Lutzomyia shannoni. Hembra. **a**. Cabeza. **b.** Detalle cibario. **c**. Tórax. **d.** Genitalia interna: espermatecas. Macho. Genitalia externa. **f.** Detalle de los ductos eyaculados y lóbulo lateral.

Figura 4- 32: *Lutzomyia scorzai* (Ortiz, 1965)

Lutzomyia scorzai Macho. **a.** Genitalia externa. **b.** Detalle de la bomba y ductos eyaculadores**. c.** Detalle de la disposición de las espinas en el gonoestilo. **d.** Detalle de grupo de setas en la base del gonocoxito.

Figura 4-33: *Lutzomyia sordellii* (Shannon & Del Ponte, 1927)

Lutzomyia sordelli. Hembra **a**. Cabeza; **b**. Tórax. Macho **c**. Genitalia externa, bomba y filamentos genitales. Hembra **d**. Genitalia interna: Espermatecas.

Figura 4-34: *Lutzomyia* sp. de baduel (Floch & Abonnenc, 1945)

Lutzomyia sp. de Baduel. Hembra **a**. Genitalia interna, espermatecas y furca genital. Macho **b**. Genitalia externa Espinas espatuladas en gonoestilo y gonocoxito. **c**. Tufo basal de setas en gonocoxito, parámero y aedeago, bomba y filamentos genitales.

Figura 4-35: *Lutzomyia trapidoi* (Fairchild & Hertig, 1952)

Lutzomyia trapidoi. Hembra. **a**. Cabeza .**b.** Cibario**. c.** Tórax. Macho: **d.** Genitalia externa. Hembra: **e.** Genitalia interna: espermatecas.

Figura 4-36: *Lutzomyia triramula* (Fairchild & Hertig, 1952)

Lutzomyia triramula. Macho **a**. Genitalia externa; **b**. Parámero con ramo de setas ubicado en la región medial de la estructura y prolongación ventral en parámero curvada hacia la base de la genitalia.

Figura 4-37: *Lutzomyia youngi* (Feliciangeli & Murillo, 1985)

Lutzomyia youngi. Hembra. **a**. Cabeza y tórax. **b.** Detalle cibario. Macho. **c**. Genitalia externa **d.** Detalles de ápices de filamentos genitales, tufo de setas en el gonocoxito y parámero. **d.** Detalle de espinas dispuestas en el gonoestilo y tufo de setas en el gonocoxito.

Figura 4-38: *Lutzomyia walkeri* (Newstead, 1914)

Lutzomyia walkeri Hembra. **a**. Genitalia interna: Espermatecas.

Figura 4-39: *Lutzomyia yuilli yuilli* (Young & Porter, 1972)

Lutzomyia yuilli. Hembra. **a**. Cabeza. **b.** Detalle cibario. **c**. Tórax. **d**. Genitalia interna: espermatecas. Macho. **e.** Genitalia externa y detalle de ápices de los filamentos genitales.

Figura 4-40: *Lutzomyia* (*Helcocyrtomyia*) sp. 1

Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 1. Hasta la fecha siguen siendo objeto de estudios taxonómicos. Macho. **a**. Cabeza. **b.** Detalle setas espiniformes en palpómero IV. **c**. Ala. **d.** Genitalia externa

Figura 4-41: *Lut*zomyia (*Helcocyrtomyia*) sp. 2

Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 2. Hembra. **a**. Detalle cibario. **c**. Tórax. **c.** Genitalia interna: espermatecas. **d.** Ala.

Figura 4-42: *Warileya rotundipennis* Fairchild & Hertig, 1951

Warileya rotundipennis hembra**. a.** cabeza; **b.** Tórax, ala y abdomen; **c.** Ala; **d.** Espermatecas y furca.

El municipio de Salamina, Caldas, registró la mayor cantidad de flebotomíneos (722), seguido por Chinchiná, Caldas (267) y Samaná, Caldas (195). De acuerdo a los cinco departamentos, Caldas concentró la frecuencia más alta de flebotomíneos (1325; 81,28%), seguido por Risaralda (180; 11,04%) y Antioquia (96; 5,87%). Es de resaltar que Caldas es el departamento con la mayor cantidad de municipios en donde se realizaron colectas (Tabla 4-3).

La especie *Lu. pia* registró la mayor cantidad de individuos, con un 35,21% del total de los individuos colectados, seguida por *Lutzomyia carrerai thula* (Young, 1979) (12,94%), *Lu*. *yuilli* (109; 6,69%), *Lu*. *youngi* (102; 6,26%), *Lu*. *columbiana* (99; 6,07%) y *Lu*. *panamensis* (77; 4,72%), estando las especies restantes en porcentajes relativamente bajos (Tabla 4-5). Sin embargo estas seis especies no registraron presencia en la mayor cantidad de municipios en los 5 departamentos (Tabla 4-4).

4.1.1 Especies por ecotopo cafetero muestreado

La presencia de especies de flebotomíneos en los diferentes ecotopos cafetero muestreados, 1B, 2A y 2B se presenta en la tablas 4-5 y 4-6.

Tal como se aprecia en la tabla 4-5, el ecotopo 1B, que incluyen los municipios Jardín y Jericó, agrupó el menor número de individuos, 96 especímenes (68 ♀ y 28 ♂; 5,9%) (Tabla 4-5). Así mismo, se colectaron el menor número de especies 4 especies de *Lutzomyia*, 1 de *Brumptomyia* y 1 de *Warileya*, siendo *Lu. (Helcocyrtomyia)* sp. 2 y *Lu. scorzai* las especies de mayor captura (63; 3,7% y 20; 1,23%, respectivamente) (Tabla 4-6).

El ecotopo 2A representado por los municipios de Alcalá, Chinchiná, Quimbaya, Pueblo Rico y Salamina, agrupó el número más alto de individuos, 1.198 especímenes (684 ♀ y 514 ♂; 73,49%) (Tabla 4-5). Así mismo, el mayor número de especie colectadas, 16, donde *Lu. pia* fue la especie predominante con 574 especímenes representando el

35,21% del total, el resto de las especies presentes fueron *Lu*. *carrerai thula* (196, 12,02%), *Lu*. *youngi* (102, 6,26%) y *Lu. columbiana* (99, 6,07%) (Tabla 4-6).

En el ecotopo 2B, representado por los municipios de Samaná y Victoria, se colectaron 336 individuos (261 ♀ y 75 ♂; 20,61%) (Tabla 4-5) pertenecientes a 13 especies de *Lutzomyia*, exhibiendo las mayores capturas *Lu. trapidoi* (134, 8,22%), *Lu*. *yuilli* (109, 6,69%), *Lu. panamensis* (20, 1,23%) y *Lutzomyia triramula* (Fairchild & Hertig, 1952), (20, 1,23%) (Tabla 4-6).

Las especies *Br. beaupertuyi Lu. carrerai thula*, *Lu. gomezi*, *Lu. panamensis*, *Lu. trapidoi* y *Wa. rotundipennis* Fairchild & Hertig, 1951, se encontraron en dos de los tres ecotopos muestreados. Estas especies se colectaron en mayor cantidad en el ecotopo 2A y en menor número en los ecotopos 1B y 2B. En contraste, el resto de las especies sólo se colectaron en uno de los tres ecotopos muestreados 1B, 2A y 2B, estas especies fueron *Brumptomyia guimaraesi* (Coutinho & Barretto, 1941), *Brumptomyia* sp., *Lutzomyia bifoliata* Osorno-Mesa, Morales, Osorno & Hoyos, 1970, *Lutzomyia camposi* (Rodríguez, 1950), *Lutzomyia carpenteri* (Fairchild & Hertig, 1953), *Lu. columbiana*, *Lutzomyia dasymera* (Fairchild & Hertig, 1961), *Lu. hartmanni, Lu. lichyi, Lu. nuneztovari, Lu. pia, Lu. scorzai, Lu. shannoni, Lutzomyia sordellii* (Shannon & Del Ponte,1927), *Lutzomyia* sp. Baduel (Floch & Abonnenc, 1945)*, Lu. triramula, Lutzomyia walkeri* (Newstead, 1914), *Lu. youngi, Lu. yuilli, Lu. (Helcocyrtomyia)* sp. 1 *y Lu. (Helcocyrtomyia)* sp. 2 (Tabla 4-5).

Tabla 4-3: Número de individuos por géneros de Phlebotominae encontrados en cada uno de los municipios incluidos en el área de estudio.

GÉNEROS	Antioquia		Total Antioquia (%)	Caldas				Total Caldas (%)	Quindío	Total Quindío (%)	Risaralda	Total Risaralda (%)	Valle del Cauca	Total Valle del Cauca (%)	TOTAL GENERAL (%)
	El Jardín	Jericó		Chinchiná	Salamina	Samaná	Victoria		Quimbaya		Pueblo Rico		Alcalá		
Brumptomyia	-	1	1 (0,06)	17	-	-	-	17 (1,04)	-	-	-	-	-	-	**18 (1,1)**
Lutzomyia	88	2	90 (5,5)	250	722	195	141	1308 (80,24)	4	4 (0,24)	136	136 (8,34)	25	2 5 (1,53)	**1563 (95,9)**
Warileya	-	5	5 (0,31)		-	-	-	-	-	-	44	44 (2,7)	-	-	**49 (3,0)**
Total general	**88**	**8**	**96 (5,87)**	**267**	**722**	**195**	**141**	**1325 (81,28)**	**4**	**4 (0,24)**	**180**	**180 (11,04)**	**25**	**25 (1,53)**	**1630**

Tabla 4-4: Número de individuos por especie de Phlebotominae encontrados en cada uno de los municipios incluidos en el área de estudio.

ESPECIES	Antioquia		Total Antioquia (%)	Caldas				Total Caldas (%)	Quindío	Total Quindío (%)	Risaralda	Total Risaralda (%)	Valle del Cauca	Total Valle del Cauca (%)	TOTAL GENERAL (%)
	El Jardín	Jericó		Chinchiná	Salamina	Samaná	Victoria		Quimbaya		Pueblo Rico		Alcalá		
Brumptomyia beaupertuyi	-	1	1 (0,06)	4	-	-	-	4 (0,24)	-	-	-	-	-	-	**5 (0,31)**
Brumptomyia guimaresi	-	-	-	2	-	-		2 (0,12)	-	-	-	-	-	-	**2 (0,12)**
Brumptomyia sp.	-	-	-	11	-	-		11 (0,67)	-	-	-	-	-	-	**11 (0,67)**
Lutzomyia bifoliata	-	-	-	-	-	-	6	6 (0,37)	-	-	-	-	-	-	**6 (0,37)**
Lutzomyia camposi	-	-	-	-	-	-	2	2 (0,12)	-	-	-	-	-	-	**2 (0,12)**
Lutzomyia carpenteri	-	-	-	-	-	-	2	2 (0,12)	-	-	-	-	-	-	**2 (0,12)**
Lutzomyia carrerai thula	-	-	-	162	-	6	9	177 (10,86)	-	-	34	34 (2,08)	-	-	**211 (12,94)**
*Lutzomyia columbiana**	-	-	-	33	64	-	-	97 (5,95)	1	1 (0,06)	-	-	1	1 (0,06)	**99 (6,07)**
Lutzomyia dasymera	-	-	-	-	-	-	1	1 (0,06)	-	-	-	-	-	-	**1 (0,06)**
*Lutzomyia gomezi**	-	-	-	-	-	-	7	7 (0,43)	1	1 (0,06)	-	-	24	24 (1,47)	**32 (1,96)**
*Lutzomyia hartmanni**	-	-	-	-	-	11	5	16 (0,98)	-	-	-	-	-	-	**16 (0,98)**
*Lutzomyia lichyi**	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1 (0,06)	-	-	-	-	**1 (0,06)**
*Lutzomyia nuneztovari**	-	-	-	-	32	-	-	32 (1,96)	-	-	-	-	-	-	**32 (1,96)**
*Lutzomyia panamensis**	-	-	-	-	-	1	19	20 (1,23)	-	-	57	57 (3,5)	-	-	**77 (4,72)**
*Lutzomyia pia**	-	-	-	51	523	-	-	574 (35,21)	-	-	-	-	-	-	**574 (35,21)**
Lutzomyia scorzai	20	-	20 (1,23)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**20 (1,23)**
*Lutzomyia shannoni**	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2 (0,12)	-	-	-	-	**2 (0,12)**

Lutzomyia sordelli	-	-		-	-	-	2	2 (0,12)	-	-	-	-	-	-	**2 (0,12)**
Lutzomyia sp. de Baduel	-	2	2 (0,2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**2 (0,12)**
*Lutzomyia trapidoi**	-	-	-	-	-	66	68	134 (8,22)	-	-	45	45 (2,8)	-	-	**179 (10,98)**
Lutzomyia triramula	-	-	-	-	-	6	14	20 (1,23)	-	-	-	-	-	-	**20 (1,23)**
Lutzomyia walkeri	-	-	-	-	-	1	1	1 (0,06)	-	-	-	-	-	-	**1 (0,06)**
*Lutzomyia youngi**	-	-	-	3	99	-	-	102 (6,26)	-	-	-	-	-	-	**102 (6,26)**
*Lutzomyia yuilli**	-	-	-	-	-	104	5	109 (6,69)	-	-	-	-	-	-	**109 (6,69)**
Lutzomyia sp.	-	-	-		4	-	-	4 (0,24)	-	-	-	-	-	-	**4 (0,24)**
Lu. (verrucarum) sp.	-	-	-	1	-	-	-	1 (0,06)	-	-	-	-	-	-	**1 (0,06)**
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 1	5	-	5 (0,31)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**5 (0,31)**
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 2	63	-	63 (3,7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**63 (3,7)**
Warileya rotundipennis	-	5	5 (0,31)	-	-	-	-	-	-	-	44	44 (2,7)	-	-	**49 (3,0)**
Total	**88**	**8**	**96 (5,87)**	**267**	**722**	**195**	**141**	**1325 (81,28)**	**4**	**4 (0,24)**	**180**	**180 (11,04)**	**25**	**25 (1,53)**	**1630**

Tabla 4-5: Número de individuos por especie de Phlebotominae colectados en los ecotopos cafeteros 1B, 2A y 2B, en áreas de influencia cafetera, Colombia.

Especie	1, Cordillera Occidental; B, vertiente oriental			2, Cordillera Central; A, vertiente occidental			2, Cordillera Central; B, vertiente oriental			Total (%)		
	Nº ♀	Nº ♂	Nº Total	Nº ♀	Nº ♂	Nº Total	Nº ♀	Nº ♂	Nº Total	Nº ♀(%)	Nº ♂ (%)	Nº Total (%)
Brumptomyia beaupertuyi	-	1	1	-	4	4	-	-	-	-	5 (0,31)	5 (0,31)
Brumptomyia guimaresi	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	2 (0,12)	2 (0,12)
Brumptomyia sp.	-	-	-	11	-	11	-	-	-	11 (0,67)	-	11 (0,67)
Lutzomyia bifoliata	-	-	-	-	-	-	1	5	6	1 (0,06)	5 (0,31)	6 (0,37)
Lutzomyia camposi	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1 (0,06)	1 (0,06)	2 (0,12)
Lutzomyia carpenteri	-	-	-	-	-	-	2		2	2 (0,12)	-	2 (0,12)
Lutzomyia carrerai thula	-	-	-	103	93	196	10	5	15	113 (6,93)	98 (6,01)	211 (12,94)
*Lutzomyia columbiana**	-	-	-	48	50	98	-	-	-	48 (2,94)	50 (3,07)	98 (6,01)
Lutzomyia dasymera	-	-	-	-	-	-	1	-	1	1 (0,06)	-	1 (0,06)
*Lutzomyia gomezi**	-	-	-	8	17	25	6	1	7	14 (0,86)	18 (1,1)	32 (1,96)
*Lutzomyia hartmanni**	-	-	-	-	-	-	12	4	16	12 (0,74)	4 (0,25)	16 (0,98)
*Lutzomyia lichyi**	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1 (0,06)	1 (0,06)
*Lutzomyia nuneztovari**	-	-	-	11	21	32	-	-	-	11 (0,67)	21 (1,29)	32 (1,96)
*Lutzomyia panamensis**	-	-	-	12	45	57	18	2	20	30 (1,84)	47 (2,88)	77 (4,71)
*Lutzomyia pia**	-	-	-	374	200	574	-	-	-	374 (22,94)	200 (12,27)	574 (35,21)
Lutzomyia scorzai	-	20	20	-	-	-	-	-	-	-	20 (1,23)	20 (1,23)
*Lutzomyia shannoni**		-	-	1	1	2	-	-	-	1 (0,06)	1 (0,06)	2 (0,12)
Lutzomyia sordelli		-	-	-	-	-	2	-	2	22 (0,12)	-	2 (0,12)
Lutzomyia sp. de Baduel	1	1	2	-	-	-	-	-	-	1 (0,06)	1 (0,06)	2 (0,12)
*Lutzomyia trapidoi**	-	-	-	10	35	45	106	28	134	116 (7,12)	63 (3,87)	179
Lutzomyia triramula	-	-	-	-	-	-	16	4	20	16 (0,98)	4 (0,25)	20 (1,23)
Lutzomyia walkeri	-	-	-	-	-	-	1	1	2	1 (0,06)	1 (0,06)	2 (0,12)
*Lutzomyia youngi**	-	-	-	86	16	102	-	-	-	86 (5,28)	16 (0,98)	102 (6,26)

*Lutzomyia yuilli**	-	-	-				85	24	109	85 (5,21)	24 (1,47)	109 (6,69)
Lutzomyia sp.	-	-	-	2	2	4	-	-	-	2 (0,12)	2 (0,12)	4 (0,25)
Lu. (verrucarum) sp.	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1 (0,06)	-	1 (0,06)
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 1		5	5)	-	-	-	-	-	-	-	5 (0,31)	5 (0,31)
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 2	63	-	63	-	-	-	-	-	-	63 (3,87)	-	63 (3,87)
Warileya rotundipennis	4	1	5	17	27	44	-	-	-	21 (1,29)	28 (1,72)	49 (3,01)
Total	68	28	**96**	684	514	**1198**	261	75	**336**	1013 (62,15)	617 (37,85)	**1630 (100)**

Tabla 4-6: Número de individuos por especie de Phlebotominae en los ecotopos cafeteros 1B, 2A y 2B, por municipio en áreas de influencia cafetera, Colombia.

Especies	1, Cordillera Occidental; B, vertiente oriental		Total (%)	2, Cordillera Central; A, vertiente occidental					Total (%)	2, Cordillera Central; B, vertiente oriental		Total (%)	TOTAL GENERAL (%)
	El Jardín	Jericó		Alcalá	Chinchiná	Pueblo Rico	Quimbaya	Salamina		Samaná	Victoria		
Brumptomyia beaupertuyi	-	1	1 (0,06)	-	4	-	-	-	4 (0,24)	-	-	-	**5 (0,31)**
Brumptomyia guimaresi	-	-	-	-	2	-	-	-	2 (0,12)	-		-	**2 (0,12)**
Brumptomyia sp.	-	-	-	-	11	-	-	-	11 (0,67)	-		-	**11 (0,67)**
Lutzomyia bifoliata	-	-	-	-	-	-	-	-		-	6	6 (0,37)	**6 (0,37)**
Lutzomyia camposi	-	-	-	-	-	-	-	-		-	2	2 (0,12)	**2 (0,12)**
Lutzomyia carpenteri	-	-	-	-	-	-	-	-		-	2	2 (0,12)	**2 (0,12)**
Lutzomyia carrerai thula	-	-	-	-	162	34	-	-	196 (12,02)	6	9	177 (10,86)	**211 (12,94)**
*Lutzomyia columbiana**	-	-	-	1	33	-	1	64	99 (6,07)	-	-		**99 (6,07)**

Lutzomyia dasymera	-	-	-	-	-	-	-	-		-	1	1 (0,06)	**1 (0,06)**
*Lutzomyia gomezi**	-	-	-	24	-	-	1	-	25 (1,53)	-	7	7 (0,43)	**32 (1,96)**
*Lutzomyia hartmanni**	-	-	-	-	-	-	-	-		11	5	16 (0,98)	**16 (0,98)**
*Lutzomyia lichyi**	-	-	-	-	-	-	1	-	1 (0,06)	-	-	-	**1 (0,06)**
*Lutzomyia nuneztovari**	-	-	-	-	-	-	-	32	32 (1,96)	-	-		**32 (1,96)**
*Lutzomyia panamensis**	-	-	-	-	-	57	-	-	57 (3,5)	1	19	20 (1,23)	**77 (4,72)**
*Lutzomyia pia**	-	-	-	-	51	-	-	523	574 (35,21)	-	-		**574 (35,21)**
Lutzomyia scorzai	20	-	20 (1,23)	-	-	-	-	-		-	-	-	**20 (1,23)**
*Lutzomyia shannoni**	-	-	-	-	-	-	2	-	2 (0,12)	-	-	-	**2 (0,12)**
Lutzomyia sordelli	-	-		-	-	-	-	-		-	2	2 (0,12)	**2 (0,12)**
Lutzomyia sp. *de baduel*	-	2	2 (0,2)	-	-	-	-	-		-	-	-	**2 (0,12)**
*Lutzomyia trapidoi**	-	-	-	-	-	45	-	-	45 (2,76)	66	68	134 (8,22)	**179 (10,98)**
Lutzomyia triramula	-	-	-	-	-	-	-	-		6	14	20 (1,23)	**20 (1,23)**
Lutzomyia walkeri	-	-	-	-	-	-	-	-		1	1	1 (0,06)	**1 (0,06)**
*Lutzomyia youngi**	-	-	-	-	3	-	-	99	102 (6,26)	-	-		**102 (6,26)**
*Lutzomyia yuilli**	-	-	-	-	-	-	-	-		104	5	109 (6,69)	**109 (6,69)**
Lutzomyia sp.	-	-	-	-		-	-	4	4 (0,24)	-	-		**4 (0,24)**
Lu. (verrucarum) sp.	-	-	-	-	1	-	-	-		-	-	1 (0,06)	**1 (0,06)**
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 1	5	-	5 (0,31)	-	-	-	-	-		-	-	-	**5 (0,31)**
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 2	63	-	63 (3,7)	-	-	-	-	-		-	-	-	**63 (3,7)**
Warileya rotundipennis	-	5	5 (0,31)	-	-	44	-	-	44 (2,7)	-	-	-	**49 (3,0)**
Total	**88**	**8**	**96 (5,87)**	**25**	**267**	**180**	**4**	**722**	**1198**	**195**	**141**	**336 (20,65)**	**1630**

***** Especies reconocidas como antropofílicas y relacionadas con la transmisión de *Leishmania* spp.

4.2 Guía taxonómica: Diagnosis taxonómicas de las especies *Lutzomyia* de importancia médica encontradas en el área de estudio con base en la revisión de la información disponible y las observaciones del presente estudio

A continuación se presenta una revisión del estado actual de conocimiento taxonómico con base en morfología y la disponibilidad de carácteres diagnósticos para las especies de importancia médica colectadas en el presente estudio. En este sentido se presenta la categorización taxonómica según los esquemas actuales de clasificación en flebotomíneos Young y Duncan (1994) y Galati (2010), así también los datos de la distribución y bionomía.

4.2.1 *Lutzomyia columbiana* (Ristorcelli y Van Ty, 1941)

Phlebotomus columbianus Ristorcelli & Van Ty, 1941. ♀♀

Phlebotomus columbianus Rozeboom, 1947. ♂♂.

Sinonimia de Phlebotomus monticolus variedad. incarum Ristorcelli & Van Ty, 1941.

Estatus taxonómico

Taxonómicamente, según el esquema de clasificación de Young y Duncan *Lu. columbiana* pertenece al grupo *verrucarum* Theodor, 1965 del género *Lutzomyia*, sin embargo, algunos autores consideran (Galati, 2010) este taxón dentro género *Pintomyia* Costa Lima, 1932 subgénero *Pifanomyia* Ortiz & Scorza, 1963 Serie *verrucarum* Fairchild, 1955 (Galati, 2010), junto a otras 8 especies, que son *Lutzomyia andina* (Osorno, Osorno-Mesa & Morales, 1972), *Lutzomyia antioquiensis* Wolff & Galati, 2002, *Lutzomyia aulari* (Feliciangeli, Ordoñez & Manzanilla, 1984), *Lutzomyia cajamarcensis* (Galati, Cáceres & Le Pont, 1995), *Lutzomyia deorsa* (Pérez, Ogusuku, Monje & Young, 1991), *Lutzomyia disiuncta* (Morales, Osorno & Osorno-Mesa, 1974), *Lutzomyia moralesi* (Young, 1979) y *Lutzomyia verrucarum* (Townsend, 1913).

Diagnosis

Macho: Se caracteriza por flagelómero I considerablemente más largo que el labroepifaringe, quinto palpómero más largo que el tercer palpómero. Genitalia: Los especímenes machos de *Lu. columbiana* colectados poseen el gonoestilo típico de la

serie *verrucarum* con dos espinas mediales y dos distales. En el gonoestilo se observa una cerda espiniforme pre-apical y cuatro espinas largas pareadas, dos terminales y dos medianas (casi en el mismo nivel), de ápices espatulados. Gonocoxito con un tufo basal de 10 a 15 setas fuertes tan largas como la longitud del gonocoxito. Filamentos genitales largos con estriaciones a largo de la estructura y engrosados en su ápice. Parámero con setas dorsales restringidas a la tercera parte distal de la estructura, presenta un grupo de setas aisladas dorsales ubicadas en la cuarta parte del parámero. Adeago simple y cónico (Figura 4-24).

Hembra: Presenta en la cabeza cibario con cuatro dientes horizontales, equidistantes, ausencia de arco cibarial y región pigmentada, la parte superior de la faringe es estriada con líneas cortas y dentada. Ascoides simples sobre el flagelómero II, sin sobrepasar el ápice del segmento, quinto palpómero más largo que el tercer palpómero. La fórmula palpal corresponde a 1, 4; (2, 3), 5. Esta es la fórmula característica de las especies integrantes del grupo *verrucarum* (Ristorcelli y Van Ty, 1941; Rozeboom, 1947; Sherlock, 1962), pero existe una considerable variación en la longitud de los segmentos pálpales de la serie *townsendi,* donde el quinto segmento es relativamente más corto y el segmento II puede ser más corto o igual en longitud que el tercero (Ristorcelli y Van Ty, 1941; Rozeboom, 1947; Sherlock 1962). Antenomero III mayor o equivalente en longitud al labroepifaringe. El cuerpo de las espermatecas es de forma alargada, globosas, levemente estriadas con ductos cortos, el ducto común dos veces más largo que los ductos individuales, lo que se corresponde con los caracteres diagnósticos propuestos por Ristorcelli y Van Ty, 1941 para *Lu. columbiana* (Figura 4-24).

Comentarios

Hasta la fecha, solo cuatro especies de la serie *verrucarum* están registradas en Colombia *Lu. andina*, *Lu. antioquiensis*, *Lu. columbiana, Lu. disiuncta* y *Lu. moralesi.*

El macho de *Lu. columbiana* es morfológicamente similar a *Lu. deanei* Damasceno, Causey & Arouck, 1945 diferenciándose fácilmente por la posición de las espinas en el gonoestilo en posición 1.1.2 en *Lu. columbiana* con dos espinas basales implantadas al mismo nivel, a diferencia en *Lu. deanei* se ubican en posición 1.1.1.1. También, el tufo de setas en el gonocoxito, son más largas en *Lu. columbiana* (Sherlock, 1962) lo que permite diferenciar estas dos especies. Al interior de la serie *verrucarum* el macho de *Lu. columbiana* también es morfológicamente similar a *Lu. deorsa*, pero difieren en la forma

del aedeago de ápice curvo semejante a la cabeza de un ganso en esta última especie (Galati, 2010). Ristorcelli y Van Ty, 1941.

Distribución y bionomía

Es una especie endémica de Colombia, con una distribución geográfica que se extiende desde los bosques húmedos del Nudo de Los Pastos, pasando por las Cordilleras Occidental y Central, hasta zonas esteparias de La Guajira, en un amplio rango altitudinal que va de los 100 a los 2700 msnm (Bejarano *et al.* 2003). En el presente estudio. *Lu. columbiana* se colectó en Alcalá a 1230 msnm, Chinchiná a 1312 y 1467 msnm y en Salamina a 1620, 1645 y 1820 msnm.

4.2.2 *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu, 1931)

Phlebotomus gomezi Nitzulescu 1931. ♀♀

Phlebotomus (Sintonius) gomezi Nitzulescu 1931

Sinonimia de *Flebotomus (Brumptomyia) suis* Rozeboom, 1940

Flebotomus (*Brumptomyia*) *suis* Iriarte 1944. ♂♂ y ♀♀

Phlebotomus japigny Floch y Abonnenc, 1944

Estatus taxonómico

Lutzomyia gomezi fue descrita a partir de especímenes hembras colectados en San Cristóbal, Táchira, Venezuela (Nitzulescu, 1931). Según el esquema taxonómico propuesto por Young y Duncan (1994) es definida dentro del subgénero *Lutzomyia* del género *Lutzomyia*. Por otra parte, Galati (2010) considera esta especie dentro del subgénero *Tricholateralis* Galati, 1995 del género *Lutzomyia.*

Diagnosis

Macho: Longitud de la cabeza desde el vértice hasta el borde inicial del clípeo entre 282-300 µm. La fórmula palpal 1, 4, 2, 3, 5 y en algunos individuos, 1, (2, 4), 3, 5, características descritas por Barreto (1946). El palpómero quinto de mayor longitud que el tercero. En el tórax el escuto está bien pigmentado, mientras que el pleuron totalmente claro (el pronoto y paraterguito), presencia de cerda en la pleura abdominal características típicas del subgénero *Tricholateralis* carácter adoptado por Galati (2003).. Genitalia: Gonoestilo con 4 espinas en posición 2.2. Gonocoxito con tufo basal formado

por 12 o más setas implantadas en una ligera protuberancia circular en forma de racimo de moras. Ductos eyaculadores de anchura equivalente al ancho de las cerdas del tufo basal del gonocoxito, en el parámero no se observan cerdas en la región media del margen dorsal de la estructura (Figura 4-26).

Hembra: cabeza parcialmente pigmentada con longitud desde el vértice hasta el borde inicial del clípeo entre 330-348 µm. Labroepifaringe con longitud >250 µm. Fórmula palpal 1, 4, 2, 3, 5, semejante a la observada generalmente en los machos. Antena con flagelómero terminal (XIV) más corto o subigual en longitud que el anterior (XIII). Cibario con una fila de cuatro dientes horizontales más o menos equidistantes acompañados de dientes verticales dispuestos en dos filas irregulares, el cibario está provisto por un arco cibarial completo en ausencia de un área pigmentada. Tórax: presenta el escuto completamente pigmentado y el pleuron completamente claro, caracteres presentados en machos colectados en el presente estudio. Genitalia: cuerpo de la espermateca subesférica con una anulación subterminal mucho más ancha que la anulación que la procede. Ductos individuales relativamente delgados y largos, con un ancho equivalente a 1/3 del anillo apical. Espermateca mucho más ancha que los ductos individuales.

Los caracteres morfológicos mencionados corresponden con los caracteres diagnósticos propuestos por Nitzulescu para *Lu. gomezi* (Figura 4-26).

Comentarios

El macho de *Lu. gomezi* es morfológicamente similar a *Lu. sherlocki*, pero difieren en el ancho de los ductos eyaculadores, siendo éstos más anchos que las cerdas del tufo basal del gonocoxito en *Lu. sherlocki*. También, el carácter ligeramente curvado hacia arriba del parámero permite diferenciarlas. Martins *et al.* (1971) distingue los machos de estas dos especies por el número de setas en la base del gonocoxito (40 para *Lu. sherlocki.* vs 14-19 para *Lu. gomezi*). De acuerdo a Llanos *et al.* (1975) las espermatecas en *Lu. sherlocki* son más grandes que *Lu. gomezi* y los ductos espermáticos individuales de *Lu. sherlocki*, también son más amplios que los de *Lu. gomezi.*

Según Young y Duncan, 1994, los caracteres examinados en los especímenes no fueron suficientes para concluir sobre el estado de *Lu. sherlocki* como una especie válida, distinta *Lu. gomezi*.

Distribución y bionomía

La distribución geográfica incluye Panamá, Costa Rica, Honduras, Nicaragua, El Salvador, Colombia, Ecuador, Venezuela y sur de Brasil (Young, 1979). Los hábitos de *Lu. gomezi* en Colombia (Porter y De Foliart, 1981) se relacionan con su antropofílica y su presencia en diversos hábitats. En bosque se reporta su preferencia por los claros boscosos y no en el dosel, en particular las hembras. También, se conoce que esta especie tiene preferencia por variedad de mamíferos (Porter y De Foliart, 1981; Anónimo, 1998; Ferro *et al.* 2005). En zona cafetera de Colombia los adultos de *Lu. gomezi* han sido colectada en trampas de luz CDC y cebo humano protegido y en las raíces de árboles de gran porte (Alexander *et al.* 1992, Alexander *et al.* 1995a). En presente estudio *Lu. gomezi* en el municipio de Quimbaya (970 msnm) se colectaron por búsqueda activa en raíces tabloides, mientras que en los municipios de Alcalá(1206- 1238 msnm) y Victoria con trampas tipo CDC (1054 msnm).

4.2.3 *Lutzomyia hartmanni* (Fairchild & Hertig, 1957)

Phlebotomus hartmanni Fairchild & Hertig 1957. ♂♂ y ♀♀

Psychodopygus hartmanni: Forattini 1971

Estatus taxonómico

Lutzomyia hartamanni fue descrita a partir de ejemplares obtenidos en Cerro Campana, Panamá (Fairchild & Hertig, 1957) y es ubicada, taxonómicamente, en el subgénero *Helcocyrtomyia* Barretto, 1962 (Young y Duncan, 1994) de la serie *sanguinaria* Barretto, 1962 (Galati 2010).

Diagnosis

Macho: Adulto con aspecto de gran tamaño y longitud. Cabeza ancha con una altura desde el vértice hasta el margen inferior incluyendo el clípeo 1/3 menor a la longitud del clípeo. Labroepifaringe de longitud 280 µm aproximadamente. Flagelómero I tan largo como el labroepifaringe y sobrepasando la base del tercer palpomero. Ascoides pareados y simples que se extienden hasta ¼ distal en el flagelómero II. Palpómero V de longitud menor a la suma del pIII y pIV. Fórmula palpal: 1.4.2:3.5. En el tórax se observan setas en la región anterior del catepisterno. La relación alar entre la longitud de la vena R_1 (δ)

menor o equivalente a 1/3 de R_2 (α). Gonoestilo con cinco espinas en posición 2.1.1.1 con la espina externo inferior implantada en un nivel más basal la espina interna. Espina interna implantada en el medio del Gonoestilo. Tufo basal del gonocoxito formado por 1-4 setas una de ella más larga. Bomba eyaculadora con un diámetro de pabellón, no máximo de 2 veces el diámetro del pistón eyaculador. Parámero simple de aspecto digitiforme. Lóbulo lateral más coto que el gonocoxito (Figura 4-27).

Hembra: En el cibario se observan cuatro dientes horizontales, acompañados por una o más hileras de dientes verticales (Young & Duncan, 1994), la longitud del palpómero quinto es menor a 1,25 veces la del tercer palpómero y se presentan setas espiniformes en el palpómero 4. El Clípeo corto, menor o equivalente a 1/3 de la longitud de la cabeza, la longitud del labroepifaringe fue menor o equivalente a 400 µm.

Los especímenes hembra de *Lu. hartmanni* presentan la típica espermateca característica de las hembras de la serie *sanguinaria* del subgénero *Helcocyrtomyia*, cuerpo tubular delgado con estrías transversales y anulaciones, el anillo apical es equivalente o más pequeño que el preapical. El botón terminal es grande con filamentos largos. Los ductos individuales son largos y lisos dos veces más largos que el cuerpo de las de las espermatecas y el ducto común corto o casi ausente (Figura 4-27).

Los caracteres morfológicos mencionados en la hembra son compartidos por *Lu. gonzaloi*, *Lu. hartmanni*, *Lu. kirigetiensis* y *Lu. tortura.* por lo tanto la determinación se realizó por asociación geográfica con el macho.

En este caso particular se prestó especial interés en las secuencias del gen COI derivadas de las hembras y a la correlación existente con las de los machos, así como las demás especies.

Comentarios

La serie *sanguinaria* del subgénero *Helcocyrtomyia* está compuesta por catorce especies (Galati, 2010), siete de las cuales están registradas en Colombia (Bejarano, 2010): *Lu. cirrita* (Young & Porter, 1974), *Lu. hartmanni* (Fairchild & Hertig, 1957), *Lu. sanguinaria* (Fairchild & Hertig, 1957), *Lu. scorzai* (Ortíz, 1965), *Lu.* sp. de Pichinde Young, 1979, *Lu. tortura* (Young & Rogers, 1984) y *Lu. velezi* Bejarano, Vivero & Uribe, 2010. El macho de *Lu*. *hartmanni* es morfológicamente similar a *Lu.* sp. de Pichinde, pero difieren por la longitud del labroepifaringe .(300 µm) en la cabeza y en la genitalia: el tufo basal en gonocoxito está formado por 3 cerdas subiguales en longitud. *Lu*. *hartmanni* se diferencia

de *Lu. scorzai* (Figura 4-32) en el macho por la ubicación de las espinas externo inferior la cual está implantada en el mismo nivel que la espina interna. Estos últimas dos especies fueron encontradas en el presente estudio y sus secuencias comparadas en términos de distancia para evaluar la utilidad para separación de especies.

Distribución y bionomía

Incluye Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador y Perú (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010). Los adultos de *Lu. hartmanni* se han colectado en trampas de luz CDC, cebo humano protegido, reposan en árboles de gran porte y madrigueras de animales (Duque *et al.* 2004). En los bosques, *Lu. hartmanni* tiene mayor actividad de picadura en el dosel que en el suelo. El pico de actividad es entre las 19:00 y 3:00 horas en los bosques (Porter y de foliart, 1981; Anónimo 1998; Ferro *et al.* 2005). Durante las colectas en el municipio de Victoria realizadas en el presente estudio, esta especie fue colectada en el peridomicilio y cerca a los cultivos de café con trampas de luz tipo CDC.

4.2.4 *Lutzomyia nuneztovari* (Fairchild & Hertig, 1957)

Phlebotomus nuneztovari Ortíz, 1954. ♂♂

Sinonimia. *Lutzomyia nuneztovari* anglesi Le Pont & Desjeux, 1984 (Young & Duncan 1994).

Estatus taxonómico

Esta especie fue descrita con base en especímenes colectados en Duaca, estado de Lara, Venezuela. *Lu. nuneztovari* está ubicada taxonómicamente en el grupo *verrucarum* del género *Lutzomyia*, por otro lado el esquema taxonómico de Galati (2010) propone ubicarla en el género *Pintomyia* Costa Lima, 1932 sugénero *Pifanomyia* Ortiz & Scorza, 1963, catalogándola como especie aislada.

Diagnosis

Macho: longitud de flagelómero I más corta que el labroepifaringe, presencia de una papila en flagelómero III. En el tórax se observa el escuto más pigmentado que la pleura. Los tergitos abdominales están desprovistos de papilas. Los especímenes machos de *Lu. nuneztovari* colectados poseen el gonoestilo típico de la serie *verrucarum* con dos espinas mediales y dos distales, las 4 espinas están insertadas directamente en la estructura y no implantadas en tuberculo. Gonocoxito sin tufo de setas en la región

media-apical, solamente basal. Ductos eyaculadores con una longitud no mayor a 4 veces la longitud e la bomba genital. Ápice de los filamentos genitales no inflados. Adeago simple y recto. Parámero con setas dorsales subiguales en tamaño (Figura 4-28).

