

UNIVERSIDAD EVANGÉLICA DE EL SALVADOR
ESCUELA DE POS-GRADOS



UNIVERSIDAD EVANGÉLICA
DE EL SALVADOR

INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN EPIDEMIOLOGÍA

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* TRANSMISOR DE
LEISHMANIASIS CUTÁNEA, REGIÓN ORIENTAL, EL SALVADOR JUNIO - JULIO
2022

PRESENTADO POR:

Elizabeth Melany Murillo Torres

Jaime Enrique Cruz Cortez

Luis Ovidio López Vega

ASESORES:

Dr. Mauricio Antonio Abarca Rivera

Dra. Andrea Joyce

SAN SALVADOR, NOVIEMBRE 2022

ÍNDICE

Contenido	
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
A. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA.....	4
B. ENUNCIADO DEL PROBLEMA.....	7
C. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
D. CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
E. JUSTIFICACIÓN.....	8
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEORICA	10
A. ESTADIO ACTUAL DE LA ENFERMEDAD DE LEISHMANIASIS.....	10
LA POBREZA COMO FACTOR DE RIESGO DE LA LEISHMANIASIS.....	10
CLASIFICACIÓN DE LA LEISHMANIASIS.....	11
Leishmaniasis cutánea.....	11
Leishmaniasis cutánea difusa.....	11
Leishmaniasis mucosa.....	12
Leishmaniasis visceral.....	12
GENERALIDADES DEL VECTOR.....	13
CICLO DE VIDA.....	13
EPIDEMIOLOGÍA.....	15
PREVENCIÓN Y CONTROL.....	15
GENÉTICA DE POBLACIONES.....	16
ESTUDIOS GENÉTICOS.....	16
FACTORES QUE DETERMINAN LA ESTRUCTURA GENÉTICA.....	17
Deriva Genética.....	17
Selección natural.....	17
Mutación.....	17
Flujo genético.....	18
B. ANTECEDENTES.....	18
C. HIPOTESIS.....	20
CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	21

A. ENFOQUE Y TIPO DE INVESTIGACIÓN	21
B. SUJETOS Y OBJETO DE ESTUDIO	21
I Unidades de análisis, población y muestra	21
II. Variables e indicadores	23
C. TÉCNICAS MATERIALES E INSTRUMENTOS.....	24
Técnica y procedimiento para la recopilación de la información	24
D. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	25
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LA INFORMACION	27
A. RESULTADOS	27
DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA	27
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS HAPLOTIPOS.....	29
HISTORIA DEMOGRÁFICA	31
ESTRUCTURA GENÉTICA MEDIANTE ANÁLISIS DE VARIACIÓN MOLECULAR (AMOVA)	31
ÍNDICE DE FIJACIÓN FST.....	32
AISLAMIENTO POR DISTANCIA	33
B. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	34
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
CONCLUSIONES	37
RECOMENDACIONES	38
FUENTES DE INFORMACIÓN CONSULTADAS.....	39
ANEXOS.....	47

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios por obsequiarnos el don de la vida y con ellos el de adquirir nuevos conocimientos a través del aprendizaje que día a día se forja en las entrañas de nuestra Universidad Evangélica de El Salvador. Así mismo agradecer a nuestras familias por su comprensión y apoyo en el proceso de nuestra formación, a cada uno de nuestros docentes que lograron transmitir sus conocimientos en cada una de sus materias impartidas, a nuestros asesores que nos guiaron paso a paso para sacar el máximo de cada uno de nosotros, no queremos dejar pasar esta oportunidad sin mencionar al equipo de Vectores de la Región Oriental de Salud, Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) Licda. Ana Pérez, Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología MsC. Miguel Ángel Moreno por equipo y materiales y a la Universidad de Merced de California, a la PhD. Andrea Lee Joyce, por su respaldo, por confiar en nuestras capacidades y apoyarnos en nuestra investigación final.

RESUMEN

La investigación se realizó en 11 municipios de la Región Oriental de El Salvador en los meses de junio y julio del 2022. El objetivo de la investigación fue determinar la variabilidad genética de *Lutzomyia longipalpis* transmisor de leishmaniasis cutánea en Región Oriental en El Salvador constituyendo el primer estudio y registro de la genética de este vector transmisor de la Leishmaniasis cutánea en nuestro país.

Para el estudio se colectó el vector en diferentes áreas de la Región Oriental, se analizaron un total de 355 muestras de las cuales 57 fueron *Lutzomyia longipalpis*, se realizó la extracción del ADN genómico de cada individuo y se llevó a cabo el procedimiento de ADN mitocondrial y verificar su amplificación por PCR, posteriormente se realizó la secuenciación de los fragmentos amplificados y el análisis de los datos mediante programas informáticos específicos.

Las 57 secuencias de los 11 municipios revelaron una baja variabilidad genética entre las poblaciones y una alta variabilidad dentro de las poblaciones por lo que las poblaciones presentan un elevado flujo genético y esto se confirma con los valores del índice de fijación F_{ST} , muestran claramente que las poblaciones son bastantes homogéneas genéticamente.

En este sentido, el valor negativo de Tajima encontrado y los bajos valores de F_{ST} también confirman la presencia de flujo genético entre las poblaciones. Por lo anterior, se concluye que las poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* estudiadas presentan baja variabilidad genética y un alto flujo genético en las poblaciones.

Palabras Claves: *Lutzomyia longipalpis*, Diversidad genética, Estructura genética.

INTRODUCCIÓN

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias encerradas en un círculo de enfermedades desatendidas en las Américas, las leishmaniasis constituyen un problema de salud pública debido a su morbimortalidad y amplia distribución geográfica (1) principalmente en los países con climas tropicales.

La información epidemiológica disponible indica que la infección por leishmaniasis cutánea constituye un problema importante de salud pública, no obstante, se carecen de estudios específicos con respecto a la variabilidad genética de este vector en el oriente de El Salvador.

El uso de marcadores moleculares permite determinar el grado de variación y diferenciación genética que existe dentro y entre poblaciones. El análisis de la secuencia de genes mitocondriales es actualmente una herramienta poderosa en la sistemática molecular y su aplicación en estudios de especiación y de poblaciones de insectos es cada vez más frecuente (2). La ventaja del ADN mitocondrial como un marcador molecular, es que tiene una relativamente rápida tasa de mutación, proporcionando facilidad en la detección de haplotipos (variantes en la secuencia de ADN) así como en la variación intraespecífica.

Los cambios observados a nivel de comportamiento están inducidos por cambios a nivel genético y en el ambiente, a nivel molecular se han respondido preguntas que aportan al entendimiento del comportamiento vectorial, la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, la historia demográfica y su procedencia migratoria.

La investigación se realizó mediante fase de campo enfocada en la obtención de las muestras, así mismo se llevó a cabo la fase de laboratorio donde se realizó la identificación taxonómica, los procedimientos de extracción de ADN, el proceso de ADN mitocondrial y verificar la amplificación por PCR, posteriormente se realizó la secuenciación de los fragmentos amplificados y el análisis de los datos mediante programas informáticos específicos.

El presente estudio aporta elementos para la comprensión de la variabilidad genética y los procesos evolutivos involucrados en las colonizaciones de *Lutzomyia longipalpis* en El Salvador, las cuales poseen un interés biológico y sanitario intrínseco fundamental para predecir y mitigar epidemias futuras. Por lo tanto, es necesaria comprensión de los factores genéticos que inducen esta cualidad, para ello se empleó la variabilidad genética en 11 poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* en el Oriente de El Salvador, con la técnica código de barras o 'barcode', usando para ello el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa1.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA

A nivel mundial se estima que la leishmaniasis es prevalente en 98 países y hay transmisión en los cinco continentes. Estudios recientes revelan que la leishmaniasis produce una carga de enfermedad de 2,35 millones de AVAD (años de vida perdidos ajustados por discapacidad), de los cuales 2,3% recaen en el continente americano. Su complejo ciclo de transmisión comprende diferentes especies de parásitos, reservorios y vectores que afectan principalmente a las personas más pobres y con mayor dificultad de acceso a los servicios de salud (3).

En el mundo, se estima que cada año se producen entre 0,9 a 1,6 millones de nuevos casos de leishmaniasis, y entre 20.000 y 30.000 defunciones. La leishmaniasis cutánea se registra en 20 países, siendo endémica en 18 de ellos (Colombia, Costa Rica, Brasil, Argentina, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Perú, Paraguay, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Panamá, Guyana, Surinam, Guatemala, Guyana Francesa y México) (4).

En El Salvador la principal especie de leishmania es la *Lutzomyia Longipalpis* (5). Sin embargo, el país cuenta con las condiciones ambientales y sociales para la proliferación de las otras especies de flebótomo. A principios del siglo XX, se registraron los primeros casos de leishmaniasis (5). Entre 2011 y 2018 se han reportado un total de 243 casos, la mayoría en la zona occidente y oriente del país; de estos, 84 fueron reportados como sospechosos y 159 fueron confirmados (6).

En el 2020 la incidencia de casos en la zona oriental es de 92% del total de los casos y para el 2021 el 95% de casos nuevos de Leishmaniasis cutánea se concentran siempre en los departamentos del oriente del El Salvador (6).

Este tipo de enfermedad se denomina desatendidas u olvidadas porque comparten dos características esenciales: primero, que han sido objeto de desatención, desde el nivel local, nacional, o internacional, lo que se manifiesta en la falta de recursos (financieros, técnicos y humanos) otorgados para su abordaje y control, y segundo, que se asocian fuertemente a la pobreza y marginalidad (1).

En el mundo, la coinfección de *Leishmania* y VIH ha aumentado la carga de la enfermedad debido a la mayor dificultad del tratamiento clínico. El diagnóstico de la enfermedad es esencial para establecer un tratamiento específico y para limitar el progreso de la enfermedad, aliviar los signos y síntomas, y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Si no se tratan, las formas mucosa y cutánea pueden causar deformidad y la desfiguración, y la forma visceral puede ocasionar la muerte en más del 90% de los casos no tratados.

La *Lutzomyia longipalpis* se ha convertido en unos de los vectores más importantes en la transmisión de enfermedades, una razón del aumento de su distribución pueden ser los cambios que están asociados a problemas socioeconómicos, como el desplazamiento, que aumentan la migración de personas enfermas o reservorios desde las áreas rurales endémicas a las urbanas, en donde, junto con la presencia o aparición simultánea del vector, la enfermedad puede propagarse fácilmente. La aparición del vector en estas nuevas áreas urbanas puede deberse a cambios en el ambiente, como factores climáticos o ecológicos que facilitan su colonización (7,8).

