



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Identificación molecular de fuentes alimenticias en
flebotóminos de la Estación de Biología Tropical
“Los Tuxtlas”, Veracruz**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EDUARDO ISAÍ JIMÉNEZ GIRÓN



Director de tesis:

Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes

Ciudad de México, abril de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Carrera: Biología

TESIS

Identificación molecular de fuentes alimenticias en flebotómicos de la Estación de
Biología Tropical "Los Tuxtlas", Veracruz

Área: Biodiversidad

Alumno:

Eduardo Isaí Jiménez Girón

Director de tesis:

Dr. Daniel Sokani Sánchez Montes

Centro de Medicina Tropical, División de Investigación,
Facultad de Medicina, UNAM

Asesores Internos:

Dr. Gabriel Gutiérrez Granados

Mtra. Gabriela Selene Ortiz Burgos

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	1
DEDICATORIAS.....	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO.....	7
Generalidades	7
Morfología de los flebotóminos.....	9
Fisiología de los flebotóminos.....	12
Leishmaniasis en México.....	13
Hospederos y reservorios de <i>Leishmania</i>	15
Vectores de leishmaniasis en México	18
Fuentes alimenticias de flebotóminos	19
Detección molecular de fuentes alimenticias	21
Citocromo b (<i>cytB</i>)	21
Importancia de determinar las fuentes alimenticias	22
Planteamiento del problema	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares	25
METODOLOGÍA.....	26
Área de estudio	26
Colecta de flebotóminos	27
Montaje e identificación de flebotóminos.....	27
Identificación morfológica	28
Extracción de ADN.....	28
Amplificación del gen Cyt-b mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
Secuenciación e identificación de muestras de sangre	29
RESULTADOS	31
Identificación morfológica	31
Análisis de secuencias	32

DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES	44
ANEXOS	46
REFERENCIAS.....	50

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por brindarme las herramientas necesarias para mi crecimiento profesional y por ser el lugar donde pude conocer a muchas de las personas más importantes para mí.

Este proyecto fue financiado por los proyectos CONACYT 6682 “Coinfecciones microbianas en *Lutzomyias* transmisoras de *Leishmania mexicana*: su impacto en la generación de enfermedades exacerbadas en el sureste de México y sus implicaciones para la terapia y prevención” y el proyecto PAPIIT IG201221 “Desarrollo de panel diagnóstico para enfermedades zoonóticas desatendidas en México, con estudio de terapia de rescate inmunológico en leishmaniasis.”

A mis padres, Edgar y Paty, gracias por apoyarme siempre y ser los principales promotores de mis sueños, por alentarme a ser mejor persona, por cada una de sus palabras y consejos, sin los cuales hoy no sería quien soy, así como por dejarme confiar en ustedes y por confiar en mí y en mis expectativas. Gracias por su amor, dedicación y paciencia y por, sobre todo, respetarme, comprenderme y darme la libertad de tomar mis propias decisiones.

A mi papá, por tu fortaleza, tu ejemplo, tu cariño y por motivarme para ser un mejor hombre, por demostrarme que a pesar de las dificultades siempre cuento con una familia y que todo en esta vida tiene una solución.

A mi mamá, por tu amor incondicional, por tus consejos, por tu entrega y por estar a mi lado siempre, por siempre tener una palabra de aliento cuando sentía que ya no podía más. Gracias por hacerme sentir que nunca estoy solo.

A Priscila. Gracias por todo tu apoyo y cariño. Te agradezco por estar junto a mí en cada momento, por alentarme cuando quería darme por vencido y ayudarme cuando lo necesitaba, por acompañarme en los éxitos y en los golpes de la vida, tú mejor que nadie sabes lo que esto significa para mí. Gracias por creer en mí e impulsarme a seguir mis sueños y a aspirar a más y sobre todo, por hacer mis días mejores a lo largo de tantos años.

A mis amigos de la FES, (Jlo, Diego, Fri, Betty, Breyan, Miliápodo, la Mancí, Gabs, Viri y lxs demás), por tantas risas, fiestas, viajes y anécdotas. Gracias por hacer de la universidad una experiencia inolvidable y por siempre acompañarme por comida. Gracias, “Jotos fresas”.

A Taday, por estar conmigo después de tanto tiempo, por tu apoyo y las pláticas espontáneas, por ser ese amigo que, a pesar de la distancia y tiempo, es como si no hubiera pasado un solo día. A ti mi hermano, te agradezco acompañarme y ser

mi compañero de mil batallas. Gracias por hacerme saber que siempre voy a poder contar contigo.

A la Dra. Ingeborg Becker y al Centro de Medicina Tropical, por abrirme las puertas y darme su apoyo para la realización de este proyecto.

Al Dr. Daniel Sokani, por brindarme el apoyo académico durante mi estancia en el CMT, por compartir conmigo sus conocimientos y por creer en mí y en mis capacidades, incluso cuando yo dudaba de ellas. Gracias por tu orientación, paciencia y consejos.

A la Dra. Yokomi, por su asesoría y valioso aporte en el desarrollo de esta investigación, por compartir conmigo sus conocimientos y por su paciencia.

Al Dr. Gabriel Gutierrez, gracias por sus consejos y observaciones, por su apoyo y enseñanzas en mi paso por la facultad y en el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales, por su apoyo con sus comentarios, sugerencias y enseñanzas.

A Pinwis, por ser un rayo de esperanza dentro de la cuarentena. Te extraño.

A la Sra. de los Bagels de campus II, por ser una opción rica, saludable y barata para los biólogos hambrientos. Sin usted no lo habría logrado, o sí pero más gordo.

DEDICATORIAS

A mi familia.

RESUMEN

Los flebotóminos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) son dípteros (moscas) nematóceros de importancia médica y veterinaria que son capaces de transmitir bacterias, virus y protozoarios debido a los hábitos hematófagos de las hembras en época reproductiva, teniendo especial relevancia en la transmisión del protozoario *Leishmania*.

Es por eso que el conocimiento de los hábitos alimenticios de los flebotóminos y de los hospederos de los que se alimentan es de gran relevancia, sin embargo, las enfermedades que transmiten son desatendidas y los estudios de esta índole son escasos.

El objetivo de este trabajo fue identificar las fuentes alimenticias de flebotóminos colectados en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz, a través de análisis moleculares (PCR), utilizando el gen mitocondrial Citocromo *b*.

Se realizaron 10 colectas de marzo del 2012 a mayo del 2013, utilizando trampas de luz CDC (Centers for Disease Control). Se obtuvieron un total de 179 hembras flebotomíneas pertenecientes a cuatro géneros, siendo la especie más abundante *Psathyromyia aclydifera* (45.8%).

Se realizó la disección de los flebotóminos y se montaron las muestras para su identificación taxonómica. Posteriormente, se realizó extracción de ADN y PCR para la detección de sangre de vertebrado dentro del abdomen de los dípteros.

Los análisis moleculares permitieron la identificación de 13 muestras, predominando la presencia de ADN de humano (53.85%), seguido por perro (15.38%), gallina (15.38%), gecko (7.69%) y murciélago (7.69%).

Este estudio contribuye al conocimiento general de los flebotóminos existentes en Veracruz y de los hospederos con los que interactúan, concluyendo en que se requiere mayor atención y estudios futuros para conocer los hábitos de los vectores y sus interacciones con los vertebrados que fungen como recurso nutricional para prevenir las enfermedades que transmiten.

INTRODUCCIÓN

La subfamilia Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) agrupa a dípteros de importancia médica y veterinaria ya que las hembras de hábitos hematófagos pueden transmitir patógenos como protozoarios (del género *Leishmania*), bacterias (*Bartonella bacilliformis*) y algunos arbovirus (Young & Duncan, 1994). Sin embargo, la transmisión de *Leishmania* resulta de mayor relevancia ya que es el agente causal de las enfermedades conocidas como Leishmaniasis, las cuales son endémicas de más de 98 países y afectan a más de 12 millones de personas a nivel mundial. Adicionalmente se registran 1.6 millones de nuevos casos y se estima que 350 millones de personas están en riesgo de contraer estas enfermedades en todo el mundo (Alvar *et al.*, 2012; PAHO, 2017).

Es por esto que el estudio de los flebotómicos resulta de gran relevancia a nivel taxonómico, ecológico y epidemiológico, ya que de ese modo ha sido posible crear medidas de control vectorial. Sin embargo, uno de los aspectos menos estudiados es la identificación de preferencias alimenticias en flebotómicos hembras.

Respecto a este último tema, existen escasos reportes que aborden la preferencia hacia hospederos específicos, como es el caso de *Lutzomyia longipalpis*, que se considera antropofílica o *Bichromomyia olmeca olmeca*, que se reporta con afinidad hacia roedores (Lainson & Shaw, 1968; Fairchild & Theodor, 1971). Aunque otros autores consideran más probable que estos dípteros presenten hábitos alimenticios generalistas, es decir, que su preferencia alimenticia dependerá del lugar donde habitan, así como de la disponibilidad de hospederos (Bongiorno *et al.*, 2003; de Oliveira *et al.*, 2008; Baum *et al.*, 2013).

En América, se han reportado como hospederos de los flebotómicos a algunas especies peridomésticas, como la rata espinosa colombiana (*Proechimys canicollis*), el zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), el tlacuache (*Didelphis spp.*); o algunas especies domésticas como el gato doméstico (*Felis catus*), la gallina (*Gallus gallus*), la vaca (*Bos taurus*), el perro doméstico (*Canis*

lupus familiaris), y el asno (*Equus asinus*). Estos estudios se han realizado principalmente en países como Brasil, Colombia y Ecuador (de Oliveira *et al.*, 2008; Quinell & Courtenay, 2009; Baum *et al.*, 2013; Anaguano *et al.*, 2015).

En México, a pesar de la diversidad de flebotóminos, no se ha realizado ningún estudio enfocado en identificar fuentes alimenticias como una alternativa para conocer de manera indirecta a los vertebrados que participan en su ciclo de vida, aunque de forma indirecta algunos autores sugieren que algunas especies pueden tener afinidad por roedores, murciélagos, reptiles y humanos.

Es por eso por lo que el objetivo de este trabajo fue realizar la detección de fuentes alimenticias de flebotóminos que se distribuyen en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz.

MARCO TEÓRICO

Generalidades

La subfamilia Phlebotominae (Romani, 1840) agrupa cerca de 1000 especies de dípteros nematóceros que se distribuyen en las zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. Esta subfamilia está dividida en dos tribus: Hertigiini y Phlebotomini, las cuales contienen 29 géneros, de los cuales 23 están presentes en el continente americano. La tribu Hertigiini incluye a 5 géneros (*Warileya*, *Hertigia*, *Spelaeophlebotomus*, *Idiophlebotomus* y *Chinus*) y 28 especies, mientras que la tribu Phlebotomini incluye 23 géneros (*Phlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Brumptomyia*, *Oligodontomyia*, *Sergentomyia*, *Deanemyia*, *Micropygomyia*, *Sciopemyia*, *Lutzomyia*, *Migonemyia*, *Pintomyia*, *Dampfomyia*, *Expapillata*, *Pressatia*, *Trichopygomyia*, *Evandromyia*, *Psathyromyia*, *Viannamyia*, *Martinsmyia*, *Bichromomyia*, *Psychodopygus*, *Nyssomyia* y *Trichophoromyia*) y 931 especies; adicionalmente, existe el género *Edentomyia*, el cual incluye a una especie y, hasta el momento, no ha sido incluido en ninguna de las dos tribus (Galati, 2014; 2018; Akhoundi *et al.*, 2016; Shimabukuro *et al.*, 2017).

Los flebotóminos se caracterizan por su tamaño pequeño (miden entre 1.5 y 3.5 mm), por estar cubiertos de finas sedas, por su coloración que va de tonos grisáceos a colores oscuros, por la forma lanceolada de sus alas, las cuales se mantienen en posición erecta en un ángulo de 45° (en forma de “V”) respecto a su cuerpo y por su poca capacidad de vuelo (1 – 2 km) (Albertos-Alpuche, 1990; Munstermann, 2005; Cortés & Fernández, 2008; Maroli *et al.*, 2013).

Tienen un desarrollo holometábolo, es decir, atraviesan por una metamorfosis completa con cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva (cuatro estadios), pupa y adulto; donde los estados inmaduros se desarrollan en materia orgánica en descomposición. Su ciclo de vida completo puede durar entre 30 y

100 días, lo cual dependerá principalmente de la especie, así como de las condiciones climáticas en las que se desarrolle (Maroli *et al.*, 2013; Llano *et al.*, 2014).

Estas moscas, son principalmente de hábitos nocturnos con una marcada actividad crepuscular, por lo que sus picos de actividad ocurren entre el ocaso y el amanecer, sin embargo, pueden llegar a tener actividad diurna en lugares con poca iluminación, por ejemplo, en los bosques de niebla. Durante los periodos de inactividad o descanso, los flebotómicos se refugian en cuevas, agujeros en los árboles y/o madrigueras, (Ready *et al.*, 1984; Killick-Kendrick, 1999; Bongiorno *et al.*, 2003; Al-Mayali & Al Hassani, 2016).

Los flebotómicos adultos, tanto hembras como machos, se alimentan de azúcares durante su desarrollo, los cuales obtienen de plantas y de áfidos principalmente, sin embargo, durante la época reproductiva las hembras requieren adicionalmente de la ingesta de sangre para la maduración de huevos, por lo que se alimentan de diversos vertebrados (hospederos del mosquito). Aunque algunas especies tienen la capacidad de producir huevos sin ingesta sanguínea (autogenia), la mayoría de las especies son anautogénicas, es decir, requieren de la ingesta de sangre (Cameron *et al.*, 1995; Mann *et al.*, 2009; Ready, 2013; Al-Mayali & Al-Hassani, 2016; Ibáñez-Bernal & Juárez, 2016).