Hembra: Ojos grandes cuya longitud es mayor a la del clípeo, el ancho de éstos es equivalente o mayor a la de la distancia interocular. En la antena, el flagelómero I es más corto que el labroepifaringe, se distingue la presencia de papilas en flagelómero III. La fórmula palpal es 1.4.3.2.5. En el tórax el escuto es más oscuro que la pleura (Figura 4-28). A pesar de que muchas de las especies del grupo v*errucarum* poseen hembras isomórficas (Young & Duncan, 1994), la parte terminal (knob) de las espermatecas de *Lu*. *nuneztovari* se distingue de las demás hembras miembros del grupo por exhibir forma de "*botón o capullo de flor*". Este carácter permitió con relativa facilidad identificar los ejemplares hembras colectados en el municipio de Salamina. Sin embargo, se requiere estudiar con mayores detalles su variabilidad morfológica, ya que Young y Duncan (1994) consideraron en su momento que *Lu*. *nuneztovari anglesi* descrita como una subespecie en Bolivia, es una sinonimia de *Lu*. *nuneztovari*, la cual exhibe mucha variabilidad morfológica (Young y Duncan, 1994). La separación molecular de esta especie de las demás del grupo *verrucarum* fueron verificadas en el presente estudio.

Distribución y bionomía

Lu. nuneztovari es una especie de extenso ámbito geográfico generalmente en la Región Andina (Bolivia, Perú, Colombia y Venezuela) y en Centroamérica (Guatemala, Honduras y Panamá) (Young y Duncan, 1994; Galati 2010). Se caracteriza por un patrón de baja abundancia y acompañamiento común de otras especies del grupo como *Lu. ovallesi*, *Lu. spinicrassa*, *L. torvida*, *Lu. youngi*, *Lu. longiflocosa*, *Lu. columbiana*, *Lu. saurodia*, *Lu. serrana* y *Lu. pia* (Alexander *et al.* 2001; Ferro *et al.* 1998a, Tesh *et al.* 1987; Alexander *et al.* 1992; Cárdenas *et al.* 1999), en alturas que oscilan entre los 850 y los 2.100msnm (Pardo *et al.* 1999, Alexander *et al.* 1992). Su actividad de picadura es endofágica con registros entre las 22:00-06:00 horas en estudios realizados en Bolivia (Le Pont *et al.* 1989). Inusualmente, esta especie también se ha observado picando durante el día en las plantaciones de café (Le Pont *et al.* 1989b). En el presente estudio, durante las colectas en el municipio de Salamina (en elevaciones entre 1590 y 1820 msnm), *Lu.*

nuneztovari fue colectada por búsqueda activa en arboles de sombra en cafetales (naranjo y aguacate), también en trampa CDC.

4.2.5 *Lutzomyia panamensis* (Shannon, 1926)

Phlebotomus panamensis Shannon 1926: 192. ♂♂
Phlebotomus panamensis Fairchild & Hertig 1951. ♂♂ y ♀♀
Psychodopygus panamensis. Lewis 1965

Estatus taxonómico

Lutzomyia panamensis fue descrita a partir de especímenes machos colectados en Zona del Canal, Panamá. Se encuentra ubicada taxonómicamente en el subgénero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941(Young y Duncan, 194). Por otra parte, Galati (2010) la considera al interior de la serie *panamensis* y el género *Psychodopygus*.

Diagnosis

Macho: adulto de aspecto pequeño, cuerpo no pigmentado (pálido). Fórmula palpal: 1. 4. 5. 2. 3. Palpómero 5 más corto que la mitad de la longitud del palpómero 3. Tórax con catepimero, pronoto pálido y ausencia de cerdas anepimerales. Genitalia: gonoestilo con 4 espinas en posición basal, espinas apicales bien desarrolladas, espina interna atrofiada. Parámero con el lóbulo dorsal principal que lleva dos mechones de cerdas espatuladas curvadas hacia el gonocoxito, el brazo ventral con 2 setas grandes, subapical y apical (Figura 4-29).

Hembra: Cuerpo no pigmentado. Fórmula palpal: 1. 4. 5. 2. 3. Palpómero 5 más corto que la mitad de la longitud del palpómero 3. Cibario conformado por 4 dientes horizontales, con una fila transversal de dientes verticales, los dientes ubicados en la parte madia marcadamente agrandados Área pigmentada conspicua triangular y arco cibarial completo. Tórax con catepimero y pronoto pálido y ausencia de cerdas anepimerales. Genitalia: espermateca quitinizadas e imbricadas con 13 anillos. Espermateca con anulación terminal en posición asimétrica. Los ductos individuales más cortos que el cuerpo de la espermateca, el ducto común de aspecto rugoso en la parte superior y liso en su parte basal (Figura 4-29).

Comentarios

La hembra de *Lu. panamensis* es morfológicamente similar a *Lu. yucumensis* (Le Pont, Caillard, Tibayrenc & Desjeux, 1986) y *Lu. nocticola* (Young, 1973) pero difieren la posición simétrica de la anulación y botón terminal de la espermateca.

En el caso del presente estudio disponer de las secuencias del código de barras para esta especie contribuye sin duda al conocimiento taxonómico y relaciones entre grupos y especies, aspecto de transcendencia a nivel general.

Distribución y bionomía

Se registra su presencia en México, Belize, Guatemala, Hondura, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Surinam, Guyana Francesa y Ecuador (Galati, 2010). Porter y De Foliart (1981) revisaron los hábitos antropofílicos, comportamiento y abundancia estacional de *Lu. panamensis* en Colombia. Esta especie tiene preferencia por reposar en el piso del bosque y es igualmente abundante en el período seco como en el lluvioso (Christensen *et al.* 1983). Aunque, es considerada antropofílica, también se alimenta de otros huéspedes prefiriendo roedores (Chaniotis *et al.* 1972). El presente estudio permite realizar el primer registro de *Lu. panamensis* próxima a cultivos cafeteros, colectándose en intra y peridomicilio en los municipios de Pueblo Rico, Samaná y la Victoria, con trampas de luz tipo CDC.

4.2.6 *Lutzomyia pia* (Fairchild & Hertig, 1961)

Phlebotomus pius Fairchild & Hertig, 1961. ♂♂ y ♀♀
Lutzomyia pia (Fairchild & Hertig, 1961): Theodor 1965
Pintomyia pia (Fairchild & Hertig, 1961): Galati 199*5*

Estatus taxonómico

Lutzomyia pia fue descrita a partir de especímenes, machos y hembras, colectados en Chiriquí, Panamá. Esta especie ha sido incluida en el grupo *oswaldoi* (Theodor 1965; Young 1979; Murillo y Zeledón, 1985). Sin embargo, otros estados de carácter sugieren que *Lu. pia* está estrechamente relacionada con las especies del grupo *verrucarum* (Young y Duncan, 1994). Así, según el esquema taxonómico propuesto por Young y Duncan (1994) esta definida como una especie no agrupada y por otra parte, Galati

(2010) la agrupa en el género *Pintomyia*, subgénero *Pifanomyia* de la serie *pia* Galati, 1995, junto a otras 8 especies, *Lu. torrealbai* Martins, Fernandez y Falcão, 1979; *Lu. valderramai* Cazorla, 1988; *Lu. reclusa* Fernandez y Rogers, 1991; *Lu. tihuiliensis* Le Pont, Torrez-Espejo y Dujardin,1997; *Lu. tocaniensis* Le Pont, Torrez-Espejo y Dujardin,1997; *Lu. limafalcaoae* (Wolff y Galati, 2002), *Lu. emberai* Bejarano, Duque y Vélez, 2004 y *Lu. suapiensis* (Le Pont, Torrez-Espejo & Dujardin, 1997)

Diagnosis

Macho: Gonóstilo con cinco espinas en posición 1.1.1.2. Gonocoxito con un tufo difuso de setas insertadas en el tercio medio de la estructura. Parámeros simples, sin protuberancia puntiaguda en la región preapical del margen ventral, con setas restringidas a la tercera parte de la estructura. Lóbulos laterales de ápice redondeado y de longitud equivalente al gonocoxito. La longitud de los ductos eyaculadores es 5 veces más larga que la bomba genital (Figura 4-30).

Hembra: Cibario con numerosos dientes afilados puntiagudos laterales a cada lado de los dientes horizontales. Tal lo mencionaron por Bejarano *et al* (2004), estas estructuras no se reflejan en las descripciones de esta especie disponibles hasta la fecha (Fairchild y Hertig 1961; Forattini 1973; Young 1979; Murillo y Zeledón, 1985, Young y Duncan, 1994). El número de dientes horizontales varió entre cuatro y seis, carácter señalado por Young (1979).Ascoides simples sobre el flagelómero II, sin sobrepasar el ápice del segmento, quinto palpómero más largo que el tercer palpómero. Longitud del labroepifaringe mayor a 350 µm. La pleura torácica está totalmente pigmentada (Figura 4-30). Genitalia: los individuos hembra de *Lu. pia* colectados, presentan la espermateca característica de las hembras de la serie pia, estriada en forma de saco con un anillo liso apical con bordes rectos. El ducto común es más largo, casi el doble, que los ductos individuales (Figura 4-30).

Comentarios

Hasta la fecha, solo cinco especies de la serie pia están registradas en Colombia, *Lu. pia*, *Lu. limafalcaoae*, *Lu. emberai*, *Lu. tihuiliensis* y *Lu. suapiensis*. Dentro de la serie pia, la hembra de *Lu. pia* se encuentra estrechamente relacionada con *Lu. tihuiliensis* pero se diferencia por caracteres de coloración de las pleuras torácicas, las cuales están parcialmente pigmentadas en su región basal en *Lu. tihuiliensis* (Pérez-Doria *et al.* 2008;

Galati 2010). Por su parte, el macho de *Lu. pia* es morfológicamente similar a *Lu. limafalcaoae*¸ pero se diferencian en la morfología del parámero, el cual es en su margen dorsal curveado con setas apicales restringida a la quinta parte de la estructura e esta última especie.

Distribución y bionomía

Lu. pia se registra en Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Perú y Bolivia. con un amplio rango altitudinal entre los 100 a 1900 msnm (Pérez *et al.* 1991; Alexander *et al.* 1995; Young y Duncan 1994; Galati 2010). En el presente estudio, en las colectas realizadas en Chinchiná dicha especie se encontró en diferentes altitudes 1300 y 1467 msnm y en Salamina a 1590 y 1820msnm.

4.2.7 *Lutzomyia shannoni* (Dyar, 1929)

Phlebotomus shannoni Dyar, 1929. ♂♂.

Sinonimia de Phlebotomus bigeniculatus Floch & Abonnenc, 1941 (Barretto 1946).
Phlebotomus limai Fonseca, 1935 (Barretto 1946).
Phlebotomus microcephalus Barretto & Duret, 1953 (Forattini 1973).
Phlebotomus pifanoi Ortiz, 1972 (Martins *et al.* 1978).

Estatus taxonómico

Dyar (1929), basado en la observación de tres ejemplares machos colectados en Cano Saddle, Lago Gatun, Panamá describió la especie *Lu. shannoni.* Taxonómicamente, *Lu. shannoni* se encuentra en el subgénero *Psathyromyia* Barretto, 1962, del género *Lutzomyia*, sin embargo algunos consideran (Galati 2010) este taxón dentro de la subtribu Psychodopygina, género *Psathyromyia* serie *shannoni* Fairchild, 1955.

Diagnosis

Macho: Flagelómero I corto que el labroepifaringe. Ascoides pareados y bifurcados, con prolongaciones largas sin sobrepasar la base del flagelómero, el quinto palpómero es más largo que el tercer palpómero, fórmula palpal 1. 4. 3. 2. 5. Tórax con pleuron menos pigmentado que el escuto. Genitalia: gonoestilo con 4 espinas distribuidas en dos planos, espina interna implantada en la mitad apical de la estructura. Los ductos eyaculadores

con ápice no dilatado, se observa un "velo" que cubre estas estructuras dese su base. La longitud de los ductos eyaculadores de longitud mayor (dos veces) que la bomba genital. En el parámero de forma digitiforme en su mitad apical, se aprecian cerdas en la región dorsal (Figura 4-31).

Hembra: Espermateca bananiforme de cuerpo liso con una envoltura externa. El ducto común es más largo que los ductos individuales. En el cibario se observan dos pares de dientes horizontales, el cibario está provisto por un arco cibarial completo y un área pigmentada. En el tórax el escuto está completamente pigmentado en contraste con las pleuras sin pigmentación, se evidencia una leve pigmentación en el anepisterno y región basal del catepisterno (Figura 4-31). Los caracteres morfológicos en la hembra mencionados son compartidos por *Lu. shannoni* y *Lu. abonnenci* (Young y Duncan, 1994; Galati 2010)

Comentarios

El macho de *Lu. shannoni* es morfológicamente similar a *Lu. volcanensis*, pero difieren por la presencia de setas en la región apical del margen ventral en el parámero (Galati, 2010) (Figura 4-31). La hembra de *Lu. shannoni* es morfológicamente similar a *L. abonnenci*, y para la primera de las especies se ha observado variabilidad morfométrica y genética en poblaciones de Colombia y EUA (Cárdenas *et al.* 2001; Florin, 2006) sugiriendo la existencia de un un complejo de especies.

Distribución y bionomía

Lutzomyia shannoni presenta una amplia distribución en Norte, Centro y Suramérica. Los adultos de *Lu. shannoni* han sido colectados por aspiración, a partir de troncos de árboles, también con trampas de luz. Bajo condiciones de laboratorio se ha evidenciado su preferencia alimenticia por hámster, ratón, ardilla, ternera, caballo, perro humano, zarigüeya y cerdo (Young y Duncan, 1994). Brinson *et al.* (1992) informan sobre la abundancia estacional, señalando que *Lu. shannoni* es abundante durante 4 meses, mayo a agosto.

4.2.8 *Lutzomyia trapidoi* (Fairchild & Hertig, 1952)

Phlebotomus trapidoi Fairchild & Hertig, 1952: ♂♂ y ♀♀

Lutzomyia trapidoi (Fairchild & Hertig, 1952) Barretto1962

Psychodopygus trapidoi (Fairchild & Hertig, 1952) Forattini 1971
Nyssomyia trapidoi (Fairchild & Hertig, 1961): Galati 1995

Estatus taxonómico

Lutzomyia trapidoi fue descrita a partir de especímenes, machos y hembras, colectados en Almirante, Bocas de Toro, Panamá. Según el esquema taxonómico propuesto por Young y Duncan (1994) es definida dentro del subgénero *Nyssomyia* género *Lutzomyia*. Por otra parte, Galati (2010) considera a esta especie dentro género *Nyssomyia* de la subtribu Psychodopygina Galati, 1995.

Diagnosis

Macho: Longitud del palpómero quinto mayor l tercero; fórmula palpal 1. 4. (2.3).5. En el tórax se observa el mesonoto oscuro en la región central de las cerdas presuturales, el escuto no pigmentado. La genitalia presenta estilo con 4 espinas en posición 2.2, donde la espina interna está implantada en la mitad de la estructura, el gonocoxito no presenta tufo de setas persistentes. Los filamentos genitales son cortos y simples, suavemente dilatados en su parte final. La relación de longitud entre los ductos eyaculadores y la bomba genital es menor o equivalente a 4:1.

Hembra: Cibario con una fila de (12-16) dientes horizontales, equidistantes, un arco cibarial y región pigmentada totalmente distinguibles, la parte superior de la faringe es estriada (Figura 4-35). Ascoides simples y cortos sobre el flagelómero II, quinto palpómero más largo que el tercer palpómero. La fórmula palpal corresponde a 1, 4; (2, 3), 5. El flagelómero II es menor en longitud al labroepifaringe. En el tórax: pronoto sin pigmentación. El cuerpo de la espermateca es completamente anillado, con 5 a 7 anulaciones, no se observan anillos incipientes, el eje knob es el mismo del cuerpo de la espermateca. El ducto común es ausente, los ductos individuales son cortos y sin estriaciones (apariencia lisa), en longitud los ductos individuales son dos veces más largos que la espermateca (Figura 4-35).

Comentarios

Hasta la fecha, solo 14 de las 20 especies que integran el subgénero *Nyssomyia* están registradas en Colombia, *Lutzomyia antunesi* (Coutinho, 1939), *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira, 1942), *Lutzomyia hernandezi* (Ortiz, 1965), *Lutzomyia olmeca bicolor*

(Fairchild & Theodor, 1971), *Lutzomyia reducta* (Feliciangeli, Ramirez Pérez & Ramirez, 1988), *Lutzomyia richardwardi* (Ready & Fraiha, 1981), *Lutzomyia shawi* (Fraiha, Ward & Ready, 1981), *Lutzomyia umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977), *Lutzomyia ylephiletor* (Fairchild & Hertig, 1952), *Lutzomyia yuilli yuilli* (Young & Porter, 1972) y *Lu. trapidoi.*
Los caracteres morfológicos que permiten diferenciar el macho de *Lu. trapidoi* de *Lu. anduzei* son la longitud del palpómero, la coloración del mesonoto y el ápice bifurcado de los ductos eyaculadores (Galati, 2010). Por su parte, la hembra de *Lu. trapidoi* puede distinguirse de *Lu. ylephiletor* por la completa pigmentación del mesonoto en la última.

Distribución y bionomía

Lu. trapidoi es una especies de amplia distribución geográfica. Además de Colombia, esta especie ha sido reportada en Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Ecuador (Zeledón, 1985; Young y Duncan, 1994; Galati, 2010). Durante el día desciende a nivel del suelo y reposa en el tronco de los árboles y en la hojarasca del suelo (Chaniotis *et al.* 1974, Alexander *et al.* 1992). Según algunos estudios en la variación estacional, los picos más importantes de *Lu. trapidoi* se evidencian en julio y en diciembre/enero, pero prevalece durante todo el año. La actividad de picadura es nocturna y se registrada entre las 20:00 y 21:00 y de nuevo de 03:00-04:00 horas. Otros reportes mencionan la actividad de picadura entre 23:00-05:00 horas (Anónimo, 1998; Ferro *et al.* 2005). Durante el día desciende a nivel del suelo y reposa en el tronco de los árboles y en la hojarasca del suelo (Chaniotis *et al.* 1974). *Lu. trapidoi* se alimenta de un amplio rango de hospederos, incluyendo animales reservorios de *Le. panamensis* como el perezoso *Choloepus hoffmanni* (Chaniotis *et al.* 1974). En el presente estudio las colectas de *Lu. trapidoi* en los municipios de Victoria y Samaná, se realizaron en los meses de julio y octubre, respectivamente, lo que evidencia la prevalencia de *Lu. trapidoi* en esta época.

4.2.9 *Lutzomyia youngi* Feliciangeli & Murillo, 1987

Estatus taxonómico

Esta especie fue descrita a partir de ejemplares, hembras y machos, colectados en el estado de Trujillo, Venezuela y Costa Rica, identificados erróneamente como *Lutzomyia*

townsendi (Ortiz,1959). De acuerdo a la agrupación taxonómica de Young y Duncan (1994), *Lu. youngi* pertenece al grupo *verrucarum* del género *Lutzomyia*, sin embargo Galati (2010) la considera dentro género *Pintomyia* subgénero *Pifanomyia*, serie *townsendi* Galati, 1995,), junto a otras 8 especies, que corresponden a *Lutzomyia amilcari* (Arredondo, 1984), *Lutzomyia longiflocosa* (Osorno-Mesa, Morales, Osorno & Hoyos, 1970), *Lutzomyia nadiae* (Feliciangeli, Arredondo & Ward, 1992), *Lutzomyia quasitownsendi* (Osorno, Osorno-Mesa & Morales, 1972), *Lutzomyia sauroida* (Osorno-Mesa, Morales & Osorno, 1972), *Lutzomyia spinicrassa* (Morales, Osorno-Mesa, Osorno & Hoyos, 1969), *Lutzomyia torvida* (Young, Morales & Ferro, 1994) y *Lu. townsendi*.

Diagnosis

Macho: Gonoestilo con cuatro espinas, tres espinas distales y una espina basal aislada (Bejarano *et al.* 2003; Galati, 2010). La espina apical es ligeramente más gruesa que la preapical. El gonocoxito con un tufo basal de setas que alcanzan hasta la mitad dorsal del parámero. El parámero en su margen dorsal con setas restringidas al cuarto apical, cuya longitud es menor o subigual al ancho del área donde se implantan (Figura 4-37).

Hembra: Cabeza: ojos grandes, de mayor longitud que el clípeo y mayor o subigual a la distancia interocular. Cibario con cuatro dientes horizontales, equidistantes, presencia de arco cibarial y región pigmentada, la parte superior de la faringe es estriada con líneas cortas. Los ascoides son simples y cortos sobre el flagelómero II. En el palpómero quinto se observa La fórmula palpal corresponde a 1, 4; (2, 3), 5. Los ejemplares de *Lu. youngi* colectados en el presente estudio, presentan la espermateca característica de las hembras de la serie *townsendi*, estriada en forma de saco con un anillo apical más estrecho que el cuerpo, el knob de las espermatecas se inserta en el anillo apical.

Comentarios

Dentro de las 9 especies que integran la serie *townsendi*, el macho de *Lu. youngi* se encuentra estrechamente relacionada con *Lu. townsendi* y *Lu. quasitownsendi*, pero difieren por sutiles diferencias en la setación (Young y Duncan, 1994). Las hembras dentro de la serie *townsendi*, donde son indistinguibles (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010), por tanto la identificación se realiza por asociación geográfica con el macho

Distribución y bionomía

Lu. youngi es una especie neotropical, con una distribución geográfica en Costa Rica, Venezuela y Colombia. En estos dos últimos países ha asociada a ecosistemas cafeteros y en Colombia presenta registros puntuales entre las cordilleras occidental y oriental, Antioquia, Caldas y Valle del Cauca, lo que demuestra una adaptación evolutiva a las grandes alturas (Warburg *et al.* 1991; Bejarano *et al.* 2003; Bejarano, 2006). Scorza & Spooner (1982); Scorza *et al.* (1985) y Alexander *et al.* (1994) sugieren que el fruto maduro del cafeto puede servir como fuente de azúcar para *Lutzomyia youngi* y puede facilitar el desarrollo de parásitos de *Leishmania* en los vectores. Los estudios sobre abundancia de *Lu. youngi* en Colombia sugieren un pico en agosto que coincide con el final del período seco y el comienzo de las primeras lluvias y una disminución cuando las lluvias sobrepasan los 90 mm. En segundo lugar indican que los picos nocturnos coinciden con la disminución de la temperatura y el aumento de la humedad (Alexander *et al.* 1995a). *Lu. youngi* ha sido colectada en Costa Rica en altitudes entre 900-1200m picando a humanos y en trampas tipo CDC (Murillo y Zeledón, 1985), en Venezuela, se ha registrado su presencia entre en los 800 y 1900 (Mogollón *et al.* 1977), por su parte en Colombia *Lu. youngi* a sido colectada entre los 1.375 y 1600 msnm, (Alexander *et al.* 1992, Alexander *et al.* 1995a,b; Alexander *et al.* 2001). En el presente estudio esta especie fue colectada en el municipio de Salamina a 1820 msnm por búsqueda activa, también, por trampa CDC y shannon entre 1300 y 1600 msnm; en municipio de Chinchiná fue colectada a 1330 msnm por trampa CDC.

4.2.10 *Lutzomyia yuilli yuilli* (Young & Porter, 1972)

Lutzomyia yuilli yuilli Young & Porter 1972. ♂♂ y ♀♀

Sinonimia *Lutzomyia fraihai* Martins, Falcão & Silva, 1979 (Vexenat *et al.* 1986).

Estatus taxonómico

Lutzomyia yuilli yuilli fue descrita a partir de ejemplares machos y hembras colectados en Rio Anori, Antioquia, Colombia. Según el esquema taxonómico propuesto por Young y Duncan (1994) es definida dentro del subgénero *Nyssomyia* género *Lutzomyia*. Por otra parte, Galati (2010) considera esta especie dentro género *Nyssomyia* de la subtribu Psychodopygina.

Diagnosis

Macho: Longitud del palpómero quinto mayor que el tercero; fórmula palpal 1. 4. (2.3).5. Palpómero quinto de longitud menor o equivalente a la longitud del tercer palpómero. En el tórax escuto sin pigmentación, mesonoto claro en la región central, Paratergito claro. El gonoestilo presenta cuatro espinas, las espinas basales son pareadas y la espina interna está implantada en la mitad de la estructura. Gonocoxito sin tufo de setas persistentes en la región media. Parámero: Región basal (medida en el margen ventral donde termina el codo) excede un 1/3 el área apical; y en su borde posterior, revestimiento denso setas largas. Ápices de los ductos eyaculadores en forma de púas (Figura 4-39).

Hembra: Cibario con una fila de (12-16) dientes horizontales, más o menos equidistantes, un arco cibarial y región pigmentada bien demarcadas, la parte superior de la faringe es estriada. Ascoides simples y cortos sobre el flagelómero II, quinto palpómero más largo que el tercer palpómero. La fórmula palpal corresponde a 1, 4; (2, 3), 5. El flagelómero II es menor en longitud al labroepifaringe. El cuerpo de la espermateca es anillado, en su parte apical conde mayor tamaño. Los ductos espermáticos individuales en su mayoría con pápulas esclerosadas fuertemente distribuidos de forma continua, como un patrón de pluma, en la base de los ductos éstos son más grandes. Porción basal del ducto individual mayor que la porción distal. Ducto común corto, no se extiende a 1/3 distal de la furca genital, lo que se corresponde con los caracteres diagnósticos propuestos por Young & Porter para *Lu*. *yuilli. Yuilli* (Figura 4-39).

Comentarios

Dentro de las 20 especies que integran el subgénero *Nyssomyia*, *Lu. yuilli yuilli* se encuentra estrechamente relacionada con *Lu. yuilli pajoti* (Abonnenc, Léger & Fauran 1979), pero difieren en el macho por la longitud de la región basal del parámero y en la hembra por los ductos individuales que presentan pápulas esféricas ampliamente distribuidas en la estructura.

Distribución y bionomía

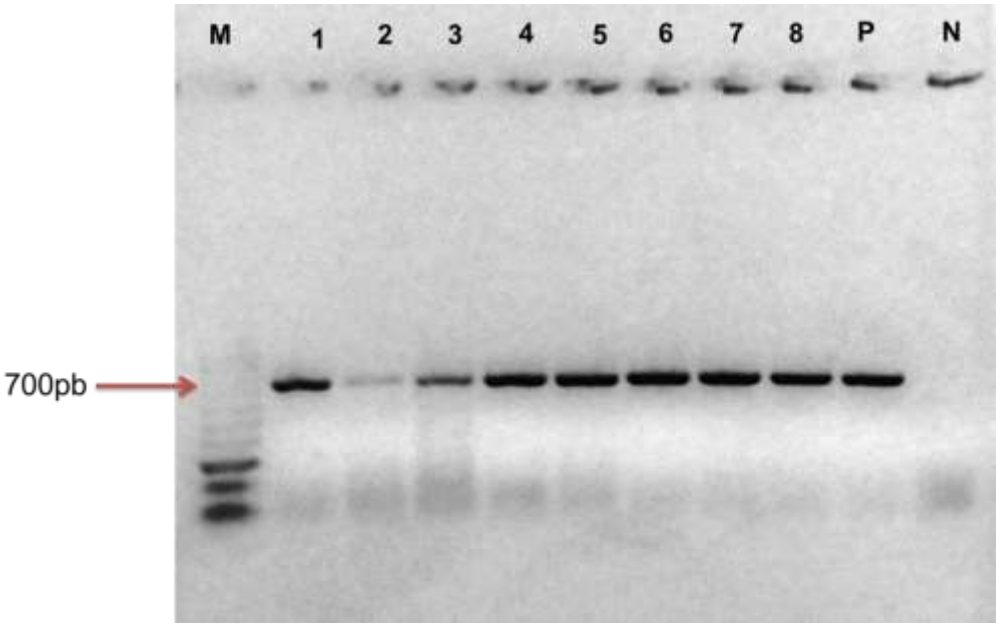
Distribución restringida algunos países de Suramérica, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil. Esta especie había sido considerada como exclusiva de áreas boscosas en diferentes países de Suramérica (Young 1979; Ferro *et al.* 2005) pero en los últimos años se ha demostrado su adaptación a ambientes modificados por el hombre

encontrándose en cultivos así como en el peri e intradomicilio (López *et al.* 1996; Alexander *et al.* 2001; Santamaría *et al.* 2006).

4.3 Identificación molecular de adultos colectados en la zona de estudio

El ADN genómico fue extraído de 126 muestras, como se describió en la sección 4.5.1. Se obtuvieron concentraciones de ADN extraído con los cuales se obtuvieron reacciones exitosas de PCR fueron entre 10 y 40 ng. El tamaño aproximado del producto amplificado fue de 700 pb. (Figura 4-43).

Figura 4-43: Gel de agarosa TE 0.8% con los productos amplificados de COI para los flebotomíneos colectados en zona cafetera.



Línea: M= Marcador de peso molecular; 1-8 flebotomíneos colectados en zona cafetera; P= Control positivo; N= Control negativo.

Considerando las muestras positivas para PCR y secuenciación, noventa y un ejemplares pertenecientes a 21 especies morfológicamente identificadas fueron tipificados por medio de código de barras de ADN en este estudio, también, se incluyeron 3 morfotipos (*Brumptomyia* sp., *Lu. (Helcocyrtomyia)* sp. 1 y *Lu. (Helcocyrtomyia)* sp. 2)

que presentaron limitaciones de identidad a nivel de especie en (Sección 4.1)(Tabla 4-8). Los detalles de colecta de los especímenes y el código de la secuencia por especímen se observan en el Tabla 4-9. Cabe resaltar que todas las secuencias obtenidas en este estudio serán sometidas a GenBank y también estarán disponibles en la plataforma de BOLD Systems (http://www.boldsystems.org), proyecto "Phlebotominae Barcoding Initiative – PBIN".

Tabla 4-7: Especímenes utilizados para obtención y análisis de secuencias COI.

Especie	Identificado*	No identificado †	Total
Brumptomyia beaupertuyi	1	0	1
Brumptomyia guimaresi	1	0	1
Brumptomyia sp.	0	2	2
Lutzomyia bifoliata	3	0	3
Lutzomyia carpenteri	2	0	2
Lutzomyia carrerai thula	5	0	5
Lutzomyia columbiana	5	0	5
Lutzomyia gomezi	5	0	5
Lutzomyia hartmanni	4	0	4
Lutzomyia lichyi	1	0	1
Lutzomyia nuneztovari	2	0	2
Lutzomyia panamensis	5	0	5
Lutzomyia pia	15	0	15
Lutzomyia scorzai	5	0	5
Lutzomyia shannoni	1	0	1
Lutzomyia sordelli	2	0	2
Lutzomyia trapidoi	6	0	6
Lutzomyia triramula	6	0	6
Lutzomyia walkeri	2	0	2
Lutzomyia youngi	1	0	1
Lutzomyia yuilli	8	0	8
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 1	0	2	2
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 2	0	4	4
Warileya rotundipennis	3	0	3

***** Especímenes flebotomíneos identificados morfológicamente fueron sugeridos para tipificación con la secuencia código de barras de ADN COI**.**
†Especímenes no identificados morfológicamente fueron sugeridos para tipificación con la secuencia código de barras de ADN COI.

Tabla 4-8: Detalles de colecta y códigos de secuencias de los especímenes para los cuales se obtuvieron secuencias COI.

Nº de Aislado	Especie	Sexo	Departamento	Localidad	Código de referencia	Código de secuencia
1	*Brumptomyia beaupertuyi*	M	Antioquia	Jericó	PPCO3671	MA80_Br_beapertuyi_Jerico
2	*Brumptomyia guimaraesi*	M	Caldas	Chinchiná	PPCO3672	MA84_Br_guimareasi_Chin
3	*Brumptomyia* sp.	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3673	MA82_Br_sp_Hembra_Chin
4	*Brumptomyia* sp.	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3674	MA83_Br_sp_Hembra_Chin
5	*Lutzomyia bifoliata*	M	Caldas	Victoria	PPCO3675	MA46_Lu_bifoliata_Vic
6	*Lutzomyia bifoliata*	M	Caldas	Victoria	PPCO3676	MA47_Lu_bifoliata_Vic
7	*Lutzomyia bifoliata*	F	Caldas	Victoria	PPCO3677	MA48_Lu_bifoliata_Vic
8	*Lutzomyia carpenteri*	F	Caldas	Victoria	PPCO3678	MA60_Lu_carpenteri_Vic
9	*Lutzomyia carpenteri*	F	Caldas	Victoria	PPCO3679	MA61_Lu_carpenteri_Vic
10	*Lutzomyia carrerai thula*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3680	MA16_Lu_carreraithula_Chin
11	*Lutzomyia carrerai thula*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3681	MA17_Lu_carreraithula_Chin
12	*Lutzomyia carrerai thula*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3682	MA18_Lu_carreraithula_Chin
13	*Lutzomyia carrerai thula*	M	Caldas	Chinchiná	PPCO3683	MA19_Lu_carreraithula_Chin
14	*Lutzomyia carrerai thula*	M	Caldas	Chinchiná	PPCO3684	MA20_Lu_carreraithula_Chin
15	*Lutzomyia columbiana*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3685	MA14_Lu_columbiana_Chin
16	*Lutzomyia columbiana*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3686	MA15_Lu_columbiana_Chin
17	*Lutzomyia columbiana*	F	Caldas	Salamina	PPCO3687	MA92_Lu_columbiana_Sala
18	*Lutzomyia columbiana*	M	Caldas	Salamina	PPCO3688	MA93_Lu_columbiana_Sala
19	*Lutzomyia columbiana*	M	Caldas	Salamina	PPCO3689	MA94_Lu_columbiana_Sala
20	*Lutzomyia gomezi*	F	Caldas	Victoria	PPCO3690	MA33_Lu_gomezi_Vic
21	*Lutzomyia gomezi*	M	Caldas	Victoria	PPCO3691	MA97_Lu_gomezi_Vic
22	*Lutzomyia gomezi*	M	Valle del Cauca	Alcalá	PPCO3692	MA34_Lu_gomezi_Alcala
23	*Lutzomyia gomezi*	F	Valle del Cauca	Alcalá	PPCO3693	MA35_Lu_gomezi_Alcala
24	*Lutzomyia gomezi*	M	Valle del Cauca	Alcalá	PPCO3694	MA36_Lu_gomezi_Alcala
25	*Lutzomyia hartmanni*	M	Caldas	Victoria	PPCO3695	MA37_Lu_hartmanni_Vic
26	*Lutzomyia hartmanni*	F	Caldas	Victoria	PPCO3696	MA38_Lu_hartmanni_Vic
27	*Lutzomyia hartmanni*	F	Caldas	Victoria	PPCO3697	MA85_Lu_hartmanni_Vic
28	*Lutzomyia hartmanni*	M	Caldas	Victoria	PPCO3698	MA86_Lu_hartmanni_Vic
29	*Lutzomyia lichyi*	M	Quindío	Quimbaya	PPCO3699	MA62_Lu_lichyi_Quimbaya
30	*Lutzomyia nuneztovari*	F	Caldas	Salamina	PPCO3700	MA42_Lu_nuneztovari_Sala
31	*Lutzomyia nuneztovari*	M	Caldas	Salamina	PPCO3701	MA50_Lu_nuneztovari_Sala
32	*Lutzomyia panamensis*	F	Caldas	Victoria	PPCO3702	MA66_Lu_panamensis_Vic
33	*Lutzomyia panamensis*	F	Caldas	Victoria	PPCO3703	MA67_Lu_panamensis_Vic
34	*Lutzomyia panamensis*	F	Caldas	Victoria	PPCO3704	MA68_Lu_panamensis_Vic

35	*Lutzomyia panamensis*	M	Caldas	Victoria	PPCO3705	MA69_Lu_panamensis_Vic
36	*Lutzomyia panamensis*	M	Caldas	Victoria	PPCO3706	MA89_Lu_panamensis_Vic
37	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3707	AM1_Lu_pia_Chin
38	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3708	AM2_Lu_pia_Chin
39	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3709	AM3_Lu_pia_Chin
40	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3710	AM4_Lu_pia_Chin
41	*Lutzomyia pia*	M	Caldas	Chinchiná	PPCO3711	MA5_Lu_pia_Chin
42	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3712	AM6_Lu_pia_Chin
43	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3713	MA7_Lu_pia_Chin
44	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Chinchiná	PPCO3714	MA9_Lu_pia_Chin
45	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Salamina	PPCO3715	MA10_Lu_pia_Sala
46	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Salamina	PPCO3716	MA11_Lu_pia_Sala
47	*Lutzomyia pia*	M	Caldas	Salamina	PPCO3717	MA12_Lu_pia_Sala
48	*Lutzomyia pia*	M	Caldas	Salamina	PPCO3718	MA13_Lu_pia_Sala
49	*Lutzomyia pia*	M	Caldas	Salamina	PPCO3719	MA53_Lu_pia_Sala
50	*Lutzomyia pia*	M	Caldas	Salamina	PPCO3720	MA54_Lu_pia_Sala
51	*Lutzomyia pia*	F	Caldas	Salamina	PPCO3721	MA98_Lu_pia_Sala
52	*Lutzomyia scorzai*	M	Antioquia	Jardín	PPCO3722	MA70_Lu_scorzai_Jardin
53	*Lutzomyia scorzai*	M	Antioquia	Jardín	PPCO3723	MA71_Lu_scorzai_Jardin
54	*Lutzomyia scorzai*	M	Antioquia	Jardín	PPCO3724	MA72_Lu_scorzai_Jardin
55	*Lutzomyia scorzai*	M	Antioquia	Jardín	PPCO3725	MA79_Lu_scorzai_Jardin
56	*Lutzomyia scorzai*	M	Antioquia	Jardín	PPCO3726	MA96_Lu_scorzai_Jardin
57	*Lutzomyia shannoni*	M	Quindío	Quimbaya	PPCO3727	MA63_Lu_shannoni_Quimbaya
58	*Lutzomyia sordelli*	F	Caldas	Victoria	PPCO3728	MA64_Lu_sordelli_Vic
59	*Lutzomyia sordelli*	F	Caldas	Victoria	PPCO3729	MA65_Lu_sordelli_Vic
60	*Lutzomyia trapidoi*	M	Caldas	Victoria	PPCO3730	MA22_Lu_trapidoi_Vic
61	*Lutzomyia trapidoi*	M	Caldas	Victoria	PPCO3731	MA23_Lu_trapidoi_Vic
62	*Lutzomyia trapidoi*	M	Caldas	Victoria	PPCO3732	MA24_Lu_trapidoi_Vic
63	*Lutzomyia trapidoi*	F	Caldas	Victoria	PPCO3733	MA25_Lu_trapidoi_Vic
64	*Lutzomyia trapidoi*	F	Caldas	Victoria	PPCO3734	MA26_Lu_trapidoi_Vic
65	*Lutzomyia trapidoi*	M	Caldas	Samaná	PPCO3735	MA32_Lu_trapidoi_Vic
66	*Lutzomyia triramula*	M	Caldas	Victoria	PPCO3736	MA21_Lu_triramula_Vic
67	*Lutzomyia triramula*	M	Caldas	Victoria	PPCO3737	MA27_Lu_triramula_Vic
68	*Lutzomyia triramula*	M	Caldas	Victoria	PPCO3738	MA28_Lu_triramula_Vic
69	*Lutzomyia triramula*	F	Caldas	Victoria	PPCO3739	MA29_Lu_triramula_Vic
70	*Lutzomyia triramula*	F	Caldas	Victoria	PPCO3740	MA30_Lu_triramula_Vic
71	*Lutzomyia triramula*	F	Caldas	Victoria	PPCO3741	MA88_Lu_triramula_Vic
72	*Lutzomyia walkeri*	F	Caldas	Victoria	PPCO3742	MA81_Lu_walkery_Vic
73	*Lutzomyia walkeri*	M	Caldas	Samaná	PPCO3743	MA58_Lu_walkery_Vic
74	*Lutzomyia youngi*	M	Caldas	Salamina	PPCO3744	MA91_Lu_youngi_Sala
75	*Lutzomyia yuilli*	F	Caldas	Victoria	PPCO3745	MA39_Lu_yuilli_Vic

76	*Lutzomyia yuilli*	F	Caldas	Victoria	PPCO3746	MA40_Lu_yuilli_Vic
77	*Lutzomyia yuilli*	F	Caldas	Victoria	PPCO3747	MA41_Lu_yuilli_Vic
78	*Lutzomyia yuilli*	M	Caldas	Victoria	PPCO3748	MA43_Lu_yuilli_Vic
79	*Lutzomyia yuilli*	M	Caldas	Victoria	PPCO3749	MA44_Lu_yuilli_Vic
80	*Lutzomyia yuilli*	F	Caldas	Samaná	PPCO3750	MA45_Lu_yuilli_Vic
81	*Lutzomyia yuilli*	F	Caldas	Samaná	PPCO3751	MA51_Lu_yuilli_Vic
82	*Lutzomyia yuilli*	M	Caldas	Samaná	PPCO3752	MA52_Lu_yuilli_Vic
83	*Lutzomyia (Helcocyrtomyia)* sp. 1	M	Antioquia	Jardín	PPCO3756	MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1_Jardin
84	*Lutzomyia (Helcocyrtomyia)* sp. 1	M	Antioquia	Jardín	PPCO3757	MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1_Jardin
85	*Lutzomyia (Helcocyrtomyia)* sp. 2	F	Antioquia	Jardín	PPCO3758	MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2_Jardin
86	*Lutzomyia (Helcocyrtomyia)* sp. 2	F	Antioquia	Jardín	PPCO3759	MA74_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2_Jardin
87	*Lutzomyia (Helcocyrtomyia)* sp. 2	F	Antioquia	Jardín	PPCO3760	MA75_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2_Jardin
88	*Lutzomyia (Helcocyrtomyia)* sp. 2	F	Antioquia	Jardín	PPCO3761	MA76_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2_Jardin
89	*Warileya rotundipennis*	F	Antioquia	Jardín	PPCO3753	MA56_Wa_rotundipennis_Jeri
90	*Warileya rotundipennis*	M	Antioquia	Jardín	PPCO3754	MA57_Wa_rotundipennis_Jeri
91	*Warileya rotundipennis*	F	Antioquia	Jardín	PPCO3755	MA95_Wa_rotundipennis_Jeri

4.3.1 Alineamiento, composición y divergencia nucleotídica

La longitud de las secuencias editadas y alineadas de COI fue de 711 pb (Figura 4-45). Ésto corresponde con las posiciones 16 a 726 del gen mitocondrial COI en *Aedes aegypti* (NC_010241.1), usado como genoma de referencia, este segmento, en efecto, corresponde al propuesto por Hebert *et al.* (2003) como la región código de barras para la identificación de especies. Se confirmó la ausencia de NUMTs en las secuencias obtenidas considerando que no se obtuvieron dobles bandas de PCR o picos dobles en cromatogramas, así mismo, no se observaron eventos indel (inserción- delección) (4- 45).