Los estudios de estructuración genética de las poblaciones de Phlebotominae en áreas endémicas son epidemiológicamente relevantes ya que muestran cómo estas especies o sus linajes difieren en importancia como vectores de leishmaniasis (9,10,11).

La técnica RAPD se puede utilizar para determinar el nivel de variabilidad genética en flebotomos (12,13), así mismo la variabilidad intra e interpoblacional (14,15,16). Estudios isoenzimáticos estiman las relaciones genéticas entre *Lutzomyia longipalpis* encontrando diferencias genéticas que tienen una relación directa con la distancia geográfica y que el modelo de "aislamiento por distancia"

explica la distribución de las poblaciones (17). En El Salvador se implementan acciones utilizando ciertos métodos para la prevención y control del vector, métodos de fumigación con equipo pesado ULV y aplicación de rociado residual (18). A pesar de ser una enfermedad con relevancia epidemiológica se carecen de estudios específicos con respecto a la variabilidad genética de este vector en el oriente de El Salvador.

Por lo cual debemos tomar en cuenta que muchos desconocen la existencia de esta enfermedad en sus localidades correspondientes. En el país esta enfermedad se incluye como una enfermedad desatendida y fácilmente mal diagnosticada por sus lesiones ya que se pueden confundir con diferentes lesiones de la piel.

FACTIBILIDAD DE LA INVESTIGACIÓN

Con relación a la factibilidad de la investigación es importante mencionar, con relación a los recursos, se usó algunos ya disponibles en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud como el microscopio, estereoscopio y los químicos para poder clarificar las muestras que sirvieron para la determinación taxonómica del vector.

Las visitas de campo fueron financiadas con fondos propios, teniendo en cuenta que la erogación de fondos fue de forma pausada, los investigadores no incurrieron en gastos de hotel o habitación en ninguno de los viajes ya que hay familiares cerca de las zonas de estudio.

Para la extracción de ADN y PCR se usó las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de El Salvador y los materiales para esta investigación y la secuenciación de las muestras fueron gracias al apoyo de la universidad de Merced California. Con relación al tiempo el estudio es factible siempre y cuando no haya retrasos con el envío de las muestras ya que ese proceso está fuera del alcance del investigador.

B. ENUNCIADO DEL PROBLEMA

- ¿Existe variación genética de *Lutzomyia longipalpis* en la Región Oriental de El Salvador?

C. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

- Determinar la variabilidad genética de *Lutzomyia longipalpis* transmisor de leishmaniasis cutánea en Región Oriental de El Salvador de junio- julio 2022.

Objetivos específicos

- Identificar la estructura genética de *Lutzomyia longipalpis* transmisor de la leishmaniasis cutánea en Región Oriental de El Salvador.
- Identificar el flujo genético de *Lutzomyia longipalpis* transmisor de la leishmaniasis cutánea en la Región Oriental de El Salvador.
- Identificar la variabilidad genética de la *Lutzomyia longipalpis* entre municipios estudiados.

D. CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN

El Salvador está situado en América Central, en la zona tropical, al norte de la línea ecuatorial y al este del meridiano de Greenwich, entre las coordenadas 13° 09' y 14° 27' latitud Norte y los meridianos 87° 41' y 90° 08' longitud Oeste del meridiano de Greenwich. Limita al norte con la República de Honduras, al sur con el Océano Pacífico (307 kilómetros de costa), al este con la República de Honduras y la República de Nicaragua (Golfo de Fonseca de por medio), y al oeste con la República de Guatemala (19).

En El Salvador la enfermedad de leishmaniasis se considera como una enfermedad desatendida (1). Sin embargo, en la Región Oriental es donde mayor se concentra el número de casos, específicamente en los departamentos de La Unión y Morazán (VIGEPES). La temperatura en verano e invierno en la región oriental de

El Salvador, así como el elevado número de población canina y ganado vacuno juegan un papel importante en la proliferación de flebotomos.

La región Oriental del país El Salvador difiere en costumbres y tradiciones en relación con el resto del país ya que la mayor parte de sus zonas son rurales y su población se dedica a la agricultura y ganadería conviviendo directamente con distintos reservorios del vector, esta convivencia estrecha entre la población, reservorios y vector de esta enfermedad junto con las pocas o nulas medidas de saneamiento ambiental hacen un cultivo adecuado para que el vector transmita fácilmente esta enfermedad a los humanos.

E. JUSTIFICACIÓN

Los flebotomos son una subfamilia de dípteros nematóceros de la familia Psychodidae, conocidos como el único vector en la transmisión de la leishmaniasis a través de la picadura de los flebotomos hembras (20). Es una enfermedad que afecta cada año a miles de personas alrededor del mundo y que ha sido catalogada como una enfermedad transmisible desatendida (21,22).

Los vectores flebotomos *Lutzomyia longipalpis* transmisor de la enfermedad están distribuidos en las zonas cálidas y también subtropicales que son húmedas, existe evidencia donde la variabilidad genética se condiciona por características propias del vector, como la baja capacidad de vuelo, la poca dispersión, las barreras climáticas que condicionan los aislamientos genéticos entre las diferentes poblaciones como se ha logrado determinar genéticamente (18).

El uso de marcadores moleculares permite determinar el grado de variación y diferenciación genética que existe dentro y entre poblaciones (23). Entre los marcadores comúnmente utilizados está en los flebotominos está el ADN mitocondrial (ADNmt) (24), el cual se hereda por vía materna por lo que tiene poca o nula recombinación, presenta alta tasa de mutación y alto polimorfismo (25).

No existen a la fecha estudios sobre su variabilidad genética en El Salvador, desconociéndose si existe o no flujo genético entre las poblaciones rurales y urbanas. Por lo tanto, es necesario conocer la genética y el flujo génico que hay entre

las poblaciones de este mosquito (flebótomo), así como determinar si son poblaciones monotípicas o presentan polimorfismo genético permitirá analizar la dispersión genética como una alternativa para aportar y tener un mejor control de las acciones preventivas de este vector y por consiguiente un mejor control de la enfermedad en nuestro país.

Es importante realizar este tipo de estudios debido a que las poblaciones podrían diferir en su capacidad y competencia vectorial, por lo tanto, es indispensable conocer su variabilidad genética dicha información es fundamental para un adecuado diseño e implementación de estrategias de control y vigilancia entomológica.

CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEORICA

A. ESTADIO ACTUAL DE LA ENFERMEDAD DE LEISHMANIASIS

En las Américas, han sido identificadas 15 de las 22 especies de *Leishmania* patógenas para el hombre y cerca de 54 especies diferentes de vectores están potencialmente involucradas en la transmisión. El parásito se transmite mediante la picadura de insectos flebótomos hembras de la familia *Lutzomyia* conocidos popularmente como "*chiclera, asa branca, palomilla, mosquito palha y torito*", entre otros. Este insecto es activo por la noche cuando inocular el parásito al ser humano a través de su picadura (25).

A pesar de tratarse de una enfermedad endémica sobre todo en países de ingresos medios-bajos, su prevalencia e incidencia va en aumento a nivel mundial (26). Se han reportado muchos casos de *L. cutánea* en países no endémicos, en pacientes jóvenes que resultan infectados tras viajes de aventura a zonas endémicas. En nuestro país la principal concentración de casos de esta enfermedad esta reportado en la zona Oriental.

LA POBREZA COMO FACTOR DE RIESGO DE LA LEISHMANIASIS.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las malas condiciones de vivienda y un saneamiento deficiente de los hogares pueden promover el desarrollo de los lugares de cría y reposo de los flebótomos y aumentar su acceso a la población humana. Los flebótomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una fuente de ingesta de sangre (27).

La anemia y la malnutrición dificultan una resolución favorable de la enfermedad. Dietas bajas en proteínas, hierro, vitamina A y zinc, aumentan el riesgo de que la enfermedad progrese. La falta de asistencia sanitaria o un coste elevado de la misma, hace que haya muchos casos sin diagnosticar o sin tratamiento adecuado.

Además de esto, son factores de riesgo: el cambio climático, procesos de urbanización y deforestación, aumento de reservorios como los roedores, guerras, grandes movimientos migratorios, viajes de aventura a zonas endémicas.

La leishmaniasis está constituida por un grupo de enfermedades causadas por varias especies de protozoos del género *Leishmania*, que son transmitidos a los humanos por dípteros flebotomos hembra (*Phlebotomus* y *Lutzomyia*). El reservorio del parásito está formado bien por mamíferos domésticos o salvajes. (28)

La respuesta inmune frente a este tipo de leishmaniasis se caracteriza por ser de tipo celular, pero con una importante participación de la inmunidad humoral.

CLASIFICACIÓN DE LA LEISHMANIASIS

Leishmaniasis cutánea

Se caracteriza por la aparición de una o múltiples pápulas de color rosado que aumentan de tamaño y pasan a formar una lesión nodular. Se dan en áreas expuestas y suelen ulcerarse, sin dolor y con endurecimiento periférico (29).

Las úlceras producidas por los parásitos de Europa, Asia y África se cubren por escaras hiperqueratosis y las ocasionadas por la *Leishmania* típica de América, tienen una cubierta fibrinosa. Es frecuente que se diseminan apareciendo lesiones satélite y linfadenopatías, así como infecciones secundarias bacterianas (29).

El período de incubación oscila entre 2 y 6 semanas. La evolución normal suele ser de curación gradual pudiendo tardar de meses a años, deja cicatrices atópicas deprimidas o queloides. Tras la resolución de la lesión primaria, puede darse una reactivación durante el próximo año (29).

Leishmaniasis cutánea difusa

Esta forma de la enfermedad es poco frecuente, se suele dar al comienzo de infecciones causadas por *L. aethiopica*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*. Comienza con una lesión localizada que no se ulcera, para posteriormente diseminarse por la piel en forma de nódulos cargados de parásitos en forma de amastigotes.

Generalmente se forman en la cara y en la superficie de los miembros extensores, aunque pueden diseminarse a cualquier parte del cuerpo (30).

Leishmaniasis mucosa

Su principal característica es la destrucción de las mucosas del tracto respiratorio superior como consecuencia de la migración de los parásitos a esa zona, originando hiperemia, edema, hemorragia, aumento de secreciones, ulceración y necrosis. Aun así, no suele afectar a la función respiratoria. Además de en las zonas propias del tracto respiratorio, como nariz, faringe, paladar, epiglotis, laringe y tráquea, también puede darse en los genitales.

La consecuencia más típica de esta forma de la enfermedad, suele ser desfiguración por la destrucción del cartílago nasal. Esto suele conllevar importantes consecuencias psicológicas y sociales.