Es por esta razón que algunas especies son consideradas de importancia médica y veterinaria, ya que durante su alimentación pueden transmitir diversos patógenos como los protozoarios de los géneros *Leishmania*, la bacteria *Bartonella bacilliformis* y algunos arbovirus de las familias Phlebovirus y Vesiculovirus (Rosa *et al.*, 2006; Roldán *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2009; Depaquit *et al.*, 2010; Alvar, 2012; Ready, 2013; Contreras-Gutiérrez *et al.*, 2014).

Morfología de los flebotóminos

Como se mencionó anteriormente, los flebotóminos tienen un desarrollo holometábolo, por lo que en cada estadio de su ciclo de vida se pueden observar diversas características:

- Huevos: Se caracterizan por su forma elíptica, tienen una coloración oscura y poseen patrones de crestas característicos de cada especie. Las hembras pueden depositar entre 30 y 70 huevos por puesta y generalmente son depositados en el envés de las hojas o cerca de materia orgánica en descomposición, y eclosionarán entre 10 y 30 días dependiendo de las condiciones climáticas (Young & Duncan, 1994; Munstermann, 2005).
- Larva: Es vermiforme, está cubierta de sedas en todo el cuerpo y posee cuatro sedas caudales de mayor longitud localizadas en el último segmento abdominal, además de un aparato bucal bien desarrollado con mandíbulas esclerosadas y dentadas que le permiten alimentarse, principalmente de materia orgánica. Esta etapa se completa en aproximadamente 18 días (Young & Duncan, 1994).
- Pupa: Para la transformación de larva a pupa, la larva IV deja de alimentarse y busca un lugar seco, donde se anclará y entrará en fase de reposo. La pupa es vermiforme, está cubierta de sedas y es considerablemente más resistente a los cambios climáticos. Pasados entre 7 y 12 días, emergerá el adulto (Young & Duncan, 1994).
- Adulto: El cuerpo de los flebotóminos adultos está constituido por tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen; los cuales contienen estructuras de importancia taxonómica (Figura 1).
 - La cabeza presenta un par de ojos compuestos, así como diferentes estructuras sensoriales, como las antenas, formadas por 14 segmentos conocidos como flagelómeros, los cuales contienen un

par de ascoides; y los palpos, constituidos por cinco palpómeros. El aparato bucal está constituido por un par de mandíbulas, un labro, un par de maxilas y todo está recubierto por el labio. El cual está conectado al cibario y a la faringe.

- El tórax, se divide en tres segmentos, el protórax, mesotórax y metatórax, siendo el segundo segmento el de mayor tamaño. En dicha estructura se encuentran ubicadas un par de alas funcionales y tienen un par de halterios o balancines.
- El abdomen está constituido por 10 segmentos, donde los tres últimos se han modificado para formar los segmentos genitales. En machos, la genitalia está conformada por el gonostilo y el gonocoxito, que forman de manera conjunta una estructura denominada gonopodio; cuentan con un par de lóbulos laterales, el edeago y el parámero. Por otro lado, la genitalia de las hembras se caracteriza por la presencia de dos espermatecas y la furca, que es la modificación del noveno esternito (Ibañez-Bernal, 2000; Black y Kondratieff, 2005; Contreras *et al.*, 2010;)

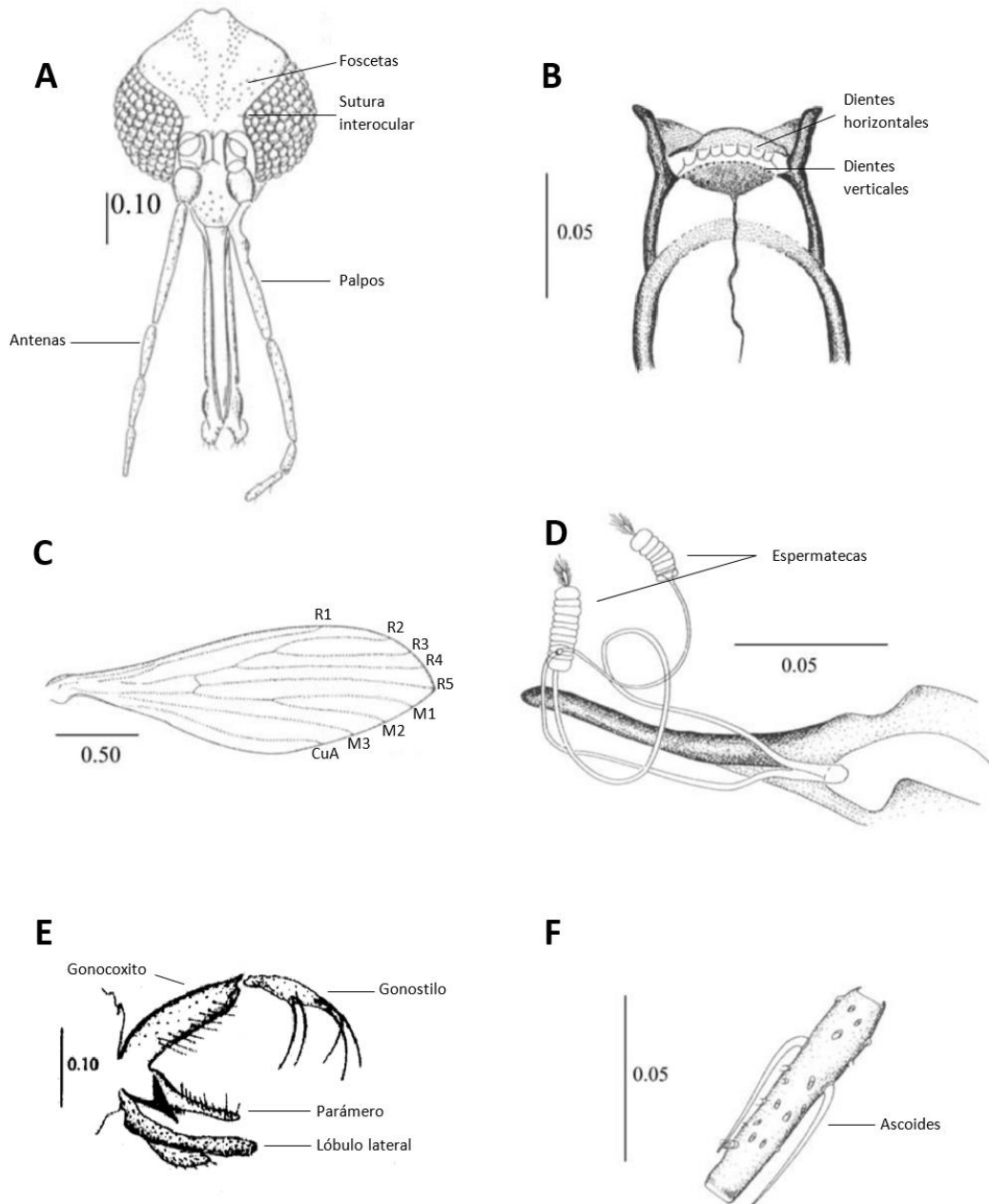


Figura 1. Caracteres de importancia taxonómica en flebotóminos. A) Cabeza completa vista frontal (*Psychodopygus panamensis*); B) Cibario (*Lutzomyia longipalpis*); C) Ala, R: vena radial alar (R1-R5), M: vena media alar (M1-M3), CuA: vena cubital anterior (*Psathyromyia texana*); D) Espermatecas (*Lutzomyia longipalpis*); E) Vista lateral de terminalia masculina (*Micropygomyia trinidadensis*); F) Flagelómero 2 (*Pintomyia ovallesi*). Extraído y modificado de Ibañez-Bernal, 2005a, 2005b.

Fisiología de los flebotóminos

Como ya se mencionó, en época reproductiva las hembras requieren de ingesta sanguínea para la maduración de huevos debido a su alto contenido proteínico, a partir del cual sintetizan reservas de lípidos y carbohidratos (Travi & Montoya, 1994; Cameron *et al.*, 1995; Black & Kondratieff, 2005; Pennington & Wells, 2005; Mann *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2010; Ready, 2013; Al-Mayali & Al-Hassani, 2016; Ibáñez-Bernal & Juárez, 2016).

Durante su búsqueda de sangre, cubren un radio que varía entre pocos a cientos de metros alrededor de su hábitat y se alimentan principalmente en la noche y en el ocaso (Sharma, 2008).

La selección del hospedero para la ingesta sanguínea depende de múltiples factores como el tamaño del hospedero, la cantidad de CO₂ exhalado, el aroma e incluso su comportamiento. Aunque los machos no se alimentan de sangre, desempeñan un papel importante en la selección del hospedero de sus contrapartes hematófagas, ya que producen una feromona que atrae a las hembras y facilita el apareamiento y la alimentación (Killick-Kendrick *et al.*, 1986; Quinell *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1996; Campbell-Lendrum *et al.*, 1999; 2000; Killick-Kendrick & Rioux, 2002; Bray & Hamilton, 2007; Rossi *et al.*, 2008; Mann *et al.*, 2009; Tripet *et al.*, 2009; Quaresma *et al.*, 2012; Ready, 2013).

El tipo de alimentación de las hembras es telmófaga, es decir, que utilizan su aparato bucal para cortar la piel y exponer capilares superficiales de los que succionan la sangre a través de un canal alimenticio central. La saliva es un componente importante durante la ingesta sanguínea, ya que contiene anticoagulantes (Apirasa), vasodilatadores (Maxilan, Fosfodiesterasa y Hialuronidasa), inmunomoduladores (Maxilan) y anestésicos (Adenosin deaminasa) (Black & Kondratieff, 2005).

Una vez alimentadas, la cantidad y composición de la sangre ingerida es fundamental en la producción de huevos, de manera que la sangre con mayor

contenido calórico brinda mayor energía potencial para la producción de huevos, sobrevivencia a la oviposición y capacidad de vuelo del insecto.

Leishmaniasis en México

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades zoonóticas desatendidas, las cuales son causadas por al menos 20 especies de protozoarios del género *Leishmania* y son transmitidas por las mordeduras de dípteros de la subfamilia Phlebotominae (WHO, 2010; Nieves *et al.*, 2011).

Se distribuyen en trópicos y subtrópicos de todo el mundo, por lo que son endémicas de 98 países, donde afectan a más de 12 millones de personas. Anualmente se reporta una incidencia de 1.6 millones de casos nuevos y una mortalidad de 50 mil personas aproximadamente, por lo que se estima que 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer alguna de estas enfermedades a nivel mundial y es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia (Albertos-Alpuche, 1990; Rosa *et al.*, 2006; WHO, 2010, 2017; Alvar *et al.*, 2012; Hoyos-López *et al.*, 2013; Maroli *et al.*, 2013; Cazorla *et al.*, 2014; Contreras-Gutiérrez *et al.*, 2014; González *et al.*, 2018).

Estas enfermedades se conocen en México desde la época prehispánica, sin embargo, fueron descritas por primera vez por Seidelin en 1912, quién nombró a la enfermedad como “ulcera del chiclero” debido a las lesiones típicas de leishmaniasis cutánea que padecían los trabajadores que participaban en la recolección de goma de chicle del árbol *Manilkara zapota* en el estado de Yucatán (López de Cogolludo, 1688; Rebollar-Téllez *et al.*, 1996; Pech-May *et al.*, 2010).

Actualmente, estas enfermedades se distribuyen principalmente en los estados de la zona neotropical del país (sur de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y parte de Yucatán), aunque existen reportes

de al menos un caso de leishmaniasis en 25 estados (Pech-May *et al.*, 2016; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Debido a que las poblaciones rurales son el grupo principal expuesto al contacto con los vectores, se estima que 16 millones de mexicanos se encuentran en riesgo a la transmisión de Leishmaniasis, no obstante, se calcula que únicamente se presentan 400 nuevos casos por año, predominantemente en varones adultos debido a cuestiones ocupacionales (Flisser, 2006; Maroli *et al.*, 2013; Ramsey *et al.*, 2013).

Existen cuatro manifestaciones clínicas: leishmaniasis mococutánea (LMC), leishmaniasis cutánea difusa (LCD), leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis visceral (LV), siendo las dos últimas las que provocan la mayor carga de enfermedad (LCL), y la más grave y de mayor patogenicidad (LV), respectivamente (Moo-Llanes *et al.*, 2013). El tipo de manifestación clínica depende del tropismo de la cepa de *Leishmania*, el estado inmunológico del vertebrado infectado y de otras variables relacionadas con el vector, con el hospedero y el medio ambiente (Rosa *et al.*, 2006).

Aunque en México se han observado todas las formas clínicas de la enfermedad, hasta el 98% de los casos corresponden a leishmaniasis cutánea localizada, la manifestación con mayor prevalencia y la cual se asocia a la infección por la especie *Leishmania mexicana*, al igual que la leishmaniasis cutánea difusa, manifestación de menor ocurrencia. Los casos de leishmaniasis mococutánea son asociados a la especie *Leishmania braziliensis* y los casos de leishmaniasis visceral son producidos por *Leishmania infantum* (Vera-Izaguirre *et al.*, 2006; Ramsey *et al.*, 2013; Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, 2015; Monroy-Ostria & Sánchez-Tejeda, 2017; Lozano-Sardaneta *et al.*, 2020).

Hospederos y reservorios de *Leishmania*

Un hospedero se define como un animal o planta que alberga y mantiene a otro organismo, en este caso a protozoarios del género *Leishmania* (Gosling, 2005), mientras que un reservorio, comúnmente es definido como un hospedero que alberga a un organismo patógeno o a un parásito, sin recibir daño por parte de este, y con la capacidad de servir como fuente de infección para otros hospederos (Dorland, 2012).