A lo largo de las 711 posiciones de las secuencias alineadas, 448 posiciones (63%) fueron conservadas, mientras que 263 posiciones (37%) fueron variables. El análisis de entropía evidenció una variabilidad distribuida casi homogéneamente a lo largo de todo el fragmento secuenciado, salvo por el ligero aumento registrado en algunas posiciones nucleotídicas (Figura 4-44).

Al estimar la composición nucleotídica (A, G, C y T) en las 91 secuencias se encontró una alta proporción de A+T (66.3%), con una relación de G+C de 33.7%. En el género *Warileya* se encontró que el contenido de G + C es relativamente menor (32.4%) que en

los géneros *Lutzomyia* (33.7%) y *Brumptomyia* (34.6%). En el uso de codones en las secuencias *COI* de flebotomíneos obtenidas en este estudio, se observó claramente una preferencia por la terminación A ó T en los tripletas, A+T tercera posición (87.6%), A+T segunda posición (56.9%) y A+T primera posición (54.3%).

Se caracterizaron 63 haplotipos, 57 del género *Lutzomyia*, 4 de *Brumptomyia* y 2 de *Warileya*. El número de haplotipos varió entre 1 y 6 para cada especie (Tabla 4-10), y en la mayoría de las especies se obtuvieron haplotipos variables a excepción de *Lu. bifoliata; Lu. carpenteri, Lu. nuneztovari, Lu. walkeri y Lu. (Helcocyrtomyia)* sp. 1, que exhibieron haplotipos únicos en diferentes especímenes. El mayor número de haplotipos fue observado en *Lu. trapidoi* (6 haplotipos), seguido de *Lu. gomezi* (5), *Lu. carrerai thula* (5), *Lu. columbiana* (5), *Lu. panamensis* (4). En relación a las diferencias en términos de número y tipo de sustituciones entre los diferentes haplotipos de una misma especie a lo largo del alineamiento, los resultados evidencian 2 a 35 posiciones variables y los cambios nucleótidos son en su mayoría sustituciones sinónimas tipo transiciones (purina por purina y pirimidina por pirimidina) en las terceras posiciones (Figura 4-45 y tabla 4-10).

Figura 4-44: Gráfica de entropía de la secuencia de nucleótidos dentro de la región código de barras del gen Citocromo oxidasa I.

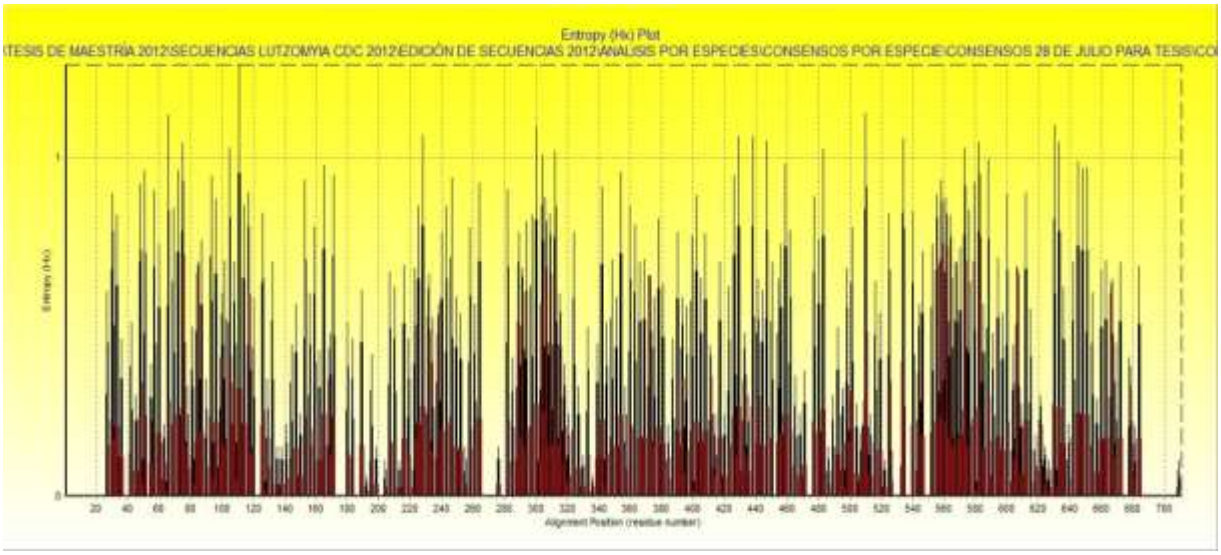
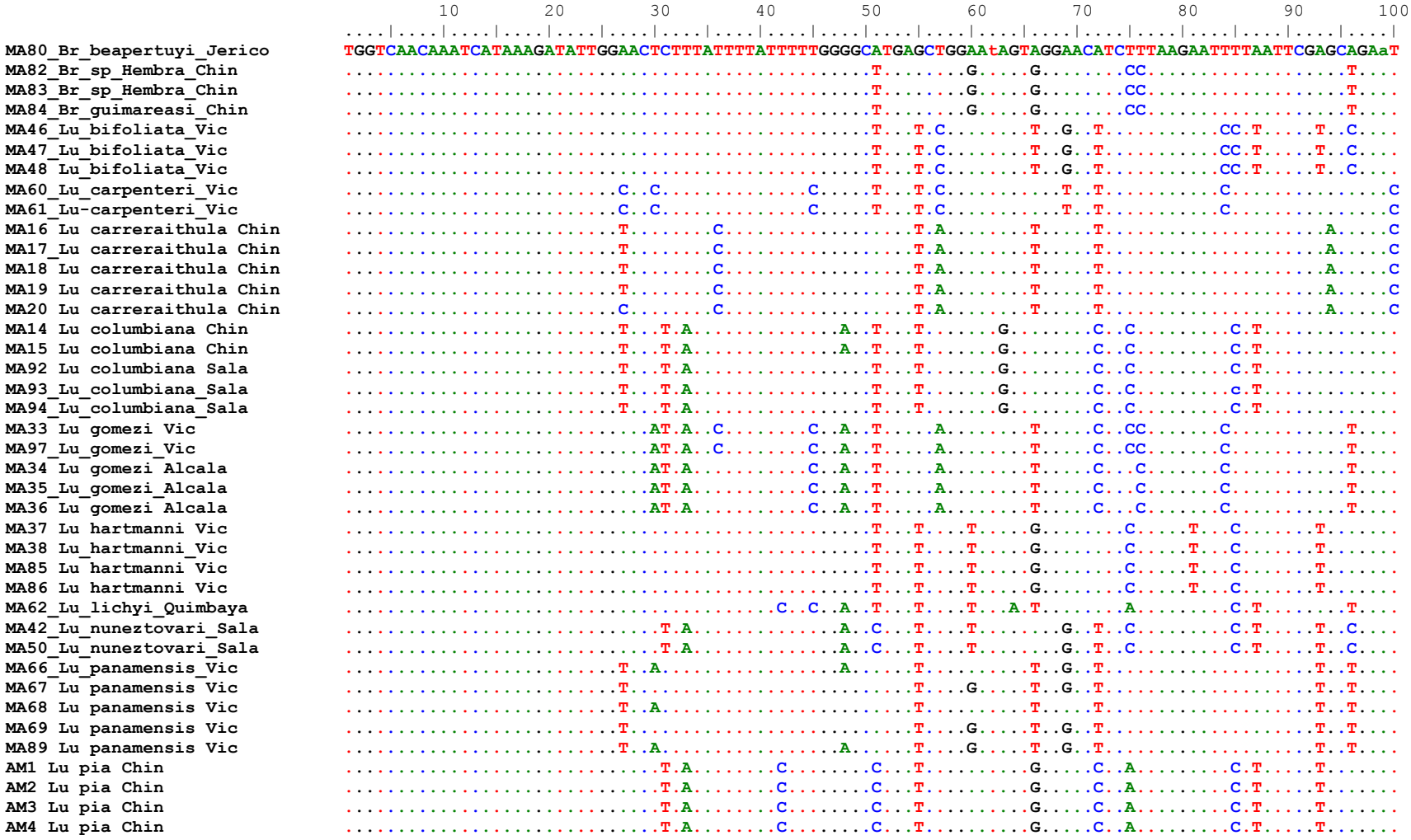
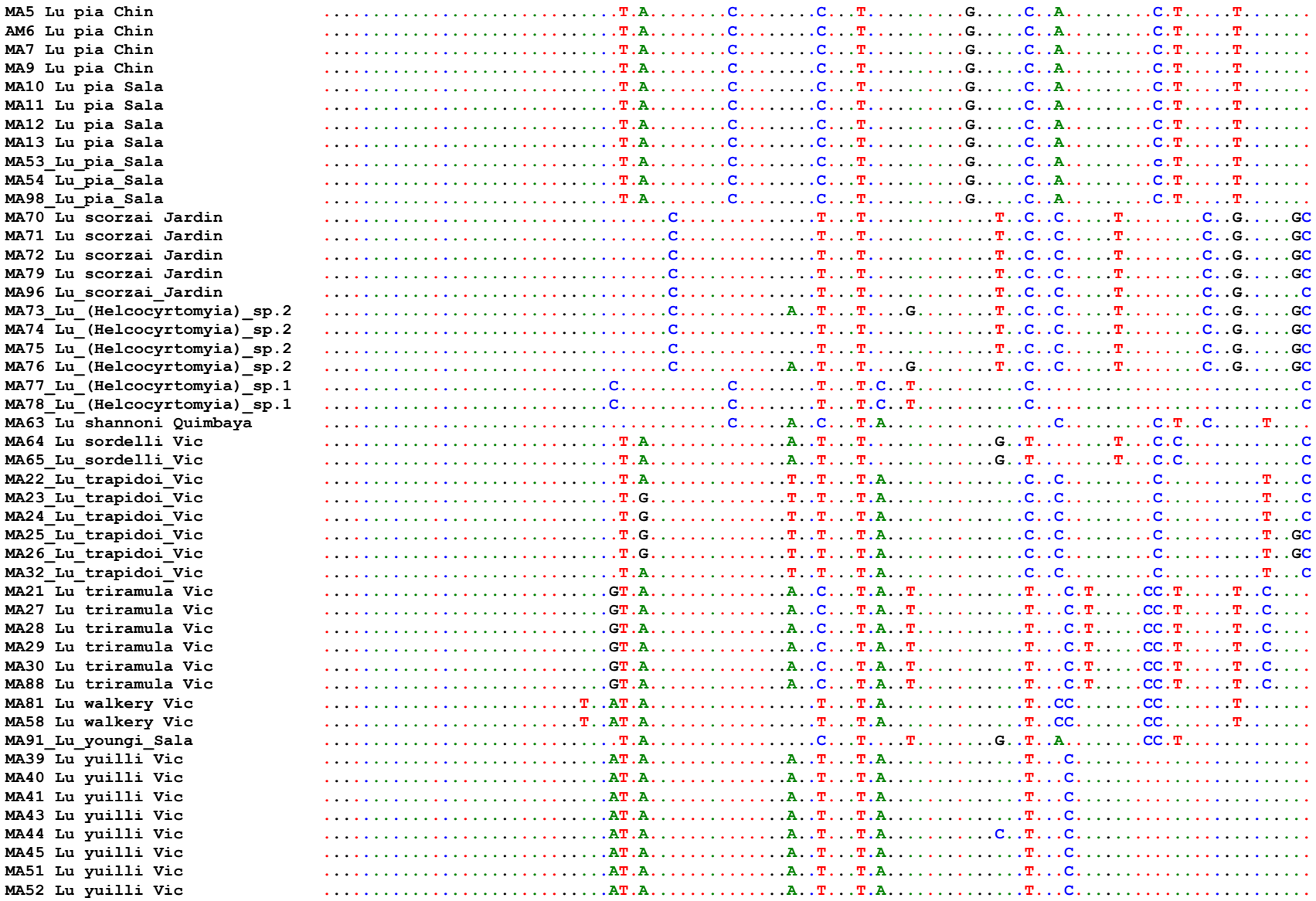
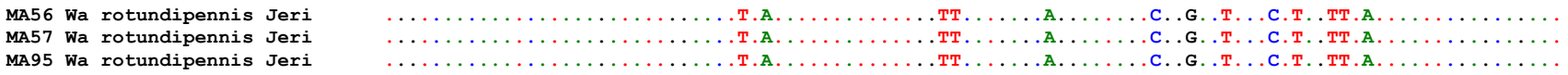


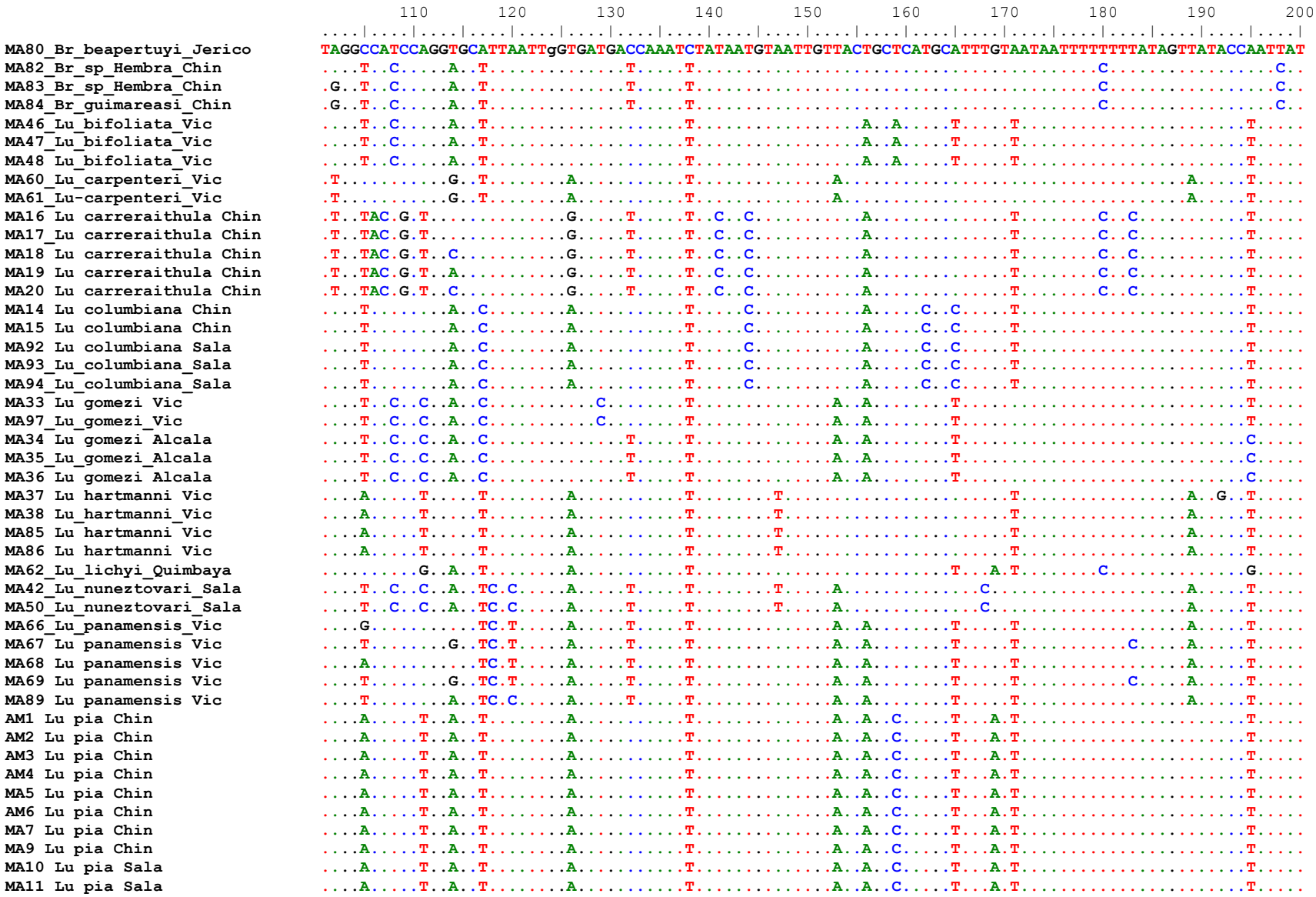
Figura 4-45: Alineamiento múltiple de 711 nucleótidos del extremo 5' del gen Citocromo oxidasa I, para 24 especies de flebotomíneos colectadas en áreas de influencia cafetera.
El alineamiento se interpreta de la siguiente manera: cada nucleótido es representado por una letra, así: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T). La numeración de la parte superior debe ser interpretada de izquierda a derecha y de arriba (posición nucleotídica). Los puntos indican homología entre los diferentes haplotipos.

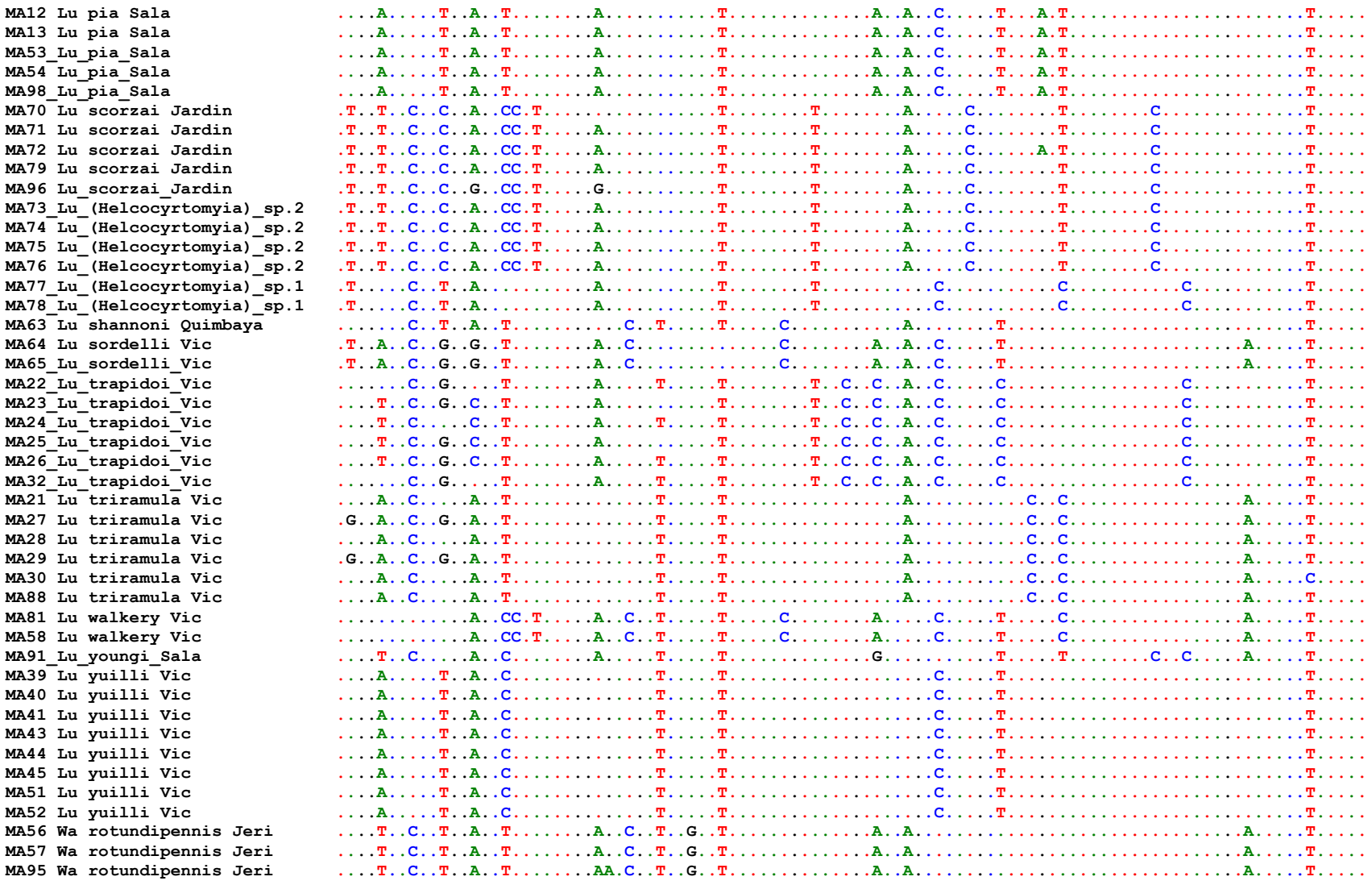
POSICIONES NUCLEOTÍDICAS

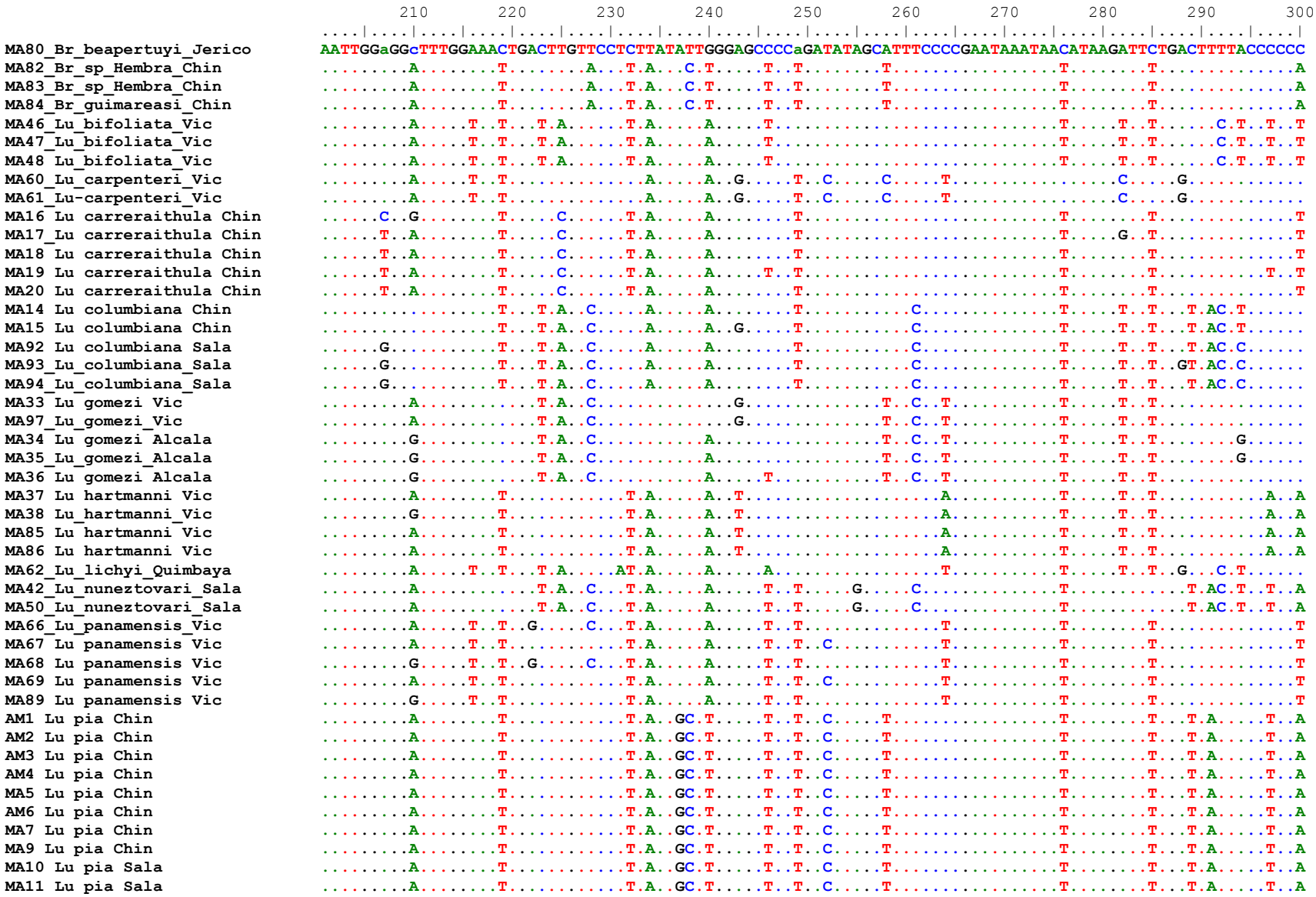


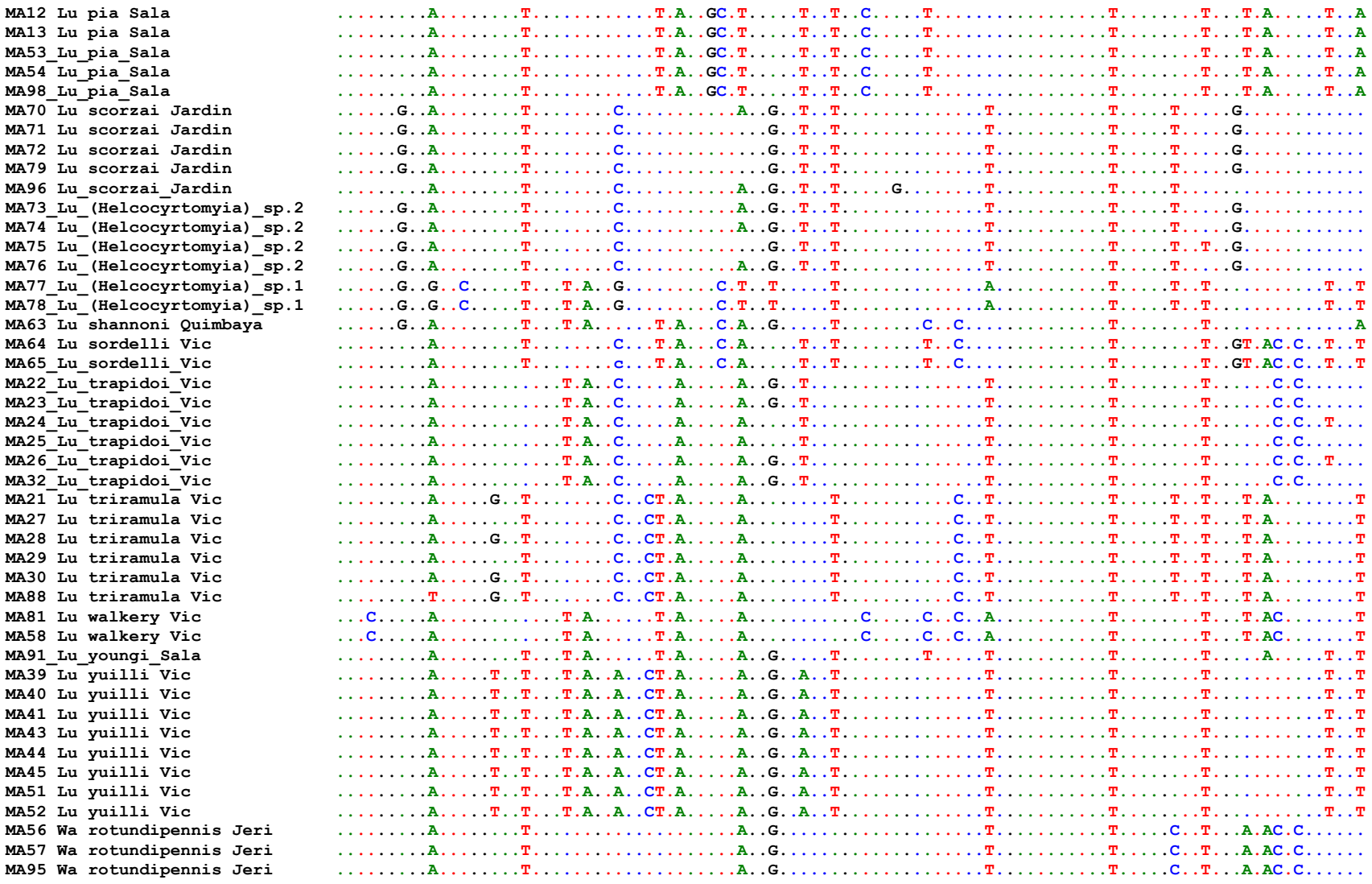

MA5 Lu pia Chin
AM6 Lu pia Chin
MA7 Lu pia Chin
MA9 Lu pia Chin
MA10 Lu pia Sala
MA11 Lu pia Sala
MA12 Lu pia Sala
MA13 Lu pia Sala
MA53_Lu_pia_Sala
MA54 Lu_pia_Sala
MA98_Lu_pia_Sala
MA70 Lu scorzai Jardin
MA71 Lu scorzai Jardin
MA72 Lu scorzai Jardin
MA79 Lu scorzai Jardin
MA96 Lu_scorzai_Jardin
MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA74 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA75 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA76 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA63 Lu shannoni Quimbaya
MA64 Lu sordelli Vic
MA65_Lu_sordelli_Vic
MA22_Lu_trapidoi_Vic
MA23_Lu_trapidoi_Vic
MA24_Lu_trapidoi_Vic
MA25_Lu_trapidoi_Vic
MA26_Lu_trapidoi_Vic
MA32_Lu_trapidoi_Vic
MA21 Lu triramula Vic
MA27 Lu triramula Vic
MA28 Lu triramula Vic
MA29 Lu triramula Vic
MA30 Lu triramula Vic
MA88 Lu triramula Vic
MA81 Lu walkery Vic
MA58 Lu walkery Vic
MA91_Lu_youngi_Sala
MA39 Lu yuilli Vic
MA40 Lu yuilli Vic
MA41 Lu yuilli Vic
MA43 Lu yuilli Vic
MA44 Lu yuilli Vic
MA45 Lu yuilli Vic
MA51 Lu yuilli Vic
MA52 Lu yuilli Vic

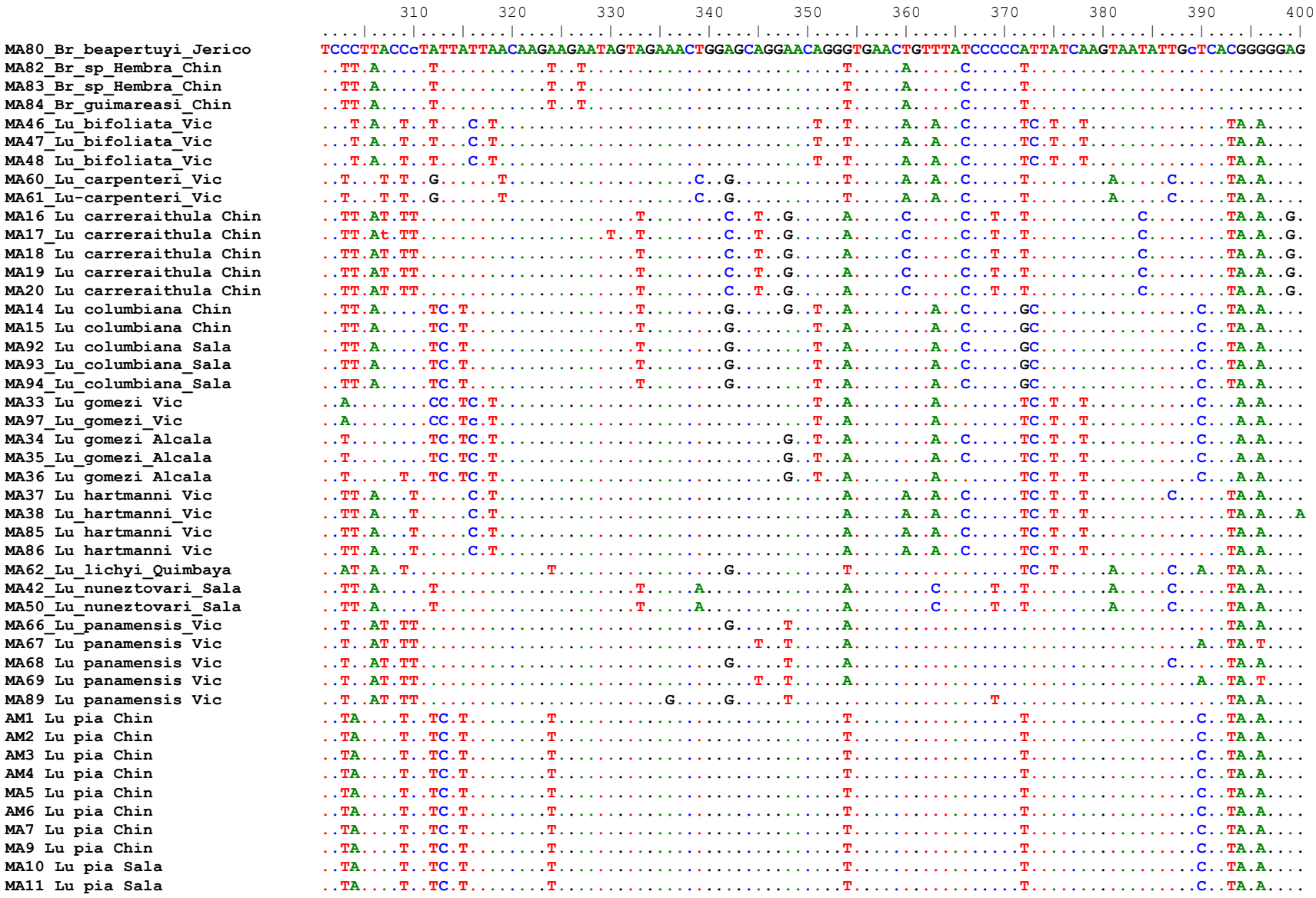

MA56 Wa rotundipennis Jeri
MA57 Wa rotundipennis Jeri
MA95 Wa rotundipennis Jeri

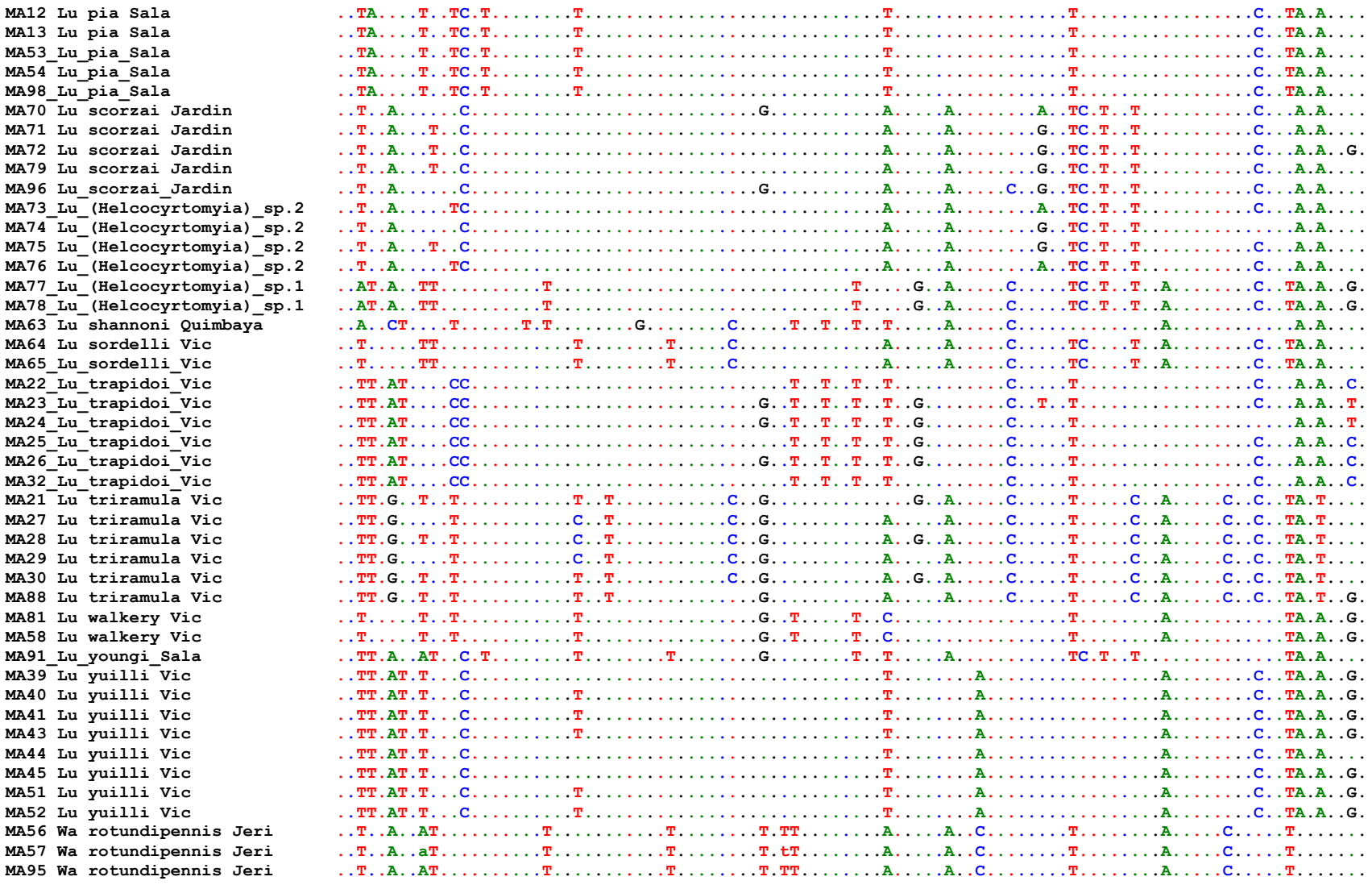

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
MA80_Br_beapertuyi_Jerico TAGGCCATCCAGGTGCATTAATTgGTGATGACCAAATCTATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCATTTGTAATAATTTTTTTTATAGTTATACCAATTAT
MA82_Br_sp_Hembra_Chin
MA83_Br_sp_Hembra_Chin
MA84_Br_guimareasi_Chin
MA46_Lu_bifoliata_Vic
MA47_Lu_bifoliata_Vic
MA48 Lu_bifoliata_Vic
MA60_Lu_carpenteri_Vic
MA61_Lu-carpenteri_Vic
MA16 Lu carreraithula Chin
MA17_Lu carreraithula Chin
MA18 Lu carreraithula Chin
MA19 Lu carreraithula Chin
MA20 Lu carreraithula Chin
MA14 Lu columbiana Chin
MA15 Lu columbiana Chin
MA92 Lu columbiana Sala
MA93_Lu_columbiana_Sala
MA94_Lu_columbiana_Sala
MA33 Lu gomezi Vic
MA97_Lu_gomezi_Vic
MA34 Lu gomezi Alcala
MA35_Lu_gomezi_Alcala
MA36 Lu gomezi Alcala
MA37 Lu hartmanni Vic
MA38 Lu_hartmanni_Vic
MA85 Lu hartmanni Vic
MA86 Lu hartmanni Vic
MA62_Lu_lichyi_Quimbaya
MA42_Lu_nuneztovari_Sala
MA50_Lu_nuneztovari_Sala
MA66_Lu_panamensis_Vic
MA67 Lu panamensis Vic
MA68 Lu panamensis Vic
MA69 Lu panamensis Vic
MA89 Lu panamensis Vic
AM1 Lu pia Chin
AM2 Lu pia Chin
AM3 Lu pia Chin
AM4 Lu pia Chin
MA5 Lu pia Chin
AM6 Lu pia Chin
MA7 Lu pia Chin
MA9 Lu pia Chin
MA10 Lu pia Sala
MA11 Lu pia Sala