Su letalidad en sí misma es baja, aunque pueden darse infecciones bacterianas secundarias en las áreas cercanas a la necrosis, así como dificultar la ingesta de alimento, provocando la muerte (29).

Leishmaniasis visceral

Las manifestaciones clásicas de la Leishmaniasis visceral son: fiebre que puede ser constante o irregular, pérdida de peso, esplenomegalia que se manifiesta en la gran mayoría de los pacientes, hepatomegalia que puede o no estar presente, palidez causada por anemia grave, leucopenia, trombocitopenia y pérdida de peso que ocurre de forma lenta y progresiva. Otros signos y síntomas secundarios incluyen trastornos respiratorios o gastrointestinales, como vómitos y diarrea, En los casos graves hay desnutrición y edema de miembros inferiores, que puede progresar a anasarca. Otros signos importantes son hemorragias (gingival, epistaxis), petequias, ictericia y ascitis. En estos pacientes, la muerte es determinada generalmente por infección bacteriana o sangrado (29).

GENERALIDADES DEL VECTOR

Las especies de *Lutzomyia* son insectos con metamorfosis completa (holometábolos), por lo que pasan por diferentes estadios de vida: huevo, larva, pupa y adulto. Es precisamente el estadio adulto el mejor conocido ya que como es el caso de otros dípteros con larvas terrestres, los estadios inmaduros son difíciles de encontrar en el campo (30).

El género *Lutzomyia* vive en época de calor, entre mayo y octubre, nacen sanos es decir sin el parásito. Para transmitirlo primero deben picar a un animal infectado y después a una persona (31). Su mayor importancia médica radica en que son los vectores de la Leishmaniasis; que después de la Malaria es la segunda enfermedad transmisible más importante producida por protozoos (30).

Aunque hay mucha diferencia entre especies, se presentarán aquí las generalidades de Phlebotominae. Son insectos pequeños (2-3 mm), su cuerpo se encuentra cubierto por una pilosidad densa, la cabeza y el abdomen forman un ángulo de 90° lo que les da un aspecto jorobado; las alas son lanceoladas, angostas y erectas en forma de V cuando están en reposo (32,33).

CICLO DE VIDA

Su ciclo de vida es holometábolo e incluye la fase de huevo, 4 estadios larvales, pupa y adulto. Los huevos son depositados de manera aislada o en pequeños grupos sobre el suelo húmedo y rico en materia orgánica, inicialmente son de color blanco o gris claro aunque viran a marrón oscuro o negro dentro de las primeras horas de la oviposición; la etapa larval comprende 4 estadios detritívoros, durante los cuales es móvil pero con agilidad limitada, morfológicamente se caracterizan por sus cápsulas cefálicas con aparato bucal masticador, pequeñas antenas y porque presentan setas largas en su región caudal; las pupas tienen el cuerpo dividido en cefalotórax y abdomen, un esbozo de las alas en formación y la exuvia de la última etapa larval adherida al extremo posterior, una vez complementado este estado alcanza finalmente el estado adulto (32,33, 34).

El primer estadio larval emerge en 12-19 días aproximadamente posteriores a la oviposición, las pupas emergen a los 25-29 y los adultos en 35-39 días (34,35).

El ciclo de desarrollo precisa, para ser completado, de un lapso de unos 40 días, aunque algunas especies extienden este periodo bajo condiciones ambientales adversas como el invierno (diapausa) que ocurre frecuentemente en la fase de huevo o cuarto estadio larval (33,36).

Los ejemplares adultos machos y hembras se alimentan de jugos vegetales, mientras que las hembras son también hematófagas debido a la necesidad fisiológica requerida para la oviposición.

La ingesta de sangre se realiza en los primeros días de vida adulta. Entre los 3 a 10 días después de haberse alimentado colocan unos 40 huevos en promedio, pero en algunos casos el número puede ascender a 110 unidades por ovipostura (34).

Por lo general el área de dispersión de muchas especies cubre zonas con vegetación elevada y densa caracterizadas por un alto grado de humedad, aunque algunas pueden estar presentes en zonas con una importante intervención antrópica, tanto en el ambiente peridoméstico, como con hábitos endofágicos y endofilicos. Son insectos voladores de naturaleza débil; en cada etapa de vuelo cubren distancias cortas, de manera que su radio de dispersión no sobrepasa los 200 metros por día. La actividad de los adultos es más intensa durante el período matutino y vespertino, pero en días nublados ésta puede ocurrir durante todo el día (33,34).

Los machos atraen a las hembras a través de feromonas y de la vibración de sus alas ocurriendo la cópula cerca o sobre los animales vertebrados fuente de la ingesta sanguínea. Los sitios son usualmente los mismos donde se desarrollaron los estadios inmaduros y consisten en microhábitats oscuros y húmedos como madrigueras de animales o plantas epífitas (36).

EPIDEMIOLOGÍA

Actualmente la leishmaniasis es endémica en los 5 continentes, se encuentra presente en 98 países con una incidencia anual de 1,5 millones de casos, de los cuales entre 0,7 a 1,2 millones corresponden a casos cutáneos y 0,2 a 0,4 millones a casos viscerales; se estima una mortalidad anual de 20.000 a 40.000 casos (37,38).

En América se reportan aproximadamente 70.000 casos de Leishmaniasis cutánea por año representando un 30% respecto de los casos reportados en el mundo (3% de los cuales corresponden a casos de Leishmaniasis mucocutánea) y se encuentra presente desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, excluyendo a Chile y Uruguay (37,39).

Para Leishmaniasis Visceral se reportan 3,800 casos al año los cuales representan un 7% respecto a los casos totales reportados mundialmente, encontrándose desde el Sur de Estados Unidos hasta el Norte de Argentina, siendo Brasil el país sudamericano donde se dan el 91,9% de los casos (33,38,40).

En El Salvador en el año 2021 el Ministerio de Salud reporta a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (VIGEPES) un total de 45 caso confirmados de leishmaniasis cutánea en la Región Oriental de Salud divididos por departamentos de la siguiente manera Usulután reporta 2 casos, San Miguel 18 casos, Morazán 1 caso y La Unión 24 casos concentrados en 14 municipios de un total de 87 municipios de la Región Oriental.

PREVENCIÓN Y CONTROL

No hay vacunas disponibles para prevenir la infección para la población humana, las medidas recomendadas para la protección personal están dirigidas a reducir el contacto con los vectores, en particular evitar las actividades al aire libre desde el atardecer hasta el amanecer, uso de mosquiteros uso de ropas protectoras y de repelentes de insectos y construcción de viviendas dejando una distancia de al

menos 400 metros a partir del límite de los bosques o áreas de densa vegetación, gestión ambiental, mediante la limpieza de patios y terrenos, con el fin de cambiar las condiciones del medio ambiente, cuando estos ofrecen lugares de cría y establecimiento de las formas inmaduras del vector (41).

GENÉTICA DE POBLACIONES

La evolución biológica consiste en el cambio de las características hereditarias de grupos de organismos a través de las generaciones. Ocurre como consecuencia de varios procesos fundamentales, tanto aleatorios como no aleatorios. La variación en las características de los organismos de una población se origina a través de la mutación al azar de secuencias de ADN (los genes) que las determinan. Además, la variación genética aumenta por recombinación durante la reproducción sexual, que produce nuevas combinaciones de genes, y también por el flujo génico, es decir, la entrada de nuevos genes desde otras poblaciones (42).

Según los mismos autores el cambio evolutivo dentro de una población consiste en un cambio en las frecuencias génicas y genotípicas. Los dos principales procesos impulsores del cambio evolutivo son la selección natural y la deriva genética (42).

ESTUDIOS GENÉTICOS.

La variación o diversidad genéticas en un contexto general, es el componente más básico de la biodiversidad. Se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. En años recientes, la ecología molecular se ha encargado de estudiar estas variaciones, que resultan en grandes cambios físicos, fisiológicos, etc., en los organismos. La mayoría de las poblaciones naturales poseen una elevada variabilidad genética. Sin embargo, la variabilidad observada en un determinado carácter puede atribuirse a variabilidad genética o a factores ambientales (43,44,45).

FACTORES QUE DETERMINAN LA ESTRUCTURA GENÉTICA

Deriva Genética

La deriva genética ocurre en poblaciones relativamente pequeñas donde algunos alelos pueden cambiar su frecuencia simplemente debido al azar. La mayoría de los organismos son diploides, debido a que tienen dos ejemplares de cada gen. Los gametos de estos organismos portan solo uno de los dos ejemplares (alelos) de cada gen. El que un gameto lleve un alelo u otro, es una cuestión de azar, por lo que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los cigotos de la siguiente generación solo puede describirse como un proceso probabilístico (46).

Selección natural

La idea de la selección natural como un proceso fundamental de los cambios evolutivos fue iniciada por Charles Darwin y Alfred Russel Wallace (47) e implica que las poblaciones naturales están constituidas por un *pool* genético con algunas variantes poco frecuentes (48). El entorno es crucial para la selección natural, dado que sus límites son los que determinan qué caracteres son los beneficiosos y dentro de ello, los cambios tanto en espacio y tiempo traen consigo modificaciones en los caracteres de los organismos.

Mutación

Ocasionalmente pueden llegar a producirse errores en la replicación del ADN, estos cambios son denominados mutaciones. Una mutación es un cambio estable y heredable en el material genético dependiendo del tipo de mutación. Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de estas variantes pueden ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de estas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie (49).

La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética. Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al ambiente. A su vez, una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales o deletéreas de los individuos, haciéndolos menos adaptados, y aumentando la probabilidad de extinción de la especie (49).

Flujo genético

El flujo genético se define como la transferencia de material genético entre poblaciones dado por el movimiento de individuos o de sus gametos (50). El impacto del flujo de genes está determinado por la capacidad de dispersión de la especie, así como por barreras geográficas y estructura poblacional (51). El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo genético cada población evoluciona en forma casi independiente (52).

B. ANTECEDENTES

En Colombia se realizó un estudio Tipificación de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* mediante Código de Barras. En este estudio se utilizaron la secuencia propuesta a nivel mundial como código de barras genético para diferenciar especies animales y poder caracterizar especímenes pertenecientes a *L. longipalpis* de tres localidades de Colombia ellos evaluaron las distancias genéticas (K2P) entre haplotipos de *L. longipalpis* (0,05-0,07) y las agrupaciones en un dendrograma de NJ, separaron adecuadamente los individuos de *L. longipalpis* de los individuos de especies cercanas. Los individuos de *L. longipalpis* se separaron en dos grupos, uno que relaciona los haplotipos de Neiva y El Callejón, y otro para Girón.