En el caso particular de *Leishmania*, los hospederos naturales son mamíferos de los órdenes Edentata (e.g. armadillo), Carnivora (e.g. gato), Rodentia (e.g. rata), Primates (e.g. humano), Marsupialia (e.g. zarigüeya) y Perissodactyla (e.g. caballo) (Ashford, 1996; Saliba & Oumeish, 1999; Gramiccia & Gradoni, 2005). En México se han realizado varios estudios que han permitido identificar a algunas especies que fungen como hospederos del protozoario (Tabla 1), principalmente especies de roedores como *Heteromys gaumeri*, *Heteromys desmarestianus*, *Reithrodontomys gracilis*, *Sigmodon hispidus* y *Oryzomys melanotis*, al marsupial *Marmosa mexicana* y al perro *Canis lupus familiaris*, además de que las especies endémicas *Otodylomys phyllotis* y *Peromyscus yucatanicus* han sido incriminadas como reservorios potenciales de *Leishmania mexicana* (Chable-Santos *et al.*, 1995; Van Wynsberghe *et al.*, 2000, 2009; Dantas-Torres, 2007; Berzunza-Cruz *et al.*, 2015).

En adición a estos hospederos, Berzunza-Cruz *et al.* (2015) identificó a 13 especies de murciélagos infectados con *Leishmania*, entre las cuales, las especies *Choeroniscus godmani*, *Glossophaga soricina* y *Glossophaga commissarisi* podrían ser incriminadas como reservorios probables debido a la alta tasa de infección registrada.

Berzunza-Cruz propone que las especies de hábitos frugívoros y nectarívoros están particularmente expuestas a la picadura de los flebotóminos debido a sus acercamientos con fines alimenticios a las plantaciones de “chico zapote” (*Manilkara zapota*, árbol del que se extrae la goma de chicle y que dio

su nombre a la enfermedad), las cuales proveen las condiciones ambientales idóneas para el desarrollo del ciclo de vida de estos dípteros.

Se considera que los reservorios de *Leishmania* son especies silvestres, principalmente roedores y cánidos silvestres, sin embargo, como parte del fenómeno de adaptación de los vectores a ambientes urbanos y el consecuente proceso de domesticación del ciclo zoonótico de transmisión de las leishmaniasis, los animales sinantrópicos y domésticos han asumido un importante papel como hospederos y reservorios de *Leishmania* (Danta-Torres, 2007; Torres-Guerrero *et al.*, 2017)

Particularmente, el perro (*Canis lupus familiaris*) ha sido considerado como reservorio de varias especies de *Leishmania* a través de múltiples estudios realizados en varios países, entre los que se incluyen Brasil (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Castro *et al.*, 2007) Italia (Rossi *et al.*, 2008), México (Esquinca *et al.*, 2005; Castrejón *et al.*, 2009; Rosete-Ortíz *et al.*, 2011), Portugal (Maia *et al.*, 2013) y Sudán (Dereure *et al.*, 2003), entre otros, por lo que se considera que tiene un papel muy importante en la transmisión de este protozooario a nivel global y tiene especial relevancia debido a la estrecha relación que tiene con el ser humano (Alvar *et al.*, 2004; Dantas-Torres, 2007; Castrejón *et al.*, 2009; Sant'Anna *et al.*, 2010).

Tabla 1. Registros de especies infectadas por *Leishmania* en México

Especie del vertebrado	Lugar de reporte	Especie de <i>Leishmania</i>	Referencia
<i>Artibeus jamaicensis</i> , <i>Artibeus lituratus</i> , <i>Carollia sowelli</i> , <i>Choeroniscus godmani</i> , <i>Dermanura phaeotis</i> , <i>Desmodus rotundus</i> , <i>Glossophaga commissarisi</i> ,	México	<i>Leishmania mexicana</i>	Berzunza-Cruz <i>et al.</i> , 2015

<i>Glossophaga soricina</i> , <i>Leptonycteris curasoae</i> , <i>Phyllostomus discolor</i> , <i>Pteronotus personatus</i> , <i>Sturnira lillium</i> y <i>Sturnira ludovici</i>			
<i>Otodylomys melanotis</i> , <i>Otodylomys phyllotis</i> , <i>Peromyscus</i> <i>yucatanicus</i> y <i>Sigmodon</i> <i>hispidus</i>	Campeche, México	<i>Leishmania mexicana</i>	Canto-Lara <i>et al.</i> , 1999
<i>Oryzomys melanotis</i> , <i>Otodylomys phyllotis</i> , <i>Peromyscus</i> <i>yucatanicus</i> y <i>Sigmodon</i> <i>hispidus</i>	Campeche, México	<i>Leishmania mexicana</i>	Chable-Santos <i>et</i> <i>al.</i> , 1995
<i>Canis lupus familiaris</i>	Chiapas, México	<i>Leishmania sp.</i>	Esquinca <i>et al.</i> , 2005
<i>Tamandua mexicana</i>	Tabasco, México	<i>Leishmania mexicana-</i> <i>amazonensis</i>	Muñoz-García <i>et</i> <i>al.</i> , 2019
<i>Canis lupus familiaris</i>	Guerrero, México	<i>Leishmania sp.</i>	Rosete-Ortíz <i>et al.</i> , 2011
<i>Oryzomys melanotis</i> , <i>Otodylomys phyllotis</i> , <i>Peromyscus</i> <i>yucatanicus</i> y <i>Sigmodon</i> <i>hispidus</i>	Campeche, México	<i>Leishmania mexicana</i>	Van Wynsberghe <i>et</i> <i>al.</i> , 2000
<i>Heteromys</i> <i>desmarestianus</i> , <i>Heteromys gaumeri</i> , <i>Marmosa mexicana</i> , <i>Oryzomys melanotis</i> , <i>Otodylomys phyllotis</i> , <i>Peromyscus</i>	Campeche, México	<i>Leishmania mexicana</i>	Van Wynsberghe <i>et</i> <i>al.</i> , 2009

<i>yucatanicus</i> , <i>Reinthrodonomys</i> <i>gracilis</i> y <i>Sigmodon</i> <i>hispidus</i>			
<i>Canis lupus familiaris</i>	México	<i>Leishmania mexicana</i>	Velasco <i>et al.</i> , 2009

Vectores de leishmaniasis en México

Hasta el momento, se han registrado 52 especies vivientes y 2 especies fósiles de flebotóminos en México, las cuales se agrupan en 10 géneros (*Brumptomyia*, *Micropygomyia*, *Lutzomyia*, *Pintomyia*, *Dampfomyia*, *Trichopygomyia*, *Psathyromyia*, *Bichromomyia*, *Psychodopygus* y *Nyssomyia*) (Ibáñez-Bernal *et al.*, 2017; Shimabukuro *et al.*, 2017; Galati, 2018). La presencia de flebotóminos ha sido reportada en 22 de los 36 estados, además de que los registros muestran que la riqueza de especies es mayor en sitios con clima tropical, por lo que la zona del sureste mexicano es donde existe mayor diversidad, siendo los estados con mayor riqueza Chiapas, Veracruz, Campeche y Quintana Roo (Sánchez-Tejeda *et al.*, 2001; Pech-May *et al.*, 2010, 2016; Moo-Llanes *et al.*, 2013).

A pesar de la diversidad de flebotóminos en el país, únicamente 4 especies han sido incriminadas como vectores de *Leishmania* en México, debido a que no todas las especies de flebotominos son capaces de transmitir al parásito o han sido comprobadas como vectores (Pech-May *et al.*, 2010; Armúa-Fernández & Venzal, 2019).

La primer especie en ser incriminada como vector de *Leishmania mexicana* fue *Bichromomyia olmeca olmeca* ya que se comprobó que flebotominos infectados naturalmente eran capaces de transmitir al parásito a hámsters y humanos; posteriormente las especies *Lutzomyia cruciata*, *Psychodopygus panamensis* y *Psathyromyia shannoni* fueron propuestas como vectores sospechosos en el sureste mexicano debido a su abundancia, área de

distribución, ritmo de picadura y las tasas de infección por *L. mexicana* (Biagi *et al.*, 1965; Pech-May *et al.*, 2010, 2016).

La amplia distribución de estas especies podría ayudar a explicar los casos de leishmaniasis que ocurren en zonas donde el vector *B. olmeca olmeca* no es prevalente, debido a que esta especie junto con *Psy. panamensis* se encuentran restringidas al sur del país, mientras que *L. cruciata* y *Psa. shannoni* están ampliamente distribuidas (Pech-May *et al.*, 2010, 2016; González *et al.*, 2011).

De manera adicional, la Secretaría de Salud de México y la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) también consideran como especies de importancia médica a las especies *Dampfomyia anthophora*, *Dampfomyia deleoni*, *Lutzomyia diabólica*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia longipalpis*, *Nissomyia ylephiletor*, *Pintomyia evansi* y *Pintomyia ovallesi* que, si bien no se han incriminado formalmente como vectores en México, se han encontrado naturalmente infectadas con *Leishmania* o son vectores confirmados del parásito en otros países (Pech-May *et al.*, 2010; Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, 2015; PAHO, 2016).

Fuentes alimenticias de flebotominos

Debido a la gran cantidad de especies que pueden transmitir *Leishmania*, se han realizado esfuerzos por identificar si existe alguna preferencia por parte de los flebotóminos al elegir un hospedero para alimentarse, principalmente en países y regiones donde se han registrado casos de leishmaniasis.

En trabajos previos (Anexo 1), se han identificado diversas especies como parte de la ingesta sanguínea de los flebotóminos, incluyendo al humano y a especies domésticas como burros (*Equus asinus*), caballos (*Equus caballus*), cerdos (*Sus scrofa domestica*), conejos (*Oryctolagus cuniculus*), gallinas (*Gallus gallus*), gatos (*Felis catus*), patos (*Anas platyrhynchos domesticus*), perros (*Canis lupus familiaris*) y vacas (*Bos taurus*), así como especies silvestres como

jabalís (*Sus scrofa*), lagartijas (*Anolis* sp.), mabuyas (*Mabuya* sp.), la marmosa de Robinson (*Marmosa robinsoni*) y el tamandúa norteño (*Tamandua mexicana*).

A pesar del amplio rango de hospederos de los que se alimentan los flebotómicos, existen hospederos que son mucho más recurrentes que otros, siendo el humano, el perro y la gallina los más reiterativos en múltiples estudios, por lo que algunos autores han propuesto que existe afinidad por parte de algunas especies de flebotómicos hacia un grupo de hospederos concreto, como ocurre con las especies *Nyssomyia intermedia* (Rangel *et al.*, 1992), *Pintomyia evansi* (Montoya-Lerma *et al.*, 1996), *Psychodopygus panamensis*, *Micropygomyia micropyga*, *Psathyromyia shannoni*, *Micropygomyia atroclavata* (Paternina *et al.*, 2015), *Lutzomyia cruciata* (Forattini, 1973), entre otras, las cuales son consideradas antropofílicas, o como a la especie *Lutzomyia longipapis*, la cual se considera tiene preferencia hacia aves (Sant'Anna *et al.*, 2008; Afonso *et al.*, 2012; Anaguano *et al.*, 2015).

Sin embargo, otros autores consideran que en realidad los flebotómicos son generalistas, y suelen alimentarse de un amplio rango de vertebrados, y la elección del hospedero está más relacionada con la disponibilidad de este. Esta característica ha permitido que los flebotómicos puedan adaptarse a ambientes urbanos y peridomiciliarios, ocasionando que los humanos sean fuentes alimenticias cada vez más comunes (Quinell *et al.*, 1992; Morrison *et al.*, 1993; Munstermann, 2005; Rossi *et al.*, 2008; Baum *et al.*, 2013).

Es de importancia resaltar que en gran parte de los estudios se encontraron mezclas de sangre de múltiples hospederos dentro del abdomen de una sola hembra, frecuentemente sangre de humano con algún otro vertebrado, como vaca, burro y gallinas. La ingesta de sangre de múltiples hospederos puede deberse a perturbaciones durante la alimentación del flebotómico, el cual buscará algún otro hospedero que se encuentre disponible para terminar su ingesta sanguínea (de Oliveira *et al.*, 2008; Marassá *et al.*, 2013; Paternina *et al.*, 2015).

Detección molecular de fuentes alimenticias

Se han utilizado diversos métodos serológicos para la identificación de fuentes alimenticias de flebotóminos, como el test de precipitado, test de aglutinación y ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), sin embargo, estas técnicas conllevan limitantes inherentes y no son tan eficientes como las herramientas moleculares, siendo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) una alternativa confiable, simple y con alta sensibilidad (Abbasi *et al.*, 2009; Maleki-Ravasan *et al.*, 2009; Baum *et al.*, 2013).

Esta técnica ha sido utilizada previamente en estudios de identificación de fuentes alimenticias en garrapatas (Pichon *et al.*, 2003; Estrada-Peña *et al.*, 2005), triatóminos (Bosseno *et al.*, 2006; Pizarro *et al.*, 2007) y en gran parte de los estudios contemporáneos en flebotóminos (Anexo 1).

A pesar de su alta eficacia, existen algunas limitantes que puedan complicar la identificación de vertebrados mediante el uso de PCR, como la baja cantidad de sangre ingerida por los flebotóminos (alrededor de 0.1 μ L) o la rápida digestión de esta, por lo que se ha sugerido que la detección se realice dentro de las 48 a 96 horas posteriores a la ingesta sanguínea (Sant'Anna *et al.*, 2008; Abbasi *et al.*, 2009).

Citocromo b (*cytB*)

Al momento, se han utilizado cuatro genes para la identificación molecular de fuentes sanguíneas en flebotóminos, el gen nuclear que codifica la prepronociceptina (PNOC), los genes mitocondriales rRNA 12S y 16S y el gen mitocondrial Citocromo b (*cyt b*) (Valinsky *et al.*, 2014).