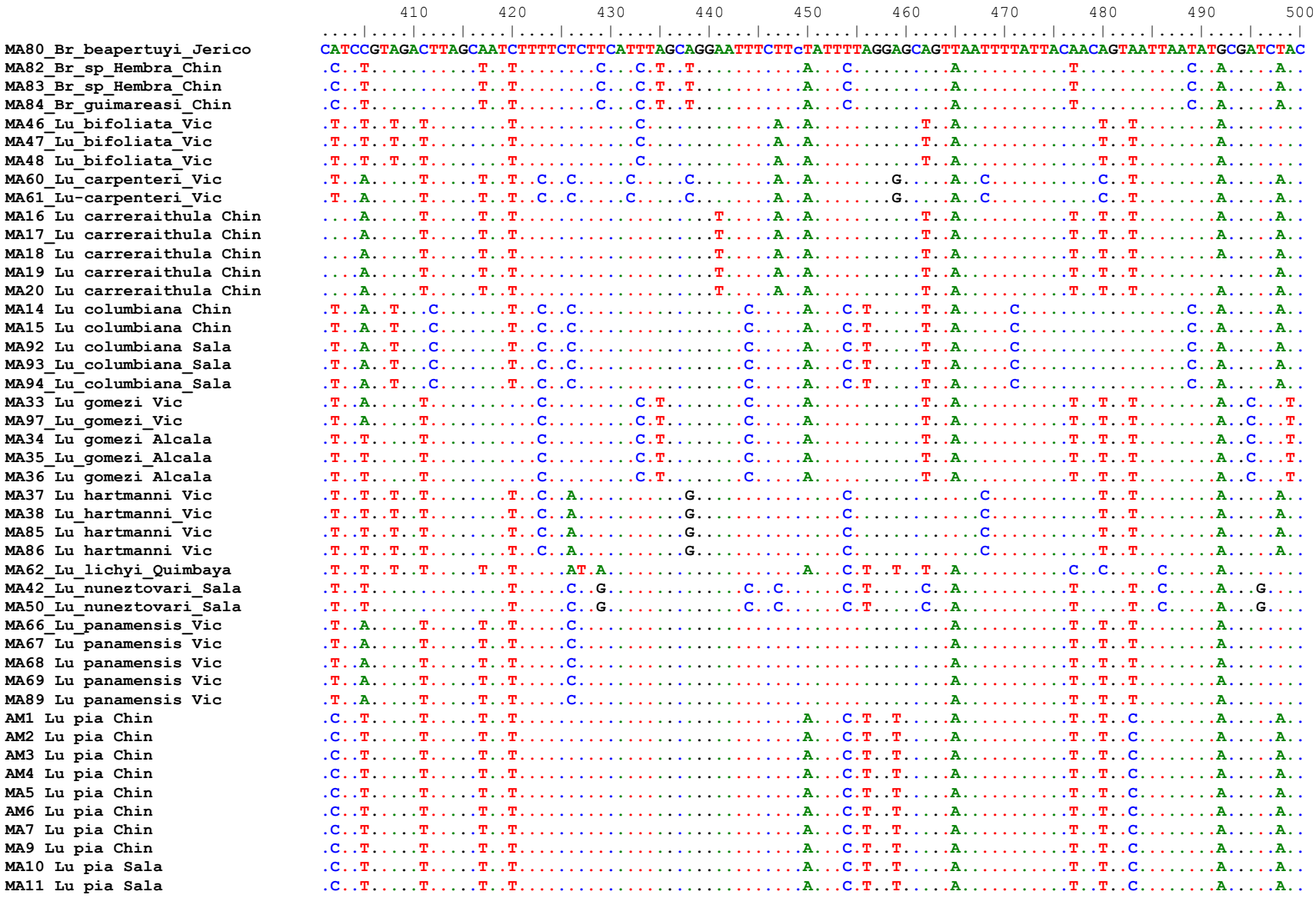

MA12 Lu pia Sala
MA13 Lu pia Sala
MA53_Lu_pia_Sala
MA54 Lu_pia_Sala
MA98_Lu_pia_Sala
MA70 Lu scorzai Jardin
MA71 Lu scorzai Jardin
MA72 Lu scorzai Jardin
MA79 Lu scorzai Jardin
MA96 Lu_scorzai_Jardin
MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA74 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA75 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA76 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA63 Lu shannoni Quimbaya
MA64 Lu sordelli Vic
MA65_Lu_sordelli_Vic
MA22_Lu_trapidoi_Vic
MA23_Lu_trapidoi_Vic
MA24_Lu_trapidoi_Vic
MA25_Lu_trapidoi_Vic
MA26_Lu_trapidoi_Vic
MA32_Lu_trapidoi_Vic
MA21 Lu triramula Vic
MA27 Lu triramula Vic
MA28 Lu triramula Vic
MA29 Lu triramula Vic
MA30 Lu triramula Vic
MA88 Lu triramula Vic
MA81 Lu walkery Vic
MA58 Lu walkery Vic
MA91_Lu_youngi_Sala
MA39 Lu yuilli Vic
MA40 Lu yuilli Vic
MA41 Lu yuilli Vic
MA43 Lu yuilli Vic
MA44 Lu yuilli Vic
MA45 Lu yuilli Vic
MA51 Lu yuilli Vic
MA52 Lu yuilli Vic
MA56 Wa rotundipennis Jeri
MA57 Wa rotundipennis Jeri
MA95 Wa rotundipennis Jeri

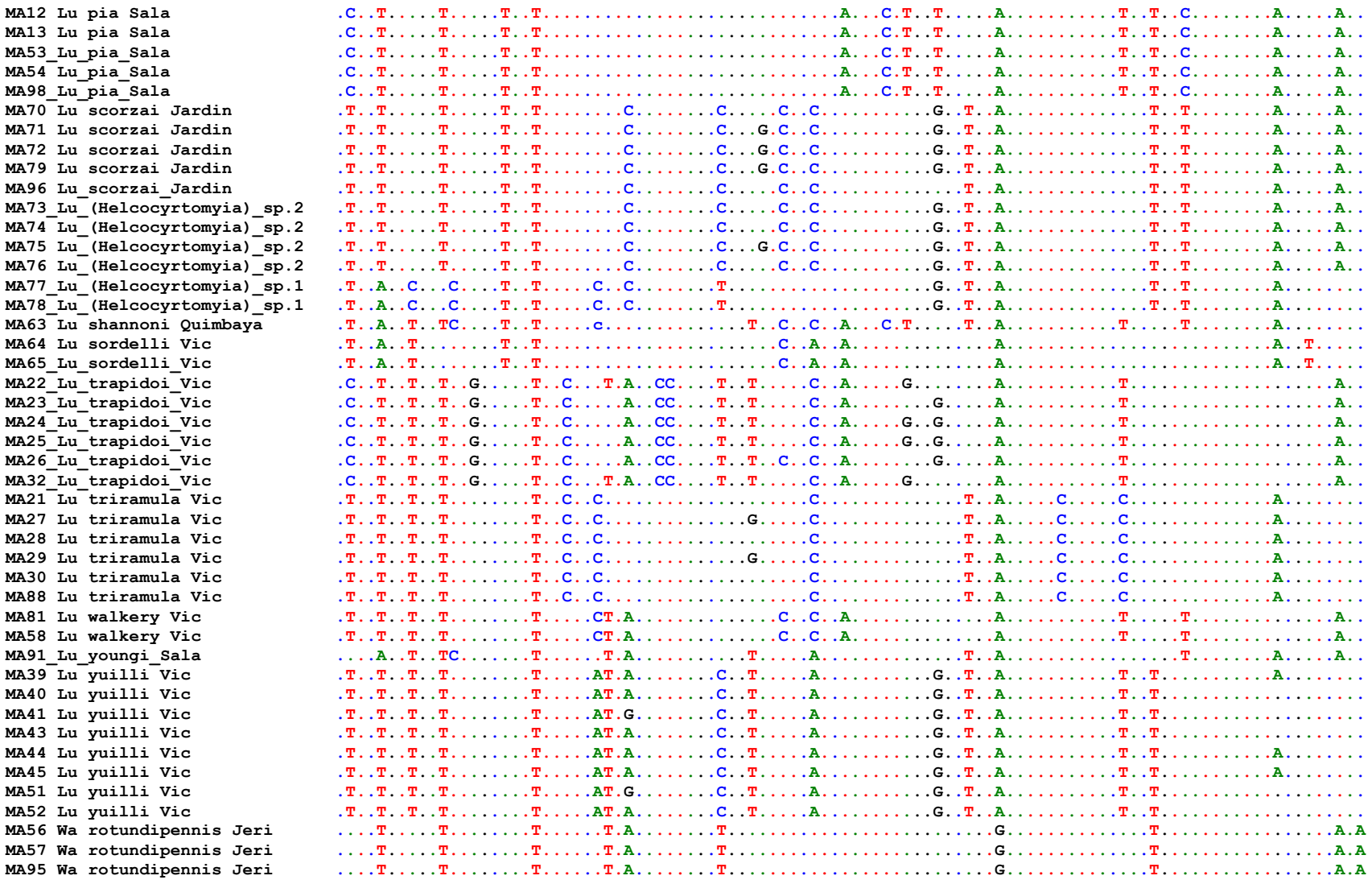

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
MA80_Br_beapertuyi_Jerico AATTGGaGGcTTTGGAAACTGACTTGTTCCTCTTATATTGGGAGCCCCaGATATAGCATTTCCCCGAATAAATAACATAAGATTCTGACTTTTACCCCCC
MA82_Br_sp_Hembra_Chin
MA83_Br_sp_Hembra_Chin
MA84_Br_guimareasi_Chin
MA46_Lu_bifoliata_Vic
MA47_Lu_bifoliata_Vic
MA48 Lu_bifoliata_Vic
MA60_Lu_carpenteri_Vic
MA61_Lu-carpenteri_Vic
MA16 Lu carreraithula Chin
MA17_Lu carreraithula Chin
MA18 Lu carreraithula Chin
MA19 Lu carreraithula Chin
MA20 Lu carreraithula Chin
MA14 Lu columbiana Chin
MA15 Lu columbiana Chin
MA92 Lu columbiana Sala
MA93_Lu_columbiana_Sala
MA94_Lu_columbiana_Sala
MA33 Lu gomezi Vic
MA97_Lu_gomezi_Vic
MA34 Lu gomezi Alcala
MA35_Lu_gomezi_Alcala
MA36 Lu gomezi Alcala
MA37 Lu hartmanni Vic
MA38 Lu_hartmanni_Vic
MA85 Lu hartmanni Vic
MA86 Lu hartmanni Vic
MA62_Lu_lichyi_Quimbaya
MA42_Lu_nuneztovari_Sala
MA50_Lu_nuneztovari_Sala
MA66_Lu_panamensis_Vic
MA67 Lu panamensis Vic
MA68 Lu panamensis Vic
MA69 Lu panamensis Vic
MA89 Lu panamensis Vic
AM1 Lu pia Chin
AM2 Lu pia Chin
AM3 Lu pia Chin
AM4 Lu pia Chin
MA5 Lu pia Chin
AM6 Lu pia Chin
MA7 Lu pia Chin
MA9 Lu pia Chin
MA10 Lu pia Sala
MA11 Lu pia Sala

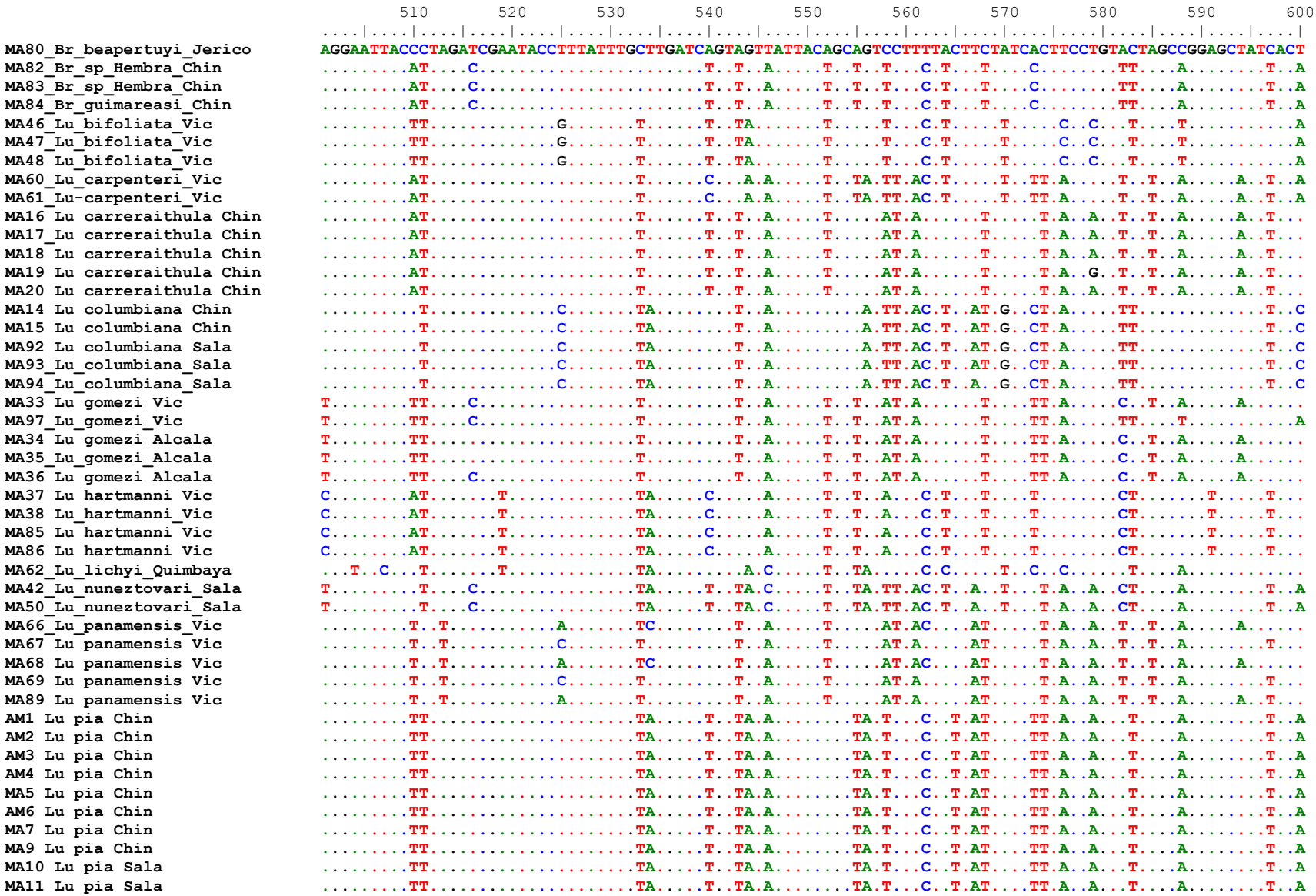

MA12 Lu pia Sala
MA13 Lu pia Sala
MA53_Lu_pia_Sala
MA54 Lu_pia_Sala
MA98_Lu_pia_Sala
MA70 Lu scorzai Jardin
MA71 Lu scorzai Jardin
MA72 Lu scorzai Jardin
MA79 Lu scorzai Jardin
MA96 Lu_scorzai_Jardin
MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA74 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA75 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA76 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA63 Lu shannoni Quimbaya
MA64 Lu sordelli Vic
MA65_Lu_sordelli_Vic
MA22_Lu_trapidoi_Vic
MA23_Lu_trapidoi_Vic
MA24_Lu_trapidoi_Vic
MA25_Lu_trapidoi_Vic
MA26_Lu_trapidoi_Vic
MA32_Lu_trapidoi_Vic
MA21 Lu triramula Vic
MA27 Lu triramula Vic
MA28 Lu triramula Vic
MA29 Lu triramula Vic
MA30 Lu triramula Vic
MA88 Lu triramula Vic
MA81 Lu walkery Vic
MA58 Lu walkery Vic
MA91_Lu_youngi_Sala
MA39 Lu yuilli Vic
MA40 Lu yuilli Vic
MA41 Lu yuilli Vic
MA43 Lu yuilli Vic
MA44 Lu yuilli Vic
MA45 Lu yuilli Vic
MA51 Lu yuilli Vic
MA52 Lu yuilli Vic
MA56 Wa rotundipennis Jeri
MA57 Wa rotundipennis Jeri
MA95 Wa rotundipennis Jeri

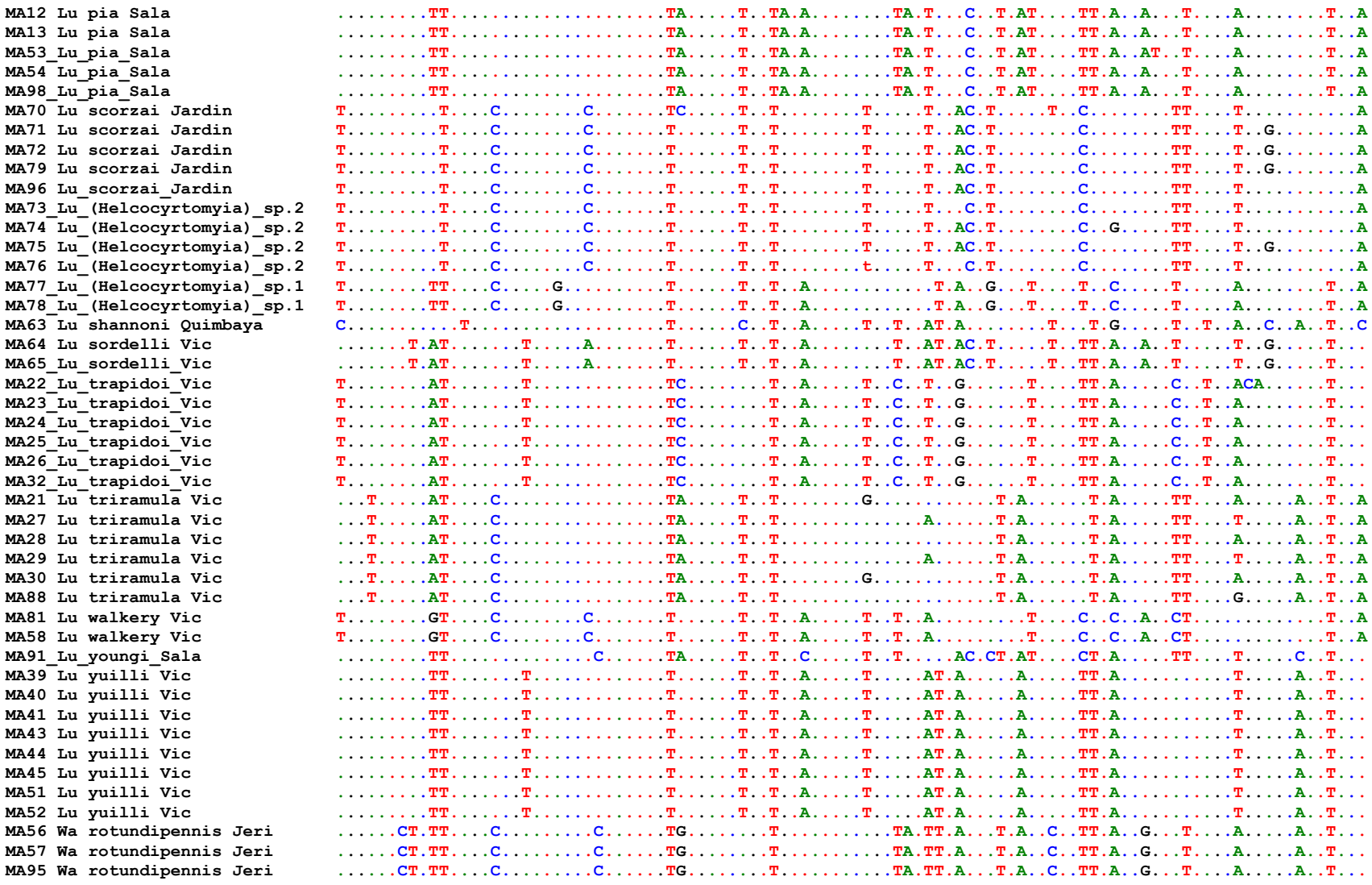

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
MA80_Br_beapertuyi_Jerico TCCCTTACCcTATTATTAACAAGAAGAATAGTAGAAACTGGAGCAGGAACAGGGTGAACTGTTTATCCCCCATTATCAAGTAATATTGcTCACGGGGGAG
MA82_Br_sp_Hembra_Chin
MA83_Br_sp_Hembra_Chin
MA84_Br_guimareasi_Chin
MA46_Lu_bifoliata_Vic
MA47_Lu_bifoliata_Vic
MA48 Lu_bifoliata_Vic
MA60_Lu_carpenteri_Vic
MA61_Lu-carpenteri_Vic
MA16 Lu carreraithula Chin
MA17_Lu carreraithula Chin
MA18 Lu carreraithula Chin
MA19 Lu carreraithula Chin
MA20 Lu carreraithula Chin
MA14 Lu columbiana Chin
MA15 Lu columbiana Chin
MA92 Lu columbiana Sala
MA93_Lu_columbiana_Sala
MA94_Lu_columbiana_Sala
MA33 Lu gomezi Vic
MA97_Lu_gomezi_Vic
MA34 Lu gomezi Alcala
MA35_Lu_gomezi_Alcala
MA36 Lu gomezi Alcala
MA37 Lu hartmanni Vic
MA38 Lu_hartmanni_Vic
MA85 Lu hartmanni Vic
MA86 Lu hartmanni Vic
MA62_Lu_lichyi_Quimbaya
MA42_Lu_nuneztovari_Sala
MA50_Lu_nuneztovari_Sala
MA66_Lu_panamensis_Vic
MA67 Lu panamensis Vic
MA68 Lu panamensis Vic
MA69 Lu panamensis Vic
MA89 Lu panamensis Vic
AM1 Lu pia Chin
AM2 Lu pia Chin
AM3 Lu pia Chin
AM4 Lu pia Chin
MA5 Lu pia Chin
AM6 Lu pia Chin
MA7 Lu pia Chin
MA9 Lu pia Chin
MA10 Lu pia Sala
MA11 Lu pia Sala

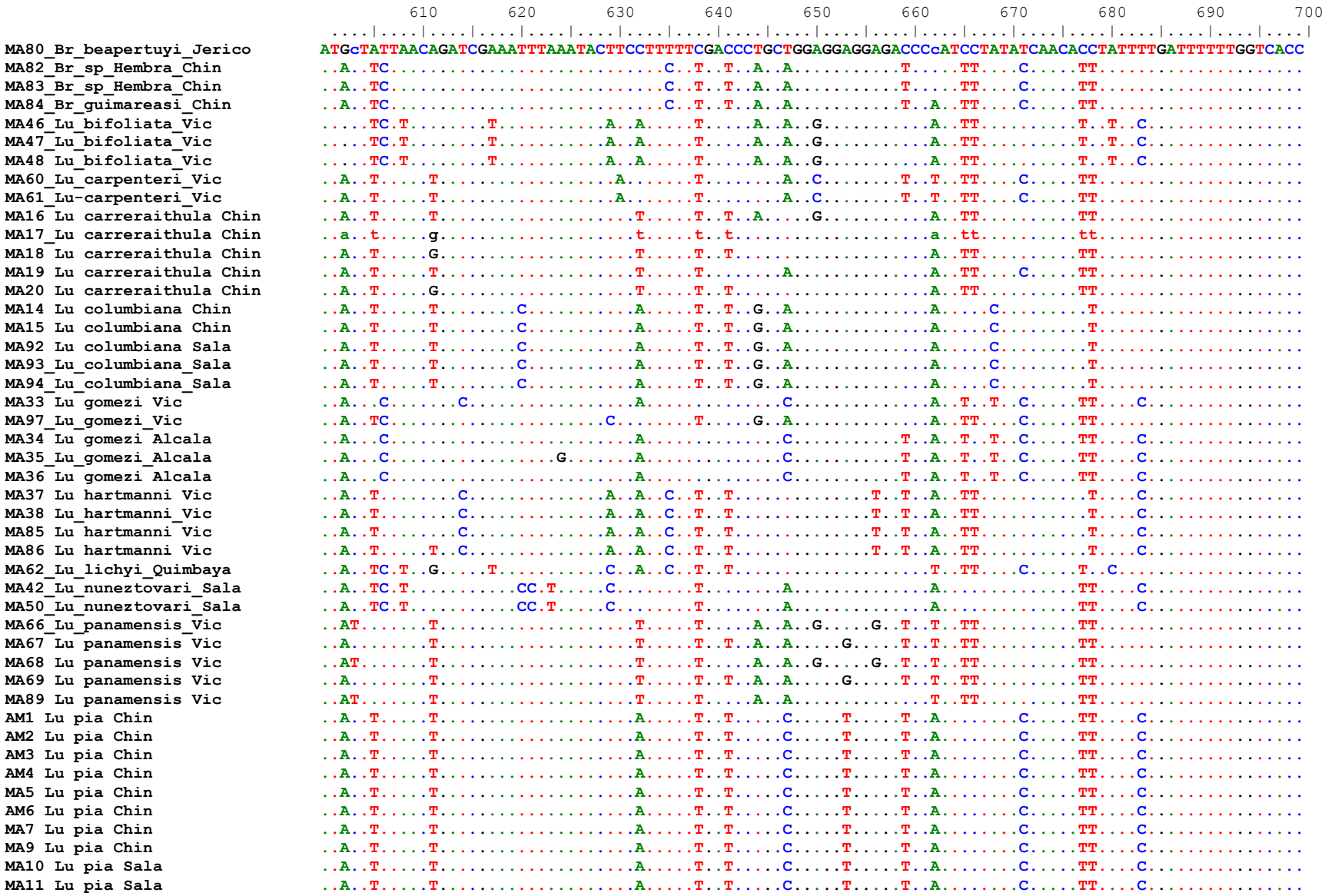

MA12 Lu pia Sala
MA13 Lu pia Sala
MA53_Lu_pia_Sala
MA54 Lu_pia_Sala
MA98_Lu_pia_Sala
MA70 Lu scorzai Jardin
MA71 Lu scorzai Jardin
MA72 Lu scorzai Jardin
MA79 Lu scorzai Jardin
MA96 Lu_scorzai_Jardin
MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA74 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA75 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA76 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA63 Lu shannoni Quimbaya
MA64 Lu sordelli Vic
MA65_Lu_sordelli_Vic
MA22_Lu_trapidoi_Vic
MA23_Lu_trapidoi_Vic
MA24_Lu_trapidoi_Vic
MA25_Lu_trapidoi_Vic
MA26_Lu_trapidoi_Vic
MA32_Lu_trapidoi_Vic
MA21 Lu triramula Vic
MA27 Lu triramula Vic
MA28 Lu triramula Vic
MA29 Lu triramula Vic
MA30 Lu triramula Vic
MA88 Lu triramula Vic
MA81 Lu walkery Vic
MA58 Lu walkery Vic
MA91_Lu_youngi_Sala
MA39 Lu yuilli Vic
MA40 Lu yuilli Vic
MA41 Lu yuilli Vic
MA43 Lu yuilli Vic
MA44 Lu yuilli Vic
MA45 Lu yuilli Vic
MA51 Lu yuilli Vic
MA52 Lu yuilli Vic
MA56 Wa rotundipennis Jeri
MA57 Wa rotundipennis Jeri
MA95 Wa rotundipennis Jeri

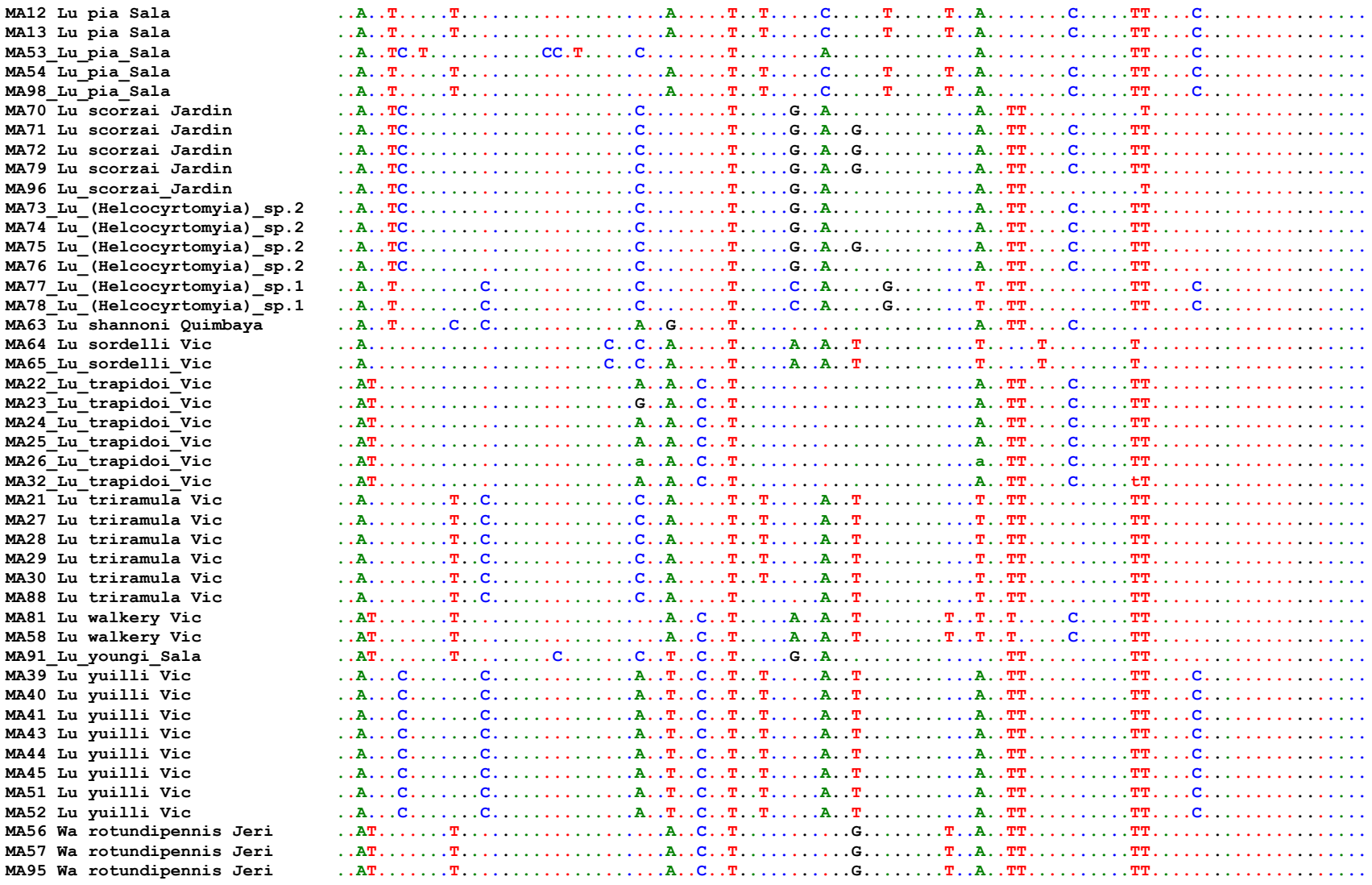

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
MA80_Br_beapertuyi_Jerico CATCCGTAGACTTAGCAATCTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTCTTcTATTTTAGGAGCAGTTAATTTTATTACAACAGTAATTAATATGCGATCTAC
MA82_Br_sp_Hembra_Chin
MA83_Br_sp_Hembra_Chin
MA84_Br_guimareasi_Chin
MA46_Lu_bifoliata_Vic
MA47_Lu_bifoliata_Vic
MA48 Lu_bifoliata_Vic
MA60_Lu_carpenteri_Vic
MA61_Lu-carpenteri_Vic
MA16 Lu carreraithula Chin
MA17_Lu carreraithula Chin
MA18 Lu carreraithula Chin
MA19 Lu carreraithula Chin
MA20 Lu carreraithula Chin
MA14 Lu columbiana Chin
MA15 Lu columbiana Chin
MA92 Lu columbiana Sala
MA93_Lu_columbiana_Sala
MA94_Lu_columbiana_Sala
MA33 Lu gomezi Vic
MA97_Lu_gomezi_Vic
MA34 Lu gomezi Alcala
MA35_Lu_gomezi_Alcala
MA36 Lu gomezi Alcala
MA37 Lu hartmanni Vic
MA38 Lu_hartmanni_Vic
MA85 Lu hartmanni Vic
MA86 Lu hartmanni Vic
MA62_Lu_lichyi_Quimbaya
MA42_Lu_nuneztovari_Sala
MA50_Lu_nuneztovari_Sala
MA66_Lu_panamensis_Vic
MA67 Lu panamensis Vic
MA68 Lu panamensis Vic
MA69 Lu panamensis Vic
MA89 Lu panamensis Vic
AM1 Lu pia Chin
AM2 Lu pia Chin
AM3 Lu pia Chin
AM4 Lu pia Chin
MA5 Lu pia Chin
AM6 Lu pia Chin
MA7 Lu pia Chin
MA9 Lu pia Chin
MA10 Lu pia Sala
MA11 Lu pia Sala


MA12 Lu pia Sala
MA13 Lu pia Sala
MA53_Lu_pia_Sala
MA54 Lu_pia_Sala
MA98_Lu_pia_Sala
MA70 Lu scorzai Jardin
MA71 Lu scorzai Jardin
MA72 Lu scorzai Jardin
MA79 Lu scorzai Jardin
MA96 Lu_scorzai_Jardin
MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA74 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA75 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA76 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA63 Lu shannoni Quimbaya
MA64 Lu sordelli Vic
MA65_Lu_sordelli_Vic
MA22_Lu_trapidoi_Vic
MA23_Lu_trapidoi_Vic
MA24_Lu_trapidoi_Vic
MA25_Lu_trapidoi_Vic
MA26_Lu_trapidoi_Vic
MA32_Lu_trapidoi_Vic
MA21 Lu triramula Vic
MA27 Lu triramula Vic
MA28 Lu triramula Vic
MA29 Lu triramula Vic
MA30 Lu triramula Vic
MA88 Lu triramula Vic
MA81 Lu walkery Vic
MA58 Lu walkery Vic
MA91_Lu_youngi_Sala
MA39 Lu yuilli Vic
MA40 Lu yuilli Vic
MA41 Lu yuilli Vic
MA43 Lu yuilli Vic
MA44 Lu yuilli Vic
MA45 Lu yuilli Vic
MA51 Lu yuilli Vic
MA52 Lu yuilli Vic
MA56 Wa rotundipennis Jeri
MA57 Wa rotundipennis Jeri
MA95 Wa rotundipennis Jeri


510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
MA80_Br_beapertuyi_Jerico AGGAATTACCCTAGATCGAATACCTTTATTTGCTTGATCAGTAGTTATTACAGCAGTCCTTTTACTTCTATCACTTCCTGTACTAGCCGGAGCTATCACT
MA82_Br_sp_Hembra_Chin
MA83_Br_sp_Hembra_Chin
MA84_Br_guimareasi_Chin
MA46_Lu_bifoliata_Vic
MA47_Lu_bifoliata_Vic
MA48 Lu_bifoliata_Vic
MA60_Lu_carpenteri_Vic
MA61_Lu-carpenteri_Vic
MA16 Lu carreraithula Chin
MA17_Lu carreraithula Chin
MA18 Lu carreraithula Chin
MA19 Lu carreraithula Chin
MA20 Lu carreraithula Chin
MA14 Lu columbiana Chin
MA15 Lu columbiana Chin
MA92 Lu columbiana Sala
MA93_Lu_columbiana_Sala
MA94_Lu_columbiana_Sala
MA33 Lu gomezi Vic
MA97_Lu_gomezi_Vic
MA34 Lu gomezi Alcala
MA35_Lu_gomezi_Alcala
MA36 Lu gomezi Alcala
MA37 Lu hartmanni Vic
MA38 Lu_hartmanni_Vic
MA85 Lu hartmanni Vic
MA86 Lu hartmanni Vic
MA62_Lu_lichyi_Quimbaya
MA42_Lu_nuneztovari_Sala
MA50_Lu_nuneztovari_Sala
MA66_Lu_panamensis_Vic
MA67 Lu panamensis Vic
MA68 Lu panamensis Vic
MA69 Lu panamensis Vic
MA89 Lu panamensis Vic
AM1 Lu pia Chin
AM2 Lu pia Chin
AM3 Lu pia Chin
AM4 Lu pia Chin
MA5 Lu pia Chin
AM6 Lu pia Chin
MA7 Lu pia Chin
MA9 Lu pia Chin
MA10 Lu pia Sala
MA11 Lu pia Sala


MA12 Lu pia Sala
MA13 Lu pia Sala
MA53_Lu_pia_Sala
MA54 Lu_pia_Sala
MA98_Lu_pia_Sala
MA70 Lu scorzai Jardin
MA71 Lu scorzai Jardin
MA72 Lu scorzai Jardin
MA79 Lu scorzai Jardin
MA96 Lu_scorzai_Jardin
MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA74 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA75 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA76 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA63 Lu shannoni Quimbaya
MA64 Lu sordelli Vic
MA65_Lu_sordelli_Vic
MA22_Lu_trapidoi_Vic
MA23_Lu_trapidoi_Vic
MA24_Lu_trapidoi_Vic
MA25_Lu_trapidoi_Vic
MA26_Lu_trapidoi_Vic
MA32_Lu_trapidoi_Vic
MA21 Lu triramula Vic
MA27 Lu triramula Vic
MA28 Lu triramula Vic
MA29 Lu triramula Vic
MA30 Lu triramula Vic
MA88 Lu triramula Vic
MA81 Lu walkery Vic
MA58 Lu walkery Vic
MA91_Lu_youngi_Sala
MA39 Lu yuilli Vic
MA40 Lu yuilli Vic
MA41 Lu yuilli Vic
MA43 Lu yuilli Vic
MA44 Lu yuilli Vic
MA45 Lu yuilli Vic
MA51 Lu yuilli Vic
MA52 Lu yuilli Vic
MA56 Wa rotundipennis Jeri
MA57 Wa rotundipennis Jeri
MA95 Wa rotundipennis Jeri


610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
MA80_Br_beapertuyi_Jerico ATGcTATTAACAGATCGAAATTTAAATACTTCCTTTTTCGACCCTGCTGGAGGAGGAGACCCcATCCTATATCAACACCTATTTTGATTTTTTGGTCACC
MA82_Br_sp_Hembra_Chin
MA83_Br_sp_Hembra_Chin
MA84_Br_guimareasi_Chin
MA46_Lu_bifoliata_Vic
MA47_Lu_bifoliata_Vic
MA48 Lu_bifoliata_Vic
MA60_Lu_carpenteri_Vic
MA61_Lu-carpenteri_Vic
MA16 Lu carreraithula Chin
MA17_Lu carreraithula Chin
MA18 Lu carreraithula Chin
MA19 Lu carreraithula Chin
MA20 Lu carreraithula Chin
MA14 Lu columbiana Chin
MA15 Lu columbiana Chin
MA92 Lu columbiana Sala
MA93_Lu_columbiana_Sala
MA94_Lu_columbiana_Sala
MA33 Lu gomezi Vic
MA97_Lu_gomezi_Vic
MA34 Lu gomezi Alcala
MA35_Lu_gomezi_Alcala
MA36 Lu gomezi Alcala
MA37 Lu hartmanni Vic
MA38 Lu_hartmanni_Vic
MA85 Lu hartmanni Vic
MA86 Lu hartmanni Vic
MA62_Lu_lichyi_Quimbaya
MA42_Lu_nuneztovari_Sala
MA50_Lu_nuneztovari_Sala
MA66_Lu_panamensis_Vic
MA67 Lu panamensis Vic
MA68 Lu panamensis Vic
MA69 Lu panamensis Vic
MA89 Lu panamensis Vic
AM1 Lu pia Chin
AM2 Lu pia Chin
AM3 Lu pia Chin
AM4 Lu pia Chin
MA5 Lu pia Chin
AM6 Lu pia Chin
MA7 Lu pia Chin
MA9 Lu pia Chin
MA10 Lu pia Sala
MA11 Lu pia Sala