Las distancias genéticas entre los dos grupos de *L. longipalpis* fueron superiores a las registradas a nivel intraespecífico para especies previamente estudiadas con base en la secuencia código de barras como *L. trinidadensis* (0,042) y *L. panamensis* (0,02) (53).

En la región de Argentina se realizó un estudio de diversidad genética de la estructura genética de *Lutzomyia longipalpis* utilizando marcadores mitocondriales a escala latinoamericana. Estimaron la diversidad genética de seis sitios de Argentina, utilizando un fragmento del ND4 y el extremo 3' de los genes *cyt b*.

La mayor diversidad genética se encontró en Tartagal, Santo Tomé y San Ignacio. Presentando una alta diferenciación genética de *L. longipalpis* en Argentina utilizando ambos marcadores: ND4 (FST = 0,452, $p < 0,0001$), *cyt b* (FST = 0,201, $p < 0,0001$).

Además, realizaron análisis espaciales de Geneland donde revelan la existencia de dos grupos genéticos primarios en Argentina, cluster 1: Tartagal, Santo Tomé y San Ignacio; clúster 2: Puerto Iguazú, Clorinda, y la ciudad de Corrientes. Así mismo, realizaron análisis filogeográficos utilizando secuencias de genes ND4 y *cyt b* disponibles en GenBank de diversos sitios geográficos. Estos estudios sugieren la necesidad de analizar la competencia del vector, entre otros parámetros intrínsecos a una zoonosis (54).

Se realizó un estudio en Brasil de estructura genética macrogeográfica de poblaciones complejas de *Lutzomyia longipalpis* usando secuenciación de próxima generación. El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de insectos vectores ayuda a dilucidar los componentes e interacciones de la ecoepidemiología de la enfermedad. Utilizaron el análisis de polimorfismo de tres marcadores moleculares para acceder a los niveles de estructura genética de la población entre nueve poblaciones diferentes de flebótomos.

Además, presentaron que los niveles de *Lutzomyia longipalpis* podría estar asociada con el aislamiento a distancia. Este nuevo método de secuenciación les permitió estudiar diferentes marcadores moleculares después de una sola ejecución de secuenciación y evaluar las diferencias entre poblaciones y especies a escala macrogeográfica (55)

En Sudamérica, *Lutzomyia umbratilis* es el principal vector de *Leishmania guyanensis*, una de las especies implicados en la transmisión de la leishmaniasis tegumentaria americana. En Brasil, *L. umbratilis* ha sido registrada en la región amazónica, y se ha identificado una población aislada en el estado de Pernambuco, región nororiental.

En este estudio se evaluó la estructura fitogeográfica de tres alopátricas brasileñas poblaciones de *L. umbratilis*. El análisis filogenético reveló la presencia de dos clados monofiléticos distintos: un clado compuesto por las muestras de Recife y Rio Preto da Eva, y un clado compuesto por las muestras de Manacapuru. Comparando la población de Manacapuru con las poblaciones de Recife y Rio Preto da Eva revelaron altos índices de divergencia interpoblacional. El análisis filogenético en este estudio presento que la distancia geográfica y el entorno no han modificado la relación ancestral compartida por las poblaciones de Recife y Rio Preto da Eva. Las similitudes genéticas mostraron que, en términos evolutivos, estas poblaciones son más cercanas entre sí que con la población de Manacapuru (56).

C. HIPOTESIS

H0= No existe variabilidad genética de *Lutzomyia longipalpis* en los municipios seleccionados

H1= Existe variabilidad genética de *Lutzomyia longipalpis* en los municipios seleccionados

CAPÍTULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

A. ENFOQUE Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

- **Tipo de estudio:** se realizó un estudio de corte transversal descriptivo debido a que no se manipularon las variables de estudio y su enfoque es cuantitativo.

B. SUJETOS Y OBJETO DE ESTUDIO

I Unidades de análisis, población y muestra

- **Universo de estudio:** fueron los flebotomos hembras de los municipios en estudio de la zona Oriental de El Salvador.
- **Método de muestreo y obtención de adultos experimentales:** Los especímenes de adultos hembras de *Lutzomyia longipalpis* se colectaron durante los meses de junio y julio 2022 en los municipios seleccionados, clasificando los especímenes por municipio para tener una distribución proporcional de la muestra, los cuales fueron clasificados. En la tabla 1 se muestran los municipios seleccionados utilizando los registros del sistema de vigilancia epidemiológica en salud (VIGEPES).
- **Área de estudio**

La Región Oriental de El Salvador está compuesta por 4 departamentos y 87 municipios, en el presente trabajo de investigación se incluyen los municipios que hayan presentado por lo menos un caso de Leishmaniasis Cutánea en el año 2021 según (VIGEPES).

Tabla 1: Departamentos y municipios en el Oriente de El Salvador con casos de Leishmaniasis Cutánea en el 2021.

Departamentos	Municipios	Casos
San Miguel	San Miguel	17
	Chapeltique	1
	Uluazapa	1
Usulután	Berlín	1
	Jiquilisco	1
Morazán	San Francisco Goteras	1
	Polorós	5
La Unión	San Alejo	5
	El Carmen	3
	Conchagua	2
	Anamorós	2
	Concepción de Oriente	2
	Yucuaiquín	1
	La unión	1
	Total	14

Fuente: VIGEPES

La colecta de *Lutzomyia longipalpis* en terreno se realizaron de la siguiente forma se colocaron trampas de luz CDC a nivel peri domiciliario con sus respectivas viñetas de identificación: Lugar y fecha de colecta y se colocaron a una altura de 1.5m del suelo teniendo así un total de cuatro trampas por municipio. Esta colecta se realizó entre las 3:00 pm y 6:00 am. Se llenaron las fichas de captura de flebótomos, y toma de coordenadas geográficas. Al día siguiente se procedió a recolectar las trampas del día anterior y se repitió el mismo proceso en los municipios de estudio. Cuando no se colectaron muestras se repitió el muestreo en la zona en un máximo de 3 veces. Finalmente, los individuos colectados fueron introducidos en tubos de 5ml con alcohol al 70% para ser conservados y posteriormente identificados en el Laboratorio de Entomología en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

II. Variables e indicadores

Las variables de estudio serán la estructura, flujo y variabilidad genética de *Lutzomyia longipalpis*. Ver tabla 2

Tabla 2: Relación de congruencia de los principales elementos de la investigación.

Tema: VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>LUTZOMYIA LONGIPALPIS</i> TRANSMISOR DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA EN REGIÓN ORIENTAL DE EL SALVADOR DE JUNIO - JULIO 2022							
Enunciado del problema: ¿Existe variación genética en las poblaciones de <i>Lutzomyia longipalpis</i> en la región oriental de El Salvador de junio- julio 2022?							
<ul style="list-style-type: none"> ● Objetivo General: Determinar la variabilidad genética de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transmisor de leishmaniasis cutánea en Región Oriental de El Salvador de junio- julio 2022. 							
Hipótesis General: H0= No Existe variabilidad genética en las poblaciones de <i>Lutzomyia longiplapis</i> de los municipios H1 Existe variabilidad genética en las poblaciones de <i>Lutzomyia longiplapis</i> de los municipios							
Objetivos Específicos	Hipótesis	Unidad de análisis	Variable	Operalización de las variables	Indicadores	Técnicas para utilizar	Tipo de instrumento a utilizar
Identificar la estructura genética de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transmisor de la leishmaniasis cutánea en Región Oriental de El Salvador.		El vector	Estructura genética	1= Calidad de ADN 2= Cantidad menor de ADN	Calidad de muestras aceptadas	Colecta entomológica	Bases de Excel, Bloc de Notas
Identificar el flujo genético de <i>Lutzomyia longipalpis</i> transmisor de la leishmaniasis cutánea en la Región Oriental de El Salvador.		El vector	Flujo genético	1= Calidad de ADN 2= Cantidad menor de ADN	Calidad de muestras aceptadas	Colecta entomológica	Bases de Excel, Bloc de Notas
Identificar la variabilidad genética de la <i>Lutzomyia longipalpis</i> entre municipios estudiados.	Existe variabilidad genética de <i>Lutzomyia longiplapis</i> en los municipios seleccionados	El vector	Vector y Municipio	Lista de Municipios	Variabilidad genética de <i>Lutzomyia longipalpis</i> encontrada en los diferentes municipios	Colecta entomológica	Bases de Excel, Bloc de Notas

C. TÉCNICAS MATERIALES E INSTRUMENTOS

Técnica y procedimiento para la recopilación de la información

Los flebotomos fueron llevados al laboratorio de CENSALUD, Para la investigación se utilizaron muestras de flebotomos hembras por municipio (por ser la responsable de transmitir el parásito a la población) (57). Las muestras fueron identificadas taxonómicamente hasta especie utilizando el proceso de diafanización y clarificación, estereoscopio, microscopio, materiales estériles y una guía taxonómica para su identificación (58,59), con la ayuda de entomólogos calificados. (Ver anexo 1). Posteriormente se colocaron en tubos eppendorf 1.5ml con una solución de etanol al 70% debidamente rotulada. Las muestras fueron utilizadas para la extracción de ADN genómico el cual se realizó en El laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología de la Universidad de El Salvador; a partir de la cabeza de cada muestra por medio del kit de Extracción PureLink™ Genomic DNA (60). Luego de la extracción se realizó electroforesis en un gel de agarosa al 1% para evaluar la calidad de las bandas de ADN, finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C. (Ver anexo 2).

La amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial de interés se realizó por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se amplificó una región del DNA mitocondrial de aproximadamente 650 pares de bases denominado código de barra, correspondiente al gen mitocondrial Citocromo Oxidasa 1. La PCR se realizó por medio de un kit comercial Takara R001 y se llevó al termociclador automático para realizar las reacciones de desnaturalización, hibridación y elongación según la programación siguiente: 1 min a 95°C y luego 35 ciclos consecutivos de 94°C (1 min), 55°C (1 min) y 72°C (1 min), seguido por 7 min a 72°C; para un total de 2 a 3 horas de duración (ver anexo 3). (60,61,62).

Los fragmentos de aproximadamente 544 pares de bases (pb) o código de barras del gen mitocondrial COI, producto de la amplificación en PCR y previamente almacenados a -20°C, fueron enviados vía FEDEX al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de California Berkeley, para una limpieza y

secuenciación en un equipo Applied biosystems 3130 genetic analyzer según los principios descritos por (60).

D. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Edición las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el Software Geneious para editar y determinar las secuencias consenso, posteriormente fueron alineadas en MEGA. Así mismo las secuencias fueron comparadas con el récord de secuencias Barcode de *Lutzomyia longipalpis* presentes en la base de datos Boldsystems para verificar la especie de estudio.