Uno de los genes más utilizados para la identificación de especies de vertebrados es citocromo b (*cyt b*), una proteína bien caracterizada del complejo III del sistema mitocondrial de fosforilación oxidativa (Kent, 2009). Dicho gen ha

resultado de gran utilidad para análisis filogenéticos, investigaciones forenses y para la identificación de vertebrados dentro de algunas especies de mosquitos como *Culiseta melanura*, *Culiseta morsitans*, *Anopheles arabiensis*, *Anopheles funestus*, *Mansonia uniformis*, *Culex pipiens* (Ngo & Kramer, 2003; Kent & Norris, 2005; Molaei *et al.*, 2006)

En el caso de los flebotóminos, es el gen más usado para la identificación de ingestas sanguíneas, lo anterior, debido al alto número de copias que produce al ser un gen mitocondrial, a la gran cantidad de secuencias de vertebrados disponibles en GeneBank y a que tiene suficiente variación genética en el nivel de secuencia primaria entre taxones de vertebrados para una identificación confiable, por lo que ha sido utilizado efectivamente para diversas especies (Anexo 1) (Johns & Avise, 1998; Zehner *et al.*, 1998; Abbasi *et al.*, 2009; Maleki-Ravasan *et al.*, 2009)

Importancia de determinar las fuentes alimenticias

La identificación de fuentes alimenticias de flebotóminos es importante para generar un mayor conocimiento de los hábitos y comportamiento de las especies de flebotóminos presentes en México, así como la forma en que interactúan con otros animales.

El conocer a los vertebrados de los que se alimentan, ayudará a tener un panorama más claro de quienes pueden ser los partícipes en la transmisión de *Leishmania* en la zona de Veracruz, así como para incriminar vectores y reservorios, definir posibles riesgos y crear estrategias de control más efectivas.

Planteamiento del problema

Los flebotóminos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) son considerados dípteros de interés médico-veterinario debido a su capacidad de transmitir diversos patógenos. Esta característica, está estrechamente relacionada con las hembras, ya que en época reproductiva recurren a la ingesta sanguínea para la maduración de huevos, no obstante, el conocimiento sobre las preferencias alimenticias de estos dípteros es escaso a nivel mundial y en México es un tema que no se ha investigado hasta el momento.

Al identificar las fuentes alimenticias de flebotóminos, es posible inferir de forma indirecta que hospederos participan en el ciclo de vida de estos dípteros y cuales probablemente están involucrados en el ciclo de transmisión de *Leishmania*. Es por eso por lo que este trabajo tiene como objetivo identificar fuentes alimenticias en flebotóminos hembra que se distribuyen en la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”, Veracruz; así como determinar la diversidad de hospederos de los cuales se están alimentando.

Este hallazgo aportará información relevante que podría ser utilizada en el desarrollo de estrategias para el control de la Leishmaniasis en el país.

HIPÓTESIS

Debido a que los flebotóminos hembra requieren de ingesta sanguínea durante la época reproductiva para la maduración de huevos, al realizar la identificación molecular de dichas ingestas se podrá conocer cuáles son los recursos nutricionales de origen animal de los que se alimentan en la zona de la Reserva de Biología Tropical “Los Tuxtlas” y que contribuyen con su ciclo de vida.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Identificar las fuentes alimenticias en las hembras flebotomíneas en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz.

Objetivos particulares

- Identificar morfológicamente los flebotóminos hembra que, colectados en Los Tuxtlas, Veracruz.
- Realizar la detección molecular de las preferencias alimenticias utilizando el gen citocromo B a partir de muestras de ADN de flebotóminos.
- Identificar las especies de vertebrados de los cuales se alimentan con mayor frecuencia las hembras flebotomíneas en Los Tuxtlas, Veracruz.

METODOLOGÍA

Área de estudio

Este trabajo se realizó en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, localizada en el municipio de San Andrés Tuxtla, Veracruz, la cual está localizada a $95^{\circ} 04' - 95^{\circ} 09'$ longitud oeste y a $18^{\circ} 34' - 18^{\circ} 36'$ latitud norte (Figura 2), y tiene un rango altitudinal desde los 120 a los 650 msnm. La precipitación media anual es de 2000 a 3500 mm y la temperatura media anual varía entre los 22°C y los 26°C (Instituto de Biología, s.f.; SEFIPLAN, 2006).



Figura 2. Ubicación geográfica de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz. Imágenes tomadas de Google Earth.

El clima es cálido húmedo y subhúmedo con lluvias en verano, y tiene una marcada estacionalidad, siendo la temporada de lluvias de junio a febrero, y la temporada de secas de marzo a mayo. La vegetación es típicamente de bosque perennifolio, caracterizado por árboles entre 30 y 40 metros de altura, mientras que la fauna de la zona es muy diversa, especialmente en aves (565 especies) y mamíferos (139 especies) (Instituto de Biología, s.f.; González-Christen & Coates, 2018).

Colecta de flebotóminos

Se procesó el material colectado por el proyecto: “Análisis de la dinámica y prevalencia de tres zoonosis emergentes en mamíferos pequeños silvestres en condiciones ambientales contrastantes”, el cual estuvo a cargo el Dr. Víctor Manuel Guillermo Sánchez Cordero Dávila del Instituto de Biología, UNAM (IN209314).

Se realizaron un total de 10 colectas, de marzo del 2012 a mayo del 2013, usando trampas de luz CDC (Modelo 512). Los flebotóminos colectados se separaron del resto de los artrópodos atrapados usando microscopio estereoscópico, se colocaron de forma individual en viales de 1.5 ml con etanol al 70% y se refrigeraron a -20°C hasta su procesamiento.

Montaje e identificación de flebotóminos

Las hembras fueron procesadas de la siguiente manera: la cabeza, alas y los últimos segmentos del abdomen fueron separados y procesados para montaje, mientras que el tórax, las patas y los primeros segmentos del abdomen fueron separados y almacenados de forma individual en etanol al 70% para su uso molecular (PCR).

El montaje se realizó siguiendo la metodología propuesta por Ibáñez-Bernal (2005); a la cabeza, alas y abdomen se les retiró gradualmente el etanol al 70% y se colocaron en potasa (KOH) al 10%, en donde permanecieron por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiraron las estructuras de la potasa y se les realizaron varios lavados con agua hasta retirar completamente la potasa. Luego fueron deshidratados gradualmente en alcohol al 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100% durante 10 minutos en cada uno de ellos. Después, las estructuras se colocaron en esencia de clavo durante 12 horas y finalmente fueron montadas usando Euparal.

Identificación morfológica

La identificación morfológica se realizó utilizando la propuesta taxonómica de Galati (2003), con el apoyo en las claves taxonómicas de Young & Duncan (1994) e Ibáñez-Bernal (1999, 2005a, 2005b).

Extracción de ADN

La extracción del material genético se realizó a partir de los primeros segmentos del abdomen, mediante el uso de la resina Chelex-100 (García-González *et al.*, 2004).

A todas las muestras se les agregó 500 µl de una solución de resina Chelex-100 al 10% y, adicionalmente, se les colocó 15 µl de proteinasa K. Se incubaron a 55°C durante una hora y posteriormente se mantuvieron a 100°C durante 15 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y se almacenaron a -20°C durante al menos 24 horas. Antes de usar las muestras, se centrifugaron a 14 000 rpm durante 10 minutos.

Amplificación del gen Cyt-b mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la identificación de fuentes sanguíneas, se amplificó un fragmento del gen mitocondrial citocromo *b* de aproximadamente 300 pares de bases, mediante PCR, usando los oligonucleótidos específicos A (rep/amph) (5' – CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC – 3') y B (rep/amph) (5' – GCH GAY ACH WVH HYH GCH TTY TCH TC – 3', donde H=A,C o T, Y = C o T, y V = A,C o G) desarrollados por Cupp *et al.* (2004) y los cuales pueden amplificar ADN de reptil, anfibio, mamífero y ave (Kent, 2009; Hamer *et al.*, 2015).

La mezcla de reacción fue preparada a 25 μ l, esta contenía 12.5 μ L of GoTaq® Green Master Mix 2X Promega Corporation (Madison, WI, USA), 1 μ L de cada oligonucleótido (100 ng cada uno), 10 μ l de ADN (~50 ng), y 0.5 μ l agua libre de nucleasas. La reacción fue realizada en un termociclador modelo C1000 Thermal Cycler (BioRad Laboratories, US) bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido por 36 ciclos a 90°C durante 30 segundos, 56° C durante 40 segundos y 72°C durante 50 segundos, y una extensión final a 72°C durante 3 minutos.

Las muestras se agruparon en 63 pools, cada pool estaba conformado por tres ejemplares, aquellos que resultaron positivos fueron analizados individualmente. Se incluyó como control positivo ADN de bisonte para mamífero, ADN de gallina para ave y ADN de gecko para reptil, el control negativo solo contenía agua ultrapura.

Los productos de ADN obtenidos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y observados en un transiluminador UV ODYSSEY CLx Imaging System (LICOR Biosciences).

Todos los productos de PCR positivos fueron purificados y secuenciados en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, del Instituto de Biología, UNAM.

Secuenciación e identificación de muestras de sangre

Los electroferogramas obtenidos se visualizaron en el programa Chromas y GeneStudio™ Professional Edition Version 2.2.0.0 (GeneStudio, Inc., USA), para la edición de la secuencia. Cada secuencia editada fue comparada con todas las secuencias disponibles en el repositorio de NCBI usando la herramienta BLASTn (Basic Local Aligment Search Tool) para una confirmación preliminar de la identidad de cada secuencia.

Se realizó un análisis de similitud entre las especies de flebotóminos identificadas mediante el cálculo del índice de Jaccard, el cual expresa el grado en que dos muestras son semejantes por las especies presentes en ellas, en este caso, para conocer la semejanza de sus hábitos alimenticios. Para esto se generó una tabla donde se registraron la presencia de especie de hospedero por especie de flebotómico y a partir de esto se calculó el índice de similitud utilizando la formula $IJ: c / (a + b - c)$, donde “**a**” es el número de hospederos registrados en el flebotómico A, “**b**” es el número de hospederos registrados en el flebotómico B y “**c**” es el número de hospederos registrados en ambas especies de flebotóminos. Los resultados de este índice son valores entre 0, cuando no hay similitud, y 1, cuando dos muestras tienen la misma composición de especies.

Finalmente, se utilizó el programa Past versión 4.05 para realizar un cladograma con los datos obtenidos mediante el análisis de similitud de Jaccard, con el fin de visualizar de manera gráfica las similitudes de los hábitos hematófagos entre las especies de flebotóminos.

RESULTADOS

Identificación morfológica

Se montaron un total de 179 hembras pertenecientes a seis especies de la familia Phlebotominae, agrupadas en 4 géneros *sensu* Galati (2003), además de tres especímenes que no se pudo identificar debido a daños en las estructuras de importancia taxonómica (Tabla 2). Las especies más abundantes fueron *Psathyromyia aclydifera*, *Psathyromyia panamensis* y *Psathyromyia carpenteri*, las cuales representaron respectivamente el 45.81%, 25.59% y 20.67% de la colecta, mientras que las especies más raras fueron *Bichromomyia olmeca olmeca* y *Psathyromyia undulata*, cuyas colectas representan el 1.67% y el 0.55% respectivamente de la colecta total.

Tabla 2. Lista de especies de flebotominos colectadas en la Estación de Biología Los Tuxtlas.

Género	Especie	Número de ejemplares	Porcentaje
<i>Bichromomyia</i>	<i>olmeca olmeca</i>	3	1.67%
<i>Lutzomyia</i>	<i>cruciata</i>	7	3.91%
<i>Lutzomyia</i>	sp.	3	1.67%
<i>Psathyromyia</i>	<i>aclydifera</i>	82	45.81%
<i>Psathyromyia</i>	<i>carpenteri</i>	37	20.67%
<i>Psathyromyia</i>	<i>undulata</i>	1	0.55%
<i>Psychodopygus</i>	<i>panamensis</i>	46	25.69%
Total	6 especies	179	100%

Análisis de secuencias

Se logró realizar la detección de preferencias alimenticias de 13 ejemplares, pertenecientes a las especies *Psathyromyia aclydifera* (n=6), *Psathyromyia carpenteri* (n=2) y *Psychodopygus panamensis* (n=2), al igual que tres ejemplares que no pudieron ser identificados y se mantuvieron como *Lutzomyia* sp.

Fue posible identificar la presencia de aves, reptiles y mamíferos en las muestras analizadas, siendo los mamíferos los que se encontraron en mayor frecuencia, con un porcentaje del 76.92%. La especie de flebotómino *Psathyromyia aclydifera* fue la que presentó mayor diversidad de ingestas sanguíneas a lo largo del muestreo.

Las ingestas sanguíneas fueron identificadas mediante la herramienta BLAST, con la que se detectó homología entre las secuencias propias y secuencias de humano (*Homo sapiens*), gallina (*Gallus gallus*), perro (*Canis lupus familiaris*), gecko común (*Hemodactylus frenatus*) y murciélago lengüeton (*Glossophaga soricina*) (Tabla 3), siendo la especie que se detectó en mayor proporción el humano, con una prevalencia del 53.85% (7/13), seguido por el perro con una prevalencia del 15.38% (2/13), la gallina con 15.38% (2/13), y el gecko y el murciélago, con una prevalencia del 7.69% (1/13) para cada uno.

Tabla 3. Especies de vertebrados identificadas dentro de hembras flebotomíneas mediante la BLAST.