MA12 Lu pia Sala
MA13 Lu pia Sala
MA53_Lu_pia_Sala
MA54 Lu_pia_Sala
MA98_Lu_pia_Sala
MA70 Lu scorzai Jardin
MA71 Lu scorzai Jardin
MA72 Lu scorzai Jardin
MA79 Lu scorzai Jardin
MA96 Lu_scorzai_Jardin
MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA74 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA75 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA76 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2
MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1
MA63 Lu shannoni Quimbaya
MA64 Lu sordelli Vic
MA65_Lu_sordelli_Vic
MA22_Lu_trapidoi_Vic
MA23_Lu_trapidoi_Vic
MA24_Lu_trapidoi_Vic
MA25_Lu_trapidoi_Vic
MA26_Lu_trapidoi_Vic
MA32_Lu_trapidoi_Vic
MA21 Lu triramula Vic
MA27 Lu triramula Vic
MA28 Lu triramula Vic
MA29 Lu triramula Vic
MA30 Lu triramula Vic
MA88 Lu triramula Vic
MA81 Lu walkery Vic
MA58 Lu walkery Vic
MA91_Lu_youngi_Sala
MA39 Lu yuilli Vic
MA40 Lu yuilli Vic
MA41 Lu yuilli Vic
MA43 Lu yuilli Vic
MA44 Lu yuilli Vic
MA45 Lu yuilli Vic
MA51 Lu yuilli Vic
MA52 Lu yuilli Vic
MA56 Wa rotundipennis Jeri
MA57 Wa rotundipennis Jeri
MA95 Wa rotundipennis Jeri

```
                                 ....|....|.
MA80_Br_beapertuyi_Jerico        CTGAAGTTTAA
MA82_Br_sp_Hembra_Chin           ...........
MA83_Br_sp_Hembra_Chin           ...........
MA84_Br_guimareasi_Chin          ...........
MA46_Lu_bifoliata_Vic            ...........
MA47_Lu_bifoliata_Vic            ...........
MA48 Lu_bifoliata_Vic            ...........
MA60_Lu_carpenteri_Vic           ...........
MA61_Lu-carpenteri_Vic           ...........
MA16 Lu carreraithula Chin       ...........
MA17_Lu carreraithula Chin       ...........
MA18 Lu carreraithula Chin       ...........
MA19 Lu carreraithula Chin       ...........
MA20 Lu carreraithula Chin       ...........
MA14 Lu columbiana Chin          ...........
MA15 Lu columbiana Chin          ...........
MA92 Lu columbiana Sala          ...........
MA93_Lu_columbiana_Sala          ...........
MA94_Lu_columbiana_Sala          ...........
MA33 Lu gomezi Vic               ...........
MA97_Lu_gomezi_Vic               ...........
MA34 Lu gomezi Alcala            ...........
MA35_Lu_gomezi_Alcala            ...........
MA36 Lu gomezi Alcala            ...........
MA37 Lu hartmanni Vic            ...........
MA38 Lu_hartmanni_Vic            ...........
MA85 Lu hartmanni Vic            ...........
MA86 Lu hartmanni Vic            ...........
MA62_Lu_lichyi_Quimbaya          ...........
MA42_Lu_nuneztovari_Sala         ...........
MA50_Lu_nuneztovari_Sala         ...........
MA66_Lu_panamensis_Vic           ...........
MA67 Lu panamensis Vic           ...........
MA68 Lu panamensis Vic           ...........
MA69 Lu panamensis Vic           ...........
MA89 Lu panamensis Vic           ...........
AM1 Lu pia Chin                  ...........
AM2 Lu pia Chin                  ...........
AM3 Lu pia Chin                  ...........
AM4 Lu pia Chin                  ...........
MA5 Lu pia Chin                  ...........
AM6 Lu pia Chin                  ...........
MA7 Lu pia Chin                  ...........
MA9 Lu pia Chin                  ...........
MA10 Lu pia Sala                 ...........
MA11 Lu pia Sala                 ...........
MA12 Lu pia Sala                 ...........
```

```
MA13 Lu pia Sala                ..........
MA53_Lu_pia_Sala                ..........
MA54 Lu_pia_Sala                ..........
MA98_Lu_pia_Sala                ..........
MA70 Lu scorzai Jardin          ..........
MA71 Lu scorzai Jardin          ..........
MA72 Lu scorzai Jardin          ..........
MA79 Lu scorzai Jardin          ..........
MA96 Lu_scorzai_Jardin          ..........
MA73_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2   ..........
MA74 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2   ..........
MA75 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2   ..........
MA76 Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.2   ..........
MA77_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1   ..........
MA78_Lu_(Helcocyrtomyia)_sp.1   ..........
MA63 Lu shannoni Quimbaya       ........A..
MA64 Lu sordelli Vic            ........A..
MA65_Lu_sordelli_Vic            ..........
MA22_Lu_trapidoi_Vic            ..........
MA23_Lu_trapidoi_Vic            ..........
MA24_Lu_trapidoi_Vic            ..........
MA25_Lu_trapidoi_Vic            ..........
MA26_Lu_trapidoi_Vic            ..........
MA32_Lu_trapidoi_Vic            ..........
MA21 Lu triramula Vic           ..........
MA27 Lu triramula Vic           ..........
MA28 Lu triramula Vic           ..........
MA29 Lu triramula Vic           ..........
MA30 Lu triramula Vic           ..........
MA88 Lu triramula Vic           ..........
MA81 Lu walkery Vic             ..........
MA58 Lu walkery Vic             ..........
MA91_Lu_youngi_Sala             ..........
MA39 Lu yuilli Vic              ..........
MA40 Lu yuilli Vic              ..........
MA41 Lu yuilli Vic              ..........
MA43 Lu yuilli Vic              ..........
MA44 Lu yuilli Vic              ..........
MA45 Lu yuilli Vic              ..........
MA51 Lu yuilli Vic              ..........
MA52 Lu yuilli Vic              ..........
MA56 Wa rotundipennis Jeri      ..........
MA57 Wa rotundipennis Jeri      ..........
MA95 Wa rotundipennis Jeri      ..........
```

Tabla 4-9: Número de haplotipos con secuencias COI para los flebotomíneos en el presente estudio.

Especie	Tamaño de la muestra	Nº Hpl.	Variabilidad (nt)	Haplotipos de la secuencia COI
Brumptomyia beaupertuyi	1	1	0	MA80
Brumptomyia guimaresi	1	1	0	MA84
Brumptomyia sp.	2	2	1	MA82 y MA83
Lutzomyia bifoliata	3	1	0	[MA46-MA47-MA48]
Lutzomyia carpenteri	2	1	0	[MA60-MA61]
Lutzomyia carrerai thula	5	5	16	MA16 , MA17, MA18, MA19 y MA20
Lutzomyia columbiana	5	5	7	MA14, MA15,MA92, MA93 y MA94
Lutzomyia gomezi	5	5	35	MA33, MA97, MA34, MA35 y MA36
Lutzomyia hartmanni	4	4	5	MA37, MA38, MA85 y MA86
Lutzomyia lichyi	1	1	0	MA62
Lutzomyia nuneztovari	2	1	0	[MA42-MA50]
Lutzomyia panamensis	5	4	31	MA66, [MA67-MA69], MA68 y MA89
Lutzomyia pia	15	2	14	[AM1-AM2-AM3-AM4-MA5-AM6-MA7-MA9 MA10 - MA11- MA12- MA13-MA54-MA98] y MA53
Lutzomyia scorzai	5	4	21	MA70, [MA71- MA79], MA72 y MA96
Lutzomyia shannoni	1	1	0	MA63
Lutzomyia sordelli	2	2	1	MA64y MA65
Lutzomyia trapidoi	6	6	20	MA22, MA23, MA24, MA25, MA26 yMA32
Lutzomyia triramula	6	5	15	MA21, [MA27-MA29], MA28, MA30 y MA88
Lutzomyia walkeri	2	1	0	[MA81-MA58]
Lutzomyia youngi	1	1	0	MA91
Lutzomyia yuilli	8	4	5	[MA39-MA45], [MA40 MA43 MA52], [MA41 MA51]y MA44
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 1	2	1	0	[MA77-MA78]
Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 2	4	3	13	MA96, [MA73-MA74] y MA75
Warileya rotundipennis	3	2	1	[MA56-MA57] y MA95
Total	91	63		

Nº Ind. Número de individuos. **Nº Hpl.** Número de haplotipos. **nt.** Nucleótidos. Los códigos dentro [ ] corresponden a un mismo haplotipo.

Cada secuencia obtenida fue comparada con los registros disponibles en las bases de datos Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/) y BOLD (http://www.barcodinglife.com/). Los porcentajes de similitud, resultaron mayores a 98%

para la mayoría de las secuencias para las cuales las bases de datos tienen registro de la especie.

Las divergencias nucleotídicas de las secuencias obtenidas en este estudio, se determinaron a los niveles intra e interespecífico aplicando el modelo de Kimura dos parámetros (K2P). En este estudio se utilizó la menor y la mayor distancia intraespecífica e interespecífica en lugar de la media (Meier *et al.* 2008).

- ***Nivel Intraespecífico***

  La divergencia entre todas las secuencias obtenidas dentro de una misma especie osciló entre 0,0 – 2,0% (Tabla 4-11). Sin considerar a los haplotipos divergentes al interior de *Lu. panamensis* (MA66, MA67, MA68, MA69) y *Lu. gomezi* (MA33, MA97), donde las distancia fluctuarón entre 0,1 – 3,6% y 0,1 – 4,7% respectivamente, sin superar el valor de 10.1% considerado como límite específico (Tabla 4-13).

  Al comparar los haplotipos que presentaron mayor divergencia intraespecífica (*Lu. panamensis* y *Lu. gomezi*) con los disponibles en las bases de datos, el rango intraespecifico encontrada dentro de las especies se mantiene (Tablas 4-12 y 4-13), obteniéndose distancias genéticas de 3,1% (Tabla 4-12) y 4,1%-4,2% (Tabla 4-13) cuando se comparan los haplotipos de zonas cafeteras colombianas con los haplotipos de la región caribe colombiana y Panamá, así mismo, no se comparten haplotipos entre estas secuencias.

Tabla 4-10: Rango de divergencia intraespecífica bajo el modelo Kimura 2 parámetros, entre secuencias nucleotídicas parciales del gen Citocromo Oxidasa I, de flebotomíneos colectados en zona cafetera

Tabla 4-11: Distancias genéticas K2P. Nótese los valores de divergencia entre los haplotipos MA66, MA67, MA68, MA69 Y MA89 para el marcador COI, comparados con los demás haplotipos de Lutzomyia panamensis de genbank y BOLD.

	Código de la secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
[1]	gi|304435269|gb|GU90													
[2]	gi|304435265|gb|GU90	0.011												
[3]	gi|304435271|gb|GU90	0.011	0.007											
[4]	gi|304435267|gb|GU90	0.013	0.006	0.009										
[5]	gi|291066726|gb|GU00	0.025	0.017	0.021	0.023									
[6]	gi|291066722|gb|GU00	0.023	0.015	0.023	0.021	0.013								
[7]	gi|291066724|gb|GU00	0.023	0.015	0.019	0.021	0.006	0.015							
[8]	gi|291066728|gb|GU00	0.021	0.011	0.019	0.017	0.011	0.006	0.013						
[9]	MA66_Lu_panamensis_Vic	0.025	0.019	0.023	0.025	0.025	0.025	0.023	0.021					
[10]	MA67_Lu_panamensis_Vic	0.031	0.023	0.027	0.025	0.028	0.027	0.026	0.025	0.032				
[11]	MA68_Lu_panamensis_Vic	0.025	0.019	0.027	0.025	0.029	0.025	0.027	0.021	0.006	**0.036**			
[12]	MA69_Lu_panamensis_Vic	**0.031**	0.023	0.027	0.025	0.028	0.027	0.026	0.025	**0.032**	0.000	0.036		
[13]	MA89_Lu_panamensis_Vic	0.009	0.007	0.007	0.009	0.025	0.023	0.023	0.019	0.023	0.030	0.023	0.030	

Tabla 4-12: Distancias genéticas K2P. Nótese los valores de divergencia entre los haplotipos MA33, MA34, MA35, MA36 Y MA97 para el marcador COI, comparados con los demás haplotipos de Lutzomyia gomezi de genbank y BOLD.

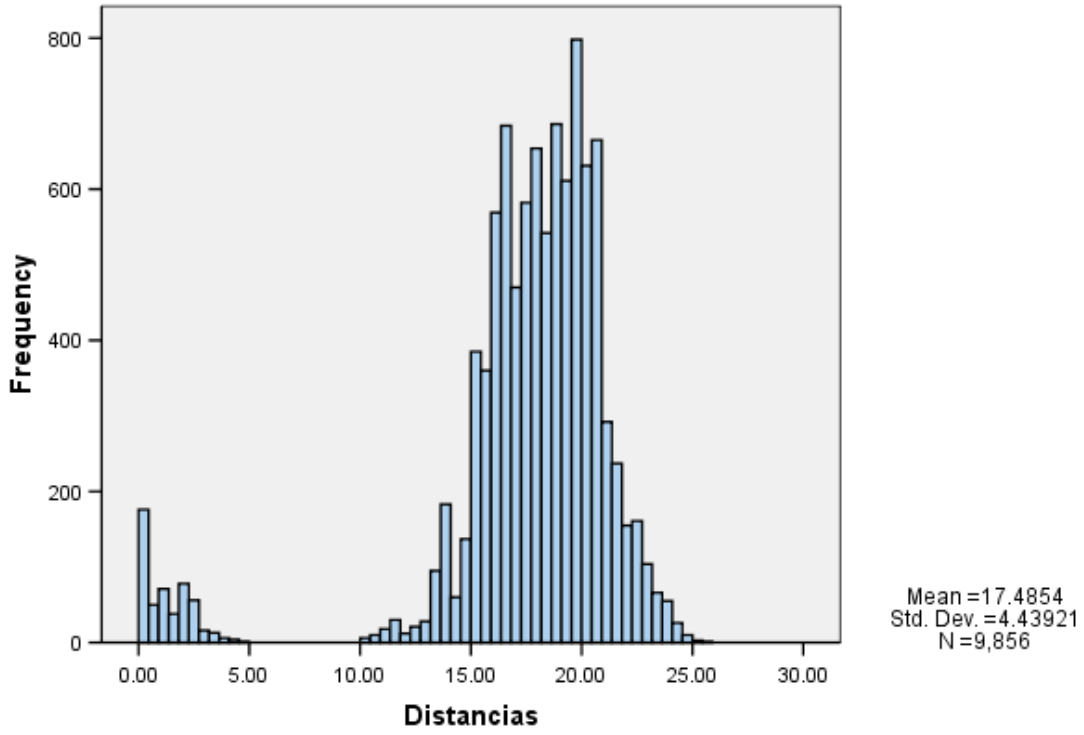
	Código de la secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
[1]	gi|304435253|gb|GU90													
[2]	gi|304435249|gb|GU90	0.000												
[3]	gi|304435255|gb|GU90	0.000	0.000											
[4]	gi|304435251|gb|GU90	0.023	0.023	0.023										
[5]	gi|304435247|gb|GU90	0.019	0.019	0.019	0.011									
[6]	gi|291066706|gb|GU00	0.000	0.000	0.000	0.023	0.019								
[7]	gi|291066702|gb|GU00	0.000	0.000	0.000	0.023	0.019	0.000							
[8]	gi|291066704|gb|GU00	0.021	0.021	0.021	0.006	0.009	0.021	0.021						
[9]	MA33_Lu_gomezi_Vic	0.004	0.004	0.004	0.027	0.023	0.004	0.004	0.025					
[10]	MA97_Lu_gomezi_Vic	0.025	0.025	0.025	**0.045**	**0.041**	0.025	0.025	**0.043**	0.021				
[11]	MA34_Lu_gomezi_Alcala	0.023	0.023	0.023	0.011	0.007	0.023	0.023	0.009	0.027	**0.045**			
[12]	MA35_Lu_gomezi_Alcala	0.025	0.025	0.025	0.013	0.009	0.025	0.025	0.011	0.029	**0.047**	0.002		
[13]	MA36_Lu_gomezi_Alcala	0.021	0.021	0.021	0.006	0.009	0.021	0.021	0.004	0.025	0.043	0.009	0.011	

- ***Nivel Interespecífico***

Las divergencias de nucleótidos registradas entre las 24 especies a nivel interespecífico, estuvieron entre 10% (*Lu. panamensis – Lu. carrerai thula*) y 22.6%. (*Lu. carrerari thula – Lu. lichyi*), superiores a las observadas a nivel intraespecífico.

Así, usando las 91 secuencias que representan 24 especies, se comprobó la presencia de una "gap de código de barras", una separación entre los niveles de intraspecíficos (0,0 – 4,7%) y la variabilidad interspecífica (10% 22.2%) (Figura 4-46).

Figura 4- 46: Gráfica de distribución de frecuencias de las divergencias genética intraespecífica e interespecífica en Phlebotominae



Al obtener el rango de distancias de las secuencias obtenidas, estos rangos se evaluaron en las secuencias de los especímenes donde no fue posible su identificación a nivel de especie (Tabla 4-8). En este sentido, los valores de distancias genéticas K2P intraespecíficas permitieron asociar las secuencias de dos hembras no identificadas de *Br*. sp al macho de *Br. guimaraesi* (0.3%) (Tabla 4-14).

La comparación a nivel haplotípico entre especies como *Lu. hartmanni* y *Lu. scorzai* muestran una clara diferenciación con valores de divergencia nucleotídica entre 14.3 y 16%. Al comparar el haplotipo de *Lu*. (*Helcocyrtomyia*) sp. 1 con los distintos haplotipos de las especies *Lu*. *scorzai* y *Lu. hartmanni,* se observan porcentajes de

divergencia nucleotídica entre 14.2 y 15.5%, lo cual sugiere que las secuencias del este morfotipo en mención no corresponden a las secuencias de *Lu. hartmanni* y *Lu. scorzai* (Tabla 4-14). Caso contrario a los porcentajes de divergencia encontrados entre las secuencias de hembras de *Lu*. (*Helcocyrtomyia*) sp. 2 y *Lu. scorzai* (0.1% y 0.3%) evidenciando que corresponden a la misma especie (Tabla 4-14).

Las divergencias genéticas entre las cuatro especies del grupo *verrucarum* encontrados en este estudio estuvieron entre 13.1 y 16.9% (Tabla 4-14) lo cual sugiere una separación evidente. Cuando se compararon las secuencias de *Lutzomyia youngi* (FJ437277.1 y FJ437272.1) reportadas por Cohnstaedt *et al.* 2011, la divergencia nucleotídica fue entre 0 y 0.3% (Tabla 4-14).

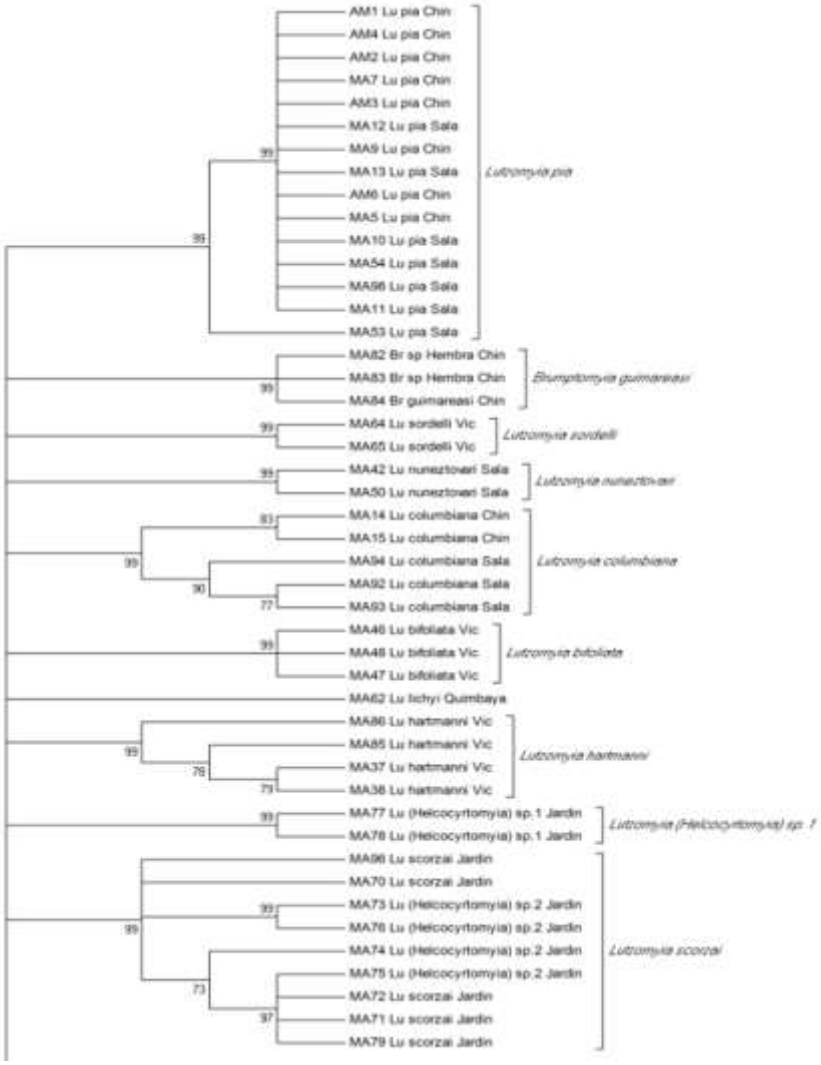
Tabla 4-13: Valores de distancia genética a nivel interespecífico según el modelo K2P, entre secuencias nucleotídicas parciales del gen Citocromo Oxidasa I, de flebotomíneos colectados en zona cafetera.

4.3.2 Dendograma

En el dendrograma de Neighbor–Joining (NJ) de las secuencias obtenidas en este estudio (Figura 4-47) se observa que las agrupaciones con base en los haplotipos con valores significativos de bootstrap (>70), correspondieron a una misma especie determinada morfológicamente.

De igual forma, se observa en el dendograma de NJ incluyendo los 53 registros de secuencias de las bases de datos Genbank y BOLD (Figura 4-48) clusters con valores bootstrap mayores a 80%, lo que sustenta la identidad de las secuencias de los flebotomíneos obtenidas en este estudio, también el análisis de distancias mediante NJ diferenció todos los haplotipos (COI), correspondientes a diferentes especies.

Figura 4-47: Dendograma consenso Neighbor-Joining



Dendograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, basado en el modelo de distancias K2P de secuencias de flebotomíneos de zona cafetera. El valor es mostrado para cada rama y su respectiva longitud interna.

Figura 4-48: (Continuación)

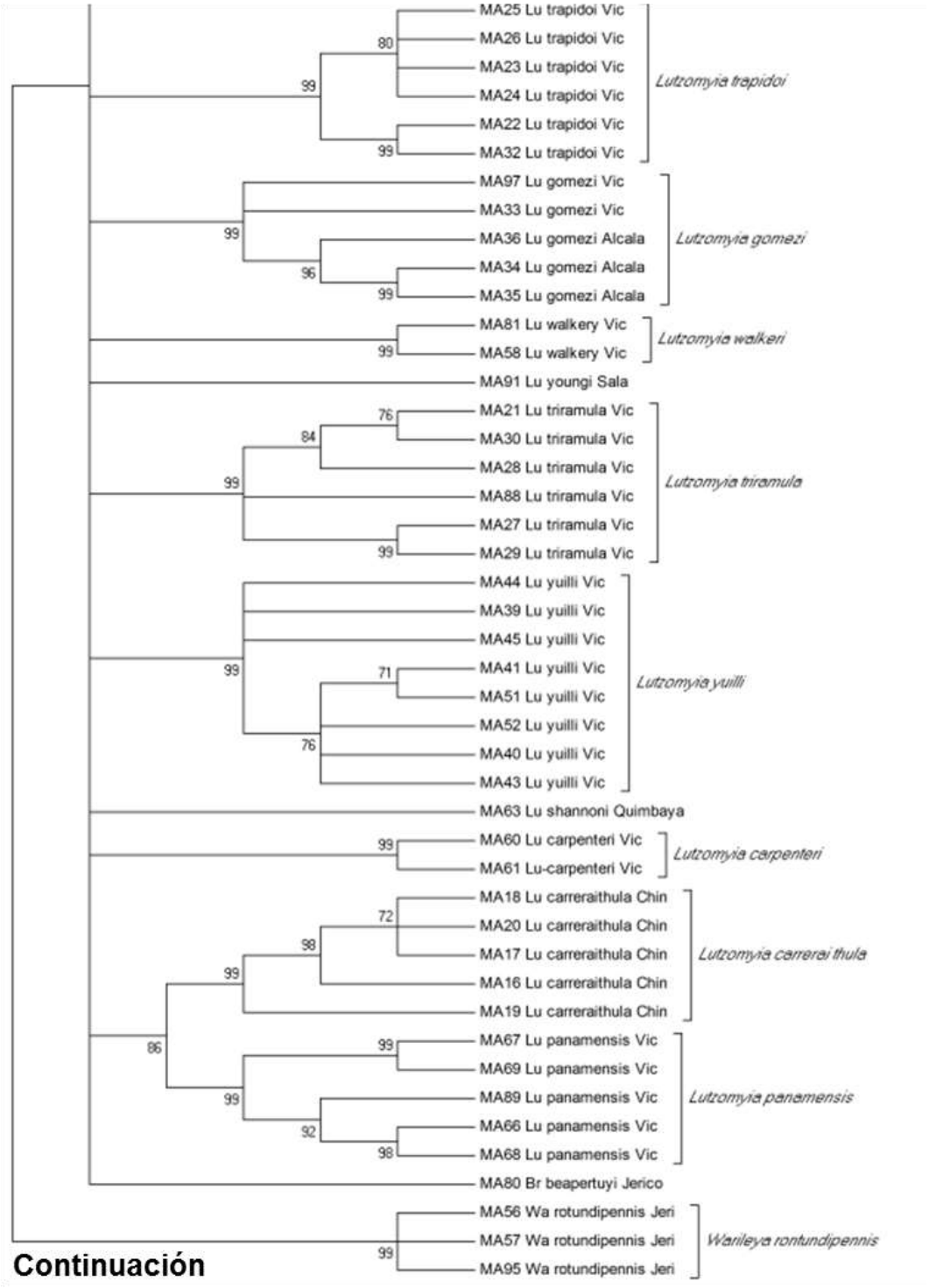
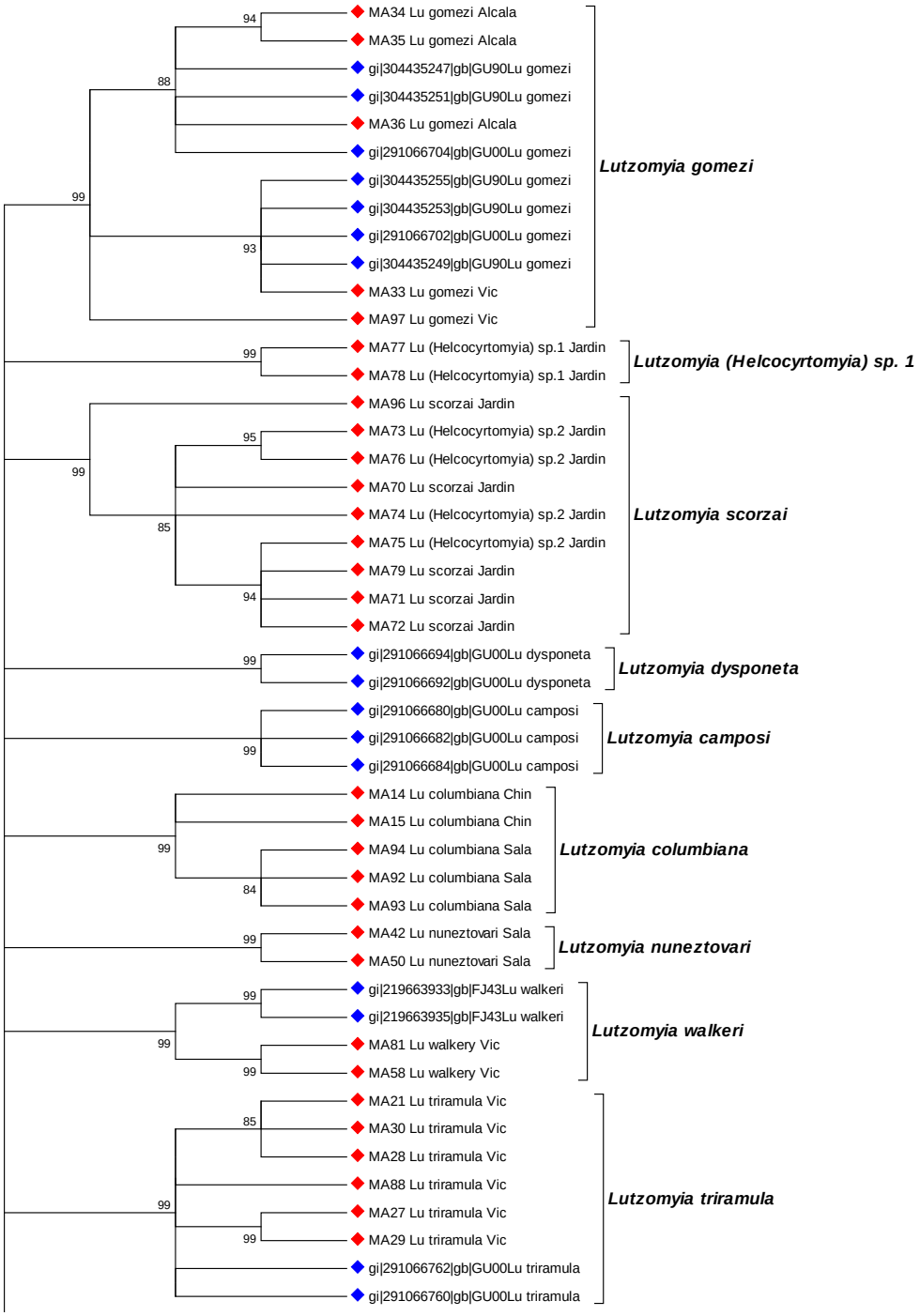


Figura 4-49: Dendograma consenso Neighbor-Joining



Dendograma consenso Neighbor-Joining, con valores bootstrap de 1000 réplicas, basado en el modelo de distancias K2P de secuencias de flebotomíneos de zona cafetera colectadas en este estudio ◊ y GenBank ◊. El valor es mostrado para cada rama y su respectiva longitud interna.

Figura 4-50: (Continuación)

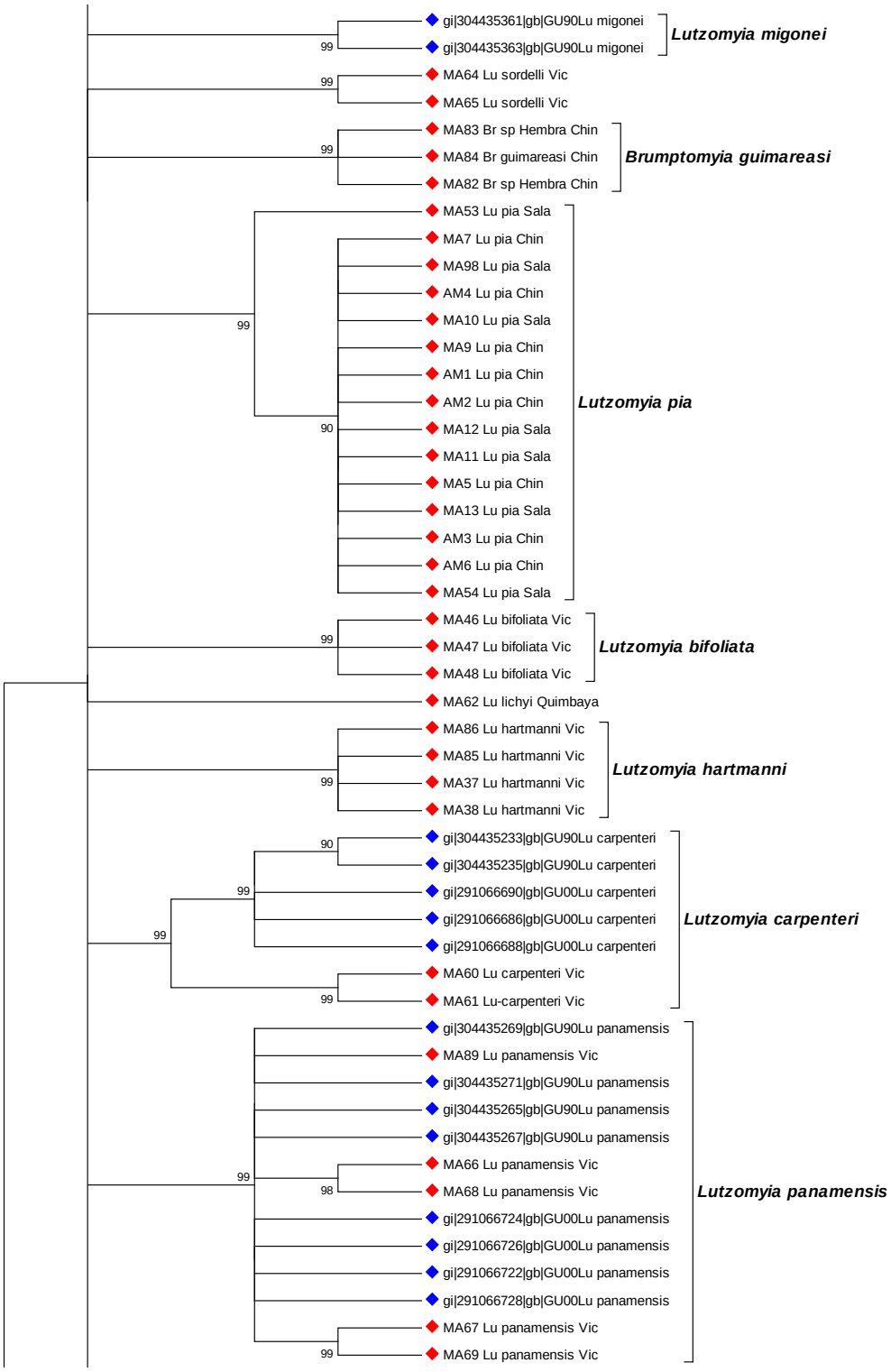
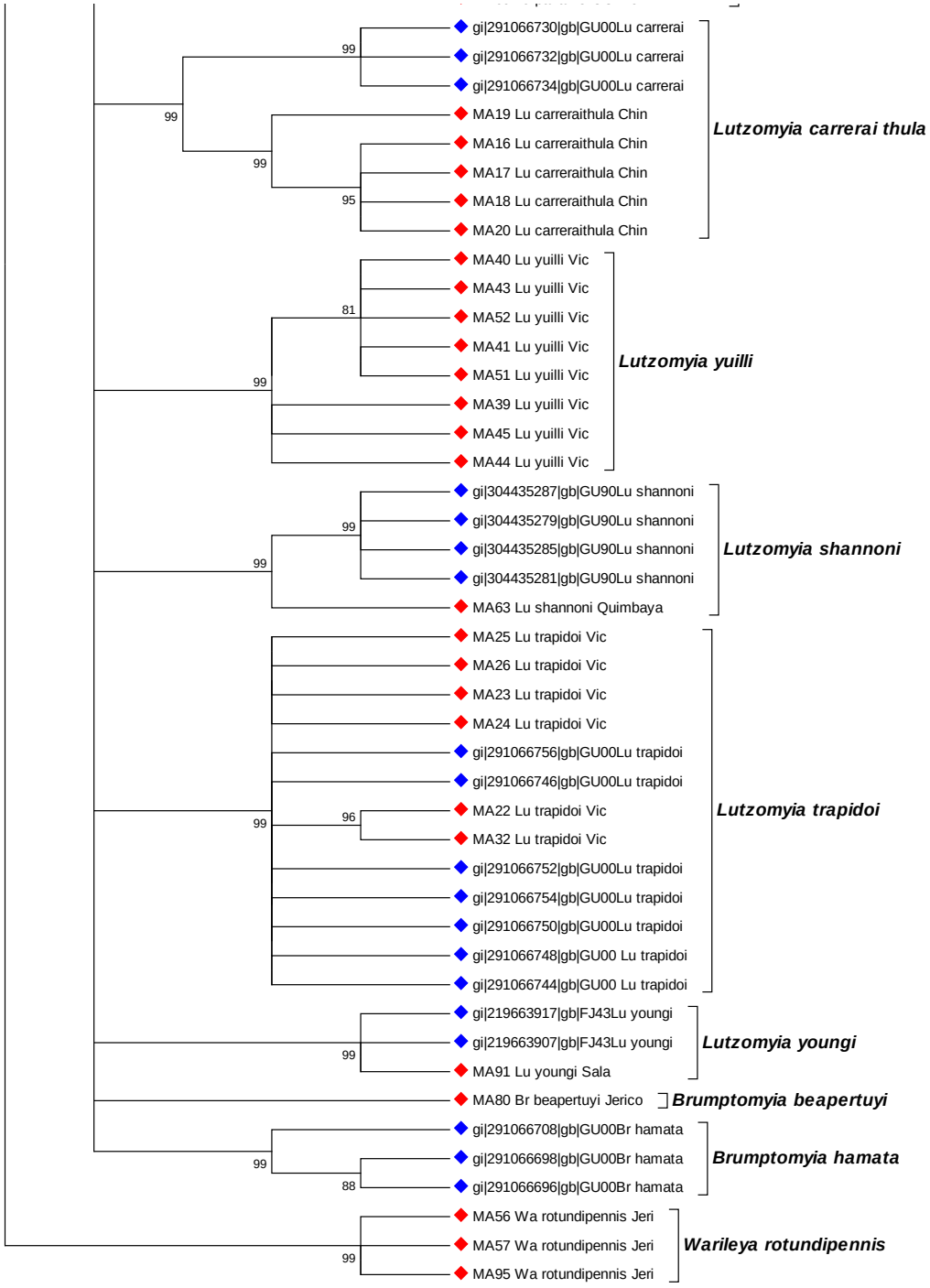


Figura 4-51: (Continuación)



4.4 Actualización sobre el conocimiento relacionado con la presencia y distribución de Phlebotominae en zonas cafeteras con base en la literatura y los resultados del presente estudio

A continuación se presenta la lista de las especies y se resalta en el listado los nuevos registros y todas las actualizaciones respecto a lo que se conocía antes de la realización del estudio.

Estructuración de la lista

La lista está ordenada de forma sistemática a nivel de género, subgénero o grupo y especie en orden alfabético. Para la clasificación y nomenclatura se siguieron los esquemas propuestos para los flebotomíneos presentados por Young y Duncan (1994). Para cada especie, se especifican las localidades, y referencias por departamento ordenados alfabéticamente. Para los nuevos registros se detalla, además, el método de colecta utilizado.

Al incluir los registros de todas las fuentes de información secundaria y los resultados del presente estudio se listan 48 especies en 11 departamentos: Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Cundinamarca; Huila, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca (Tabla 4-7). El listado comprende los géneros: *Brumptomyia* (2 especies), *Lutzomyia* (45 especies) y *Warileya* (1 especie).