Con el programa DNAsp se calculó la longitud de la secuencia, sitios conservados, sitios de parsimonia informativa, sitios polimórficos, cantidad de haplotipos, diversidad haplotípica, promedio del número de diferencias, diversidad nucleotídica estimada y la diferenciación genética entre haplotipos de las poblaciones (60,64), con el mismo programa se obtuvo la historia demográfica de los municipios y el índice de fijación (F_{ST}).

El índice F_{ST} tiene un valor cercano a 0 cuando no hay subdivisión (con apareamientos al azar) por lo que no existen divergencias genéticas entre las poblaciones; y tiene un valor cercano a 1 cuando existe subdivisión extrema (aislamiento completo), de manera que valores de F_{ST} menores a 0.05 indican una diferenciación genética insignificante, mientras que valores mayores a 0.25 muestran una diferenciación genética significativa entre las poblaciones (65). Se utilizo el programa Pop ART 1.7 y seleccionando el Opción TCS para obtener la red de haplotipos (66).

La estructura genética se obtuvo a través de la prueba de AMOVA el cual determino el grado de diferenciación entre poblaciones, así mismo, una matriz que representa las interacciones entre las poblaciones en una escala de distancias, se calcularon los porcentajes de variación de los componentes de varianza, utilizando el software Arlequín versión 3.5.2.2.

Se llevo a cabo la prueba de Mantel (67), con el cual se compararon las matrices de distancia genética y geográfica, Esta prueba mide el grado de relación, Z entre las dos matrices y se indicaron 999 permutaciones, para evaluar la posible correlación entre la distancia genética y geográfica. El análisis se realizará con el programa Genalex versión 6.51 (68), el cual es una aplicación para el programa Microsoft Office Excel.

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LA INFORMACION

A. RESULTADOS

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA

Se recolectaron un total de 344 muestras de los cuales 57 hembras pertenecientes a la especie *Lutzomyia longipalpis* fueron identificadas morfológicamente durante el presente trabajo. A partir del material genético de estos especímenes se aislaron 57 secuencias nucleotídicas distribuidas en 34 haplotipos con una longitud de 544 pb los valores obtenidos en el análisis de la diferenciación genética se presentan en la tabla 3.

Tabla 3: Valores de diferenciación genética de 11 municipios de la Región Oriental de El Salvador.

Longitud de las secuencias	Sitios conservados	Sitios Variables	Sitios de parsimonia informativa
544	527	17	15

Se identificaron 527 sitios monomórficos o regiones conservadas y 17 sitios polimórficos donde se observó variabilidad, así mismo se obtuvieron 15 sitios de parsimonia informativa en los cuales se observan al menos dos residuos que aparecen al menos dos veces cada uno de ellos.

Los sitios variables señalan la cantidad de polimorfismos en el alineamiento y los sitios informativos son los que aportan información importante para la construcción de árboles filogenéticos.

Se calculó la diversidad genética de 11 municipios como se muestra en la tabla 2. Donde (N Seq) es la cantidad de secuencias por municipio, teniendo un total de 57, el número de sitios polimórficos (S), donde se encontró el valor más alto fue en el municipio de Jiquilisco con 14 sitios polimórficos y el menor valor fue en Chalpetique con 1. La lista de haplotipos (h) mostro un total de 34, se observó en mayor cantidad en el municipio de Jiquilisco con 10. La diversidad haplotípica (hd) por municipio presento valores alto, el cual representa la probabilidad de que los

haplotipos seleccionados al azar sean diferentes. En cuanto a diversidad nucleotídica (Pi) los valores más alto y el más bajo se encontraron en el municipio de Yucuaiquín $Pi= 0.01292$ y Chapeltique con $Pi= 0.00185$ respectivamente, este índice estima la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos seleccionados al azar sean diferentes ver tabla 4.

Tabla 4: Indicadores de diversidad genética de 11 municipios de la Región Oriental de El Salvador de junio – julio 2022.

Municipios	N Seq	S	h	Hd	K	Pi
El Carmen	8	12	8	1.00000	3.92857	0.00725
Jiquilisco	10	14	10	1.00000	3.86667	0.00713
San Miguel	6	8	5	0.93333	4.00000	0.00738
Conchagua	5	7	5	1.00000	3.40000	0.00627
La Unión	3	4	2	0.66667	2.66667	0.00492
Anamorós	3	5	3	1.00000	3.33333	0.00615
Yucuaiquín	2	7	2	1.00000	7.00000	0.01292
Polorós	2	5	2	1.00000	5.00000	0.00923
Chapeltique	2	1	2	1.00000	1.00000	0.00185
Concepción de Oriente	7	8	6	0.95238	3.04762	0.00562
Uluazapa	9	13	8	0.97222	3.66667	0.00677
TOTAL	57	32	34	0.96303	3.7713	0.00696

Se identificaron 34 haplotipos para el gen CO1 en los 11 municipios de la Región Oriental, se observaron tanto, haplotipos predominantes, como haplotipos privados que aparecen restringidos en poblaciones específicas. Observándose 2 haplotipos dominantes el haplotipo 4 aparecen fijo en 6 municipios seguido del haplotipo 7 que esta fijo en 5 municipios.

Así mismo, se observan haplotipos privados, que aparecen fijos exclusivamente en municipios específicos, tal fue el caso de los haplotipos 11,12,13,14 y 15 que se encontraron en el municipio de Jiquilisco, el haplotipos 16 y 18 en San Miguel, el haplotipo 22 en Conchagua, el haplotipos 24 y 25 Anamoros, el haplotipo 26 Yucuaiquín, los haplotipos 27 y 28 Polorós, los haplotipos 29,30 y 31 Concepción de Oriente, los haplotipos 32,33 y 34 municipio de Uluazapa los dos haplotipos con mayor frecuencia los señalan como ancestros. Ver anexo 4. Los haplotipos 4 y 7 presentan mayor frecuencia, seguidos del haplotipo 2 que aparece

con una secuencia en 4 poblaciones y el resto de los haplotipos son predominantemente privados.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS HAPLOTIPOS

En la figura 1 podemos verificar los 34 haplotipos que se encuentran distribuidos en los 11 municipios podemos observar que el haplotipo 4 permanece fijos en 6 localidades, el haplotipo 7 haplotipo esta fijo en 5 localidades, y el haplotipo 2 que se encuentra en 4 localidades y los restantes que son privados.



Haplotipos por municipio de <i>Lutzomyia Longipalpis</i> de la Región Oriental de El Salvador										
Cm	Jc	Sm	Chg	Lu	An	Yc	PI	Ch	Co	UI
Hap_1	Hap_2	Hap_2	Hap_1	Hap_4	Hap_4	Hap_1	Hap_27	Hap_7	Hap_4	Hap_2
Hap_2	Hap_4	Hap_10	Hap_19	Hap_23	Hap_24	Hap_26	Hap_28	Hap_17	Hap_7	Hap_4
Hap_3	Hap_7	Hap_16	Hap_20		Hap_25				Hap_21	Hap_7
Hap_4	Hap_9	Hap_17	Hap_21						Hap_29	Hap_19
Hap_5	Hap_10	Hap_18	Hap_22						Hap_30	Hap_20
Hap_6	Hap_11								Hap_31	Hap_21
Hap_7	Hap_12									Hap_32
Hap_8	Hap_13									Hap_33
	Hap_14									Hap_34
	Hap_15									

Figura 1: Mapa con división por municipio donde se señalan los sitios de estudio y los haplotipos reportados para cada municipio en el Oriente de El Salvador de junio – julio 2022.

En la red mínima de haplotipos se observan en la figura 2 El área de cada círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipos en este caso el haplotipo 4 y 7 tienen probabilidad de ser alelos ancestrales y tenga una amplia distribución geográfica básicamente porque los individuos que tienen esos haplotipos han tenido mucho tiempo para dispersarse, los círculos más pequeños indica aquellos haplotipos que presentan menor frecuencia y aparecen privados, ya que presentan una única conexión se prevé estén unidos a haplotipos de la misma población dado que han evolucionado recientemente y por lo tanto sin tiempo para dispersarse, la línea entre uno y otro señala los eventos mutacionales que les han ido distanciando genéticamente. La fracción de cada círculo indica la frecuencia de los haplotipos presentes en las poblaciones estudiadas.

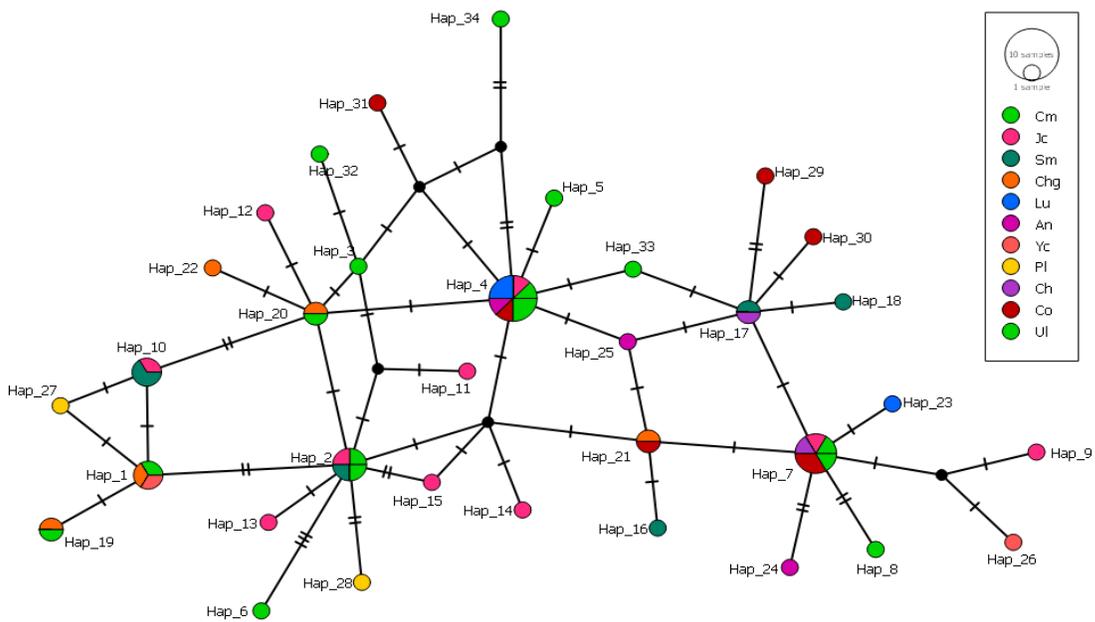


Figura 2: Red mínima de haplotipos en las que se muestran las conexiones entre 34 haplotipos de 11 municipios de la Región Oriental de El Salvador de junio – julio 2022.