Muestra	Especie de flebotomino	Vertebrado	Número de acceso	E value	Identidad
3_CytB	<i>Psychodopygus panamensis</i>	<i>Homo sapiens</i>	DQ236097.1	2.00E-82	164/164(100%)
9_CytB	<i>Psathyromyia aclydifera</i>	<i>Canis lupus</i>	JX849653.1	1.00E-92	206/213(97%)
26_CytB	<i>Psathyromyia carpenteri</i>	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	3E-58	150/163(92%)
27_CytB	<i>Lutzomyia</i> sp.	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	2.00E-86	173/174(99%)
34_CytB	<i>Psathyromyia carpenteri</i>	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	4.00E-42	98/100(98%)
35_CytB	<i>Psychodopygus panamensis</i>	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	4E-89	196/202(97%)
37_CytB	<i>Lutzomyia</i> sp.	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	3.00E-81	164/165(99%)
39_CytB	<i>Psathyromyia aclydifera</i>	<i>Homo sapiens</i>	KP126150.1	7.00E-44	97/97(100%)
45_CytB	<i>Lutzomyia</i> sp.	<i>Canis lupus</i>	JX849653.1	2.00E-82	164/164(100%)
49_CytB	<i>Psathyromyia aclydifera</i>	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	2.00E-75	156/158(99%)
52_CytB	<i>Psathyromyia aclydifera</i>	<i>Hemidactylus frenatus</i>	GQ245970.2	2E-48	136/152(89%)
54_CytB	<i>Psathyromyia aclydifera</i>	<i>Glossophaga sorcina</i>	AF382865.1	1E-148	309/317(97%)
58_CytB	<i>Psathyromyia aclydifera</i>	<i>Homo sapiens</i>	AY289052.1	7.00E-75	157/160(98%)

A partir de estos resultados se cuantificó la cantidad de especies de hospederos relacionados a cada especie de flebotómico y se colocaron en la Tabla 4, donde 1 expresa la presencia del hospedero y 0 expresa su ausencia.

Tabla 4. Hospederos identificados por especie de flebotómico

	<i>P. aclydifera</i>	<i>P. carpenteri</i>	<i>P. panamensis</i>	<i>Lutzomyia</i> sp.
<i>Homo sapiens</i>	1	1	1	1
<i>Canis lupus familiaris</i>	1	0	0	1
<i>Gallus gallus</i>	0	1	1	0
<i>Hemodactylus frentaus</i>	1	0	0	0
<i>Glossophaga soricina</i>	1	0	0	0

Posteriormente se calculó la semejanza entre los hábitos de cada especie de flebotómico (Tabla 5). Las especies con mayor similitud fueron *P. carpenteri* y *P. panamensis*, con una similitud de 1 en las cuales se encontró que ambas se alimentaron de los mismos hospederos: humano y gallina.

Consecutivamente, *P. aclydifera* y *Lutzomyia* sp. obtuvieron una similitud de 0.4, ya que ambas se alimentaron de humano y perro, sin embargo, *P. aclydifera* se alimentó también de gecko y murciélago, especies que no fueron identificadas en algún otro flebotómico.

P. carpenteri y *P. panamensis* compartieron únicamente un hospedero (el humano) con *P. aclydifera*, con quien tuvieron una similitud de 0.2, como con *Lutzomyia* sp., con una similitud de 0.33.

Los resultados del análisis de similitud muestran que no hubo especies con cero similitudes, es decir, que todas las especies de flebotóminos colectados en el área comparten al menos un hospedero.

Tabla 5. Análisis de similitud de Jaccard de especies de flebotóminos de la Estación de Biología Tropical “Los Tuxtlas”.

	<i>P. aclydifera</i>	<i>P. carpenteri</i>	<i>P. panamensis</i>	<i>Lutzomyia</i> sp.
<i>P. aclydifera</i>	-	-	-	-
<i>P. carpenteri</i>	0.2	-	-	-
<i>P. panamensis</i>	0.2	1	-	-
<i>Lutzomyia</i> sp.	0.4	0.33	0.33	-

Con los datos de la tabla 5, se realizó un cladograma utilizando el software Past (Figura 3), donde se puede observar que las especies *P. carpenteri* y *P. panamensis* se agruparon con una similitud de 1, mientras que las especies *Lutzomyia* spp. y *P. aclydifera* se agruparon con una similitud de 0.4, y a su vez, la diferencia entre *Lutzomyia* spp. con *P. carpenteri* y *P. panamensis* es de 0.33.

De esta forma, es posible observar que los hábitos alimenticios de *P. carpenteri* y *P. panamensis* fueron iguales en este muestreo, y que las preferencias de *P. aclydifera* son más parecidas a las de otras especies de flebotóminos.

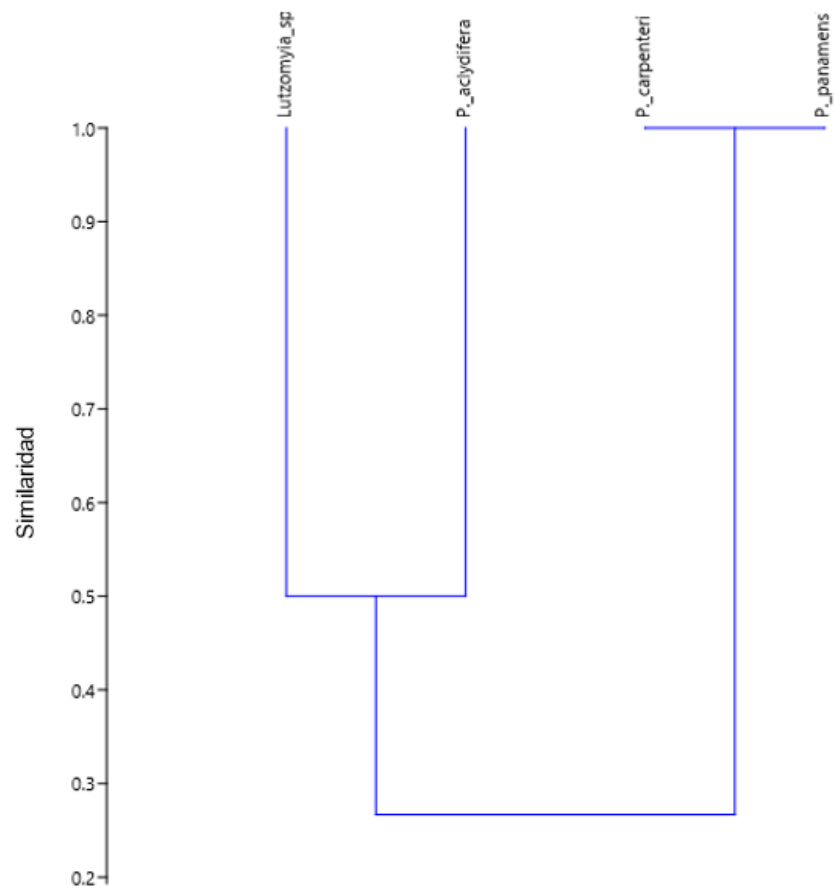


Figura 3. Cladograma del índice de similitud de Jaccard entre especies de flebotóminos con ingestas sanguíneas identificadas.

DISCUSIÓN

La identificación de las fuentes alimenticias de los flebotóminos es importante para conocer más a profundidad el ciclo de vida y el comportamiento de estos dípteros, y es necesaria para conocer la epidemiología de las enfermedades que pueden transmitir.

Se realizaron análisis moleculares para 179 organismos, de los cuales únicamente se recuperaron 13 resultados positivos durante la detección de preferencias alimenticias, lo que corresponde al 7.26% de las muestras totales.

El bajo número de muestras positivas puede deberse a múltiples factores, como la falta de alimentación, la poca cantidad de sangre ingerida por el flebotómico, por los procesos digestivos que pueden desnaturalizar el ADN del vertebrado, o una baja cantidad de ADN amplificada durante la PCR, la cual difícilmente es detectable en los geles y no es sensible durante la secuenciación (Buongiorno, 2003; Kent, 2005; Abbasi *et al.*, 2009).

En este estudio se identificaron cinco especies de vertebrados (Humano, Gallina, Gecko, Murciélago y Perro) como fuente alimenticia para las especies de flebotóminos *Lutzomyia* sp., *Psathyromyia aclydifera*, *Psathyromyia carpenteri* y *Psychodopygus panamensis* en Los Tuxtlas, Veracruz.

Se detectó sangre de humano en las cuatro especies de flebotóminos identificadas, las ingestas sanguíneas de perro corresponden a *Psathyromyia aclydifera* y *Lutzomyia* sp., la gallina corresponde a *Psathyromyia carpenteri* y *Psychodopygus panamensis*, mientras que el murciélago y el gecko se detectaron en *Psathyromyia aclydifera*.

Psathyromyia aclydifera fue la especie más abundante y con mayor diversidad de hospederos, ya que se alimentó de humano, perro, gecko y murciélago, además, le corresponden tres de las siete ingestas sanguíneas humanas detectadas en el estudio. A pesar de esto, la especie no se considera antropofílica (Ibáñez-Bernal, 2001; Gómez *et al.*, 2014) y parece tener tendencias

generalistas, sin embargo, es una especie que no ha sido estudiada a profundidad y se han realizado pocos esfuerzos en conocer sus hábitos alimenticios a pesar de que se ha encontrado infectada naturalmente con *Leishmania* en Panamá (Christensen *et al.*, 1972) y más recientemente, en México (Lozano-Sardaneta *et al.*, 2020).

Dentro de los vertebrados detectados, el perro (*Canis lupus familiaris*) es señalado como un hospedero habitual y ha sido identificado como fuente alimenticia en diversos estudios (Anexo 1), sin embargo, algunos autores han sugerido que los perros son menos atractivos para los flebotómicos que otras fuentes potenciales de sangre como ganado, cerdo y burros (Marassá *et al.*, 2013; Paternina, 2016).

Es importante mencionar que este cánido ha sido encontrado naturalmente infectado por diversas especies de *Leishmania* en todo el mundo y es considerado en la literatura como un importante reservorio del protozoario debido a la cercanía al ser humano (Ashford, 1996, Courtney *et al.*, 2002; Dantas-Torres, 2007). Sin embargo, el papel del perro doméstico como reservorio ha sido cuestionado debido a que algunos autores consideran la incriminación de este mamífero puede ser circunstancial, y que el rol del perro corresponde a un hospedero accidental y no a un reservorio (Castro *et al.*, 2007; Dantas-Torres, 2007).

La detección de este vertebrado puede ser resultado de perros pertenecientes a las comunidades rurales que se adentran a la zona boscosa y son mordidos por flebotómicos, o existe la posibilidad de que sean los flebotómicos quienes se aproximen a los perros para su alimentación. La detección de sangre de perro en *Psathyromyia aclydifera* puede implicar que existe una situación de riesgo para la población local.

Otro de los hospederos identificados es *Hemidactylus frenatus* (gecko común), una especie exótica que habita en bosques tropicales y subtropicales, y que también es considerada una especie sinantrópica, al tener una gran capacidad de adaptación para habitar en ambientes antropizados, por lo que es

posible que el flebotómico se haya alimentado de este reptil dentro o fuera de la Estación.

De igual manera, se encontró ADN perteneciente al murciélago *Glossophaga soricina*, el cual está ampliamente distribuido en todo el país y es principalmente palinófago y frugívoro. El área aledaña a la Estación de Biología es un bosque perennifolio, el cual está compuesto por especies arbóreas que proveen frutas que alimentan y atraen a murciélagos y que, además, proveen las condiciones ambientales idóneas para que los flebotómicos puedan vivir y reproducirse, por lo que la interacción entre el díptero y el quiróptero es muy propensa a ocurrir, en especial al atardecer, cuando ambos son más activos.

Berzunza-Cruz *et al.* (2015) realizó un estudio para determinar la infección por *Leishmania mexicana* en murciélagos de 6 estados de la República Mexicana, donde identificó a 13 especies de quirópteros infectados, entre ellos a *Glossophaga soricina*, la cual tuvo una alta prevalencia de individuos infectados y se designó como un reservorio potencial. De igual manera, en un estudio llevado a cabo en Brasil, Savani *et al.* (2010) detectó mediante PCR la infección de *Leishmania chagasi* y *Leishmania amazonensis* en *Glossophaga soricina* y en otras 9 especies de murciélago.

La detección de murciélago en este estudio revela la interacción entre murciélagos y flebotómicos en Veracruz, por lo que se sugiere realizar estudios que permitan conocer más a fondo esta relación, así como la importancia de *Psathyromyia aclydifera* como vector y la de *Glossophaga soricina* como reservorio de *Leishmania mexicana*.

Por otro lado, tenemos a la especie de flebotómico *Psychodopygus panamensis*, la cual fue encontrada con sangre de humano y gallina. Esta especie es considerada altamente antropofílica (Fairchild & Hertig, 1959), sin embargo, estudios realizados en Ecuador (Palacios, 2015) y Colombia (González *et al.*, 2018) atribuyen a *Psychodopygus panamensis* un comportamiento generalista, ya que se reportó que se alimenta de diversos vertebrados, como

aves (Gallinas) y varias especies de mamíferos, incluyendo al humano; lo cual se asemeja a los resultados obtenidos en este trabajo.

La presencia de la sangre de estos hospederos en este flebotómico nos hace pensar que esta especie puede participar directamente en el ciclo de transmisión de *Leishmania* en el área, considerando que *Psychodopygus panamensis* es un vector confirmado en Guatemala, Venezuela y México, y se considera vector sospechoso en Honduras, Nicaragua y Panamá (Maroli *et al.*, 2013; Pech-May *et al.*, 2016).

Es importante remarcar que la gallina (*Gallus gallus*) ha sido reportada frecuentemente como fuente alimenticia de diversas especies de flebotómicos, principalmente en zonas rurales y semiurbanas, (Sant-Anna *et al.*, 2008; Afonso *et al.*, 2012).