Entre los subgéneros y grupos de especies del género *Lutzomyia* presentes en zona cafetera se destacan el grupo *verrucarum* Theodor, 1965 representado por 17 especies, dos de la serie *evansi* Galati, 1995; tres de la serie *pia* Galati, 1995, dos de la serie *serrana* Barreto, 1962; siete de la serie *townsendi,* dos de la serie *verrucarum* Fairchild, 1955 y *Lutzomyia nuneztovari* Ortiz, 1954 (no ubicada en serie). El subgénero *Helcocyrtomyia* Barreto, 1962 está representado por dos series, *osornoi* Galati & Cáceres, 1994 y *sanguinaria* Barretto, 1962 con una y cuatro especies respectivamente, seguido por el subgénero *Lutzomyia* França, 1924 con cuatro especies, el grupo *migonei*, el subgénero *Psathyromyia* Barretto, 1962 y el subgénero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941 con tres especies cada uno. Los subgéneros *Micropygomyia* Barretto, 1962, *Nyssomyia* Barretto, 1962 y *Trichopygomyia* Barreto, 1962, están representados por dos

especies, mientras que, los subgéneros *Pressatia* Mangabeira, 1942, *Sciopemyia* Barretto, 1962, *Trichophoromyia* Barretto, 1962, *Trichopygomyia* Barreto, 1962 y los grupos *aragaoi* Theodor, 1965 y *oswaldoi* Theodor, 1965, están representados por una sola especie (Tabla 15).

En la lista aparecen taxones de extenso ámbito geográfico en zona cafeteras colombiana (*Lu. lichy, Lu. columbiana, Lu. nuneztovari, Lu. shannoni* y *Lu. pia*). *Lu. lichy* es una de las especies con mayor registro en zona cafetera colombiana, seis departamentos, 12 localidades. Seguida por *Lu. columbiana*, cinco departamentos, 20 localidades. *Lu. nuneztovari*, especie también se registra en cinco departamentos, 15 localidades. Patrón de distribución similar en zona cafetera presenta *Lu. shannoni* (cinco departamentos, diez localidades), *Lu. pia* (cuatro departamentos, diez localidades*)* (Tabla 5-15).

Tabla 4-14: Lista actualizada de especies de flebotomíneos presentes en áreas de influencia cafetera

† Especies colectadas en el estudio, ♦Registro nuevo para Colombia, ****** Registro nuevo de distribución para los departamentos y * nuevos registros para el municipio. Método de colecta utilizado para colectar los flebotomíneos que constituyen nuevos registros: [a] búsqueda activa, [b] Shannon, [c] CDC, [d] Cebo Humano.

Género	subgénero o grupo, serie	Especie	Departamento	Municipio o localidad (Referencia)
Brumptomyia		*Br. beapertuyi* †	Antioquia**	Jericó (*)[c]
			Caldas**	Chinchiná(*)[c]
			Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992)
		Br. guimaresi †♦	Caldas	Chinchiná(*)[c]
Lutzomyia	*aragaoi*	*Lu. carpenteri* †	Caldas**	Victoria (*)[c]
			Tolima	Chaparral (Contreras *et al.* 2012)
	Helcocyrtomyia, serie *osornoi*	*Lu. erwindonaldoi*	Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Durania (Tesh *et al.* 1987)
			Tolima	Chaparral (Marín *et al.* 2008, Contreras *et al.* 2012)
	Helcocyrtomyia, serie *sanguinaria*	*Lu. hartmanni* †	Antioquia	Montebello (Vélez *et al.* 1991), San Carlos (VHET, 1992)[b]
			Caldas	Filadelfia (Alexander *et al.* 2001), Pensilvania (Alexander *et al.* 2001), Samaná (*)[c]
		Lu. scorzai †	Antioquia	Jardín (*)[b]
			Valle del Cauca	Dagua (Montoya *et al.* 1990), La Guaira (Alexander *et al.* 1995b)
		Lu. sp.	Caldas	Arma/Aguadas (Alexander *et al.* 2001)
			Tolima	Chaparral (Pardo *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2012), Planadas (Cárdenas *et al.* 1999),
		Lu. sp 1 †	Antioquia	Jardín (*)[b]
	Lutzomyia	*Lu. bifoliata* †	Antioquia	San Carlos (VHET, 1992) [b]

		Caldas	Arma/Aguadas (Alexander *et al.* 2001), Victoria (*)[c]
	Lu. gomezi †	Antioquia	Montebello (Vélez *et al.* 1991), San Carlos (VHET, 1992) [d]
		Caldas	Filadelfia (Alexander *et al.* 2001), Victoria (*)
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Gramalote (Alexander *et al.* 2001)
		Quindío**	Quimbaya (*)[a]
		Valle del Cauca	Alcalá (*)[c]
	Lu. lichy †	Caldas	Filadelfia (Alexander *et al.* 2001), Salamina (Alexander *et al.* 2001)
		Quindío	Montenegro (Alexander *et al.* 2001), Quimbaya (*)[a]
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Gramalote (Alexander *et al.* 2001)
		Tolima	Chaparral (Contreras *et al.* 2012)
		Risaralda	Marsella (Alexander *et al.* 2001)
		Valle del Cauca	Alto Aguacatal (Alexander *et al.* 1995a), Dagua (Montoya *et al.* 1990),
	Lu. longipalpis	Caldas	Marquetalia (Mondragón- Shem *et al.* 2007)
		Norte de Santander	Arboledas(Young *et al.* 1987), Durania (Young *et al.* 1987)
Micropygomyia	*Lu. atroclavata*	Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992)
		Tolima	Chaparral (Marín *et al.* 2008)
		Risaralda	Marsella (Bejarano *et al.* 2007)
	Lu. cayennensis	Norte de Santander	Bochamela (Alexander *et al.* 2001)
		Risaralda	Guática (Barreto *et al.* 1997)
Migonei	*Lu. dubitans*	Antioquia	Montebello (Vélez *et al.* 1991)
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992)
	Lu. sp. *baduel* †	Antioquia**	Jericó (*)[c]
	Lu. walkeri †	Caldas**	Samaná (*)[c] , Victoria (*)[c]
		Tolima	Chaparral (Marín *et al.* 2008)
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Gramalote (Alexander *et al.* 2001)
Nyssomyia	*Lu. trapidoi* †	Antioquia	San Carlos (VHET, 1992) [d]
		Caldas	Pensilvania (Alexander *et al.* 2001), Samaná (*)[c] Victoria (*)[c]
		Risaralda	Pueblo Rico (*)[c]
	Lu. yuilli †	Antioquia	San Carlos (VHET, 1992)[d]
		Caldas	Pensilvania (Alexander *et al.* 2001), Samaná (*)[c] Victoria (*)[c]
Pressatia	*Lu. camposi* †	Caldas	Victoria (*)[c]
Psathyromyia	*Lu. dasymera* †	Caldas **	Victoria (*)[c]
	Lutzomyia lerayi	Tolima	Chaparral (Marín *et al.* 2008, (Contreras *et al.* 2012)
	Lu. shannoni †	Caldas	Filadelfia (Alexander *et al.* 2001)
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Bochamela (Alexander *et al.* 2001), Gramalote (Alexander *et al.*
		Tolima	Chaparral (Pardo *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2012), Planadas (Cárdenas *et al.* 1999),
		Quindío**	Quimbaya (*)[a]

		Valle del Cauca	Dagua (Montoya *et al.* 1990), La Guaira (Alexander *et al.* 1995b)
Psychodopygus	*Lu. carrerai thula* †	Caldas**	Chinchiná (*)[c] Samaná (*)[c]
		Risaralda	Pueblo Rico (*)[c]
	Lu. davisi	Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992)
	Lu. panamensis †	Antioquia	San Carlos (VHET, 1992)[d]
		Caldas	Victoria (*)[c] Samaná (*)[c]
oswaldoi	*Lu. trinidadensis*	Tolima	Chaparral (Pardo *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2012)
Sciopemyia	*Lu. sordelli* †	Tolima	Chaparral (Contreras *et al.* 2012)
		Caldas	Arma/Aguadas (Alexander *et al.* 2001), Victoria (*)[c]
Trichophoromyia	*Lu. reburra*	Cauca	(Young y Duncan 1994)+
Trichopygomyia	*Lu. ferroae*	Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Gramalote (Alexander *et al.* 2001)
	Lu. triramula †	Caldas	Samaná (*)[c] Victoria (*)[c]
verrucarum, especie aislada	*Lu. nuneztovari* †	Antioquia	Montebello (Vélez *et al.* 1991)
		Caldas	Salamina (Alexander *et al.* 2001)
		Huila	Algeciras (Pardo *et al.* 1999), Garzón (Pardo *et al.* 1999),
		Tolima	Chaparral (Pardo *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2012), Planadas (Cárdenas *et al.* 1999),
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992),, Durania (Tesh *et al.* 1987),
verrucarum, serie *evansi*	*Lu. evansi*	Valle del Cauca	Versalles (Warburg *et al.* 1991)
	Lu. ovallesi	Caldas	Arma/Aguadas (Alexander *et al.* 2001)
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Bochamela (Alexander *et al.* 2001), Durania (Tesh *et al.* 1987),
		Tolima	Herveo (VHET, 1993)[d]
verrucarum, serie *pia*	*Lu. pia* †	Caldas	Chinchiná (*)[b,c] Filadelfia (Alexander *et al.* 2001), Salamina
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Durania (Tesh *et al.* 1987),
		Valle del Cauca	Argelia (Barreto *et al.* 2006), Versalles (Warburg *et al.* 1991)
		Risaralda	Guática (Barreto *et al.* 1997), Marsella (Alexander *et al.* 2001)
	Lu. suapiensis	Tolima	Chaparral (Contreras *et al.* 2012)
verrucarum, serie *serrana*	*Lu. oresbia*	Tolima	Chaparral (Marín e al. 2008)
	Lu. serrana	Caldas	Samaná (Bejarano *et al.* 2003)
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Durania (Tesh *et al.* 1987),
		Valle del Cauca	Ulloa (Alexander 1995)
verrucarum, serie *townsendi*	*Lu. longiflocosa*	Huila	Algeciras (Pardo *et al.* 1999), Garzón (Pardo *et al.* 1999),
		Tolima	Casablanca (Pardo *et al.* 1999), Chaparral (Pardo *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2012),
	Lu. quasitownsendi	Norte de Santander	Villa Caro (Bejarano *et al.* 2003)
	Lu. spinicrassa	Boyacá	Guateque (Morales *et al.* 1969; Escobar *et al.* 2004)
		Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992), Bochamela (Alexander *et al.* 2001), Durania (Tesh *et al.* 1987),

		Lu. sp. cerca a *saurodia*	Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992)
		Lu. torvida	Cundinamarca	Reventones (Young y Duncan, 1994)
		Lu. townsendi	Valle del Cauca	Dagua (Montoya *et al.* 1990), Jiguales (Testa *et al.* 2002),
		Lu. youngi †	Antioquia	Montebello (Vélez *et al.* 1991)
			Caldas	Arma/Aguadas (Alexander *et al.* 2001), Chinchiná (*)[c] ,
			Valle del Cauca	Alto Aguacatal (Alexander *et al.* 1995a), Argelia (Barreto *et al.* 2006),
	verrucarum, serie *verrucarum*	*Lu. antioquiensis*	Antioquia	Montebello (Wolff y Galati. 2002)
		Lu. columbiana †	Antioquia	Gómez Plata (Bejarano *et al.* 2003)
			Caldas	Aguadas (Bejarano *et al.* 2003), Chinchiná (*)[b,c] Filadelfia (Alexander *et al.* 2001),
			Risaralda	Guática (Barreto *et al.* 1997), Marsella (Alexander *et al.* 2001)
			Tolima	Chaparral (Pardo *et al.* 2006; Contreras *et al.* 2012), Planadas (Cárdenas *et al.* 1999),
			Valle del Cauca	Alcalá (*)[c] Alto Aguacatal (Alexander *et al.* 1995a),
Warileya		*Wa. rotundipennis*†	Antioquia	San Carlos, PECET b, Jericó (*)[c]
			Norte de Santander	Arboledas (Alexander *et al.* 1992)
			Tolima	Chaparral (Contreras *et al.* 2012)
			Risaralda	Pueblo Rico (*)[c]

5. Discusión

En el presente estudio, basados en morfología externa e interna comparada se identificaron dos especies del género *Brumptomyia*, 22 especies y 2 morfotipos del género *Lutzomyia* y una especie del género *Warileya* encontrándose diferencias en ocho especies (*Br. guimareasi*, *Lu. camposi*, *Lu. carrerari thula*, *Lu. dasymera*, *Lu. panamensis*, *Lu. triramula*, *Lu*. (*Helcocyrtomyia*) sp.2 y *Lu*. sp. de Baduel con los rregistros previos sobre las especies flebotomíneas presentes en estos ecosistemas (Tabla 7) (Montoya-Lerma *et al.* 1990, Warburg e al. 1991; Vélez *et al.* 1991, Alexander *et al.* 1995, Alexander *et al.* 2001).

Los subgéneros y grupos de especie con mayor presencia y abundancia en nuestro estudio fueron *verrucarum, Nyssomyia*, *Psychodopygus Lutzomyia* y *Helcocyrtomyia* de forma similar a estudios realizados anteriormente en la zonas cafeteras colombianas, donde evidencian la dominancia de especies de la serie *townsendi* del grupo *verrucarum* en zona cafetera (Montoya-Lerma 1990, Warburg *et al.* 1991, Vélez *et al.* 1991, Warburg *et al.* 1991, Young y Duncan, 1994; Cárdenas *et al.* 1999; Pardo *et al.* 1999, Alexander *et al*. 2001; Marín *et al.* 2008; Contreras *et al.* 2012).

Con respecto al mayor número de especímenes de *Lu. pia* colectados en este estudio, 574 individuos, es comparable con el estudio de Alexander *et al.* (2001), quien también documentó a *Lu. pia* como la especie dominante en cultivos de café tradicional como tecnificado, con valores equivalentes a 344 individuos y 54 individuos respectivamente. Sin embargo, estos autores utilizaron un método diferente (trampas pegajosas) para la captura de adultos de flebotomíneos, durante un mayor periodo de tiempo que además incluyó épocas seca y lluviosa. Por el contrario, la especie *Lu. pia* se encontró en menor número en los muestreos en los departamentos de Norte de Santander, Risaralda y Valle del Cauca y realizados por Tesh *et al.* (1987), Warburg *et al.* (1991), Alexander *et al.* (1992), Barreto *et al.* (1997) y Barreto *et al.* (2006).

Lu. carrerai thula es la segunda especie más numerosa en el área estudiada, y como fue mencionado anteriormente no había sido registrada en zonas cafeteras, esta especie no está asociada a la transmisión de *Leishmania* spp. al hombre y a los animales. *Lu. youngi* y *Lu. yuilli se* presentaron en menor frecuencia, la presencia de estas especies en zona cafetera ha sido registrada por Vélez *et al.* 1991, Alexander *et al.* (1995ª) , Alexander *et al.* (2001) y Barreto *et al.* (2006) (Tabla 4-7).

La alta densidad de las especies *Lu. pia*, *Lu. carrerai thula*, *Lu. youngi* y *Lu. yuilli* en las localidades muestreadas de zona cafetera, es una clara evidencia de que estas especies han sabido aprovechar los factores abióticos que más repercusión tienen en los cambios de la dinámica poblacional como son la humedad relativa, la temperatura y las precipitaciones y la altitud (Bejarano *et al.* 2003; Bejarano *et al.* 2004; Vergara *et al.* 2008).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, representan una clara demostración que la fauna flebotomínea en zona cafetera, es cambiante tanto en el número de especies como en su distribución poblacional, evidenciado en los nuevos registros (Tabla 4-7). La densidad poblacional de estos vectores y la aparación de nuevas especies, está relacionada con los factores climticos y con las labores culturales y económicas practicadas en la zona (Alexander *et al.* 2001, Azevedo *et al.* 2002; Travi *et al.* 2002, Barata *et al.* 2005)

Entre las especies de flebotomíneos colectadas en este estudio, 11 especies (37,93%) son reconocidas por su hábitos antropofílicos y/o antecedentes epidemiológicos: *Lu. columbiana, Lu. nuneztovari, Lu. pia, Lu. youngi, Lu. trapidoi, Lu. panamensis, Lu. yuilli, Lu. gomezi, Lu. lichyi, Lu. hartmanni* y *Lu. shannoni*. Esta flebotofauna de importancia médica es semejante a estudios realizados anteriormente en la zonas cafeteras colombianas (Montoya-Lerma 1990, Warburg *et al.* 1991, Alexander *et al.* 1995; Rodríguez-Barraquer et al 2008, Young *et al.* 1987, Montoya-Lerma *et al.* 1990, Vélez *et al.* 1991, Warburg *et al.* 1991, Alexander *et al.* 1992; Young y Duncan, 1994; Alexander *et al.* 1995; Pardo *et al.* 1996; Alexander *et al.* 1998; Cárdenas *et al.* 1999; Pardo *et al.* 1999, Alexander *et al.* 2001; Bejarano *et al.* 2003; Marín *et al.* 2008; Contreras *et al.* 2012). Se destaca la presencia de *Lu. panamensis*, especie de importancia médica no registrada previamente en zona cafetera. En este sentido, se confirma que la zona

cafetera es un área de riesgo potencial para la transmisión de las leishmaniasis, tal como fue sugerido inicialmente por Corredor *et al.* (1986), posteriormente, Montoya-Lerma *et al.* (1990), Vélez *et al.* (1991) y Alexander *et al.* (1995), quienes consideran el factor caficultura asociado con distintos focos de leishmaniasis en Antioquia, Norte de Santander y el Valle del Cauca.

Desde el punto de vista epidemiológico, se destaca *Lu. columbiana*, especie con hábitos de picadura agresivos (Young y Duncan, 1994; Alexander *et al.*1995) que ha sido asociada con la transmisión del parásito tripanosomatídeo *Le. mexicana* en un foco de leishmaniasis cutánea del suroccidente del país (Montoya- Lerma *et al.* 1999) y es susceptible a la infección experimental por *Le. braziliensis* (Warburg *et al.* 1991) y *Le. mexicana* Biagi, 1953 (Montoya-Lerma *et al.* 1999). También, se considera vector sospechoso de la bacteria *Bartonella bacilliformis* durante un brote de bartonelosis humana registrado en el departamento de Nariño, entre finales de la década de los 30 y principios de los 40 (Rozeboom, 1947) (Tabla 5-15).

Por otra parte, *Lu. gomezi*, es una especie reconocida por su comportamiento antropofílico y endofílico, es considerada como probable vector en varias regiones endémicas de leishmaniasis cutánea en Colombia (Travi *et al.*1988; Vélez *et al.* 1991; Muñoz, 1998); además, ha sido encontrada naturalmente infectada con promastigotes no identificados en Panamá (Johnson *et al.* 1963), Ecuador (Gómez y Hashiguchi, 1987) y Colombia (Young *et al.* 1987; Morales *et al.* 1981). En Venezuela, se encontró naturalmente infectada con *Le. braziliensis* (Feliciangeli *et al.* 1994; Rodríguez *et al.* 1999). *Lu. gomezi*, bajo condiciones experimentales, permite el desarrollo de *Le. panamensis* (Walters *et al.* 1989; Jaramillo *et al.* 1994). Santamaría *et al.* (2006) detectaron a *Lu. gomezi* naturalmente infectada con *Le*. *panamensis* y consideran a esta especie como un vector eficiente de *Leishmania* spp.(Tabla 5-15).

En relación con *Lu. hartmanni,* esta especie es considerada de hábitos antropofílicos y vector sospechoso de *Le*. *panamensis* en Ecuador (Alexander *et al.* 1992b), también fue encontrada infectada naturalmente con *Le. equatorensis* (Furuya *et al.* 1998) y *Leishmania* spp (Kato *et al.* 2007). En Colombia, *Lu hartmanni* es implicada en la transmisión de *Le*. *colombiensis*, parásito reconocido como agente etiológico de leishmaniasis cutánea (Kreutzer *et al.* 1991) (Tabla 5-15).

Entre tanto, *Lu. lichyi*, ha sido incriminada en Colombia como vector de *Le*. *braziliensis* (Alexander *et al.* 2001). El hallazgo de individuos de *Lu. lichyi* en Colombia con autogenia y picando en horas diurnas y dentro del domicilio (Alexander *et al.* 1995; Cárdenas *et al.* 2005) permite ubicarla entre las especies de importancia médica.

Desde el punto de vista epidemiológico, *Lu. nuneztovari* es antropofílica y aunque en Colombia esta especie no ha sido involucrada como vector principal en ningún foco de leishmaniasis cutánea, *Lu*. *nuneztovari* ha mostrado ser susceptible a la infección con *Le. braziliensis* bajo condiciones experimentales (Santamaría *et al.* 1999) por lo que es tratada como probable vector secundario, dado que su baja densidad no permitiría el mantenimiento del ciclo de transmisión en ausencia de otros vectores (Santamaría *et al.* 1999). *Lu. nuneztovari* es considerada en Bolivia como vector de *Le. amazonensis*, *Le. braziliensis* y *Le. lainsoni* (Torrez *et al.* 1998; Martínez *et al.* 1999; Bastrenta *et al.* 2002). En Bolivia, la subespecie *Lu. nuneztovari* anglesi es considerada vector de *Le. braziliensis* en el foco de Las Yungas (Torrez *et al.* 1989; Torrez *et al.* 1998) y de *Le. amazonensis* en Cajuata (Martínez *et al.* 1999) (Tabla 5-15).

Se debe enfatizar en la presencia de *Lu. panamensis* en áreas de influencia cafetera de la región andina Colombia, debido a que ha sido considerado vector natural de *Le. panamensis* (Christensen *et al.* 1983). En Ecuador fue encontrada con flagelados no identificados (WHO, 1984). En Venezuela, se ha incriminado como vector de *Le. braziliensis* (Rodríguez *et al.* 1999). En Colombia fue registrada infectada naturalmente por *Le. panamensis* por Santamaría *et al.* (2006) (Tabla 4-7).

Hasta la fecha, *Lutzomyia pia* no ha sido directamente incriminada con la transmisión de agentes patógenos a el hombre. Sin embargo se destaca por su tendencia antropofílica (Zeledón *et al.* 1985; Alexander *et al.* 1992; Agudelo *et al.* 2002; Bejarano *et al.* 2004). Existe una fuerte evidencia de un posible papel vectorial de *Lu. pia* en Colombia, ya que ha demostrado ser susceptible a *Le. braziliensis* (Warburg *et al.* 1991). Las hembras infectadas experimentalmente son potencialmente capaces de transmitir el parásito por la picadura (Killick-Kendrick, 1990). En cuanto a su antropofilia, *Lu. pia*, se ha observado sutiles diferencias de comportamiento de picadura (Warburg *et al.* 1991; Zuleta, 2002) (Tabla 4-7).

Aunque a la fecha *Lu. scorzai* no ha sido incriminado como vector de leishmaniasis, pero integra el subgénero *Helcocyrtomyia* Barreto, 1962, grupo al que pertenecen varias especies de importancia médica que participan en la transmisión de *Leishmani*a spp. (Young y Duncan, 1994). En Colombia, las hembras de esta especie se han colectado usando cebo humano (Alexander *et al.* 1995; Barreto *et al.* 2006).

Lu. shannoni es de hábitos antropofílicos (Jiménez, 2000), fue infectado experimentalmente y tiene la capacidad de mantener la infección de *Leishmania* sp.(Lawyer y Young, 1987). En Colombia, Ferro *et al* (1998) indican que experimentalmente *Lu. shannoni* permite el desarrollo de al menos tres especies de parásitos de *Leishmania*, *Leishmania* (*Viannia*) *mexicana* Biagi 1953, *Le. panamensis* y *Leishmania infantum* Nicolle 1908. En Estados Unidos *Lu. shannoni* es un vector comprobado de la leishmaniasis visceral y del virus de la estomatitis vesicular (VSV) serotipo Nueva Jersey (Lawyer y Young, 1987; Comer *et al.* 1994) (Tabla 4-7).

Especial énfasis se debe hacer con *Lu. trapidoi*, esta especie en Ecuador es considerada vector de *Le. panamensis* (Le Ponti *et al.* 1994). En Colombia, ha sido reportada en los focos de leishmaniasis del Bajo Calima y Tumaco (Loyola *et al.* 1988). *Lu. trapidoi* se considera vector primario de leishmaniasis en diferentes localidades (Morales *et al.* 1981; Duque *et al.* 2004). Por su parte, Molina (1995) encontró formas flageladas en las hembras colectadas de *Lu. trapidoi* y Muñoz (1998) detecto parásitos del subgénero *Leishmania* (Tabla 4-7).

En relación con *Lu. yuilli yuilli,* ésta se destaca por su carácter antropofílico (Young y Porter, 1972; Wolff *et al.* 2003).En hembras de esta especie Ferro y Morales (1998) encontraron flagelados sin identificar; de la misma forma fueron hallados parásitos en hembras en Brasil (Lainson *et al.* 1987; Arias *et al.* 1985). Santamaría *et al.* (2006) presentaron el primer reporte de infección natural sugiriéndose como vector (Tabla 4-6).

Finalmente, *Lu. youngi* es vector de *Le. braziliensis* en Venezuela (Scorza *et al.* 1984), donde se halló naturalmente infectada en sitios de transmisión activa de leishmaniasis. En Costa Rica, es considerada vector sospecho (Young y Duncan, 1994). Es importante indicar que el vector de *Le. braziliensis* en el departamento del Valle del Cauca, Colombia, fue inicialmente registrado como *Lu. townsendi* por Warburg *et al.* (1991), pero en los informes posteriores de Alexander y Usma (1994), Alexander *et al.* (1995a, b) y

Feliciangeli, 2012 (Comunicación personal) informan que la identidad correcta es *Lu. youngi* Feliciangeli y Murillo, 1987, por ende, *Lu. youngi* actúa, probablemente, como un vector de *Le. braziliensis* en el departamento de Valle del Cauca y es un potencial transmisor *Le. braziliensis* y *Le. infantum* (Warburg *et al.* 1991, Travi *et al.* 2002) (Tabla 4-6). A la fecha, en Colombia el único registro de la especie *Lu. townsendi* ha sido el realizado por Barreto *et al.* (2006) (Tabla 5-15).

Tabla 5-15: Importancia médica de las especies de *Lutzomyia* colectadas en el estudio

ESPECIE FLEBOTOMÍNEA	ENFERMEDAD	ESTADO VECTORIAL	INFECCIÒN NATURAL	INFECCIÒN EXPERIMENTAL	REFERENCIAS
Lutzomyia columbiana Ristorcelli y Van Ty, 1941	Bartonelosis, leishmaniasis cutánea	Potencial		*Le. braziliensis, Le. mexicana*	Rozeboom 1947; Montoya *et al.* 1990; Kreutzer *et al.* 1991; Warburg *et al* 1991; Alexander *et al.* 1995; Montoya-Lerma *et al.* 1999
Lutzomyia gomezi (Nitzulescu, 1931)	Leishmaniasis cutánea	Confirmado	*Le. panamensis, Le. braziliensis*	*Le. panamensis, Le. braziliensis*	Johnson *et al.* 1963; Morales *et al.* 1981; Christensen *et al.* 1983; Gómez y Hashiguchi, 1987; Young *et al.* 1987; Travi *et al.* 1988; Walters *et al.* 1989; Vélez *et al.* 1991; Feliciangeli *et al.* 1994; Jaramillo *et al.* 1994; Muñoz 1998; Rodríguez *et al.* 1999; Santamaría *et al.* 2006
Lutzomyia hartmanni (Fairchild & Hertig, 1957)	Leishmaniasis cutánea	Potencial	*Le. colombiensis, Le. equatorensis, Leishmania* spp., *Le. panamensis*		Kreutzer *et al.* 1991,Alexander *et al.* 1992; Furuya *et al.* 1998; Kato *et al.* 2007
Lutzomyia lichyi (Floch & Abonnenc, 1950)		Potencial	*Le. braziliensis*		Alexander *et al.* 1995; Alexander *et al.* 2001; Cárdenas *et al.* 2005
Lutzomyia nuneztovari (Ortíz, 1954)	Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y difusa	Confirmado	*Le. amazonensis, Le. braziliensis, Le. Lainsoni*	*Le. amazonensis, Le. braziliensis*	Torrez *et al.* 1998; Martínez *et al.* 1999; Pardo *et al.* 1999; Santamaría *et al* 1999; Bastrenta *et al.* 2002
Lutzomyia panamensis (Shannon, 1926)	Leishmaniasis cutánea	Confirmado	*Le. panamensis*	*Le. braziliensis*	Christensen *et al.* 1983; WHO 1984; Santamaría *et al.* 2006;
Lutzomyia pia (Fairchild & Hertig, 1961)	Leishmaniasis cutánea	Potencial		*Le. braziliensis*	Warburg *et al.* 1991
Lutzomyia shannoni (Dyar, 1929)	Leishmaniasis visceral	Potencial		*Le. mexicana, Le. panamensis, Le. infatum*	Lawyer and Young 1987; Ferro *et al.* 1998; Travi *et al.* 2002; Schantz 2004

Lutzomyia trapidoi (Fairchild & Hertig, 1952)	Leishmaniasis cutánea	Confirmado	*Le. panamensis*	*Le. braziliensis*	Morales *et al.* 1981; Christensen *et al.* 1983, Hashiguchi *et al.* 1985; Young *et al.* 1987; Travi *et al.* 1988; Jaramillo *et al.* 1994; Molina 1995; Muñoz 1998
Lutzomyia youngi Feliciangeli & Murillo, 1987	Leishmaniasis cutánea, mucocutánea	Confirmado	*Le. braziliensis*	*Le. braziliensis, Le. infantum,* Complejo *Le. mexicana*	Scorza *et al.* 1984; Scorzay Añez, 1984; Rojas *et al.* 1995; Alexander *et al.* 1995; Travi *et al.* 2002
Lutzomyia yuilli (Young & Porter, 1972)	Leishmaniasis cutánea	Potencial	*Le. panamenisis*	*Le. panamenisis*	Ferro y Morales. 1998; Lainson *et al.* 1987; Arias *et al.* 1985; Santamaría *et al.* 2006

A nivel ecorregional, las diferencias en el número de especímenes y especies de flebotomíneos encontrados cada ecotopo podría estar influenciado de acuerdo a factores intrínsecos (inherentes a la especie) y los factores extrínsecos (relativos al ambiente que inciden sobre la especie) (Davies *et al.* 2000; Ozbel *et al.* 2011). Para este estudio, en cada sitio de muestreo se utilizaron los tres métodos (CDC, shannon y búsqueda en sitios de reposo) que han sido descritas previamente y como se observa en la tabla 4-5, las colectas fueron, en gran medida, diferentes. Una caracterización del hábitat completa y detallada de cada sitio de colecta, no se llevó a cabo y por lo tanto es una mera especulación en cuanto qué factores específicos podrían ser responsables en las diferencias de las colectas en los sitios. Sin embargo, se mencionan a continuación los posibles responsables que podrían estar relacionados con las diferencias en la presencia de especies de flebotomíneos en los distintos ecotopos:

Factores intrínsecos: La capacidad de diapausa (interrupción temporal del desarrollo) en estado de huevo y pupa; fertilidad y longevidad, la plasticidad ecológica favorecida por su ciclo de vida; la preferencia de la hembra por ovipositar en lugares húmedos con gran cantidad de materia orgánica.

Factores extrínsecos: Por su parte, aunque estrechamente relacionados con los anteriores, los factores extrínsecos más significativos involucrados con las características bióticas y abióticas en el microambiente y el desequilibrio del ecosistema, así:

- Las características abióticas particulares que presenta cada ecotopo asociadas con la precipitación, el brillo solar, la temperatura, humedad relativa, el suelo, el relieve y la altitud (CENICAFE, 2010). Estos factores en especial la humedad

relativa y la temperatura, ya que pueden ser de importancia en la estimulación de la etapa inmadura, en la activación de la diapausa y la eventual emergencia de los adultos. De la misma forma, los factores físicos tales como las barreras geográficas, la disponibilidad de hábitat y los factores bióticos presentes en cada ecotopo, podrían también condicionar la presencia de flebotomíneos (Davies *et al.* 1995; Davies *et al.* 2000).

En este sentido, las diferencias en la presencia de flebotomíneos colectados en los tres diferentes ecotopos, pueden probablemente estar relacionados con los gradientes altitudinales, ya que, éstos están directamente correlacionados con las características ambientales bióticas y abióticas. Estudios sobre la ecología de flebotomíneos informan que la altitud y la estructura bioclimática tiene una importante impacto en la distribución de especies de flebotomíneos ya que ofrecen diversidad de hábitats, relieves, y perfil climático (Belén y Alten, 2006; Guernaoui *et al.* 2006). Estudios ecológicos de los flebotomíneos en la zona cafetera serían de gran pertinencia para precisar estos aspectos y paso lógico de continuidad para el presente estudio de diagnóstico sobre la presencia e importancia de las especies en la zona.

- A nivel de microambiente, la combinación de sitios de reposo de adultos, el hábitat propicio para los estadios inmaduros y la oferta de fuentes de azúcar y sanguínea, que podrían o no estar en una ecotopo sugiere que: *i*) Algunas estructuras morfológicas de plantas (ej. existencia de raíces tabulares y surcos en troncos de árboles), generan microambientes atractivos para algunas especies de flebotomíneos porque proporcionan protección y condiciones microclimáticas favorables en lo que respecta a humedad relativa, temperatura, luz y materia orgánica en descomposición (Baitone 2003), *ii*) que existen diferencias significativas para la riqueza y abundancia proporcional de los inmaduros que pueden desarrollarse hasta adulto de acuerdo al sitios de cría donde se desarrolla (Vivero 2011) *iii*) de acuerdo a la disponibilidad de ciertas fuentes sanguíneas en el área, la distribución y abundancia de hospederos vertebrados podrían también condicionar la presencia de flebotomíneos (Alexander *et al.* 1992; Davies *et al.* 1995; Davies *et al.* 2000; Feitosa y Castellón 2004).

En nuestro estudio se observaron potenciales sitios de cría de inmaduros de flebotomíneos en zona cafetera tal como: arena gruesa, hojarasca, madrigueras de

animales, huecos de los árboles, lo cual debe ser contemplado en próximos estudios. Así mismo, la presencia de condiciones morfofisilógicas en los flebotomíneos adultos colectados en sitios de reposo, como machos con la genitalia no rotada -180º, hembras grávidas, y hembras con ingesta sanguínea (datos no mostrados), también evidencia la presencia de potenciales sitios de cría cerca del sitio de colecta.

- Otro fenómeno importante de resaltar, generalmente relacionado con la presencia y distribución de especies son los cambios ocasionados por la destrucción de los ecosistemas naturales (deforestación, ampliación de la frontera agrícola, etc.) y el efecto de fenómenos físicos (cambio climático), generando cambios en la dinámica de la transmisión de las leishmaniasis, en la vegetación y en algunas especies flebotomíneas, donde algunas de éstas desaparecen, otras se tornan más abundantes, o se adaptan a los ambientes sinantrópicos, generalmente las especies de importancia médica (Agudelo *et al.* 2002; Bejarano *et al.* 2001; 2002; Días-Lima, Guedes y Sherlock, 2003; Petterson y Shaw, 2003).

En el presente estudio se observaron diferencias en las especies de flebotomíneos de importancia médica y/o antropofílicas de acuerdo al ecotopo (Tabla 4-5), evidenciándose una riesgo epidemiológico en los ecotopos 2A y 2B, más aún si se han registrado casos de leishmaniasis cutánea, es precisamente Caldas uno de los departamentos endémicos para leishmaniasis en el país, según reportes de las estadísticas (INS, 2011). Por el contrario en el ecotopo 1B (localidades de Jardín y Jericó) no se colectaron especies de importancia médica (Tabla4- 5) y no se registró transmisión activa de la enfermedad en el momento de las colectas de los insectos en las localidades mencionadas ni evidencia histórica de casos (Seccionales locales de Salud, comunicación personal).

En este sentido, las especies *Lu. pia*, *Lu. youngi*, *Lu. columbiana* y *Lu nuneztovari* podrían participar como potenciales vectores de leishmaniasis en las localidades de colecta en el ecotopo 2A (Tabla 5-16). En el ecotopo 2B, *Lu. trapidoi*, *Lu. yuilli* y en menor proporción *Lu. panamensis* y *Lu. hartmanni* pueden jugar algún papel en la transmisión de *leishmania* spp. (Tabla 5-16). La presencia de estas especies constituye un aspecto importante como punto de partida para futuros estudios epidemiológicos (Perruolo 2004).

Tabla 5-16: Presencia y ausencia de de las especies de *Lutzomyia* de importancia médica colectadas en el estudio.

Especies de Importancia médica	Ecotopos muestreados		
	1, Cordillera Occidental; B, vertiente oriental	2, Cordillera Central; A, vertiente occidental	2, Cordillera Central; B, vertiente oriental
Lutzomyia columbiana		X	
Lutzomyia gomezi		X	X
Lutzomyia hartmanni			X
Lutzomyia lichyi		X	
Lutzomyia nuneztovari		X	
Lutzomyia panamensis		X	X
Lutzomyia pia		X	
Lutzomyia shannoni		X	
Lutzomyia trapidoi		X	X
Lutzomyia youngi		X	
Lutzomyia yuilli			X

Las diferencias mencionadas pueden rrelacionarse con:

- Factores intrínsecos como la competencia vectorial de la cual se conoce poco en los flebotomíneos vectores, el hecho que las especies exhiban diferentes patrones de comportamiento y bionomía probablemente, sea un factor relacionado con la presencia o no de especies en las localidades, por ejemplo la actividad estacional ó el comportamiento (antropofílico o zoofílico, fitófago, endofágico, exofágico, endofilico, exofílico) (Davies *et al.* 1995; Davies *et al.* 2000; Alexander *et al.* 2001).
- Así mismo, factores extrínsecos como las actividades humanas, como el cultivo de café y materiales de construcción de las casas, podrían también influir en el contacto humano – vector y por ende en que se encuentren especies de comportamiento antropofílico en los ecotopos 2A y 2B (Davies *et al.* 2000; Alexander *et al.* 2001; King *et al.* 2004).

Estos factores valdría la pena estudiarlos en zona cafetera colombiana.

Por otra parte, Feliciangeli 1987, resalta el hecho que la composición de las especies flebotomíneos puede ser considerado como el resultado de las condiciones geográficas y meteorológicas, el tipo y uso del suelo y la vegetación. Las similitudes en la composición de especies por lo tanto, se pueden esperar en los lugares que presenten similares condiciones siempre y cuando, se utilicen los mismos métodos de colecta. Esta apreciación parece verse apoyada con los resultados del trabajo realizado por Alexander *et al.* (2001) quienes detectan similaridad de fauna flebotomínea presente en plantaciones de café de dos regiones representantes (Cordillera Central y Cordillera Oriental), donde los flebotomíneos miembros de grupo *verrucarum,* como *Lu. columbiana*, *Lu. nuneztovari*, *Lu. ovallesi*, *Lu. serrana*, *Lu. youngi* y *Lu. spinicrassa* son claramente adaptadas a plantaciones de café de distinto sistemas en las regiones mencionadas (Alexander *et al.* 2001). Con respecto a los resultados del presente trabajo, se observa que seis especies de flebotomíneos están presentes en dos de las tres ecotopos explorados, así en las regiones agroecológicas1B y 2A (Tabla 4-5), se presentan simultáneamente dos especies, *Br. beaupertuyi* y *Wa. rotundipennis*. En las regiones agroecológicas 2A y 2B, se presentan simultáneamente cuatro especies, *Lu. carrerai thula, Lu. gomezi, Lu. panamensis y Lu. trapidoi*, donde las tres últimas revisten importancia médica por estar relacionadas con la transmisión de la leishmaniasis (Tabla 4-7). Es importante señalar, que a excepción de *Lu. trapidoi*, un mayor número de especímenes de las especies mencionadas se colectaron en el ecotopo 2A, donde probablemente, desde la teoría ecológica del nicho, esta región agroecológica podría corresponder con el nicho fundamental (Hutchinson 1957), que provee las condiciones bióticas y abióticas, que hacen referencia a los recursos o fuente alimenticias que pueden utilizar, lugares de reposo, hábitats etc.,(Whittaker *et al.* 1973; Davies *et al.* 2000; Petterson y Shaw, 2003; Gonzales *et al.* 2010;), lo cual está relacionado con su fitness y selección. Por el contrario, para *Lu. trapidoi*, en el ecotopo 2A, esta especie, probablemente, puede tener un rango de población subóptima, a diferencia que en el ecotopo 2B.