HISTORIA DEMOGRÁFICA

En la prueba genética poblacional Tajima o valor D se obtuvieron resultados negativos para 4 poblaciones contrasta con 2 que fueron positivos ver tabla 5. El valor D total negativo presenta el comportamiento de las poblaciones que indican una tendencia a la expansión.

Tabla 5: Valores de Tajima o valor D presentes por municipios de la Región Oriental de El Salvador de junio – julio 2022.

Municipios	D
El Carmen	-0.76049
Jiquilisco	-1.00148
San Miguel	0.83517
Conchagua	0.08298
La Unión	*
Anamorós	*
Yucuaiquín	*
Polorós	*
Chapeltique	*
Concepción de Oriente	-0.35022
Uluazapa	-1.11367
TOTAL	-1.55781

*La cantidad de secuencias no fue suficiente por municipio para brindar el valor correspondiente de Tajima.

ESTRUCTURA GENÉTICA MEDIANTE ANÁLISIS DE VARIACIÓN MOLECULAR (AMOVA)

Con la prueba AMOVA se determinó la variación molecular dentro de las poblaciones he identificar cuales se encuentran más diferenciadas, tal como se muestra en la tabla 6, los porcentajes de variación de los componentes de varianza indican mayor variabilidad dentro de las poblaciones que y menor porcentaje entre ellas.

Tabla 6: Valores de varianza poblacional de 11 municipios de la Región Oriental de El Salvador de junio – julio 2022.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	10	21.337	0.0601	3.18
Dentro de las poblaciones	46	84.26	1.83173	96.82
TOTAL	56	105.596	1.89183	100

ÍNDICE DE FIJACIÓN F_{ST}

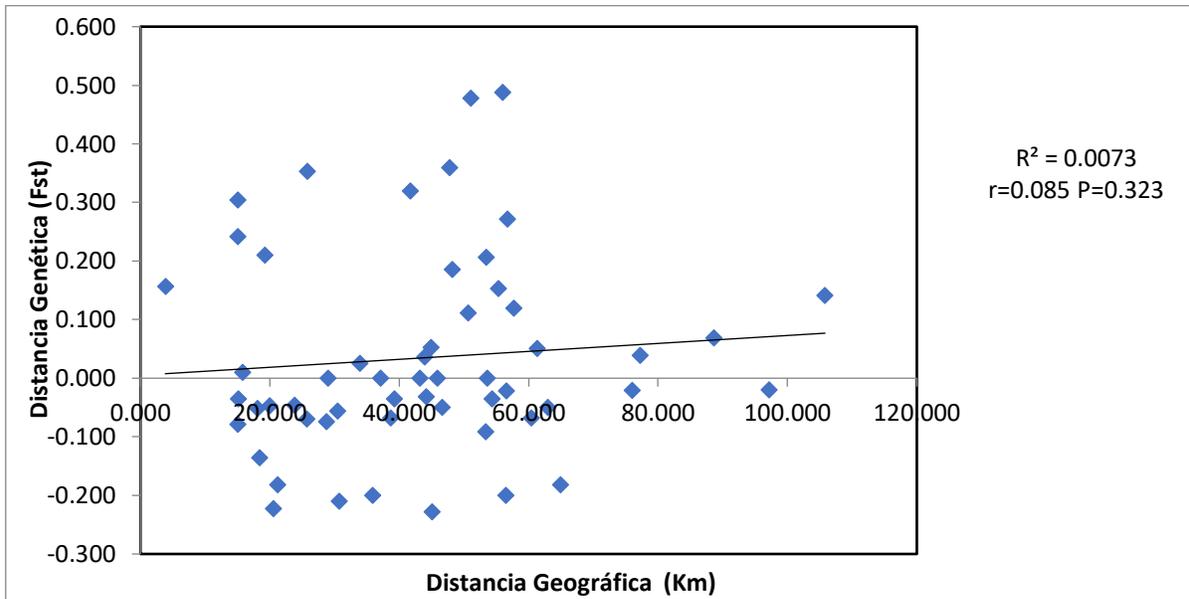
En la diagonal inferior de la tabla 7 se muestran los resultados de los valores de (F_{ST}) que mide el grado de diferenciación genética entre poblaciones. El valor F_{ST} más alto se localizó entre las poblaciones de Chalpetique y Conchagua F_{ST} 0.4884. Otro valor que se encontró alto fue entre las poblaciones Chalpetique y Polorós F_{ST} 0.4783. Las poblaciones que mostraron menos divergencia genética fueron las de La Unión y El Carme F_{ST} 0.0107, así mismo, se observaron poblaciones donde no hay diferenciación ya que presentaron un P valor negativo.

Tabla 7: Matriz de distancia genética valores de (F_{ST}) de 11 municipios de la Región Oriental de El Salvador de junio – julio 2022.

Municipios	El Carmen	Jiquilisco	San Miguel	Conchagua	La Unión	Anamorós	Yucuaiquín	Polorós	Chapeltique	Concepción de Oriente	Uluazapa
El Carmen	0.0000										
Jiquilisco	-0.0678	0.0000									
San Miguel	-0.0455	0.0000	0.00000								
Conchagua	-0.0469	-0.0206	-0.0673	0.0000							
La Unión	0.0107	0.0392	-0.0345	0.1574	0.0000						
Anamorós	0.0528	0.0690	-0.0313	0.1855	-0.2273	0.0000					
Yucuaiquín	-0.1815	-0.1812	-0.2222	-0.2093	-0.0741	-0.0690	0.0000				
Polorós	-0.0352	-0.0192	0.0000	-0.2000	0.2069	0.2424	-0.2000	0.0000			
Chapeltique	0.3202	0.3596	0.2105	0.4884	0.1538	0.0000	0.0000	0.4783	0.0000		
Concepción de Oriente	0.1201	0.1418	0.0513	0.2720	-0.0909	-0.1356	-0.0498	0.3045	-0.0494	0.0000	
Uluazapa	-0.0516	-0.0211	-0.0350	0.0000	-0.0556	0.0258	-0.0787	0.037	0.3538	0.1113	0.0000

AISLAMIENTO POR DISTANCIA

En la gráfica 2 se muestran los puntos por pares de valores de distancia genética (FST) y geográfica (km) entre las poblaciones, mostrando que no existe una correlación, con un valor de $R^2 = 0.0073$ y $P = 0.323$. Estos resultados sugieren que la especie estudiada no presenta un aislamiento por distancia.



Gráfica 2: Análisis de correlación entre Distancia Geográfica (Km) y Distancia Genética entre las 11 poblaciones de *Lutzomyia longipalpis*.

B. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio representa el primer análisis de la variabilidad genética de *Lutzomyia longipalpis* en El Salvador. Se utilizó la técnica de ADN mitocondrial y los resultados obtenidos reportan una baja variabilidad entre poblaciones, lo cual puede interpretarse como un elevado flujo de genes. Los estudios sobre la estructura genética de poblaciones naturales de insectos vectores tienen múltiples aplicaciones en biología evolutiva y de la conservación, un aspecto esencial para entender la ecoepidemiología de las enfermedades (69).

En esta investigación se identificaron 34 haplotipos, de 57 secuencias analizadas, obteniendo datos similares a otros estudios con en Colombia en donde se caracterizaron 26 haplotipos de 33 secuencias (53). La frecuencia relativa de los haplotipos y la red de haplotipos generada, indica una dominancia de los haplotipos 4 y 7 (Figura 2), estos haplotipos podrían considerarse como ancestros desde los cuales se han ido originando nuevos haplotipos que aparecen privados para otras poblaciones en su mayoría, esto se correlaciona con valores de diversidad genética altos observados en dichas poblaciones (tabla 4).

Los resultados de la prueba AMOVA, indican un bajo porcentaje de variación entre las poblaciones del 3.18 % y de una variación alta dentro de las poblaciones con 96.82% y los porcentajes son sensibles a la frecuencia de los haplotipos H4 y H7; esto se ve reforzado por los valores de F_{ST} cercanos 0 que indican que las poblaciones son bastante homogéneas genéticamente, similar con un estudio de Colombia donde *Lutzomyia longipalpis* presentó una baja variabilidad genética (53), así mismo otro género de *Lutzomyia* (70), En Brasil se presentan avances significativos en la comprensión de la estructura genética de la población de *Lutzomyia longipalpis* (71).

La estimación de la diferenciación genética entre poblaciones F_{ST} es fundamental en los estudios genéticos para comprender la historia demográfica de la población (72). Cuando la población mantiene un tamaño pequeño durante un

largo periodo de tiempo, se produce una erosión gradual de la variabilidad genética al interior de esa población, por un proceso conocido como deriva genética (73).

Los valores F_{ST} mostraron diferenciación genética nula, pequeña, moderada y muy alta entre las poblaciones de las localidades de estudio, para Chalpetique y Conchagua un $F_{ST} = 0.4884$, para Chalpetique y Polorós un $F_{ST} = 0.4783$, mientras que para La Unión y El Carmen mostró un $F_{ST} = 0.0107$; y para las demás poblaciones una diferenciación genética nula (Tabla 7). Dicho lo anterior, las poblaciones de *Lutzomyia Longipalpis* son bastante homogéneas genéticamente, debido a que el flujo genético es mayor. Además, es importante destacar que los valores más altos de F_{ST} entre las poblaciones de Chalpetique y Conchagua indican un flujo génico menor, y por lo tanto mayor diferencias genéticas entre estas poblaciones de insectos, que a su vez concuerda con la similitud de las condiciones ambientales que caracterizan estas localidades.

Por lo tanto, entre más alto el flujo genético la variabilidad entre poblaciones disminuirá. Los resultados obtenidos, podrían considerarse como una estrategia adaptativa a la presión selectiva con insecticidas, donde las poblaciones tiendan a la homogeneidad frente a un mismo estímulo de presión en un territorio geográfico reducido y bien interconectado, lo que estaría en concordancia con el valor de Tajima negativo, indicando a una disminución de la variabilidad genética entre las poblaciones. Los valores obtenidos para el índice de Tajima permiten detectar procesos que afectaron a la muestra en el pasado; por ejemplo, cambios en el tamaño de la población, estructuración poblacional, selección natural y recombinación de genes (74).