El papel de las gallinas en la epidemiología de las leishmaniasis es interesante; por un lado, las aves constituyen una fuente alimenticia atractiva, y se ha reportado que el refugio de las gallinas domésticas puede proveer sitios de crianza ideales para los flebotómicos, logrando un crecimiento poblacional de estos y, en consecuencia, haciendo más probable la interacción humano-flebotómico (zoopotenciación) (Valderrama, 2011; de Ávila *et al.*, 2018; González *et al.*, 2018). Por otro lado, debido a sus características fisiológicas, las aves son un grupo refractario a la infección por *Leishmania*, y pueden promover un efecto de dilución, logrando que en las zonas donde los flebotómicos se alimenten de ellas haya una baja prevalencia del parásito en mamíferos y en otros flebotómicos (zooprofilaxis) (Sant'Anna *et al.*, 2010; González 2018).

Saul (2003) llegó a la conclusión de que el nivel de riesgo de mortalidad vectorial mientras se busca alimento, determinado por la proximidad de los hospederos al sitio de cría de los mosquitos es crítico para determinar si existe zooprofilaxis o zoopotenciación.

Adicionalmente, Sant'Anna *et al* (2010) aseveró que, a pesar de que las aves no desarrollan la infección por *Leishmania* debido a factores fisiológicos, su

sangre no impide el desarrollo del parásito en los flebotóminos e incluso propicia una mayor producción de promastigotes metacíclicos (la forma infectiva del protozooario) en comparación con la sangre de mamífero, por lo que la alimentación flebotomínea de sangre de gallina no constituye una protección contra la enfermedad, ya que puede promover el desarrollo de una mayor cantidad de parásitos en el vector, aumentando el potencial de transmisión.

Gallus gallus fue identificada también en el flebotómicono *Psathyromyia carpenteri*, del cual no se conocen con certeza sus preferencias alimenticias y si tiene algún papel en la transmisión de *Leishmania*. Este díptero no se considera antropofílico y es comúnmente encontrado cerca de madrigueras de armadillos (Williams, 1970; Ibáñez-Bernal *et al.*, 2015; Vivero *et al.*, 2017) Adicionalmente, se reportó infectado con *Leishmania infantum* en el estado de Veracruz (Lozano-Sardaneta *et al.*, 2020).

Finalmente, se lograron identificar dos muestras de ingestas sanguíneas correspondientes a humano y una correspondiente a perro, las cuales pertenecen a las hembras flebotomíneas que no pudieron ser identificadas taxonómicamente.

Uno de los resultados de mayor relevancia en este estudio es la alta prevalencia de sangre humana identificada en las hembras flebotomíneas, pues se encontró presente en 7 de las 13 muestras identificadas y en las cuatro especies de flebotóminos, a pesar de que únicamente *Psychodopygus panamensis* es considerada antropofílica. Esto se puede atribuir a la presencia humana en el área de la Estación de Biología Los Tuxtlas, además de la presencia de algunas casas en la zona aledaña. Asimismo, se sabe que los flebotóminos se pueden mover hacia zonas peridomiciliarias para su alimentación y posteriormente regresar a sus sitios de reposo, permitiendo que se alimenten de humano, animales domésticos y vertebrados silvestres (Lainson & Rangel, 2005).

La aparente preferencia hacia el humano se puede atribuir a la disponibilidad de vertebrados presentes en la zona, así como al tamaño corporal

de estos, de manera que el humano, al tener mayor masa corporal, es más propenso a actuar como fuente alimenticia para los flebotominos (Deane, 1956; Quinell et al., 1992).

Es probable también que la recurrencia del humano como fuente alimenticia se deba al comportamiento de estos insectos, ya que es conocido que estos tienden a alimentarse en agregaciones e incluso “invitan” a otras hembras a alimentarse en el mismo sitio a través de una feromona producida en los palpos maxilares (Schlein *et al.*, 1984). La alimentación cooperativa brinda diversos beneficios para los flebotóminos, como un menor gasto de saliva, una mayor fecundidad y un menor tiempo de alimentación (Tripet *et al.*, 2009). De esta forma, es posible que una gran cantidad de los flebotóminos colectados en un mismo sitio, se hayan alimentado de un mismo hospedero.

La detección del humano como fuente alimenticia de flebotóminos es de relevancia, ya que constituye un precedente en caso de que fuera necesario incriminar a alguna de estas especies como posibles vectores de *Leishmania* en México, considerando que uno de los cinco criterios de incriminación es observar o identificar que el flebotómino se alimente de humanos (Killick-Kendrick, 1999).

Independientemente del origen de la sangre humana, es notable que esta constituye la mayoría de las muestras identificadas, por lo que se puede determinar que hay una propensión hacia el ser humano, aunque los flebotóminos se alimentarán de otros vertebrados si es oportuno.

Cazorla (2014) realizó un estudio para determinar patrones de coocurrencia y conducta alimenticia de flebotóminos en Venezuela, donde encontró que las estructuras de los gremios (“antropofílicas” y “zoofílicas”) no son significativamente diferentes y menciona que las preferencias de una hembra flebotomínea hacia un hospedero en particular pudiera interpretarse como un evento heterogéneo, circunstancial y oportunista, donde las densidades de los flebotóminos y de los hospederos vertebrados juegan un papel más fundamental.

Es importante realizar mayores estudios para conocer a fondo las conductas alimenticias de los flebotóminos mexicanos y si en realidad existe alguna preferencia antropofílica que pueda estar relacionada en la transmisión de enfermedades vectoriales.

Actualmente, tenemos acceso a tecnologías de secuenciación de nueva generación, como el metabarcoding, que puede ser una alternativa apta para la identificación de muestras sanguíneas en mosquitos, permitiendo la identificación de múltiples insectos a la vez, así como la correcta detección e identificación de ADN de distintos vertebrados en una muestra sanguínea (Batovska *et al.*, 2018; Estrada-Franco *et al.*, 2020)

Aunque esta técnica cuenta con sus propias limitaciones, su uso es prometedor para la elaboración de análisis ecológicos más complejos, la detección de ADN en muestras ambientales y, más particularmente, para incrementar el conocimiento de los mosquitos, sus hábitos alimenticios y los patógenos presentes en ellos (Taberlet *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

En este estudio se identificaron y procesaron 179 ejemplares de flebotóminos provenientes de la región de los Tuxtlas, Veracruz; los cuales pertenecen a 6 especies de 4 géneros distintos, además de 3 ejemplares que no se lograron identificar taxonómicamente y se registraron como *Lutzomyia* sp.

Las especies identificadas fueron *Bichromomyia olmeca olmeca*, *Lutzomyia cruciata*, *Lutzomyia* sp., *Psathyromyia aclydifera*, *Psathyromyia carpenteri*, *Psathyromyia undulata* y *Psathyromyia panamensis*, siendo las especies más abundantes *P. aclydifera*, *P. panamensis* y *P. carpenteri*. Dentro de las especies colectadas, *B. olmeca olmeca*, *L. cruciata* y *P. panamensis* han sido incriminadas como vectores de *Leishmania* en el país.

Los ejemplares fueron procesados para la amplificación e identificación de vertebrados mediante PCR, utilizando el gen mitocondrial Citocromo *b*; de los cuales se identificaron el 7.26% de las muestras y se encontró al humano como la fuente alimenticia con mayor recurrencia en este estudio, seguido por el perro y gallina, además, se registró la presencia de sangre gecko y murciélago.

La variedad de hospederos identificados es interesante, ya que aporta conocimientos de los hábitos alimenticios de los flebotóminos, de sus relaciones ecológicas y nos deja entrever la existencia de conductas oportunistas de alimentación.

Aunque en este estudio se obtuvo una alta prevalencia del humano como fuente alimenticia, esta se puede atribuir a la cercanía de comunidades y de la Estación de Biología Tropical con el sitio de muestreo, sin embargo, es imperativo realizar estudios posteriores para determinar si esta conducta es meramente oportunista o si existe una afinidad hacia el humano.

De manera independiente a la conducta flebotomínea, este hallazgo tiene importancia médica y ecológica, y debe ser considerado para la incriminación

futura de vectores o para la creación de medidas preventivas y de control de enfermedades vectoriales.

ANEXOS

Anexo 1. Estudios de identificación de fuentes alimenticias de flebotóminos.

Especie del vertebrado		Especie del flebotómico	Método de detección	País	Referencia
Nombre científico	Nombre común				
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	<i>Nyssomyia trapidoi</i>	PCR	Ecuador	Anaguano <i>et al.</i> , 2015*
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro				
<i>Bos taurus</i>	Vaca				
Especie no especificada	Ave	<i>Nissomyia intermedia</i>	Test de precipitado	Brasil	Baum <i>et al.</i> , 2013*
<i>Equus caballus</i>	Caballo				
<i>Felis catus</i>	Gato doméstico				
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro				
Especie no especificada	Roedor				
Especie no especificada	Tlacuache				
<i>Bos taurus</i>	Vaca				
Especie no identificada	Ave	<i>Phlebotomus mascitti</i> , <i>Phlebotomus patasi</i> , <i>Phlebotomus perfilliewi</i> y <i>Phlebotomus perniciosus</i>	ELISA	Italia	Bongiorno <i>et al.</i> , 2003
Especie no identificada	Borrego				
Especie no identificada	Equino				
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro				
Especie no especificada	Ave	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	ELISA	Brasil	de Oliveira <i>et al.</i> , 2008*
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro				
<i>Sus scrofa domestica</i>	Cerdo				

<i>Cantorchilus leucotis</i>	Cucarachero	<i>Lutzomyia gomezi</i> , <i>Micropygomyia cayennensis</i> , <i>Micropygomyia trinidadensis</i> , <i>Pintomyia evansi</i> y <i>Psychodopygus panamensis</i>	PCR (citocromo b)	Colombia	González <i>et al.</i> , 2018
<i>Gallus gallus</i>	Gallina				
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
<i>Marmosa robinsoni</i>	Marmosa de Robinson				
<i>Anas platyrhynchos domesticus</i>	Pato doméstico				
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro				
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	<i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>Phlebotomus sergenti</i> y <i>Sergentomyia minuta</i> .	PCR (citocromo b)	Portugal	Maia <i>et al.</i> , 2013*
<i>Felis catus</i>	Gato doméstico				
Especie no especificada	Lagartija				
Especie no especificada	Roedor				
<i>Homo sapiens</i>	Humano	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	PCR-RFLP (citocromo b) y ELISA	Irán	Maleki <i>et al.</i> , 2009*
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro				
<i>Bos taurus</i>	Vaca				
Especie no especificada	Bovino	<i>Nyssomyia intermedia</i> y <i>Nyssomyia neivai</i>	ELISA	Brasil	Marassá <i>et al.</i> , 2013*
<i>Equus caballus</i>	Caballo				
<i>Sus scrofa domestica</i>	Cerdo				
<i>Gallus gallus</i>	Gallina				
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro				
<i>Equus asinus</i>	Asno	<i>Lutzomyia gomezi</i> , <i>Micropygomyia atroclavata</i> , <i>Micropygomyia cayennensis</i>	PCR (citocromo b)	Colombia	Paternina <i>et al.</i> , 2015
<i>Equus caballus</i>	Caballo				
<i>Gallus gallus</i>	Gallina				

<i>Homo sapiens</i>	Humano	<i>cayennensis</i> , <i>Micropygomyia</i> <i>micropyga</i> , <i>Micropygomyia</i> <i>trinidadensis</i> , <i>Pintomyia evansi</i> , <i>Psathyromyia</i> <i>shannoni</i> y <i>Psychodopygus</i> <i>panamensis</i>			
<i>Sus scrofa</i>	Jabalí				
<i>Anolis</i> sp.	Lagartija				
<i>Mabuya</i> sp.	Mabuya				
<i>Proechimys guyanensis</i>	Rata espinosa				
<i>Tamandua mexicana</i>	Tamandúa norteño				
<i>Bos Taurus</i>	Vaca				
Especie no especificada	Ave	<i>Psychodopygus lloydi</i>	PCR-RFLP (citocromo b)	Brasil	Quaresma <i>et al.</i> , 2012*
Especie no especificada	Marsupial				
Especie no especificada	Roedor				
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	<i>Phlebotomus</i> <i>perniciosus</i>	ELISA	Italia	Rossi <i>et al.</i> , 2008*
<i>Gallus gallus</i>	Gallina				
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
Especie no especificada	Borrego				
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro				
<i>Gallus gallus</i>	Gallina	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	PCR (citocromo b)	Brasil	Sant'Anna <i>et al.</i> , 2008*
<i>Homo sapiens</i>	Humano				
Especie no especificada	Borrego	<i>Phlebotomus alexandri</i> <i>Phlebotomus</i> <i>bergeroti</i> , <i>Phlebotomus</i> <i>duboscqi</i> , <i>Phlebotomus lesleyae</i> ,	PCR-RFLP (citocromo b y COI) y ELISA	Etiopía	Yared <i>et al.</i> , 2019*
<i>Equus africanus asinus</i>	Burro				
Especie no especificada	Camello				

<i>Gallus gallus</i>	Gallina	<i>Phlebotomus orientalis,</i>			
<i>Homo sapiens</i>	Humano	<i>Phlebotomus papatasi,</i>			
<i>Canis lupus familiaris</i>	Perro	<i>Sergentomyia africana,</i>			
<i>Bos taurus</i>	Vaca	<i>Sergentomyia bedfordi,</i>			
		<i>Sergentomyia clydei,</i>			
		<i>Sergentomyia schwetzi</i>			