Adicionalmente, nuestro estudio, evaluó la capacidad de la secuencia código de barras del ADN para la identificación de flebotomíneos mediante el examen de la variabilidad en 24 especies. Así, el aislamiento (amplificación por PCR) y el análisis del extremo 5’ del

gen mitocondrial Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI) fue facilitado ya que esta región está caracterizado por estar flanqueado por regiones altamente conservadas, como lo señala Hebert y Gregory (2005).

La longitud de nucleótidos de las secuencias amplificadas para el gen COI fue la esperada de acuerdo con los trabajos previos efectuados en Phlebotominae (Azpurua *et al.* 2010; Cohnstaedt *et al.* 2011; Kumar *et al.* 2012; Pinto *et al.* 2012)

En las secuencias código de barras de ADN en flebotomíneos, se observó un alto contenido de A+T, el cual está dentro de los promedios (68,1 a 70,7%) registrado para especies del orden Diptera, subórdenes Nematocera y Brachycera (Lunt *et al.* 1996; Crease 1999; Hoy 2006). Valores similares de A+T (66.7%) se observaron en los género *Phlebotomus* y *Sergentomyia* en estudios con COI (Kumar *et al.* 2012).

No se observó una variación significativa en el porcentaje de G+C entre las secuencias de Phlebotominae de las diferentes localidades estudiadas, ni una correlación diagnóstica. Igualmente, no se encontró ninguna correlación entre la longitud de la secuencia con el contenido de G+C ni con algún patrón de característico o de diagnósis para las especies estudiadas, lo que corrobora que este contenido parece ser estable a nivel de insectos y poco variable en categorías más bajas en la escala zoológica.

En cuanto al uso de codones, se observó claramente una preferencia por la terminación A ó T en los tripletas esto se sustenta en que la composición de bases del ADN mitocondrial está altamente correlacionada con el uso de codones, porque los genes que codifican para proteínas mitocondriales exhiben una preferencia para el uso de los codones ricos en A + T. Este fenómeno parece ser característico para el genoma mitocondrial de Insecta (Crozier y Crozier, 1993; Herbeck & Novembre, 2003). Estos valores son similares a los observados para otros insectos del orden Diptera (Lunt *et al.* 1996; Morlais y Severson, 2002; Herbeck & Novembre, 2003; Oliveira *et al.* 2005; Cywinska *et al.* 2006; Kumar *et al.* 2007; Navarro *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2012) y, en particular para especies del género *Lutzomyia* en diferentes fragmentos de genes mitocondriales analizados como Citocromo b (A+T = 73,09%), $tRNA^{serina}$ (A+T = 81,2%) y ND4 (A+T = 72,5%) (Vivero *et al.* 2007; Vivero *et al.* 2009; Uribe.*et al.* 2001).

En trabajos previos, han sido reportados niveles de variación genética adecuados para la tipificación de especies del género *Lutzomyia* haciendo uso del gen mitocondrial Citocromo B (5,54% - 30%) (Torgenson *et al.* 2003; Pérez-Doria *et al.* 2008; Vivero *et al.* 2009) y el gen de ARN de transferencia para Serina (2,86%- 11,43%) (Vivero *et al.* 2007; Pérez-Doria *et al.* 2011), sin embargo, sugieren ampliar el análisis, incluyendo más individuos de las mismas especies, así como otros taxones de origen neotropical. En este estudio, el número de taxones analizados fue mayor a los registrados y los resultados mostraron niveles de divergencia nucleotídica del gen COI adecuados para la tipificación a nivel intra e interespecífico en Phlebotominae. Esto es corroborado al verificar secuencias del gen COI publicadas (Azpurua *et al.* 2010; Cohnstaedt *et al.* 2011; Romero *et al.* 2010), cuyos análisis de divergencia revelaron valores similares a los mostrados en este trabajo.

En relación a las diferencias en términos de número y tipo de sustituciones entre los diferentes haplotipos de una misma especie a lo largo del alineamiento, los resultados evidencian 2 a 35 posiciones variables y los cambios nucleótidos son en su mayoría sustituciones sinónimas tipo transiciones (purina por purina y pirimidina por pirimidina) (Figura 4-45) en las terceras posiciones, los cuales no afectan la conformación aminoacídica de la proteína. Por el contrario, entre las especies, las tasas de sustitución nucleotídica aumentan gradualmente en relación con las distancias genéticas. Blouin *et al.* (1998), expresan que los patrones de sustitución de nucleótidos y la tasa de divergencia entre los sitios proporcionan datos información la aplicación del uso de secuencias de ADN a diagnósticos moleculares.

En general, los resultados revelan que no hay solapamiento entre los niveles de divergencia intra e interespecíficos - gap de código de barras, a pesar, que se observaron algunos valores muy altos de divergencia intraespecífica (Figura 4-46). Esta separación confirma La validez y eficacia de mala secuencia código de barras de ADN como identificador molecular de especie, tal como lo menciona Hebert et al. (2003).

Los resultados relacionados con la divergencia intraespecificá <2% en la mayoría de las se las secuencias de flebotmíneos de zona cafetera, son similares a los obtenidos en Phlebotominae por Azpurua *et al.* (2010) y Cohnstaedt *et al.* (2011), quienes revelan distancias intra-especie no mayores a 2% para *Lu. trinidadensis*, *Lu. gomezi* y *Lu. panamensis,* al igual que Kumar *et al.* (2012), en especies de los géneros *Phlebotomus* y

Sergentomyia (0.0% - 2%). Las grandes diferencias intraespecíficas (> 2%, como entre los distintos haplotipos de *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi,* 3,6% y 4,7% respectivamente,) podrían sugerir, probablemente, diferenciación de la población, o presencia de especies crípticas (Hoyos et al. 2012; Hebert *et al.* 2003), ésto es reflejo de la gran cantidad de mutaciones con respecto a las demás secuencias (divergencia intraespecífica mayor a 4%). Tal divergencia puede ser explicada por la presencia de polimorfismos ancestrales, los cuales pueden ser conservados a lo largo del tiempo debido, probablemente, a la distribución poblacional agregada característica de los flebotomíneos (Memmott, 1991), donde varios elementos deben ser considerados como su limitada capacidad de vuelo y por ende su menor capacidad de dispersión, aproximadamente 200 metros para las especies de bosque (Alexander, 1987) y 1.000 metros para las zonas desérticas (Morrinson *et al.* 1993) lo influye que se estructuren en pequeñas poblaciones. Tambien esta alta divergencia intraespecicifica observada en *Lu. panamensis* y *Lu. gomezi* podría relacionarse el carácter uniparental de genoma mitocondrial, por tanto es posible que la estimación de la diversidad genética presente algún sesgo, ya que las tasas de evolución de ADNmt varían considerablemente entre y dentro de las especies y entre grupos diferentes de especies, lo que resulta en superposición de las distancias intra e interespecíficas (Kipling y Rubinoff, 2004; Rubinoff, 2006; Rubinoff *et al.* 2006).

La heterogeneidad intrapoblacional observada puede ser producto de la amplitud de nicho correspondiente a la variedad de criaderos que podría ocupar estas especies. También, los cambios genéticos poblacionales en estas especies parecen estar determinados en gran medida por la disminución poblacional por el efecto, quizás, de insecticidas en localidades de alta presión por enfermedades endémo-epidémicase, o posiblemente por la acción de prolongados períodos de sequía que reducirían la disponibilidad de criaderos, mientras que en localidades sin presión antropogénica determinaría un patrón de continúa expansión genética, que se ve reflejada en la gran variabilidad y gran número de haplotipos. Pero para apoyar estos supuestos es necesario realizar un amplio muestreo de las entidades taxonómicas en mención y asi también incluir análisis más refinados.

A pesar que se ha criticado mucho que un simple valor de distancia genética pueda discriminar especies diferentes (Rubinoff *et al.* 2006) por lo que se prefiere un análisis no

sólo basado en distancias, sino en la observación de caracteres compartidos entre las secuencias (sinapomorfías) (De Salle *et al.* 2005), en este estudio, se encontró un rango de divergencia de nucleótidos entre 10% y 22.2% para diferenciar entre las 22 especies de Phlebotominae, también, las secuencias analizadas en este estudio son informativas y diagnósticas de especie y pueden ser utilizados para discriminar entre taxones. Estos resultados evidencian un rango de variación a nivel interespecífico más amplio que el registrado previamente por Azpuara *et al.* (2010) entre el 12-18% y Kumar *et al.* (2012), 14.1 – 20,2%, debido posiblemente, al número de especies analizadas, 16 y 8 especies, repectivamente.

Los resultados indican que la secuencia de COI permite diferenciar haplotipos de los géneros *Lutzomyia*, *Brumptomyia* y *Warileya*, con un patrón de variación nucleotídica a lo largo de la secuencia, que a su vez posibilita la rápida identificación molecular de especies del género *Lutzomyia* de importancia médica e isomórficas, colectadas en el presente estudio. Se resalta el hecho que los valores de distancias genéticas K2P intraespecíficas permitieron asociar las secuencias de dos hembras no identificadas de *Br*. sp al macho de *Br. guimaraesi* (0.3%) (Tabla 5-15). Con base en los porcentajes de divergencia (0.1% y 0.3%) se encontró que las hembras de *Lu*. (*Helcocyrtomyia*) sp. 2 corresponden a *Lu. scorzai* (Tabla 5-15). A pesar que esta especie no es considerada de importancia médica, la agrupación como *Lu. scorzai* es importante debido a que las hembras del subgénero *Helcocyrtomyia* no se pudieron asociar geográficamente con un macho, ya que se encontraron dos especies de macho de la misma serie, *Lutzomyia scorzai* (Ortiz, 1965) y *Lutzomyia* sp. 1 del subgénero *Helcocyrtomyi*a Barretto, 1962.

En el análisis del dendrograma de Neighbor–Joining (Figura 4-47) se observa que las agrupaciones con base en los haplotipos con valores significativos de bootstrap (>70), correspondieron a una misma especie determinada morfológicamente, esto se sustenta con las agrupaciones entre las secuencias registradas en las bases de datos y las obtenidas en el presente estudio (Figura 4-48). Así el análisis de las secuencias que fueron generadas indica que los clusters de las especies son congruentes con la identificación morfológica tal como lo mencionan Azpuara *et al.* (2010), Kumar *et al.* (2012) y Pinto *et al.* (2012) en sus trabajos.

En el dendograma se observa una separación adecuada de las especies de los diferentes géneros *Brumptomyia*, *Lutzomyia* y *Warileya* con suficiente soporte y se refleja el nivel variación con base en las distancias genéticas, lo que permite separar y asignar los haplotipos a especies designadas según criterios morfológicos (Young y Duncan, 1994; Galati, 2010). Las agrupaciones de haplotipos representan las *Molecular Operational Taxonomic Units* (*MOTUS*) permitiendo la diferenciación especie-específica, según lo establecido por Hebert *et al.* (2003), validando la consistencia y la utilidad de la secuencia código de barra COI para asignar individuos a los grupos que corresponden a las especies de Phlebotominae previamente definidos por especialistas basados en caracteres morfológicos. Los nodos principales (es decir, agrupación intraespecífica) en el dendrograma, están generalmente soportados por un alto valor de bootstrap. Los haplotipos de una especie formaron grupos de código de barras claramente distinguidas de las de especies afines. Como era de esperarse, algunas especies que fueron representadas por un solo individuo no se agruparon con ninguna otra especie (Figura 4-47).

El hecho de contar con los haplotipos de machos y hembras en el análisis (Tabla 4-9) permite realizar asociaciones con base en las agrupaciones que no fueron posibles con base en morfología. En este sentido, en los diferentes MOTUS obtenidos (Figura 4-47) se evidenció la agrupación de los haplotipos y se realizó una asignación correcta de los machos con sus respectivas hembras y una asignación de especies para las hembras isomórficas esto se observó para (bootstrap equivalentes a 99%) *Lu. pia*, *Lu. carrerai thula, Lu. nuneztovari, Lu. columbiana, Lu. sordelli, Lu. bifoliata, Lu. hartmanni, Lu. trapidoi, Lu. gomezi, Lu. walkeri, Lu. triramula, Lu. yuilli , Lu. panamensis* y *Wa. rotundipennis.* También se evidenciaron las agrupaciones de los distintos haplotipos de las hembras isomórficas de *Br*. sp y *Lu.* (*Helcocyrtomyia*) sp. 2 con las secuencias de los machos de identificados basados en caracteres morfológicos como *Br. guimaraesi* y *Lu. scorzai* (Figura 4-47).

Asi mismo en el análisis de NJ (Figura 4-48), se incluyeron secuencias de entidades taxonómicas morfológicamente similares a las estudiadas, para descartar una posible identificación taxonómica a nivel de especie errónea, así, se incluyeron secuencias de *Lu. dysponeta*, para discriminar de *Lu. camposi*, también de *Lu. migonei* para comparar

con las secuencias de *Lu. walkeri,* obteniéndose una evidente diferencias entre las agrupaciones entre especies.

El perfil COI obtenido para Phlebotominae corrobora la gran variación que ocurre en el genoma mitocondrial de estos insectos. La asignación de especies en este grupo precisa de una combinación entre los valores de divergencia nucleotídica y los estudios de taxonomía convencional.

Aunque la tipificación presentada en el presente estudio es parcial para la zona cafetera y se limita a los especímenes colectados, permite asignar haplotipos correspondientes a especies o agrupaciones de los mismos, los cuales son útiles para efectos de la identificación de estas especies (Tabla 4-11), ya que las secuencias de ADN son conectables a diferencia de muchos otros caracteres moleculares, el aumento en la disponibilidad de secuencias y la obtención para todas las especies registradas para zona cafetera permitirá obtener un panorama más amplio y explícito, sobre la posibilidad del uso de la secuencia COI como marcador molecular. El estudio adicional sobre los patrones genéticos y los procesos de evolución mejorará la capacidad de crear un código de barras basado en especies sistema de identificación en las flebotomíneos, así como avanzar en el conocimiento de la biología de estos insectos.

La validez y eficacia de un marcador como identificador molecular de especie está determinada por: (a) fácil aislamiento de la secuencia de interés de todas las especies; (b) fácil análisis de la secuencia (c) información suficiente de la secuencia que permita la identificación a nivel de especies (Hebert el al. 2003). Las tres condiciones mencionadas se cumplen con la secuencia COI. En este estudio se ha obtenido la secuencia código de barras, de interés a partir de pequeñas cantidades de tejido del tórax. Estas secuencias fueron fácilmente alineadas y analizadas. Adicionalmente, la divergencia genética entre las secuencias permitió la formación de agrupaciones que corresponden a especie. Los límites de las especies fueron congruentes con los establecidos por taxonomía basada en caracteres morfológicos.

6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

Este estudio se propuso con el objetivo de realizar el listado actual de las especies de flebotomíneas colectadas en zonas cafeteras (región Andina) de Colombia con énfasis en la taxonomía morfológica y molecular de las especies de importancia médica. Este objetivo fue desarrollado en tres preguntas ¿Qué especies de flebotomíneos se presentan en zona cafetera? y entre éstas ¿cuáles revisten gran importancia para la salud pública de dichos ecosistemas? En relación a la identificación a nivel de especie ¿Los flebotomíneos colectados en zonas cafeteras son fácilmente identificados por criterios morfológicos tradicionales? O por el contrario ¿Para la identificación a nivel de especie es necesario un sistema complementario de identificación basado en caracteres moleculares (gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I)?

Los principales hallazgos se comentan a continuación:

Al realizar un análisis comparativo basado en caracteres morfológicos y los moleculares se evidencia el hallazgo de 25 especies de flebotomíneos, 23 del género *Lutzomyia*, 2 del género *Brumptomyia* y 1 *Warileya.*

Dentro de las especies del género *Lutzomyia* colectadas en zonas cafetera, oncese destacan por su relación en la dinámica de la transmisión de la leishmaniasis, lo que confirma que la zona cafetera es un área de riesgo potencial para la transmisión de esta enfermedad.

La utilidad de la morfología externa e interna comparada para la identificación de especies de importancia médica colectadas en zonas cafeteras, es relativamente limitada, ya que diferencias morfológicas sutiles permiten distinguirlas. Ésto sumado al hecho que algunas especies se destacan por ser morfológicamente indistinguibles, lo que indica que la taxonomía alfa en flebotomíneos debe preferiblemente complementarse con otro sistema como por ejemplo de datos moleculares.

En el presente estudio, se evaluó y validó un método molecular sencillo y confiable para la identificación de 22 especies de flebotomíneos capturadas en diferentes áreas cafeteras de la región andina en Colombia. El análisis de secuencias nucleotídicas de la región código de barras del gen mitocondrial Citocromo oxidasa I complementado con información que relaciona patrones morfológicos consistentes, facilita la identificación de flebotomíneos de los géneros *Lutzomyia, Brumptomyia* y *Warileya,* así mismo, de las especies de importancia médica colectadas en zona de influencia cafetera, por tanto se valida la utilidad de la región código de barras COI como una herramienta diagnóstica complementaria a la taxonomía alfa en Phlebotominae. Este esquema metodológico y los resultados obtenidos, proporcionan la base para futuras identificaciones de especies indistinguibles y la oportunidad de explotar las combinaciones morfológicas y moleculares hacia la taxonomía integrativa.

Lu. pia fue la especie antropofílica mayormente colectada en el ecotopo 2A, y posiblemente representa, junto a *Lu. youngi*, los principales vectores de leishmaniasis cutánea en esta región. Aunque se debe indagar mejor el posible papel de estas especies en la transmisión de *Leishmania* al humano.

A juzgar por su abundancia, *Lu. trapidoi*, *Lu*. *yuilli* y *Lu. panamensis*, probablemente pueden ser consideradas los potenciales vectores en el ecotopo 2B, pero se hace necesario realizar estudios desde el enfoque ecoepidemiológico para aclarar su papel en la transmisión de leishmaniasis en las localidades de colecta.

Luego de acoplar la revisión de la literatura, la información presente en bases de datos y las colectas derivadas del presente estudio se suministra una lista de 48 especies de flebotomíneos actualizada para zona cafetera en diez departamentos y se destacan el hallazgo de la especie *Br. guimaresi* que corresponden a un nuevo registro para Colombia. De la misma forma se aporta nuevos registros: *Lu. carrerai thula, Lu. dasymera, Lu. carpenteri, Lu. walkeri* y Br. beaupertuyi en el departamento de Caldas, *Lu*. sp. de Baduel y *Br. beaupertuyi* en el departamento de Antioquia.

6.2 Perspectivas

A futuro, además de realizar el inventario a partir de los flebotomíneos adultos en la zona cafetera, es importante avanzar en el reconocimiento y la recuperación de estados inmaduros de los sitios potenciales de cría, así como la caracterización los microhábitats

ya que estos se convierten además, en sitios blancos potenciales para dirigir medidas de control. En la zona cafetera los sitios de cría podrían ser: hojarasca del café, sustrato orgánico en madrigueras, corteza, base y raíces de árboles asociados. Entender y conocer los microambientes naturales donde estos insectos se desarrollan es considerado una tarea ardua (Feliciangeli, 2004), pero ofrece información relevante para las medidas de control. En el caso de los inventarios y la verificación de las especies que podrían generar riesgo epidemiológico, incluir los inmaduros permite obtener resultados más reales y representativos para la zona de estudio.

También, es necesaria la evaluación del uso del barcode para la identificación de los inmaduros a nivel de especie, principalmente larvas (con mayor probabilidad de obtenerse de los criaderos), con base en sus haplotipos, al compararlos con la librería de secuencias código de barras obtenidas en este estudio y otras secuencias obtenidas de los adultos previamente identificados con morfología y verificados por el especialista.

Bibliografía

Abonnenc E, Léger N. Su rune classification rationelle dès Diptères Phlebo -tomidae. Cahiers O.R.S.T.O.M. série Entomologie Medicale. 1986; 1: 69-78.

Acevedo M, Arrivillaga J. Eco-Epidemiología de flebovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) transmitidos por flebótomos (Psychodidae, Phlebotominae). Bol Dir Malariol Sanea Amb. 2008; 48(1): 2-16.

Armed Forces Pest Management Board (AFPMB). Regional disease vector ecology profile. Defense pest management information analysis center. Forest Glen section. Washington DC: Walter Reed Army Medical Center; 2001: Pp. 231. Disponible en: http://books.google.pt/books?id=Hpr10wAwoE0C&printsec=frontcover&dq=reginal+disease+vector+ecology+profile+Central+Europe&ei=VOyOSa3UG4iUzATy_PyB.

Aguiar GM, Shuback PA, Soucasaux T, Azevedo AC. Aspectos da ecologia dos flebotomíneos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. Rio de Janeiro, IV. Freqüência mensal em armadilhas luminosas (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985; 80: 465-482.

Alexander JB. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. J Med Entomol. 1987; 124: 552-558.

Alexander B. Sampling methods for phlebotomine sand flies. Med Vet Entomol. 2000; 14: 109-122.

Alexander B. Manual de entomología médica para investigadores de América Latina. Ciclo de vida de los flebótomos. 1994; 1: 26-28.

Alexander JB, Agudelo LA, Navarro F, Ruiz F, Molina J, Aguilera G, Quiñones ML. Phlebotomine sandflies and leishmaniasis risks in Colombian coffee plantations under two systems of cultivation. Med Vet Entomol. 2001; 15: 364-373.

Alexander B, Ferro C, Young DG, Morales A, Tesh RB. Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae)in a focus of Leishmania (Viannia) brasiliensis in northeastern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992; 87(3): 387-395.

Alexander JB, Eshita Y, Labrada, M., Jiménez M, Furuya M, Gomez EA, Hashiguchi Y. Vector entomological aspects. 2. Transmission of Leishmania panamensis to man by the sandflies Lutzomyia hanmanni and Lu. trapidoi (Diptera: Psychodidae) in Ecuador. 1992b: 28-32. In: Hashiguchi Y (ed.). Studies on New World leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador. Research Report Series No.3, Kyowa Printing & Col., Kochi City, Japan.

Alexander B, Morales AL, Becerra J, Rojas CA. Entomological aspects of a leishmaniasis control project based on community participation in riverine communities of SW Colombia. Bol Dir Malariol y San Amb. 1995a; 35(1): 29-40.

Alexander JB, Usma MC, Cadena H, Quesada BL, Solarte Y, Roa W, Montoya J, Jaramillo C. Phlebotomine sandflies associated with a focus of cutaneous leishmaniasis in Valle del Cauca, Colombia. . Med Vet Entomol. 1995b; 9: 273-278.

Alexander JB, Lozano C, Barker DC, Mccann SH, Adler GH. Detection of Leishmania (Viannia) braziliensis complex in wild mammals from Colombian coffee plantations by PCR and DNA hybridization. Acta Trop. 1998; 69: 41-50.

Alexander B, Usma MC. Potential sources of sugar for the phlebotomine sandfly Lutzomyia youngi (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. Ann Trop Med Parasitol.1994; 88(5):543-9.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997; 25: 3389–3402.

Agudelo LA, Uribe J, Sierra D, Ruiz F, Vélez ID. Presence of American cutaneous Leishmaniasis vectors surrounding the city of Medellín, Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97: 641-642.

Alvar JP. Las leishmaniasis: De la biología al control. Centro colaborador de la OMS para leishmaniasis. Servicio de Parasitología. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología. 2001.

Anónimo. Regional Disease vector Ecology Profile: Colombia. Defense Pest Management Board. Forest Glen Section, Walter Reed Army Medical Center, Washington DC. 1998: Pp 85

Antunes PCA. Informe sobre una investigación realizada en Colombia. Rev Fac Med Bogotá Colombia. 1937; 6: 3-29.

Arias JR, Miles MA, Naiff RD, Povoa MM, De Freitas RA, Bianciardi CB, Castellon EG. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of Endotrypanum and Leishmania. Am J Trop Med Hyg. 1985; 34: 1098-1108.

Arrivillaga J, Navarro J, Feliciangeli D. Morfología y quetotaxia del tagma cefálico larval de Lutzomyia França 1924 (Diptera: Psychodidae): Proposición de un sistema de nomenclatura. Bol Entomol Venez. 1999; 14 (1): 1-13.

Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD, Lanzaro GC. Phylogeography of the neotropical sand fly Lutzomyia longipalpis inferred from mitochondrial DNA sequences. Infect Genet Evol. 2002; 2(2):83-95.

Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol. 2000; 30: 1269-1281.

Artemiev NM. Classification of the Subfamily Phlebotominae, Parassitologia. 1991; 33 (Suppl. 1): 69-77.

Avise JC. Phylogeography. The History and formation of epecies. Harvard University Press, Cambridge Attardi, G. (1985) Int. Rev. Cytol. 2000. 93-145

Awasthi A, Kumar MR, Saha B. Immune response to Leishmania infection. Indian J Med Res. 2004; 119: 238-258.

Azevedo AC, Souza NA, Meneses CR, Costa WA, Costa SM, Lima JB, Rangel EF. Ecology of sand flies (Diptera: psychodidae: phlebotominae) in the north of the state of Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(4): 459-64.

Azpurua J, De La Cruz D, Valderrama A, Windsor D. Lutzomyia Sand Fly Diversity and Rates of Infection by Wolbachia and an Exotic Leishmania Species on Barro Colorado Island, Panama. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(3): e627. doi:10.1371/journal.pntd.0000627.

Baitone R. Criadouros naturais de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em floresta de terra-firme na vila do Pitinga, estado do Amazonas. Instituto nacional de pesquisas da amazônia. INPA universidade federal do amazonas UFAM. 2003.

Barretto MP. Sôbre a sinonímia de flebótomos americanos (Diptera, Psychodidae). Segunda nota. Ann Fac Med Univ S Paulo. 1946; 22: 1-27.

Barata RA, França-Silva JC,, Mayrink W, Costa da Silva J, Prata A, Seixas Lorosa E, Araújo Fiúza J, Macedo Gonçalves C, Maria de Paula K, Santos Dias E. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(5): 421-425.

Barretto MP. Sobre a sistematica da subfamília Phlebotominae Rondani (Díptera: Psychodidae). Revista Brásilera Entomologia. 1955; 3: 173-190.

Barretto MP. Subfamílias e gêneros neotropicais da família Psychodidae Big., 1854 (Diptera). Pap Avuls Dep Zool Sec Agr S Paulo.1961; 14: 211-25.

Barretto, M.P. Novos subgeneros de Lutzomyia França, 1924 (Psychodidae, subfamilia Phlebotominae). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1962; 4:91-100.

Barreto M, Burbano ME, Barreto P. Nuevos registros de flebotominos (Diptera: Psychodidae) y triatominos (Hemiptera: Reduviidae) para Risaralda, Cauca y Valle del Cauca, Colombia. Colomb Med. 1997; 28: 116-122.
Barreto M, Burbano ME, Barreto P. Registros de Lutzomyia (Diptera: Psychodidae) en nuevas localidades de Colombia. Colomb Med. 2006; 37:39-45.

Barrett T, Freitas R, Albuquerque M, Guerrero J. Report on a colecion of Lutzomyia sand fly (Diptera: Psychodidae) from the Middle Solimões (Amazonas, Brasil). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 9 (1): 27-35.

Bastrenta B, Buitrago R, Vargas F, Le Pont F, Torrez M, Flores M, Mita N, Brenière SF. First evidence of transmission of Leishmania (Viannia) lainsoni in a sub-Andean region of Bolivia. Acta Trop. 2002; 83: 249-253.

Beati L, Cáceres AG, Lee JA, Munstermann LE. Systematic relationships among Lutzomyia sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. Int J Parasitol. 2004; 34: 225–234.

Bejarano EE. Sistemática de especies del Lutzomyia del grupo verrucarum Theodor, 1965 (Diptera: Psychodidae). Biomédica. 2003; 23(1): 87-102.

Bejarano EE. Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. Folia Entomol Mex. 2006; 45: 47-56.

Bejarano EE., Duque P, Vélez ID. Taxonomy and distribution of the series pia of the Lutzomyia verrucarum group (Diptera: Psychodidae), with a description of Lutzomyia emberai n. sp. J Med Entomol. 2004; 41(5): 833-841.

Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID. Novedades en la distribución geográfica del grupo verrucarum (Diptera: Psychodidae) en Colombia. Biomédica. 2003; 23: 341-350.

Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez I.D. Presence of Lutzomyia evansi, a vector of American visceral leishmaniasis, in an urban area of the Colombian Caribbean coast. Trans. R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95(1): 27-28.

Bejarano EE, Uribe S, Rojas W, Vélez I.D. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(5): 645-647.

Bejarano EE, Vivero R, Uribe S. Description of Lutzomyia velezi, a new specie of phlebotominae sand fly (Diptera:Psychodidae) from the Departament of Antioquia, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105 (3): 322-325.

Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID. Dos nuevos registros de Lutzomyia (Diptera: Psychodidae) para el departamento de Risaralda, Colombia. Rev Col Entomol. 2007; 33 (1): 43-44.

Belcour J. Contribution à l'étude du développement et de la biologie des formes larvaires des phlébotomes. Thèse Méd. 1928: 92.

Belen A, Alten B. Variation in life table characteristics among populations of Phlebotomus papatasi at different altitudes. J Vector Ecol. 2006; 31: 35-44.

Bensasson D, Zhang D, Hartl DL, Hewitt GM. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. Trends Ecol Evol. 2001; 16: 314–321.

Berlocher, S. Insect Molecular Systematics. Annual Review of Entomology. 1984; 29: 403-433 DOI: 10.1146/annurev.en.29.010184.002155

Besansky NJ, Severson DW, Ferdig MT. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. Trends Parasitol. 2003; (12): 545-546.

Blouin MS, Yowell CA, Courtney CH, Dame JB. Substitution bias, rapid saturation, and use of mtDNA for nematode systematics. Mol Biol Evol. 1998; 15: 1719–1727.

Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, Lappin MR. Bartonellosis: An emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. J Vet Emerg Crit Care. 2010; 20(1):8-30.

Brinson FJ, Hagan DV, Comer JA, Strohlein DA. Seasonal abundance of Lutzomyia shannoni on Ossabaw Island, Georgia. J Med Entomol. 1992; 29(2): 178 – 182.

Cabrera OL, Neira M, Bello F, Ferro C. Ciclo de vida y colonización de Lutzomyia ovallesi (Diptera: Psychodidae) vector de Leishmania sp en América Latina. Biomédica. 1999; 19: 223-229.

Cabrera OL, Ferro C. Ciclo de vida de Lutzomyia spinicrassa, L. quasitownsendi y L. youngi, especies del grupo verrucarum (Diptera: Psychodidae). Actualidades Biológicas. 2000; 22: 225-232

Cáceres A. Distribución geográfica de Lutzomyia verrucarum (Townsend 1913) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector de la bartonellosis humana en el Perú. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1993; 35: 485-490.

Cárdenas E, Munstermann L, Martínez O, Corredor D, Ferro C. Genetic variability among populations of Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni (Dyar 1929) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96(2): 189-196.

Cárdenas R, Pabón E, Anaya H, Sandoval C. Presencia de Lutzomyia longiflocosa (Díptera: Psychodidae) en el foco de leishmaniasis tegumentaria americana del municipio de Abrego, Norte de Santander. Primer registro para el departamento. Clon. 2005; 3(1): 7-14.

Cárdenas R, Romo GM, Santamaría E, Bello F, Ferro C. Lutzomyia longiflocosa (Diptera: Psychodidae) posible vector en el foco de leishmaniasis cutánea del municipio de Planadas, zona cafetera del Tolima. Biomédica 1999; 19: 239-244.

Cardenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales AJ, Franco-Paredes C Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2006; 75: 273–277.

Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti M, De Mattia F. DNA barcoding: theoretical aspects and practical applications. Nimis P. L., Vignes Lebbe R. (eds.)
Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems – pp. 269-273.
ISBN 978-88-8303-295-0. EUT, 2010.

Casanova C. A soil emergente trap for collections of phlebotomine sand flies. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96: 273-275.

Caterino MS, Cho S, Sperling FA. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annu Rev Entomol. 2000; 45: 1-54.

Center for Disease Control (CDC). Parasitic disease information: fact sheet on Leishmania infection. 2008. Disponible en: http://wwwcdcgov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmaniahtm#common.

CENICAFE. Guía Ambiental para el Sector Cafetero. 2010.

Chaniotis BN, Parsons RE, Harlan HJ, Correa MA. A pilot study to control phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) in a neotropical rain forest. J Med Entomol.1982; 19: 1-5.

Chaniotis BN, Correa MA, Tesh RB, Johnson KM. Horizontal and vertical movement of Phlebotomine sandfiies in Panamanian rain forest. J. Med. Ent. 1974; 11: 369–375.

Chaniotis BN, Tesh RB, Correa MA, Jofinson EM. Diurnal resting sitaes of Phlebotominae sandfiies in a Panamian tropical forest. J Med Ent. 1972; 9: 91-98.

Christensen HA, Fairchild GB, Herrer A, Johnson CM, Young DG, De Vasquez AM. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. J Med Entomol. 1983; 20: 463-484.

Chaves LF, Pascual M. Climate cycles and forecasts of cutaneous leishmaniasis, a nonstationary vector-borne disease. PLoS Med. 2006; 3:e295. doi:210.1371/journal.pmed.0030295.

Cifuentes LE. Café orgánico. En: Enciclopedia agropecuaria de agricultura ecológica. Bogotá D.E. 2ª. Ed. Editorial Terranova. 2001; Tomo 7: 331- 340.

Cohnstaedt LW, Beati L, Caceres A, Ferro C, Munstermann LE. Phylogenetics of the Phlebotomine Sand Fly Group Verrucarum (Diptera: Psychodidae: Lutzomyia). Am J Trop Med Hyg. 2011; 84(6): 913–922.

Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the Anopheles gambiae complex. Am J Trop Med Hyg. 1987; 37 (1): 37-41.

Comer J, Tesh R. Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses: A review. Parassitologia. 1991; 33: 143-150.

Comer JA, Irby WS, Kavanaugh DM. Hosts of Lutzomyia shannoni (Diptera: Psychodidae) in relation to vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia, U.S.A. Med Vet Entomol. 1994; 8: 325-330.

Consortium for the Barcode of Life (CBOL). A global standard for identifying biological specimens. National History Museum, Smithsonian Institution, Washington, DC. (www.barcoding.si.edu). 2005.

Contreras MA, Vivero RJ, Bejarano EE, Carrillo LM, Vélez ID. Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en el área de influencia del río Amoyá en Chaparral, Tolima. Biomédica. 2012; 32(2): 263-268.

Corredor A, Rey MP, Hernández, CA, Parra MT. Leishmaniasis tegumentaria americana. Boletín Epidemiológico Nacional (Colombia). 1986: 12-25.

Consortium for the Barcode of Life (CBOL). A global standard for identifying biological specimens. National History Museum, Smithsonian Institution, Washington, DC. 2005. (www.barcoding.si.edu).

Crease TJ. The complete sequence for the mitochondrial genome of Daphnia pulex (Cladocera: Crustacea). Gene. 1999; 233: 89-99.

Crozier RH, Crozier YC. The mitochondrial genome of the honeybee Apis mellifera: complete sequence and genome organization. Genetics. 1993; 133: 97–117.

Cywinska A, Hunter FF, Hebert PD. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med Vet Entomol. 2006; 20(4): 413–424.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges Rl, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad. Saúde Pública 2000; 16(4): 925-950.
Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2000000400013&lng=en.

Davies CR Llanos-Cuentas EA, Campos P, Monge J, Villaseca P, Dye C. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: Risk factors identified from a village cohort study. Am J Trop Med Hyg.1997; 56: 85-95.

Davies CR, Lane RP, Villaseca P, Pykes, Campos P, Llanos-Cuentas EA. The relationship between CDC light-trap and human-bait catches of endophagic sandflies (Diptera: Psychodidae) in the Peruvian Andes. Med Vet Entomol. 1995; 9:241-248.

Dedet JP, Desjeux P, and Derouin F. Ecologie d'un foyer de leishmaniose cutanee dans la region de Thies (Senegal, Afrique de l'Ouest. 4. Infestation spontanee et biologie de Phlebotomus duboscqi Neveu-Lemaire 1906. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique. 1982; 75: 588–589.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001; 95(3): 239-43.

De Almedia MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmania infection: analysis of its first steps. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98: 861-870.

DeSalle R, Egan M, Siddall M. The unholy trinity: taxonomy,species delimitation and DNA barcoding. Philos.Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005; 2360 (1462): 1905-1916.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2004; 27: 305-318.

Deubel V, Georges–Courbot MC. Les arbovirus et les virus épizootiques. Comptes rendus biologies. 2002; 325: 855-861.

Dias-Lima A, Guedes M, Sherlock I. Horizontal stratification of the sand fly fauna (Diptera: Psychodidae) in a transitional vegetation between caatinga and tropical rain forest, state of Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(6): 733-737.

Duckhouse A. A catalogue of the Diptera of the Americas south of the United States. 6A: Family Psychodidae, subfamilies Bruchomyiinae, Trichomyiinae, Sycoracinae and Psychodinae. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. 1973: Pp29.

Dujardin, F. Pont, E. Bianchi Galati. Cryptic speciation suspected by morphometry within Lutzomyia runoides. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie. 1999; 322(5): 375-382.

Dujardin JP, Le Pont F, Cruz M, Tarrieu LF, Guderian RH, Echeverria R, Tibayrenc M. Cryptic speciation in Lutzomyia (Nyssomyia) trapidoi (Diptera: Psychodidae) detected by multilocus enzyme electrophoresis. Am J Trop Med Hyg. 1996; 54: 42-45.

Duque P, Vélez I, Morales M, Sierra D. Sand flies fauna involved in the transmission of cutaneous leishmaniasis in Afro–Colombian and American communities of Chocó, Pacific coast of Colombia. Neotrop Entomol. 2004; 33: 255-64.

Dyar HG. The present knowledge of the American species of Phlebotomus Rondani (Diptera, Psychodidae). Amer J Hyg. 1929; 10: 112-124.

Endris RD, Young DG, P Perkins. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five Lutzomyia species (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 1987; 24: 412- 415.

Escovar J, Bello FJ, Morales A, Moncada L, Cárdenas E. 2004. Life tables and reproductive parameters of Lutzomyia spinicrassa (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(6): 603-607.

Etter A, W. van Wyngaarden. Patterns of landscape transformation in Colombia, with emphasis in the Andean Region. Ambio. 2000; 29: 432-439.

Fairchild GB, Hertig M. Notes on the Phlebotomus of Panama (Diptera, Psychodidae). VII. The subgenus Shannonomyia. Pratt Ann Ent Soc Amer. 1951; 44: 399-421.

Fairchild GB, Hertig M. Notes on the Phlebotomus of Panama (Diptera, Psychodidae). IX. Description of seven new species. Ann Entomol Soc Amer. 1952; 45: 505-528.

Fairchild GB, Hertig M. Notes on the Phlebotomus of Panama (Diptera, Psychodidae). XIII.The vaxator group with descriptions of new species from Panama and California. Ann Ent Soc Amer. 1957; 50: 325-334.

Fairchild GB, Hertig M. Notes on the Phlebotomus of Panama. XVI. (Diptera, Psychodidae). Descriptions of new and little-known species from Panama and Central America. Ann Entomol Soc Amer. 1961; 54: 237-255.

Fangling X, Chen H, Amelia PA. Travassos R, Robert B. Tesh R, Shu-Yuan X. Phylogenetic relationships among sandfly fever group viruses (Phlebovirus: Bunyaviridae) based on the small genome segment. J Gen Virol. 2007; 88: 2312-2319.

Fausto AM, Feliciangeli MD, Maroli M, Mazzini M. Ootaxonomic investigation of five Lutzomyia species (Diptera, Psychodidae) from Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 96: 197-204.

FEDERACAFÉ. Ecotopos cafeteros: caracterización agroecológica de la zona cafetera. Avance de Resultados. Bogotá. 1993: Pp63.

Feitosa M, Castellón E. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em fragmentos florestais ao redor de conjuntos habitacionais na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. II. Estratificação horizontal. Acta Amazonica.2004; 34(1): 121-127.

Feliciangeli MD, Castejón O, Limongi J. Egg surface ultrastructure of eight New World phlebotomine sand fly species (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 1993; 30: 651-656.

Feliciangeli M, Lampo, M. Phlebotomine sandflies in Venezuela. V. Review of the genus Brumptomyia (Diptera: Psychodidae), with description of the female of Brumptomyia devenanzii, re-description of the male and isozymatic profile. Ann Trop Med Parasitol. 2001; 95(3): 297-308.