En este sentido, el valor negativo del índice de Tajima encontrado y los bajos valores de F_{ST} también confirman la presencia de flujo genético entre las poblaciones, donde todos los individuos tienen altas probabilidades de cruzarse de forma aleatoria y por ende sus genes pueden migrar de una población a otra. Estos resultados explican la baja variabilidad en las poblaciones de *Lutzomyia longipalpis*, probablemente la especie es nativa porque hay mucha diversidad ya que, en ocasiones los insectos introducidos tienen poca diversidad y pocos haplotipos. En otro estudio analizaron la estructura genética de 5 especies del género *Lutzomyia*

que presentaron valores alto de flujo genético (71). Así mismo, en otro estudio encontraron datos que contrastan con los datos obtenidos ya que presentan valores positivos de Tajima (75).

En el caso particular de El Carmen, Jiquilisco, Concepción de Oriente y Uluazapa, la prueba Tajima, mostro valores negativos, indicando que estas poblaciones están en una reciente expansión poblacional (76,77,78), indicando un proceso de fijación de nuevos alelos. Estas poblaciones pudieron haber atravesado un cuello de botella recientemente viéndose afectada debido a fumigaciones o bien por cambios de temperatura y pluviosidad en las zonas.

La diferenciación genética es el resultado de varios procesos evolutivos, como el flujo de genes, la selección y aislamiento por distancia geográfica. Este último es un proceso representante capaz de provocar la especiación en diferentes poblaciones de una misma especie. Este evento ocurre porque el espacio geográfico conduce a la variación ambiental (79,80,81) y con el aumento de la distancia, el flujo de genes tiende a disminuir (82,83). Para esta investigación se realizó la prueba de Mantel para evaluar las poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* el cual mostro que no existe una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica. Esta correlación presentó un valor de $R^2 = 0.0073$ y no fue significativa $P=0.323$. Este resultado muestra que, hubo mayor diferenciación genética entre los individuos, por ende, no existe un aislamiento por distancia entre las poblaciones.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Los indicadores de diversidad genética arrojan tres poblaciones con valores considerables, siendo Jiquilisco el que más sitios polimorfos presenta y una diversidad haplotípica alta, seguido de los municipios de Uluazapa y el Carmen siendo las poblaciones que presentaron mayor riqueza génica.
- Los análisis moleculares de la varianza (AMOVA) arrojan valores que indican mayor variabilidad dentro de las poblaciones de *Lutzomyia longipalpis*, y una baja variabilidad genética en el fragmento CO1 de las poblaciones evaluadas.
- La baja variabilidad genética entre las poblaciones y el alto flujo genético dentro de las poblaciones no sugieren un obstáculo para las estrategias de control vectorial que se implementan en la Región Oriental de El Salvador.
- Los valores obtenidos indican que las poblaciones pasaron recientemente por un cuello de botella y se encuentran en un proceso de expansión demográfica por lo que a mayor flujo génico menor variabilidad en las poblaciones.
- No se encontró una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica ya que hubo mayor diferenciación genética entre los individuos de las poblaciones.

RECOMENDACIONES

- Al Ministerio de Salud, a través de la Unidad de epidemiología, se recomienda mantener una vigilancia activa de casos de Leishmaniasis cutánea en todos los municipios y realizar un seguimiento a los departamentos o municipios con mayor índice de la enfermedad.
- A la Dirección de Salud Ambiental del Ministerio de Salud, se recomienda que, a través de sus Unidades de Entomología, realizar periódicamente Análisis de densidad de poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* en los municipios que presenten casos de Leishmaniasis entre sus poblaciones en el último año.
- Al Ministerio de Salud, en coordinación con alianzas estratégicas a realizar estudios de variabilidad genética y morfometría del vector transmisor de la leishmaniasis cutánea en temporada seca y temporada lluviosa para determinar cómo se comportas la genética del vector en esas temporadas.
- Se recomienda a la Universidad Evangélica de El Salvador seguir estimulando a los estudiantes a seguir realizando estudios innovadores y de carácter científico.

FUENTES DE INFORMACIÓN CONSULTADAS

1. Organización Panamericana de la Salud. Proyecto de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles. Guía para el desarrollo de planes integrados de acción para la prevención, control y eliminación de las enfermedades infecciosas desatendidas en Latino América y el Caribe. Washington, D.C.: OPS; 2011
[Internet] 2022. [Consultado el 11 de enero de 2022]. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16771&Itemid
2. Avise, J.C., 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. Roy. Soc. (B)* 312, 325-342
3. Botero, David; Restrepo, Marcos. Parasitosis Humana Incluye Animales Venenosos Y Ponzosñosos, 5ª EDICIÓN, CIB. Corporación Para Investigaciones Biológicas Medellín, Colombia. 2012, 733 Págs.
4. Organización Mundial de la Salud. OMS: Leishmaniasis cutánea y mucosa [Internet] 2022. [Consultado el 11de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>
5. Arias Ramírez J, Beltrán F, Desjeux P, Walton B. Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud; 1996. PMID:9223156
6. Ministerio de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica - VigEpES [Internet]. 2022. [Consultado el 11 de enero de 2022] Disponible en: <http://vigepes.salud.gob.sv/>
7. Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes EB. Climate and vector borne diseases. *Am J Prev Med.* 2008;35:436-50. [Consultado el 11de enero de 2022] <http://dx.doi.org/10.1016/j.amepre.2008.08.030>
8. Anyamba A, Linthicum KJ, Small JL, Collins KM, Tucker CJ, Pak EW, et al. Climate teleconnections and recent patterns of human and animal disease outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1465. [Consultado el 11 de enero de 2022] <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001465>
9. Azevedo ACR, Monteiro FA, Cabello PH, Souza NA, Rosa- Freitas MG, Rangel EF. Studies on Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(3):305-322. [Consultado el 11 de enero de 2022] <https://www.scielo.br/j/mioc/a/RcxtwjtHx5zXRLKbVQ4tmXN/?format=pdf&lang=en>

10. Bejarano EE, Rojas W, Uribe S, Vélez ID, Porter, CH. Genetic analysis of a recently detected urban population of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) in Colombia. *Rev Soc Entomol Argent.* 2009;68(1-2):135-141.
11. Freitas MTS, Costa Jr CRL, Silva LG, Leal-Balbino TC, Brazil RP, Balbino VQ. Genetic Structure of Sympatric Populations of Female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) In Sobral and Caririçu, Ceará State, Brazil. *Vector Biol J.* 2018;3(1):1-5.
12. Adamson RE, Ward RD, Feliciangeli MD, Maingon R. The application of random amplified polymorphic DNA for sandfly species identification. *Med Vet Entomol.* 1993;7(3):203-207.
13. Fraga J, Rodriguez J, Fuentes O, Hernández Y, Castex M, Gonzalez R, *et al.* Genetic variability of *Triatoma flavida* and *Triatoma bruneri* (Hemiptera: Reduviidae) by RAPD-PCR technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011;53(1):19-24.
14. Meneses CR, Cupolillo E, Monteiro F, Rangel EF. Micro-geographical variation among male populations of the sandfly, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, from an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Med Vet Entomol.* 2005;19(1):38-47.
15. Rocha LS, Falqueto A, Santos CB, Grimaldi Jr G, Cupolillo E. Genetic structure of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* populations from two ecologic regions in Brazil where transmission of *Leishmania (Viannia) braziliensis* reflects distinct eco-epidemiologic features. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76(3):559-65.
16. Seblova V, Volfova V, Dvorak V, Pruzinova K, Votypka J, Kassahun A, *et al.* *Phlebotomus orientalis* sand flies from two geographically distant Ethiopian localities: biology, genetic analyses and susceptibility to *Leishmania donovani*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4): e2187.
17. Duiardin JP, Torrez EM, Le Pont F, Hervas D. Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Med Vet Entomol* 1997; 1:394-400
18. Ministerio de Salud MINSAL. Boletín epidemiológico 2018. [Internet] 2022. [Consultado el 16 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.salud.gob.sv/boletines-epidemiologicos-2018/>
19. MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2012). Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo San Salvador. Plan Nacional de

Implementación del Convenio de Estocolmo El Salvador. Disponible en la red: <http://www.marn.gob.sv> [acceso el 15/03/2022]

20. Cabrera O, Mosquera L, Santamaria E, Ferro C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) del departamento de Guaviare, Colombia, con nuevos registros para el país. *Biomedica*. 2009; 29:73-86.
21. Organización Mundial de la Salud. OMS: Why are some tropical diseases called “neglected”? [Internet]. 2022 [Consultado el 11 de enero de 2022]. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/58/en/>
22. Organización Mundial de la Salud. OMS: Leishmaniasis [Internet] 2022. [Consultado el 11 de enero de 2022]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
23. Avise J.C., Arnold., Ball RM, Bermingham E., Lamb T., Niegel JE., Reeb C.A. & Saunders N.C. 1987 Intraspecific Phylogeography. The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematic* 18:489-522.
24. Essegir S., Ready P., Killick-Kendrick R & Ben-Ismaïl R. 1997 Mitochondrial Haplotypes and phylogeography of Phlebotomus vectors of Leishmania major. *Insect Molecular Biology* 6:211-215.
25. Avise J.C. 2004 *Molecular markers, Natural History, and Evolution*. Second ed. Sunderland, M.A: Sinauer Associates
26. Leishmaniasis Paho.org. [Internet] 2022. [Consultado el 16 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
27. Urmeneta roncal c, n punto. Leishmaniasis humana. un problema de salud pública. leishmaniasis humana un problema de salud pública [Internet] 2022. [Consultado el 16 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.npunto.es/revista/20/leishmaniasis-humana-un-problema-de-salud-publica>
28. Del Rosal Rabes T, Baquero-Artigao F, García MJ. *Isciii.es*. [Internet] 2022. [Consultado el 16 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/pap/v12n46/revision1.pdf>
29. Sanchez JD. OPS/OMS [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. [Internet] 2022. [Consultado el 16 de febrero de 2022]. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=es

30. Botero, David; Restrepo, Marcos. Parasitosis Humana Incluye Animales Venenosos Y Ponzosos, 5ª EDICIÓN, CIB. Corporación Para Investigaciones Biológicas Medellín, Colombia. 2012, 733 Págs.
31. Dr. Carbone Campoverde F, Dr. Urgarte Ubilluz O. Manual de Procedimientos de Identificación de Vectores de Leishmaniosis y Enfermedad de Carrión. Técnicas N° 36. Lima – 2002. Lima Perú. Octubre 2002. [16 de febrero 2022]. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1052_INS-NT36.pdf
32. Alvar Ezquerro, J., 2001. *Las Leishmaniasis: De la Biología al Control*. 2da edición. Madrid: Centro Nacional de Microbiología. Instituto de la Salud Carlos III.
33. Salomón., O.D., 2005. *Artrópodos de interés médico en Argentina. Phlebotominae, flebotomos. Capítulo 10. Serie enfermedades transmisibles*, Fundación Mundo Sano
34. Maroli, M. et al., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), pp.123–147.
35. Volf, P. & Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology*, 36, pp. S1–S9.
36. Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, pp.227–250.
37. Alvar, J. et al., 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloSone*, 7(5), pp.356-371.
38. OPS/OMS, 2013. *RePLEish. 2º Reunión de los Programas Nacionales de Leishmaniasis en las Américas. Informe Final*, Ciudad de Panamá, Panamá.
39. Salomón, O.D., 2010. Mapa de riesgo de leishmaniasis visceral en áreas vulnerables de Argentina y Uruguay. Informe ANLIS, DET.
40. Gould, I.T. et al., 2013. Leishmaniasis Visceral en la Argentina. Notificación y situación vectorial (2006-2012). *Medicina*, 73, pp.104–110.
41. Ministerio de Salud MINSAL. Boletín epidemiológico 2018. [Internet] 2022. [Consultado el 16 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.salud.gob.sv/boletines-epidemiologicos-2018/>
42. Cabrero J. & P.M., Camacho (2009). Fundamentos de poblaciones genéticas. Manual Soler, editor. Evolución la base de la biología. p. 83-488.