REFERENCIAS

1. Abbasi, I., Cunio, R., & Warburg, A. (2009). Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using cytochrome b PCR and reverse line blotting. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 9(1), 79–86. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0064>
2. Afonso, M. M., Duarte, R., Miranda, J. C., Caranha, L., & Rangel, E. F. (2012). Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Journal of tropical medicine*, 2012, 858657. <https://doi.org/10.1155/2012/858657>
3. Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
4. Al-Mayali, H. M. H., & Al-Hassani, M. K. K. (2016). Morphological Descriptive Study of Phlebotominae Species (Diptera: Psychodidae) in Eastern Al-Hamza District/Al-Diwaniya City. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 5(9), 667-674. doi:10.20546/ijcmas.2016.509.077
5. Albertos-Alpuche, N. E. (1990). Vectores de la Leishmaniasis cutánea en México. *Rev Biomed*, 1(2).
6. Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*, 57, 1–88. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)
7. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., & WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

8. Anaguano, D. F., Ponce, P., Baldeón, M. E., Santander, S., & Cevallos, V. (2015). Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta tropica*, 152, 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.09.004>
9. Armúa-Fernández, M. T., & Venzal, J. M. (2019). Leishmaniosis: breve puesta al día. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 29-36. doi: 10.29155/VET.55.211.5
10. Ashford R. W. (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clinics in dermatology*, 14(5), 523–532. [https://doi.org/10.1016/0738-081x\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0738-081x(96)00041-7)
11. Batovska, J., Lynch, S. E., Cogan, N., Brown, K., Darbro, J. M., Kho, E. A., & Blacket, M. J. (2018). Effective mosquito and arbovirus surveillance using metabarcoding. *Molecular ecology resources*, 18(1), 32–40. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12682>
12. Baum, M., Ribeiro, M. C., Lorosa, E. S., Damasio, G. A., & Castro, E. A. (2013). Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, state of Paraná, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(5), 560–565. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0157-2013>
13. Berzunza-Cruz, M., Rodríguez-Moreno, Á., Gutiérrez-Granados, G., González-Salazar, C., Stephens, C. R., Hidalgo-Mihart, M., Marina, C. F., Rebollar-Téllez, E. A., Bailón-Martínez, D., Balcells, C. D., Ibarra-Cerdeña, C. N., Sánchez-Cordero, V., & Becker, I. (2015). *Leishmania* (L.) *mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(1), e0003438. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003438>
14. Biagi, F. F., De Biagi, A. M., & Beltrán, F. (1965). *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmisor natural de *Leishmania mexicana*. *Prensa Med Mex*, 30, 267-272.

15. Black, W. & Kondratieff, B. (2005) Evolution of Arthropod Disease Vectors en Marquardt, W. (Ed), *Biology of Vector-Borne Diseases* (pp. 9-24). Academic Press.
16. Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., & Maroli, M. (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta tropica*, 88(2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(03\)00190-6](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(03)00190-6)
17. Bosseno, M. F., García, L. S., Baunaure, F., Gastelúm, E. M., Gutierrez, M. S., Kasten, F. L., Dumonteil, E., & Brenière, S. F. (2006). Identification in triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74(2), 303–305.
18. Bray, D. P., & Hamilton, J. G. (2007). Host odor synergizes attraction of virgin female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 44(5), 779–787. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[779:hosaov\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[779:hosaov]2.0.co;2)
19. Cameron, M. M., Pessoa, F. A., Vasconcelos, A. W., & Ward, R. D. (1995). Sugar meal sources for the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medical and veterinary entomology*, 9(3), 263–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1995.tb00132.x>
20. Campbell-Lendrum, D. H., Pinto, M. C., Brandão-Filho, S. P., de Souza, A. A., Ready, P. D., & Davies, C. R. (1999). Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). *Medical and veterinary entomology*, 13(3), 299–309. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1999.00174.x>
21. Campbell-Lendrum, D. H., Brandão-Filho, S. P., Pinto, M. C., Vexenat, A., Ready, P. D., & Davies, C. R. (2000). Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. *Bulletin of entomological research*, 90(1), 41–48.

22. Castrejón, O. V., Rivas Sánchez, B., Saldaña, A. M., & Hobart, O. (2009). Leishmaniasis cutánea de perros en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(4), 135-140.
23. Castro, E. A., Thomaz-Soccol, V., Augur, C., & Luz, E. (2007). *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis in the State of Paraná (Brazil). *Experimental parasitology*, 117(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.03.003>
24. Cazorla, D. J., Nieves, E., & Morales, P. (2014). Patrones de coocurrencia y conducta alimentaria a escala local de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) del estado Falcón, Venezuela. *Revista peruana de biología*, 21(1), 099-104. doi: [10.15381/rpb.v21i1.8253](https://doi.org/10.15381/rpb.v21i1.8253)
25. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (2015) *Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis*. Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector, Secretaría de Salud.
26. Chable-Santos, J. B., Van Wynsberghe, N. R., Canto-Lara, S. B., & Andrade-Narvaez, F. J. (1995). Isolation of *Leishmania* (L.) *mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state of Campeche, Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 53(2), 141–145. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.141>
27. Contreras, M. A., Hoyos, R., Mondragón, K., Cadena, H., Vivero, R., Acosta, L. A., Valencia, A., Rocha, R. L. & Torres C. (2010) Entomología en Vélez, I. D. & Robledo, S. M. (Ed), Manual de diagnóstico y control de la leishmaniasis en Centroamérica (pp 47-71). Universidad de Antioquia.
28. Contreras-Gutiérrez, M. A., Vélez, I. D., Porter, C., & Uribe, S. I. (2014). Lista actualizada de flebotómíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) de la región cafetera colombiana [An updated checklist of Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from the

- Colombian Andean coffee-growing region]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 34(3), 483–498. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572014000300017>
29. Cortés, L. A., & Fernández, J. J. (2008). Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia [Species of *Lutzomyia* involved in an urban focus of visceral and cutaneous leishmaniasis]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 28(3), 433–440.
30. Courtenay, O., Quinell, R. J., Garcez, L. M., Shaw, J. J., & Dye, C. (2002). Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *The Journal of infectious diseases*, 186(9), 1314–1320. <https://doi.org/10.1086/344312>
31. Dantas-Torres, F., & Brandão-Filho, S. P. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 48(3), 151–156. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652006000300007>
32. Dantas-Torres F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Veterinary parasitology*, 149(3-4), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>
33. de Ávila, M. M., Brilhante, A. F., de Souza, C. F., Bevilacqua, P. D., Galati, E., & Brazil, R. P. (2018). Ecology, feeding and natural infection by *Leishmania* spp. of phlebotomine sand flies in an area of high incidence of American tegumentary leishmaniasis in the municipality of Rio Branco, Acre, Brazil. *Parasites & vectors*, 11(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2641-y>
34. de Oliveira, A. G., Marassá, A. M., Consales, C. A., Dorval, M. E., Fernandes, C. E., de Oliveira, G. R., Brazil, R. P., & Galati, E. A. (2008). Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta*

- tropica*, 107(3), 238–241.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.002>
35. Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P. E., & Peyrefitte, C. (2010). Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(10), 19507.
36. Deane, L. M. (1956) Leishmaniose Visceral no Brasil. *Estudos sobre Reservatorios e Transmissores Realizados no Estado do Ceará*. Serviço Nacional do Educação Sanitaria. Rio de Janeiro.
37. Dereure, J., El-Safi, S. H., Bucheton, B., Boni, M., Kheir, M. M., Davoust, B., Pratlong, F., Feugier, E., Lambert, M., Dessein, A., & Dedet, J. P. (2003). Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes and infection*, 5(12), 1103–1108. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.07.003>
38. Dorland, N. W. (2012). *Dorland's illustrated medical dictionary*. 32nd. Ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders
39. Esquinca, R. R., Hernández, C. H. G., & Guevara, Á. (2005). Encuesta rápida de Leishmaniasis visceral en caninos en un área endémica en Chiapas. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 6(8), 1-7.
40. *Estación de biología Los Tuxtlas* (s.f.)
http://www.ibiologia.unam.mx/informe/sintesis_2003_2011/LOSTUXTLA_S_sintesis.pdf
41. Estrada-Franco, J. G., Fernández-Santos, N. A., Adebisi, A. A., López-López, M. J., Aguilar-Durán, J. A., Hernández-Triana, L. M., Prosser, S., Hebert, P., Fooks, A. R., Hamer, G. L., Xue, L., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2020). Vertebrate-Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus (Diptera)-arbovirus transmission networks: Non-human feeding revealed by meta-barcoding and next-generation sequencing. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(12), e0008867. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008867>

42. Estrada-Peña, A., Osácar, J. J., Pichon, B., & Gray, J. S. (2005). Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Experimental & applied acarology*, 37(3-4), 257–268. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-3271-6>
43. Fairchild, G. B., & Theodor, O. (1971). On *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) and L. Olmeca (Vargas and Diaz-Najera) (Diptera: Psychodidae). *Journal of medical entomology*, 8(2), 153–159. <https://doi.org/10.1093/jmedent/8.2.153>
44. Flisser, A. (2006). *Aprendizaje de la Parasitología: basado en problemas*. 1ª ed. ETM.
45. Forattini, O. P. (1973). *Entomologia médica: 4º volume: psychodidae. phlebotominae. leishmanioses. Bartonelose*. Vol. 4. Editora da Universidade de Sao Paulo.
46. Galati, E. A. B. (2014). Bioecologia e identificação de Phlebotominae Recuperado el 15 de Noviembre de 2019 de http://www.fsp.usp.br/egalati/ApostilaPhlebotominae_2014_vol_I.pdf
47. Galati, E. A. (2018). Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classification, morphology and terminology of adults and identification of American taxa. In *Brazilian sand flies* (pp. 9-212). Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-75544-1_2
48. Galati, E.A.B. (2018) Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): classification, morphology and terminology of adults and identification of american taxa en Rangel, E.F., Shaw, J.J. (Eds.), *Brazilian Sand flies*. Springer International Publishing, Cham, pp. 9–212. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_2.
49. González-Christen, A., & Coates, R. (2018). Los mamíferos no voladores de la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 90. 1-15. 10.22201/ib.20078706e.2019.90.2580.

50. González, C., Rebollar-Téllez, E. A., Ibáñez-Bernal, S., Becker-Fauser, I., Martínez-Meyer, E., Peterson, A. T., & Sánchez-Cordero, V. (2011). Current knowledge of *Leishmania* vectors in Mexico: how geographic distributions of species relate to transmission areas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(5), 839–846. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0452>
51. González, C., León, C., Paz, A., López, M., Molina, G., Toro, D., Ortiz, M., Cordovez, J. M., Atencia, M. C., Aguilera, G., & Tovar, C. (2018). Diversity patterns, *Leishmania* DNA detection, and bloodmeal identification of Phlebotominae sand flies in villages in northern Colombia. *PloS one*, 13(1), e0190686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190686>
52. Gosling, P. J. (2005). *Dictionary of parasitology*. CRC press.
53. Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International journal for parasitology*, 35(11-12), 1169–1180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>
54. Hoyos-López, R., Vivero-Gomez, R. J., Contreras, M. A., & Soto, S. U. (2013). Phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae) on a rural area from Santa Fe de Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 51-55.
55. Ibáñez-Bernal, S. (2000) *Los Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México*. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México] https://repositorio.unam.mx/contenidos/los-phlebotominae-diptera-psychodidae-de-mexico-100072?c=mqGqqj&d=false&q=*&i=6&v=1&t=search_0&as=0
56. Ibáñez-Bernal, S. (2005a). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. V.-Clave ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia* França. *Folia Entomologica Mexicana*, 44(1), 49-66.

57. Ibáñez-Bernal, S. (2005b). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia* França. *Folia Entomologica Mexicana*, 44(2), 195-212.
58. Ibáñez-Bernal, S., & Juárez, L. A. I. (2016). Notes on Phlebotomine sand flies of Michoacán, Mexico, with a key. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (NS)*, 32(1).
59. Ibáñez-Bernal, S., García-Torres, C. R., & Vásquez-Márquez, M. (2017). *Micropygomyia (Coquillettimyia) nahua* sp. nov., a new Phlebotominae sand fly from Mexico (Diptera, Psychodidae). *Zootaxa*, 4347(1), 169–180. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4347.1.10>
60. Instituto de biología (s.f.)
<http://www.ibiologia.unam.mx/tuxtlas/localizacion/aspectos/centro.htm>
61. Johns, G. C., & Avise, J. C. (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular biology and evolution*, 15(11), 1481–1490. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875>
62. Kelly, D. W., Mustafa, Z., & Dye, C. (1996). Density-dependent feeding success in a field population of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Animal Ecology*, 517-527. doi:10.2307/5786
63. Kent, R. J., & Norris, D. E. (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(2), 336–342.
64. Kent R. J. (2009). Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Molecular ecology resources*, 9(1), 4–18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02469.x>
65. Killick-Kendrick, R., Wilkes, T. J., Bailly, M., Bailly, I., & Righton, L. A. (1986). Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine

- sandfly. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(1), 138–142. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90213-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90213-0)
66. Killick-Kendrick R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology*, 17(3), 279–289. [https://doi.org/10.1016/s0738-081x\(99\)00046-2](https://doi.org/10.1016/s0738-081x(99)00046-2)
67. Killick-Kendrick, R., & Rioux, J. A. (2002). Mark-release-recapture of sand flies fed on leishmanial dogs: the natural life-cycle of *Leishmania infantum* in *Phlebotomus ariasi*. *Parassitologia*, 44(1-2), 67–71.
68. Lainson, R., & Rangel, E. F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 811-827.
69. Lainson, R., & Shaw, J. J. (1968). Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis--incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the Lower Amazonian Basin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(3), 385–395. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(68\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(68)90090-4)
70. Llano, E. G., Maidana, H. R., Cabrera, W. R., Báez, A. D., & Meyer, S. N. (2014). Características del cibario y órganos genitales internos en la identificación de *Lutzomyia longipalpis* hembra. *Revista veterinaria*, 25(1), 61-63.
71. López de Cogolludo, D. (1688). Historia de Yucatán, Mérida. Edición original. Reeditado por la Universidad de Yucatán, 1978.
72. Lozano-Sardaneta, Y. N., Sánchez-Montes, S., Sánchez-Cordero, V., Becker, I., & Paternina, L. E. (2020). Molecular detection of *Leishmania infantum* in sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) from Veracruz, Mexico. *Acta tropica*, 207, 105492. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105492>
73. Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M. O., Neto, L., Cristóvão, J. M., & Campino, L. (2013). *Leishmania* infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European