Feliciangeli MD, Murillo J. Lutzomyia youngi (Diptera: Psychodidae), a new phlebotomine sand fly previously misidentified as L. townsendi in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Venezuela and Costa Rica. J Med Entomol. 1987; 24: 141-146.

Feliciangeli MD, Rodriguez N, Bravo A, Arias F, Guzmán B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. Med Vet Entomol. 1994; 8: 317-24.

Feliciangeli MD. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Med Vet Entomol. 2004; 18: 71-80.

Ferro C, Cabrera OL, Ayala M, Santamaria E, Castillo M, Neira M. Especies del grupo verrucarum (Diptera: Psychodidae) y su papel como vectores de dos focos de Leishmania braziliensis del centro e Colombia. Resúmenes, XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, Cali.1998a: Pp. 41.

Ferro C, Cárdenas E, Corredor D, Morales A, Munstermann LE. Life Cycle and Fecundity Analysis of Lutzomyia shannoni (Dyar) (Diptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1998; 93(2): 195 -199.
Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761998000200011&lng=en.

Ferro C, Santamaria E, Pardo R, Tibaduiza T, Carrasquilla MC. Actividad nocturna en el intradomicilio de Lutzomyia trapidoi, L. hartmanni, L. yuilli y L. gomezi (Diptera: Psychodidae) en el Piedemonte del Magdalena Medio en el departamento de Boyacá. Memorias XXXII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN. 2005: Pp 61.

Ferro C, Morales A. Flebótomos de Colombia: Estudios realizados por el laboratorio de entomología 1966-1997. En: Toro G, Hernández CA, Raad J, editores. Instituto Nacional de Salud 1917-1997: una historia, un compromiso. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1998: 219-33.

Ferro C, Pardo R, Torres M, Morrison A. Larval microhabitats of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol. 1997; 34: 719-728.

Floch H, Abonnenc E. Phlébotomes de Guyana Française.(VII). Description de six espéces nouvelles. Inst Pasteur Guyane Publ.1944, Nº 80: 20.

Florin, D. Morphometric and Molecular Analyses of the Sand Fly Species Lutzomyia shannoni (Dyar 1929) (Diptera:Psychodidae:Phlebotiminae) Collected from Seven Different Geographical Areas in the Southeastern United Status. Trabajo de Tesis Doctoral Inédita. University of health Sciences Bethesda, Bethesda, Maryland, EUA. 2006.

Forattini OP. Sobre a classificaçao da subfamilia Phlebotominae nas Americas (Diptera, Psychodidae). Pap Avuls Dep Zool Sec Agr S Paulo. 1971; 24: 93-111.

Forattini OP. Entomologia médica: Psychodidae, Phlebotominae, Leishmanioses, bartonelose. Editora Blucher Ltda. 1973; 1-658.

Furuya M.; Shiraishi M.; Akimaru Y.; Mimori T.; Gomez L. E.A.; Hashiguchi Y. Natural infection of Lutzomyia hartmanni with Leishmania (Viannia) equatorensis in Ecuador. Parasitology International. 1998; 47(2): 121-126.

Galati EAB. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. Bol Dir. Malariol y San Amb. 1995; 35(Supl. 1): 133-142.

Galati EAB. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. Pp.53-175. Em: Rangel EF, Lainson R (eds.). Flebotomíneos do Brasil. Río do Janeiro. Editora Fiocruz. 2003: Pp368.

Galati EAB. Classificação Morfologia e Terminologia E Identificação de Adultos Vol. I.Apostila Disciplina HEP 5752. Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. Departamento de Epidemiologia Faculdade de Saúde Pública Universidade de São Paulo Av. Dr. Arnaldo, 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil. 2010

Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GD. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. Molecular Ecology.2009; 18: 4541–4550

Gellissen G, Bradfield JY, White BN, Wyatt GR. Mitochondrial DNA sequences in the nuclear genome of a locust. Nature. 1983; 24: 774–786.

Gómez EA, Hashiguchi Y. Vector entomology. 1. Natural infections of sand flies with Leishmania promastigotes. En: Hashiguchi Y, editor. Studies on New World leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador. Kochi: Kyowa Printing. 1987: 70-78.

González C, Wang O, Strutz SE, González-Salazar C, Sánchez-Cordero V, Sahotra Sarkar. Climate Change and Risk of Leishmaniasis in North America: Predictions from Ecological Niche Models of Vector and Reservoir Species. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(1): e585. doi:10.1371/journal.pntd.0000585

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. Int J Parasitol. 2005; 35: 1169–1180.

Grassi B, Bhatthacharya A. Ricerche sui flebótomo. Memorie della Societá Italiana di Scienze Naturalli. 1907; 4: 353-394.

Gressel J, Ehrlich G. Universal inheritable barcodes for identifying organisms. Trends Plant Sci. 2002; 7 (12).

Grimaldi G, Tesh RB, McMahon;Pratt D. A review of the geographic and Distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. Am J Trop Med Hyg. 1989; 41(6): 687-725.

Guernaoui S, Boumezzough A, Laamrani A. Altitudinal structuring of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the High-Atlas mountains (Morocco) and its relation to risk of leishmaniasis transmission. Acta Trop. 2006; 97: 346-351.

Guhl A. Café y cambio de paisaje en la zona cafetera colombiana entre 1970 y 1997. Cenicafé. 2004; 55: 29-44.

Guía para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis Disponible en: http://dssa.media.vcb.com.co/dssa.gov.co/documentos/Protocolos-Vectores-INS/Entomologica-Leishmaniasis.pdf

Hajibabaei M, de Waard JR, Ivanova NV. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. Philos Trans R Soc Lond, B. 2005; 360: 1959–1967.

Hanson W. The immature stages of the subfamily Phlebotominae in Panama (Diptera: Psychodidae). [Tesis]. Kansas: University of Kansas. Available from: University Microfilms, Ann Arbor, MI. 1968.

Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. Emerg Infect Dis. 2002; 8, 1468–1473.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball S, de Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Roy Soc Lond B. 2003; 270: 313– 321.

Hebert PDN, Gregory T. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Syst Biol 2005; 54: 852-859.

Herbeck JT, Novembre J. Codon usage patterns in cytochrome oxidase I across multiple insect orders. J Mol Evol. 2003; 56(6): 691-701.

Hoy M. Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications. Academic press, San Diego. 2006: Pp 544.

Hoyos R, Uribe S, Vélez ID. Tipificación de especímenes colombianos de Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) mediante “Código de Barras”. Rev Col Entomol. 2012; 38 (1): 134-140

Hutchinson GE. Concluding Remarks. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.1957; 22: 415-427

Ibáñez BS. 1999. Phlebotominae de México. I. Brumptomyia França y Parrot; Lutzomyia França, las especies de L. (Lutzomyia) França y del grupo verrucarum. Folia Entomol Mex. 107: 61-116.

Ibáñez BS, Hernández-Xoliot R, Mendoza F. Collections of Bruchomyiinae and Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) from the north-central portion of the State of Veracruz, Mexico, with the description of a new species. Zootaxa. 2006; 1270: 19-33.

Ibáñez-Bernal S, Rodríguez G, Gómez C, Ricardez J. First record of Lutzomyia evansi (Nuñez-Tovar,1924) in Mexico (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99 (2): 127-129.

Ilango K. Structure and function of the spermathecal complex in the phlebotomine sandfly Phlebotomus papatasi Scopoli (Diptera: Psychodidae): II. Post copulatory histophysiological changes during gonotrophic cycle. J Biosci. 2005; 30 (5): 733-747.

Instituto Nacional de Salud- INS. Programa de Enfermedades de Transmisión Vectorial. Informe sobre leishmaniasis en Colombia. Sivigila; 2010. Años 2019- 2010.Semana 45

Iriarte DR. Sobre una nueva espécie de flebótomo en el pais: Flebotomus (Brumptomyia) suis .Rozeboom. 1940. Bol Lab Clin Luiz Razetti. 1944; 5: 268-275.

Isaza D, Restrepo BN, Arboleda M, Casa E, Hineztroza H, Yurgaqui T. La leishmaniasis. Conocimientos y prácticas en poblaciones e a costa pacífica de Colombia. Pan Am J Public Health. 1999; 6 (3): 177–184.

Jaramillo C, Travi BL, Montoya J. Vector competence of some Neotropical sandflies for the Leishmania (Viannia) braziliensis complex. Med Vet Entomol.1994; 8: 1-7.

Jaramillo-Robledo A, Arcila-Pulgarín J. Variabilidad climática en la zona cafetera Colombiana asociada al evento de El Niño y su efecto en la caficultura. Cenicafé, Avances técnicos. 2009: Pp. 390.

Jimenez AE; Rojas JC, Vargas F, Herrero M. Temporal and spatial variation of phlebotomine (Diptera : Psychodidae) community diversity in a cutaneous leishmaniasis endemic area of Costa Rica . J Med Entomol. 2000; 37: 216-221.

Jinbo U, Kato T, Ito M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. Entomol Sci. 2011; 14: 107–124.

Johnson PT, Mcconell E, Hertig M. Natural infections of leptomonad flagellated in Panamian Phlebotomus sandflies. Exp Parasitol. 1963;.14: 107-22.

Kato H, Uezato H, Gomez EA, Terayama Y, Calvopina M, Iwata H, Hashiguchi Y. Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for Leishmania infection by molecular biological methods. Am J Trop Med Hyg. 2007; 77: 324-329.

Killick-Kendrick. The biology and control of phlebotomine sand flies. R.Clin Dermatol. 1999; 17(3): 279-289.

Killick-Kendrick R, Rioux JA, Bailly M, Guy MW. Wilkes T.. Guy FM, Davidson I, Knechtli R, Ward RD, Guilvard E. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 20. Dispersal of Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of visceral leishmaniasis in the Cévennes. Ann Parasitol Hum Comp. 1984; 59: 555-572.

King RJ, Campbell-Lendrum DH, Davies CR. Predicting Geographic Variation in Cutaneous Leishmaniasis, Colombia. Emerg Infect Dis. 2004; 10: 598-606.

Kipling WW, Rubinoff D. Myth of the Molecule: DNA Barcodes for Species Cannot Replace Morphology for Identification and Classification. Cladistics. 2004; 20: 47-55.

Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi G, GrogL GR, Rowton ED, Young DG, Morales A, Mcmahon-Pratt D, Guzmán H, Tesh RB. 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. 1991; 44(6): 662-675.

Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 2007; 44 (1): 1–7.

Kumar NP, Srinivasan R, Jambulingam P. DNA barcoding for identification of sand flies (Diptera: Psychodidae) in India. Mol Ecol Resour. 2012; 414-20. doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03117

Lawyer PG, Young DG. Experimental transmission of Leishmania mexicana to hamsters by bites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from the United States. 1987. J Med Entomol. 1987; 24: 458-462.

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of Leishmania in the sand fly vector and some observations on the mechanism of transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987; 82: 421-441.

Lainson R, Killick-Kendrick R, Flisser A. Ecological interactions in the transmission of leishmaniasis (and discussion). Philos Trans R Soc Lond. 1988; 31: 389–404.

Lanteri AA., Loiácono MS, Margaría C. Aportes de la Biología Molecular a la Conservación de los insectos. Pp.: 207-220. En: Costa, C., S.A. Vanin, J.M. Lobo & A. Melic (eds.). Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología

Sistemática PrIbes 2002. Sociedad Entomológica Aragonesa, m3m Monografías Tercer Milenio.

Léger N, Depaquit J. Phlebotominae. In Épidémioloie des maladies parasitaires. Arthropodes et affections qu'ils provoquent ou quíls transmettent. Tome 4. Ripert (C), coordonnateur. Editi Méd Internat. 2007: 159-175.

Leng YJ. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south- west China, and description and discussion of a primitive new genus Chinius. Ann Trop Med Parasitol.1987; 81 (3): 311–317.

Le Pont F, Desjeux P. Phlebótomes de Bolivia.I. Lutzomyia nuneztovari anglesi n ssp (Diptera, Psychodidae) nouveau phlebotome anthropophile du piemont andin. Cah. ORSTOM. Ser Ent Med Parasit. 1984; 22: 277-282.

Le Pont F, Mouchet J, Desjeux P. Leishmaniasis in Bolivia.VI. Observations on Lutzomyia nuneztovari anglesi Le Pont & Desjeux, 1984, the presumed vector of tegumentary leishmaniasis in the Yungas focus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84: 277-278.

Le Ponti F, Leon R, Guerrini F, Gantier JC, Mouchet J, Echeverria R, Guderian RH. Leishmaniasis in Ecuador. 3. Lutzomyia trapidoi, vector of Leishmania panamensis. Ann Soc Belg Med Trop. 1994; 74(1): 23-8.

Lewis D.J. Internal structural features of some central American phlebotomine sandflies. Ann. Trop. Med. Parasit.1965; 59: 375-385.

Lewis DJ , Young DG, Fairchild GB, Minter DM. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). System Entomol. 1977; 2 (4): 319 –332.

Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009; 25: 1451–1452

Llanos BZ, Martins AV, da Silva J. Estudos sobre os flebotomíneos do Peru (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) 1. Departamento de Cuzco; 2. Descriçao das fèmeas de Lutzomyia campbelli e Lutzomyia sherlocki e redescriçao do macho e descriçao de fémea de Lutzomyia octavioi. Rev Brasil Biol. 1975; 35: 655-664.

Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi W, O'Brien SJO. Numt, a Recent Transfer and Tandem Amplification of Mitochondrial DNA to the Nuclear Genome of the Domestic Cat. J Mol Evol. 1994; 39: 174-190.

Loyola EG, Álzate A, Sanchez A, González A. Epidemiology of a natural focus of Leishmania braziliensis in the Pacific lowlands of Colombia. III Natural infections in wilds mammals. Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg. 1988; 82: 406-407.

Lucientes J, Antonio J, Gracia MJ, Peribañez MA. Flebotomos, de la biología al control. REDVET.2005; 6 (8). Disponible en:
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080805/080502B.pdf

Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Mol Biol. 1996; 5: 153–165.

Marín D, Ocampo C, Munstermann L, Ferro C. Actualización de la lista de flebotomíneos reportados para el departamento del Tolima - Colombia. Memorias, XXXV Congreso SOCOLEN, Cali. 2008; 135.

Marins G, Vilela M. Aspects of the ecology of sandflies at the serra dos orgaos national park, state of Rio de Janeiro. vi. shelters and breeding places (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz.1987; 82(4): 585-586.

Maroli M. Flebotomi. In Parassitologia urbana. Cittá, animali e salute pubblica. Puccini V, Tarsitano E. 2003. Il Sole 24 Ore Edagricole: 344 pp.

Martínez E, Le Pont F, Torres M, Telleria J, Vargas F, Dujardin JC, Dujardin JP. Lutzomyia nuñeztovari anglesi (Le Pont & Desjeux, 1984) as a vector of Leishmania amazonensis in a sub-Andean leishmaniasis focus of Bolivia. Am J Trop Med Hyg. 1999; 61: 846-9.

Martins AV, Silva E, Falçao AL. Lutzomyia sherlocki sp. n., do Estado de Mato Grosso, Brasil (Diptera, Psychodidae). Rev Brasil Bio. 1971; 31: 415-418.

Martins AV, Williams P, Falcão AL. American Sand Flies. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. 1978: Pp195.

Mascari T. Novel methods for the control of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). Tesis de Doctorado. University of London. Inglatera. 2008.

Meyer C, Paulay G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. PLoS Biol. 2005; 3(12): e422. doi:10.1371/journal.pbio.0030422

Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PK.L. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. Syst Biol. 2006; 55(5): 715-728.

Meier R, Zhang G, Ali F. The use of mean instead of smallest interspecificdistances exaggerates the size of the ‘‘barcoding gap” and leads to misidentification. Syst. Biol. 2008; 57: 809-813.

Memmott J. Sandfly distribution and abundance in a tropical rain forest. 1991. Med Vet Entomol. 1991; 5(4): 403-411.

Mogollón J, Manzanilla P, Scorza JV. Distribución altitudinal de nueve especies de Lutzomyia (Diptera, Psychodidae) en el estado Trujillo, Venezuela. Bol Dir Malariol San Amb. 1977; 17: 206-23.

Mondragon-Shem K , Acosta LA, Vivero RJ, Carrillo LM, Vélez ID. Primer registro de Lutzomyia longipalpis para los municipios de Marquetalia y Norcasia en el departamento de Caldas" Memorias XIII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. 2007: 27: 149 – 149.

Molina JA. Determinación de la fauna flebotominea en el noroccidente de Boyacá. Implicación de Lutzomyia trapidoi como especie vectora en el foco de leishmaniasis de la Zambera (trabajo de grado). Bogotá: Universidad de los Andes; 1995: Pp.98

Molina JA, Ortiz MI, Guhl F. Seasonality of Lutzomyia fairtigi (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae), a species endemic to Eastern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(5):477-482.

Montoya-Lerma J. Transmisión de leishmaniasis tegumentaria en zonas cafeteras de Colombia. Entomólogo. 1990; 66:1-2.

Montoya J, Cadena H, Jaramillo C. Rearing and colonization of Lutzomyia evansi (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 263-268.

Montoya-Lerma J, Jaramillo C, Palma G, Gómez T, Segura I, Travi B. Report of an epidemic outbreak of cutaneous leishmaniasis in a coffee-growing area of Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1990; 85:119-21.

Montoya-Lerma J., Ferro C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. En: Amat, G., M. G. Andrade y F. Fernández (eds.), Insectos de Colombia, Volumen II. Colección Jorge Álvarez Lleras, No. 13, Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Centro Editorial Javeriano, Santafé de Bogotá. 1999: 211-245.

Montoya-Lerma J, Cadena H, Segura I, Travi B. Association of Lutzomyia columbiana (Diptera: Psychodidae) with a leishmaniasis focus in Colombia due to species of the Leishmania mexicana complex. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: 277-83.

Moore JS. Kelly, Killick-Kendrick TB, Killick-Kendrick R, Wallbanks M, K.R, Molyneux DH. Honeydew sugars in wild caught Phlebotomus ariasi detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography. Med. Vet. Entomol. 1987; 1: 427 434.

Morales A, Ferro C, De Rodríguez C. Establecimiento de una colonia de Lutzomyia walkeri (Newstead, 1914) (Diptera: Phlebotominae). Biomédica.1984; 4: 37-41.

Morales D. McMahon-Pratt H. Guzman, Tesh RB. 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. 1991; 44: 662-675.

Morales A, Bello F, Cárdenas E. Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de Lutzomyia spinicrassa Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Diptera: Psychodidae) en Colombia. Rev. Cienc. Salud. 2005; 3(2): 129-135. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732005000200003&lng=en.

Morales A, Corredor A, Cáceres E, Ibagos AL, Rodríguez CI. Aislamiento de tres cepas de Leishmania a partir de Lutzomyia trapidoi en Colombia. Biomédica. 1981; 4: 37-41.

Morales A., Osorno-Mesa E, De Osorno F, Muñoz de Hoyos P. “Phlebotominae de Colombia (Diptera, Psychodidae) V. “Descripción de una nueva especie de Lutzomyia”. Rev Acad Colomb.Cienc. 1969; 13(51): 383-390.

Moritz C, Cicero C. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. PLoS Biol. 2004; 2(10): e354. doi:10.1371/journal.pbio.0020354

Morlais I, Severson DW. Complete Mitochondrial DNA Sequence and Amino Acid Analysis of the Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) from Aedes aegypti. DNA Seq. 2002; 13 (2): 123–127.

Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML. Dispersal of the sand Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. J Med Entomol. 1993. 30: 427-435.

Moureau G, Ninove L, Izri A, Cook S, De Lamballerie X, Charrel RN. Flavivirus RNA in phlebotomine sandflies. Vector-Borne Zoonot. 2010; 10(2): 195-197.

Munstermann LE. Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. In: Marquardt, W.C.; Black,WC, Freier JE; Hagedorn HH, Hemingway J, Higgs S, James AA, Kondratieff B, Moore CG. (Eds.). Biology of Disease Vectors, Second edition. Elsevier, San Diego, CA. 2004. pp. 141–151.

Munstermann LE. Phlebotomine sand flies, the Pshychodidae. In Biology of disease vectors (2nd edn). Mrquardt WC (Ed). Elsevier Academic Press. 2005: 141 -151.

Muñoz G. The sandfly vectors and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Landázuri focus, Colombia (tesis). Londres: University of London; 1998: Pp.257.

Murillo J, Zeledón R. Flebótomos de Costa Rica(Diptera: Psychodidae). Brenesia. 1985. 23 (Supl.1): 1-137.

Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press. New York. 2000: Pp333.

Neira M, Díaz-Martínez A, Bello F, Ferro C. Estudio en condiciones de laboratorio de los ciclos de vida deLutzomyia torvida y Lutzomyia longiflocosa (Diptera: Psychodidae),

posibles vectores de Leishmania braziliensisen la zona cafetera colombiana. Biomédica. 1998; 18: 251-255.

Nieves E, Ribeiro A. Physical Factors Influencing the Oviposition of Lutzomyia migonei (Diptera: Psychodidae) in Laboratory Conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997: 92(6): 733-737.

Nitzulescu V. Sur un Phlebotome nouveau du Venezuela. P. gomezi n. sp. Ann Parasit Hum Camp. 1931; 9: 247-255.

Navarro JC, Hernández C, Rangel-Díaz G, Guerrero E, Rangel Y, Arrivillaga Y. Invalidación de autapomorfías putativas mediante análisis de filogenia molecular en Anopheles subgénero Nyssorhynchus. Bol Mal Salud Amb. 2009; 49 (2): 223-239.

Oliveira de MT, Lima de Azeredo-Espin AM, Lessinger AC. Evolutionary and structural analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene from Haematobia irritans, Stomoxys calcitrans and Musca domestica (Diptera: Muscidae) mitochondrial DNA.Mitochondrial. DNA. 2005; 16(2): 156-160.

Organización Mundial de la Salud OMS 60ª Asamblea Mundial de la Salud. Control de la leishmaniasis. Informe de la Secretaria; Resolución N° A60/10; Ginebra, Suiza. 2007.
Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud - OPS, O. P. d. S. Leishmaniasis: Actualización. 2007.

Ortiz I. Descripción de dos nuevas especies del género Phlebotomus Rondani (Diptera, Psychodidae) de Venezuela. Acta Biol. Venez. 1954; 1: 231-250.

Ovalle CE, Porras L, Rey M, Ríos M, Camargo YC. Distribución geográfica de especies de Leishmania aisladas de pacientes consultantes al Instituto Nacional de Dermatología Federico Lleras Acosta,E.S.E., 1995-2005. Biomédica. 2006; 26(1):145-151.

Oviedo M, Feliciangeli D. Esculpido exocoriónico del huevo de dos poblaciones de Lutzomyia longipalpis s.l. (Diptera: Psychodidae) de Venezuela. Bol Mal Salud Amb. 2007; 47(2): 253-256.

Ozbel Y, Sanjoba C, Alten B, Asada M, Depaquit J, Matsumoto Y, Demir S, Siyambalagoda RRMLR, Rajapakse RPVJ, Matsumoto Y. Distribution and ecological aspects of sand fly (Diptera: Psychodidae) speciesin Sri Lanka. J Vector Ecol. 2011; 36 (1): S77-S86.

Padial JM, Miralles A, De la Riva I, Vences M. The integrative future of taxonomy. Front Zool. 2010: 7:16. doi:10.1186/1742-9994-7-16.

Pardo RH, Cabrera OL, Becerra J, Fuya P, Ferro C. Lutzomyia longiflocosa, posible vector en un foco de leishmaniasis cutánea en la región subandina del departamento del Tolima, Colombia, y el conocimiento que tiene la población sobre este insecto. Biomédica. 2006; 26 (suppl1): 95-108.

Pardo RH, Farieta S, Munstermann LE, Ferro C. Estudio preliminar de los flebótomos de Villeta y Quebradanegra, Cundinamarca: sus implicaciones en salud pública. Biomédica 1996; 16: 293-302.

Pardo R, Ferro C, Lozano CA, Cabrera OL, Davies C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) vectores de leishmaniasis cutánea y sus determinantes ecológicos en la zona cafetera del Huila. XXVI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN. Bogotá, 28-30 de julio de 1999: 147.

Pérez J, Ogusuku E. Chorion patterns on eggs of Lutzomyia sandflies from the Peruvian Andes. Med Vet Entomol. 1997, 11: 127-133.

Pérez JE, Ogusuku E, Monje J, Young DG. Lutzomyia (Diptera: Psychodidae) de Pillcopata (Cusco), nuevos registros para el Perú y descripción de Lutzomyia deorsa n.sp. Rev Per Entomol. 1991; 33: 133-135.

Pérez-Doria A, Bejarano EE. . tRNASer (UCN) mitocondrial de Lutzomyia hartmanni predicción de la estructura secundaria del tRNASer (UCN) mitocondrial del flebotomíneo Lutzomyia hartmanni (Diptera: Psychodidae). Acta biol.Colomb. 2011; 16 (1).

Pérez-Doria A, Bejarano EE, Sierra D, Vélez ID. Molecular evidence confirms the taxonomic separation of Lutzomyia tihuiliensis from Lutzomyia pia (Diptera: Psychodidae) and the usefulness of pleural pigmentation patterns in species identification. J Med Entomol. 2008; 45(4): 653-659.

Perfecto I, Vandermeer J. Spatial pattern and ecological process in the coffee agroforestry system. Ecology. 2008; 89: 915–920. http://dx.doi.org/10.1890/06-2121.1

Perfecto I Rice RA, Greenberg R, Van Der Voort ME. Shade coffee: a disappearing refuge for biodiversity. Bioscience. 1996; 46: 598-608.

Perfecto I, Vandermeer J, Hansen P, Cartin V. Arthropod biodiversity loss and the transformation of tropical agro-ecosystem. Biodivers. Conserv. 1997. 6: 935-945.

Perruolo G. Aspectos ecológicos de Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) en un foco endémico de leishmaniasis cutánea en el estado Táchira, Venezuela. Bol Malar Salud Ambient. 2004; 44(1): 35-44

Peterson, A. & Shaw, JLutzomyia vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. Int J Parasitol. 2003; 33(9): 919-931.

Pinto IS, Ferreira AL, Andrade-Filho JD, Galati EAB, Rodrigues AA, Brazil RP, Peixoto AA. 2012. DNA barcoding for identification of sandflies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Brazil - a preliminary Analysis. Resumos do 58o Congresso Brasileiro de Genética. 11 a 14 de setembro de 2012.

Polly, R. Orbiviruses. In Knipe, D. and P. Howley. Fields Virology (5 Ed.) (p. 1975-1997). Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. 2007:

Porter C.H, De Foliart GR. The man-biting activity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in tropical wet forest environment in Colombia. Arq Zool Sao Paulo. 1981; 30: 81-158.

Quate, LW. Taxonomy of Netropical Psychodidae (Diptera) 3. Psychodines of Barro Colorado Island and San Blas, Panama. Pp. 405-441. In J.F Burger (Ed.). Contributions to the knowledge of Diptera Momoirs on entomology, International, Volume 14. Associated Publishers, Gainesville, Florida. 1999.

Quate LW, Brown V. Revision of Neotropical Setomimini (Diptera: Psychodidae: Psychodinae). Contributions in Science, Natural Hystory Museum of Los Angeles Conunty. 2004; 500:1-117.

Rangel EF, Lainson R, Souza AA, Ready P, Azevedo ACR. Variation between geographical populations of Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996; 91: 43-50.

Ratnasingham S, Hebert PD. BOLD: The Barcode of Life Data. Mol Ecol Notes. 2007; 7: 355-364.

Ready PD, Frahia H, Lainson R, Shaw JJ. Psychodopygus as a genus: reasons for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology. 1980; 17: 75-88.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous Leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007; 7(9):581-96.

Rispail P. & N. Léger. Numerical taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). 2. Restatement of classification upon subgeneric morphological characters. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 787-793.

Ristorcelli, A. & D. Van Ty. Phlébotomes d'une region de Colombie ou la verruga du Perou est devenue depuis ou trois ans (Seconde note). Ann Parasit Hum Compo. 1941; 18: 251-269.

Rivera J; Currie D. Identification of Nearctic blackflies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). Mol Ecol Res. 2009; 9: 224-236.

Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, Barker DC. Detection of Leishmania braziliensis in naturally infected individual sand flies by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999; 93: 47-49.

Rodriguez-Barraquer I, Gongora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Navas A, Ferro C, Miranda MC, Saravia NG. Etiologic agent of an epidemic of cutaneous leishmaniasis in Tolima, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2008; 78: 276–282.

Romero M., Sánchez J. Una mirada a la epidemiología y al control de la Leishmaniasis zoonótica en Colombia. Biosalud. 2007; 6: 99-111.

Romero LR, Lastre NM, Perez-Doria AJ, Bejarano EE. DNA barcoding for identification of phlebotomine sand fly species (Diptera: Psychodidae). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore?term=caimus%20coi

Rosero DA, Gutiérrez LA, Cienfuegos AV, Jaramillo LM, Correa MM. Optimización de un procedimiento de extracción de ADN para mosquitos anofelinos. Rev Colomb Entomol. 2010; 36(2): 260-263

Rozeboom LE. Flebotomus suis, a new Flebotomus from Panama (Diplera: Psychodidae). Amer J.Hyg. 1940; 32 (C): 8-11.

Rozeboom LE. The identity of the Phlebotomus associated with bartonellosis in Colombia. Annals of the Entomological Society of America. 1947; 40: 705–714.

Rubinoff D. Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. Conserv Biol. 2006; 20: 1026-1033.

Rubinoff D, Cameron S, Will K. A genomic Perspective on the Shortcomings of Mitochondrial DNA for “Barcoding” Identification”. J Hered. 97: 581–594.

Rutledge L, Mosser HL. Biology of immature sandflies (Diptera: Psychodidae) at the bases of trees in Panama. Environmental Entomology. 1972.1: 300-309.

.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987; 4: 406–425.

Sandoval CM, Gutierrez, Cardenas R, Ferro C. Especies de género Lutzomyia (Psychodidae, Phlebotominae) en áreas de transmisión de leishmaniasis tegumentaria y visceral en el departamento de Santander, en la cordillera oriental de los Andes colombianos. Biomédica. 2006; 26(suppl.1): 218-227.

Santamaría E, Castillo M, Cárdenas R, Bello F, Ayala M, Ferro C. Competencia vectorial de las especies de Lutzomyia del grupo Verrucarum (Diptera: Psychodidae) en un foco

endémico de Leishmania braziliensis en Reventones, Cundinamarca. Biomédica. 1999; 19: 115-26.

Santamaría E, Ponce N, Zipa Y, Ferro C. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con Leishmania (Viannia) panamensis en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. Biomédica. 2006; 26(suppl.1): 82-94.

Shannon R. The occurreuce of Phlebolomus in Panama. J Wash Acad Sci. 1926; 16: 190-193.

Sherlock I. Sobre alguns Phlebotomus e Brumptomyia da Colombia (Diptera: Psychodidae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1962; 60: 321-336.

Saravia N, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama l, Valencia AZ, Escorcia B, Mcmahon-Pratt D. 2002. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of Leishmania viannia in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2002; 66(6):738–744.

Scorza JV, Márquez M, Márquez JC. Hallazgo de Lutzomyia townsendi (Ortiz, 1959) naturalmente infectada con Leishmania braziliensis, en el área suburbana de Trujillo. Venezuela. Bol Dir. Malariol Saneam. Amb. 1984; 24: 21-28.

Scorza JV. Cambios epidemiológicos de la leishmaniasis tegumentaria en Venezuela. Bol Dir Malariol San Amb. 1985; 25.

Scorza JV, Castillo I, Rezzano S; Marquez M; Marquez JC. El papel del cafeto en la endemicidad de la Leishmaniasis cutánea en Venezuela. Bol. Dir. Malariol. San. Amb. 1985; 25: 82-88.

Scorza JV, Spooner R. La leishmaniasis tegumentaria del pie de monte oriental de los andes venezolanos. Bol Dir Malariol San Amb.1982; 19: 34-44.

Selma MB, de Queiroz, Pearson RD. Leishmaniasis (2011) In Tropical Infectious Diseases por Guerrant RL.; Walker DH; Weller PF. (p. 696–706) Editorial: Elsevier Science Health Science Div 2011/04/12.

Sierra A, Vélez B, Uribe S. Identificación de Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) grupo verrucarum por medio de microscopia electrónica de sus huevos. Rev biol Trop. 2000; 48 (2-3): 615-622.

Song H, Buhay JE, Whiting MF, Crandall KA. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. Proceedings of the National Academy of SciencesUSA. 2008; 105: 13486–13491.

Tamura K, Dudley J, Nei, M, Kumar S. MEGA 4.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007; 24: 1596–1599.

Theodor O. Classification of the Old World species of the subfa -
mily Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). Bull Entomol Res. 1948; 39: 85-115.

Theodor O. On the classification of the American Phlebotominae.
Journal of Med Entomol.1965; 2: 171-197.

Tesh RB, Guzman H. Sandflies and the agents they transmit. En: The biology of disease vectors. University Press of Colorado. 1996:117-27.

Tesh RB, Boshell J, Modi GB, Morales A, Young DG, COrredor A. Natural infection of humans, animals and phlebotomine sand flies with Alagoas serotype of vesicular stomatitis virus in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1987; 36: 653 – 661

Testa JM, Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD. Molecular identification of vectors of Leishmania in Colombia: mitochondrial introgression in the Lutzomyia townsendi series. Acta Trop. 2002; 84: 205-18.

Theodor O. On the classification of American Phlebotominae. J Med Entomol. 1965; 2: 171 – 197.

Torgerson DG, Lampo M, Velázquez Y, Woo TK. Genetic relationships among some species groups within the genus Lutzomyia (Diptera: Psychodidae). Am J Trop Med Hyg. 2003; 69 (5): 484-493.

Torrez JM, Le Pont F, Mouchet J, Desjeux P, Richard A. Epidemiologie de la leishmaniose tegumentaire en Bolivie. 1. Description des zones d'etude et frequence de la maladie. Ann Soc Belge Med Trop. 1989; 69: 297-306.

Torrez M, López M, Le Pont F, Martínez E, Muño M, Hervas D , Yaksic N, Arevalo J, Sossa D, Dedet JP, Dujardin JP. Lutzomyia nuñeztovari anglesi (Diptera: Psychodidae) as a probable vector of Leishmania braziliensis in the Yungas, Bolivia. Acta Trop. 1998; 71: 311-6

Travi BL, Ferro C, Cadena H, Montoya-Lerma J, Adler GH. Canine visceral leishmaniasis: dog infectivity to sand flies from non-endemic areas. Res Vet Sci. 2002; 72: 83-6.

Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Vélez ID. Bionomics of Lutzomyia evansi (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. J Med Entomol. 1996; 33(3):278-285.

Travi BL, Montoya J, Solarte Y, Lozano L, Jaramillo C. Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotomine fauna associated with endemic foci in the Pacific coast region. Am J Trop Med Hyg. 1988; 39 :261-6.

Uribe S. The status of the Lutzomyia longipalpis species complex and possible implications for Leishmania transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94: 729-734.

Uribe S, Lehmann T, Rowton E, Velez ID & Porter CH. Speciation and population structure in the morphospecies Lutzomyia longipalpis (Lutz and Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. Mol Phylo Evol. 2001; 18: 84 – 93.

Valenta DT, Anez N, Tang Y, Killick-Kendrick R. The genital atrium as a good taxonomic carácter to distinguish between species of Phlebotominae sandflies (Diptera: Pshycodidae) from Venezuela. Ann Trop Med Parasitol. 1999; 93: 389-399.

Vélez ID, Wolff M, Valderrama R, Escobar JP, Osorio L. Community and environmental risk factors associated with cutaneous leishmaniasis in Montebello, Antioquia, Colombia. En: IDRC, editors. Leishmaniasis control strategies: a critical evaluation of IDRCsupported research. London: IDRC Publications; 1991; 261-74.

Vélez ID, Hendrickx E, Robledo S, Agudelo S. Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. Cad. Saúde Pública. 2001; 17,(1):171-180.

Vergara D, Carrillo LM, Vélez ID, Bejarano EE. Primer informe de Lutzomyia yuilli Young & Porter, 1972 y Lutzomyia triramula (Fairchild & Hertig 1952) (Diptera: Psychodidae) en el departamento de Caldas, Colombia. BIOTA neotropica. 2008; 8 (1): 251-253.

Vexenat JA, Barreto AC, Cuba Cuba C, Marsden PD. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em região endêmica do Estado da Bahia. III. Fauna flebotomínica. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81: 293-301.

Viña A, Echavarria F, Rundquist DC. Satellite Change Detection Analysis of Deforestation Rates and Patterns along the Colombia – Ecuador Border. AMBIO. 2004; 33(3):118-125.

Vivero RJ. Caracterización de criaderos naturales y composición de flebotomíneos en áreas con transmisión de leishmaniasis en ecosistemas de bosque húmedo y bosque seco tropical en colombia. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. Medellín. 2011

Vivero RJ, Bejarano EE, Contreras MA. Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de Lutzomyia. Biomédica. 2007; 27(3): 429-438.

Vivero RJ, Bejarano EE, Contreras MA. Cambios en el extremo carboxilo terminal de citocromo b como carácter taxonómico en Lutzomyia (Diptera: Psychodidae). Rev. Colomb. Entomol. 2009; 35(1): 83–88.

Ward RD. A revised numerical chaetotaxy for neotropical Phlebotomine sandfly larvae (Diptera: Psychodidae). Systematic Entomology. 1976;.1: 89-94.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 2005; 360, 1847-1857.

Warburg A; Montoya-Lerma J; Jaramillo C, Cruz-Ruiz AL, Ostrovska K. Leishmaniasis vector potential of Lutzomyia spp. in Colombian coffee plantations. Med Vet Entomol journal 1991; 5: 9-16.

Walters LL, Chaplin GL, Modi GB, Tesh RB. Ultrastructural biology of Leishmania (Viannia) panamensis (= Leishmania braziliensis panamensis) in Lutzomyia gomezi (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. Am J Trop Med Hyg. 1989 ;40: 19-39.

Whittaker RH, Levins SA, Root RB. 1973. Niche, Hábitat, and Ecotope. Amer.Naturalist. 1973; 107(955), 321-338.

World Health Organization (WHO). The leishmaniasis. Technical Report Series No. 793, Geneva: World Health Organization; 1984: Pp.120.

World Health Organization (WHO).. WHO Information Fact Sheet N-116, 2000.

World Health Organization (WHO). Control de la Leishmaniasis. 60a Asamblea mundial de la Salud. WHO/HQ. Geneva. A60/10, 2007.

Wolff M, Sierra D, Murcia LM, Vélez ID. Phlebotomine fauna (Diptera: psychodidae) in the department of Amazonas, Colombia. Neotrop Entom. 2003; 32: 523-6

Xia X. DAMBE: Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. New York, Kluwer Academic Express Editors. 2002: Pp284.

Young DG. A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Tech Bull 806. Gainesville: Universidad de la Florida; 1979. Pp.226.

Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol. 1994; 54: 1-881.

Young DG, Morales A, Kreutzer RD, Alexander B, Corredor A, Tesh RB,Ferro C, de Rodríguez C. Isolations of Leishmania braziliensis (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreseved Colombian sandflies (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol. 1987; 24:587-589.

Young DG, Porter CH. Lutzomyia yuilli a new manbiting phlebotomine sand fly from Colombia (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol.1972 ;9: 524-6.

Young DG, Fairchild GB. Studies on phlebotomine sandflies . Gainesvlle, Dept. of Entomology and Nematology, University of Florida. 1974. 151 pp.

Zambrano P. Comportamiento de Leishmaniasis en Colombia, Informe Final 2009. Instituto Nacional de Salud, Colombia.

Zhang DX, Hewitt GM. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. Trends Ecol Evol. 1996; 11: 247–251.

Zhioua E, Chelbi I. Efficacy of active underground rabbit holes around houses for reducing the indoor density of sandflies. Arch Inst Pasteur Tunis. 2005; 82: 76 ISOPS.

Zeledón R, Murillo J, Gutiérrez H. Flebótomos antropofílicos y leishmaniasis cutánea en Costa Rica. Bol of Sanit Panam. 1985; 99: 163-72.

Zuleta BRA. Determinación de la fauna flebotomínea del área periurbana del Valle de Aburrá. B. Sc. Tesis. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2002.