- area, the Algarve Region in Portugal. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 481–487. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276108042013014>
74. Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., & Mohtarami, F. (2009). Blood Meal Identification in Field-Captured Sand flies: Comparison of PCR-RFLP and ELISA Assays. *Iranian journal of arthropod-borne diseases*, 3(1), 8–18.
75. Mann, R. S., Kaufman, P. E., & Butler, J. F. (2009). *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) response to olfactory attractant- and light emitting diode-modified Mosquito Magnet X (MM-X) traps. *Journal of medical entomology*, 46(5), 1052–1061. <https://doi.org/10.1603/033.046.0512>
76. Marassá, A. M., Galati, E. A., Bergamaschi, D. P., & Consales, C. A. (2013). Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(5), 547–554. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0168-2013>
77. Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, 27(2), 123–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>
78. Molaei, G., Oliver, J., Andreadis, T. G., Armstrong, P. M., & Howard, J. J. (2006). Molecular identification of blood-meal sources in *Culiseta melanura* and *Culiseta morsitans* from an endemic focus of eastern equine encephalitis virus in New York. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(6), 1140–1147.
79. Monroy-Ostria, A., & Sanchez-Tejeda, G. (2017). Survey of cutaneous leishmaniasis in Mexico: *Leishmania* species, clinical expressions and risk factors. *The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis*, InTech: London, United Kingdom. <http://dx.doi.org/10.5772/65501>, 153-165. doi: 10.5772/65501

80. Montoya-Lerma, J., & Lane, R. P. (1996). Factors affecting host preference of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Bulletin of Entomological Research*, 86(1), 43-50. doi: 10.1017/S0007485300052184
81. Moo-Llanes, D., Ibarra-Cerdeña, C. N., Rebollar-Téllez, E. A., Ibáñez-Bernal, S., González, C., & Ramsey, J. M. (2013). Current and future niche of North and Central American sand flies (Diptera: psychodidae) in climate change scenarios. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(9), e2421. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002421>
82. Morrison, A. C., Ferro, C., Morales, A., Tesh, R. B., & Wilson, M. L. (1993). Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of medical entomology*, 30(2), 427–435. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.2.427>
83. Munstermann, L. E. (2005) Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae en Marquardt, W. (Ed), *Biology of Vector-Borne Diseases* (pp. 141-152). Academic Press
84. Muñoz-García, C. I., Sánchez-Montes, S., Villanueva-García, C., Romero-Callejas, E., Díaz-López, H. M., Gordillo-Chávez, E. J., Martínez-Carrasco, C., Berriatua, E., & Rendón-Franco, E. (2019). The role of sloths and anteaters as *Leishmania* spp. reservoirs: a review and a newly described natural infection of *Leishmania mexicana* in the northern anteater. *Parasitology research*, 118(4), 1095–1101. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06253-6>
85. Ngo, K. A., & Kramer, L. D. (2003). Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. *Journal of medical entomology*, 40(2), 215–222. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.215>
86. Nieves, E., Oliveros, J. L., & Rondon, M. (2011). Impacto de *Leishmania amazonensis* y la Sangre de Ave en el Potencial Biológico y Fecundidad

- de *Lutzomyia migonei* y *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae). *EntomoBrasilis*, 4(1), 20-25.
87. Palacios-Cevallos, E. L. (2015) *Identificación molecular de las preferencias tróficas de flebótomos colectados en 5 provincias ecuatorianas* [Tesis] <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/4556>
88. Pan American Health Organization (2016) *Leishmaniasis cutaneous and mucosal*.
http://www.panaftosa.org/leish/inf2016_en/INFO_MEX_ENGLISH_2016.pdf
89. Pan American Health Organization (2017) *Neglected infectious diseases: Leishmaniasis*. www.paho.org/leishmaniasis
90. Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., Romero-Ricardo, L., Pérez-Doria, A., Paternina-Gómez, M., Martínez, L., & Bejarano, E. E. (2016). Evidence for anthropophily in five species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from northern Colombia, revealed by molecular identification of bloodmeals. *Acta tropica*, 153, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.005>
91. Pech-May, A., Escobedo-Ortegón, F. J., Berzunza-Cruz, M., & Rebollar-Téllez, E. A. (2010). Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Medical and veterinary entomology*, 24(2), 150–161. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00870.x>
92. Pech-May, A., Peraza-Herrera, G., Moo-Llanes, D. A., Escobedo-Ortegón, J., Berzunza-Cruz, M., Becker-Fauser, I., Montes DE Oca-Aguilar, A. C., & Rebollar-Téllez, E. A. (2016). Assessing the importance of four sandfly species (Diptera: Psychodidae) as vectors of *Leishmania mexicana* in Campeche, Mexico. *Medical and veterinary entomology*, 30(3), 310–320. <https://doi.org/10.1111/mve.12169>

93. Pennington, J. & Wells, M. A. (2005) The adult midgut: structure and function en Marquardt, W. (Ed), *Biology of Vector-Borne Diseases* (pp. 289-296). Academic Press
94. Pichon, B., Egan, D., Rogers, M., & Gray, J. (2003). Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 40(5), 723–731. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.5.723>
95. Pizarro, J. C., Lucero, D., & Stevens, L. (2007). A method for the identification of guinea pig blood meal in the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*. *Kinetoplastid biology and disease*, 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-6-1>
96. Quaresma, P. F., Carvalho, G. M., Ramos, M. C., & Andrade Filho, J. D. (2012). Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 480–485. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000400007>
97. Quinnell, R. J., Dye, C., & Shaw, J. J. (1992). Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Medical and veterinary entomology*, 6(3), 195–200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1992.tb00606.x>
98. Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915–1934. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991156>
99. Ramsey, J. M., Moo-Llanes, D. A., Danis-Lozano, R., Pinto-Castillo, J. F., Ibarra-Cerdeña, C. N., & CasasMartinez, M. (2013). *Peligro de exposición actual y futuro para Dengue, Chagas, leishmaniasis y Paludismo en México*. México: CONACyT / SEMARNAT-0108158. http://www.pincc.unam.mx/congresonacional2013/documentos_descargas/PDF/Anfi/RamseyJM%20.pdf

100. Rangel, E. F., Barbosa, A. F., Andrade, C. A., Sousa, N. A., & Wermelinger, E. D. (1992). Development of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis vianna*, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) under experimental conditions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(2), 235–238. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761992000200011>
101. Ready, P. D., Lainson, R., & Shaw, J. J. (1984). Habitat and seasonality of *Psychodopygus wellcomei* help incriminate it as a vector of *Leishmania braziliensis* in Amazônia and northeast Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(4), 543–544. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(84\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90079-8)
102. Ready P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual review of entomology*, 58, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
103. Rebollar-Téllez, E. A., Ramírez-Fraire, A., & Andrade-Narvaez, F. J. (1996). A two years study on vectors of cutaneous Leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission cycle in the state of Campeche, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(5), 555–560. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761996000500004>
104. Roldán, J. E., Burga, A. M., Vergara, C. A., Casanova, M. & Padilla, C. (2007). Distribución geográfica y diversidad de vectores naturales e incriminados en la transmisión de *Leishmania* y *Bartonella* en la provincia de Sánchez Carrión. Serie informes técnicos No. 2. Ministerio de Salud
105. Rosa, J. R., Stein, M., Willener, J., Salomón, O. D., & Gorodner, J. O. (2006). Presencia de *Lutzomyia* (Diptera; Psychodidae; Phlebotominae) en un área de transmisión de Leishmaniasis Tegumentaria (LT) en la ciudad de Resistencia, Chaco, Argentina. Resultados preliminares.
106. Rosete-Ortíz, D., del Socorro Berzunza-Cruz, M., Salaiza-Suazo, N. L., González, C., Treviño-Garza, N., Ruiz-Remigio, A., Gudiño-Zayas, M. E., Beltrán-Silva, S., Romero-Zamora, J. L., Ugarte-Soto, A., Rivas-Sánchez,

- B. & Becker, I. (2011). Canine leishmaniasis in Mexico: the detection of a new focus of canine leishmaniasis in the state of Guerrero correlates with an increase of human cases. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 68(2), 88-93.
107. Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., & Maroli, M. (2008). Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta tropica*, 105(2), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.10.005>
108. Saliba, E. K., & Oumeish, O. Y. (1999). Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. *Clinics in dermatology*, 17(3), 275–277. [https://doi.org/10.1016/s0738-081x\(99\)00045-0](https://doi.org/10.1016/s0738-081x(99)00045-0)
109. Sanchez-Tejeda, G., Rodríguez, N., Parra, C. I., Hernandez-Montes, O., Barker, D. C., & Monroy-Ostria, A. (2001). Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania braziliensis* complex in Nayarit, State of Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(1), 15–19. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000100002>
110. Sant'Anna, M. R., Jones, N. G., Hindley, J. A., Mendes-Sousa, A. F., Dillon, R. J., Cavalcante, R. R., Alexander, B., & Bates, P. A. (2008). Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta tropica*, 107(3), 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.003>
111. Sant'anna, M. R., Nascimento, A., Alexander, B., Dilger, E., Cavalcante, R. R., Diaz-Albiter, H. M., Bates, P. A., & Dillon, R. J. (2010). Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasites & vectors*, 3(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-3>
112. Saul, A. (2003). Zooprophyllaxis or zoopotential: the outcome of introducing animals on vector transmission is highly dependent on the mosquito mortality while searching. *Malaria Journal*, 2(1), 1-18.

113. Savani, E. S., de Almeida, M. F., de Oliveira Camargo, M. C., D'Auria, S. R., Silva, M. M., de Oliveira, M. L., & Sacramento, D. (2010). Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. *Veterinary parasitology*, 168(1-2), 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.019>
114. Schlein, Y., Yuval, B., & Warburg, A. (1984). Aggregation pheromone released from the palps of feeding female *Phlebotomus papatasi* (Psychodidae). *Journal of insect physiology*, 30(2), 153-156.
115. Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of vector borne diseases*, 45(4), 255–272. (Retraction published J Vector Borne Dis. 2012 Mar;49(1):54)
116. Shimabukuro, P., de Andrade, A. J., & Galati, E. (2017). Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. *ZooKeys*, (660), 67–106. <https://doi.org/10.3897/zookeys.660.10508>
117. Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 21(8), 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
118. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
119. Travi, B. & Montoya, J. (1994) Manual de entomología médica para investigadores de America Latina. Cali, Colombia. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas fundación CIDEIM. 280 páginas.
120. Tripet, F., Clegg, S., Elnaiem, D. E., & Ward, R. D. (2009). Cooperative blood-feeding and the function and implications of feeding aggregations in the sand fly, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *PLoS*

- neglected tropical diseases*, 3(8), e503.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000503>
121. Valderrama, A., Tavares, M. G., & Andrade Filho, J. D. (2011). Anthropogenic influence on the distribution, abundance and diversity of sandfly species (Diptera: Phlebotominae: Psychodidae), vectors of cutaneous leishmaniasis in Panama. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8), 1024–1031. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000800021>
 122. Valinsky, L., Ettinger, G., Bar-Gal, G. K., & Orshan, L. (2014). Molecular identification of bloodmeals from sand flies and mosquitoes collected in Israel. *Journal of medical entomology*, 51(3), 678–685. <https://doi.org/10.1603/me13125>
 123. Van Wynsberghe, N. R., Canto-Lara, S. B., Damián-Centeno, A. G., Itzá-Ortiz, M. F., & Andrade-Narváez, F. J. (2000). Retention of *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* in naturally infected rodents from the State of Campeche, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(5), 595–600. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000500001>
 124. Van Wynsberghe, N. R., Canto-Lara, S. B., Sosa-Bibiano, E. I., Rivero-Cárdenas, N. A., & Andrade-Narváez, F. J. (2009). Comparison of small mammal prevalence of *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* in five foci of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, Mexico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(2), 87–94. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652009000200006>
 125. Vera-Izaguirre, D. S., Vega-Memije, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Arenas, R. (2006). Leishmaniasis. A review. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 4(4), 252-260.
 126. WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases. Meeting, & World Health Organization. (2010). *Control of the Leishmaniases: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010* (Vol. 949). World Health Organization.

127. WHO (2017) Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. Le point sur la situation mondiale de la leishmaniose, 2006-2015: un tournant dans la surveillance de la maladie. *Releve epidemiologique hebdomadaire*, 92(38), 557–565.
128. Williams P. (1970). Phlebotomine sandflies and leishmaniasis in British Honduras (Belize). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(3), 317–368. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(70\)90171-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(70)90171-9)
129. Yared, S., Gebresilassie, A., Abbasi, I., Aklilu, E., Kirstein, O. D., Balkew, M., Brown, A. S., Clouse, R. M., Warburg, A., Hailu, A., & Gebre-Michael, T. (2019). A molecular analysis of sand fly blood meals in a visceral leishmaniasis endemic region of northwestern Ethiopia reveals a complex host-vector system. *Heliyon*, 5(7), e02132. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02132>
130. Young, D. G., & Duncan, M. (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae) Gainesville: Associated Publishers American Entomological Institute.
131. Zehner, R., Zimmermann, S., & Mebs, D. (1998). RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *International journal of legal medicine*, 111(6), 323–327. <https://doi.org/10.1007/s004140050180>