43. Fernandez de Castro, I. (2009). Variabilidad genética en poblaciones naturales: detección, cuantificación y significado.
44. Lanteri, A. A., Loíacono, M. S., & Margaría, C. (2002). Aportes de la biología molecular la conservación de los insectos (Vol. 2, pp. 207–220). La Plata, Argentina.: Proyecto de Red Iberoamericana de Biografía y Entomología Sistemática.
45. Piñero, D. (2015). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In Capacidad Natural de México (Vol. 20, pp. 468–494). Conabio.
46. Galtier, N., Depaulis, F., & Barton, N. H. (2000). Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. *Genetics*, 155(2), 981-987.
47. Ayala, F. J., & Kiger, J. A. (1984). *Genética moderna*. Omega. Barcelona.
48. Futuyma, D. (1986). *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 223-231 pp.
49. Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR´ s), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review).
50. Avise, J. C., & Hamrick, J. L. (1996). *Conservation genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall.
51. Orell, M., Lahti, K., Koivula, K., & WELLING, P. (1999). Immigration and gene flow in a northern willow tit (*Parus montanus*) population. *J. Evol. Biol*, 1(2), 283-295.
52. Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure, en L.A. Real (ed.), *Ecological genetics*, Princeton University Press, Princeton, pp. 3-18.
53. Hoyos, Richard. (2012). Tipificación molecular de especímenes colombianos de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae) mediante DNA Barcodes. *Revista colombiana de entomología*. 38. 134.
54. Pech-May A, Ramsey JM, GonzaÁlez Ittig RE, Giuliani M, Berrozpe P, Quintana MG, et al. (2018) Genetic diversity, phylogeography and molecular clock of the *Lutzomyia longipalpis* complex (Diptera: Psychodidae). *PLoS Negl Trop Dis* 12(7): e0006614. <https://doi.org/10.1371/ journal. pntd.0006614>

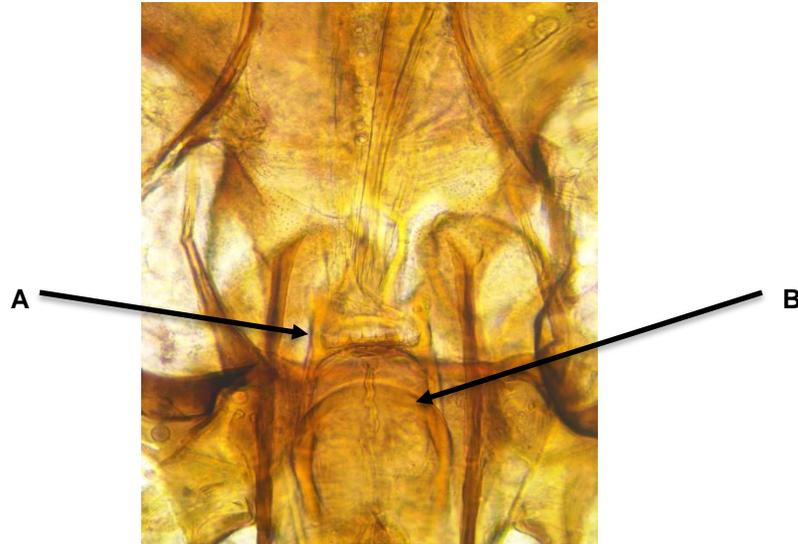
55. Casaril, A. E., Alonso, D. P., Franco, K. G., Alvarez, M., Barrios, S., Fernandes, W. S., Infran, J., Rodrigues, A., Ribolla, P., & Oliveira, A. G. (2019). Macrogeographic genetic structure of *Lutzomyia longipalpis* complex populations using Next Generation Sequencing. *PloS one*, 14(10), e0223277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223277>
56. M.T. Souza Freitas, C.M. Ríos-Velasquez, L.G. da Silva, C.R. Costa Jr., A. Marcelino, T.C. Leal-Balbino, V.Q. Balbino, F.A. Pessoa. Analysis of the genetic structure of allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis* using the period clock gene. *Acta Trop.*, 154 (2016), pp. 149-154
57. Bejarano EE, Rojas W, Uribe S, Vélez ID, Porter CH. Genetic analysis of a recently detected urban population of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) in Colombia. *Rev Soc Entomol Argent* 2009; 68 (1-2): 1-7
58. Ibáñez–Bernal, S. 1999. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. I.– *Brumptomyia* Franca y Parrot; *Lutzomyia* Franca, las especies de L. (*Lutzomyia*) Franca y del grupo *verrucarum*. *Folia Entomológica Mexicana*, 107: 61–116.
59. Viela Dml and MREG.2015 Curso de capacitación en taxonomía de flebotomíneos y vigilancia entomológica. Documento.16(2): 39
60. Joyce, AL, Torres, M.M., Torres, R, Moreno M. 2018. Genetic variability of the *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquito in El Salvador, vector of dengue, yellow fever, chikungunya and Zika. *Parasites and Vectors*, 11: 637, 1-14. doi.org/10.1186/s13071-018-3226-5
61. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 1994;3:294–9
62. Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDN. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med Vet Entomol*. 2006;20:413–24.
63. Sanger, F.; Nikelen, S. y A.R. Coulson 1977 DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467
64. Librado P, Rozas J. Dnasp v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25:1451–2.
65. Hartl, D. L. & Clark, A. G. (1997). *Principles of population genetics* (Vol. 116). Sunderland: Sinauer associates.

66. Leigh JW, Bryant D. POPART: full feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.* 2015;6:1110–6
67. Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalize regression approach. *Cancer research*, 27(2 Part 1), 209-220.
68. Peakall, R. & Smouse P. E. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539
69. Meirmans PG, Hedrick PW. Assessing population structure: F(ST) and related measures: INVITED TECHNICAL REVIEW. *Mol Ecol Resour* [Internet]. 2011;11(1):5–18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x>
70. BEJARANO, E. E., ROJAS, W., URIBE, S., VÉLEZ, I. D., & PORTER, C. H. (2009). Genetic analysis of a recently detected urban population of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) in Colombia. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 68(1-2),135-141.[fecha de Consulta 19 de Noviembre de 2022]. ISSN: 0373-5680. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=322028484006>
71. Santos MFC, Ribolla PEM, Alonso DP, Andrade-Filho JD, Casaril AE, Ferreira AMT, et al. (2013) Genetic Structure of *Lutzomyia longipalpis* Populations in Mato Grosso Do Sul, Brazil, Based on Microsatellite Markers. *PLoS ONE* 8(9): e74268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074268>
72. Hey J, Fitch WM, Ayala FJ. Systematics and the origin of species: an introduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102 Suppl 1(suppl_1):6515–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501939102>
73. Wright, S. (1969). *Evolution and Genetics of Populations*, vol.2, The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago.
74. Piñero D. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas [Internet]. Unam.mx. 2008 [citado el 18 de noviembre de 2022]. Disponible en: http://web.ecologia.unam.mx/laboratorios/fmolina/images/stories/publicaciones/LibrosCapitulosLibro/I15_Ladiversidadgen.pdf
75. Pech-May A, Ramsey JM, González Ittig RE, Giuliani M, Berrozpe P, et al. (2018) Genetic diversity, phylogeography and molecular clock of the *Lutzomyia longipalpis* complex (Diptera: Psychodidae). *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12(7): e0006614. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006614>

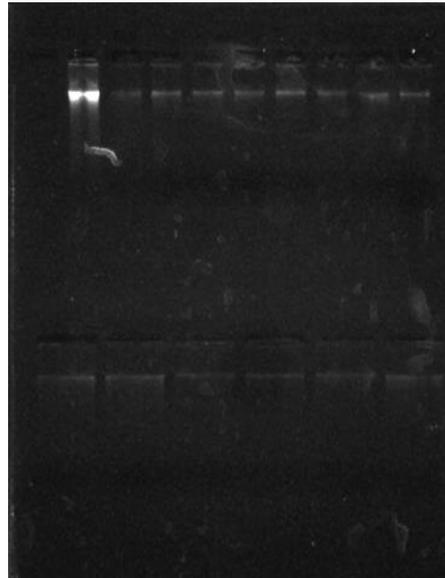
76. Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
77. Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* [Internet]. 1997 [citado el 20 de noviembre de 2022];147(2):915–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
78. Brito RA de, Manfrin MH, Sene FM. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. *Genet Mol Biol* [Internet]. 2002 [citado el 20 de noviembre de 2022];25(2):161–71. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/wh7NMYwP7sQJxqBLf7mdcMQ/?lang=en>
79. Darwin CR. Origin of species [Internet]. Tue.nl. 1882 [citado el 20 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://rauterberg.employee.id.tue.nl/lecturenotes/DDM110%20CAS/Darwin-1859%20Origin%20of%20Species.pdf>
80. Polato NR, Gray MM, Gill BA, Becker CG, Casner KL, Flecker AS, et al. Genetic diversity and gene flow decline with elevation in montane mayflies. *Heredity* (Edinb) [Internet]. 2017 [citado el 20 de noviembre de 2022];119(2):107–16. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/hdy201723>
81. Star, B., & Spencer, H. G. (2013). Effects of genetic drift and gene flow on the selective maintenance of genetic variation. *Genetics*, 194(1), 235–244. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.149781>
82. Martins, AB (2014). La especiación por distancia y la evolución de las especies anulares. Tesis de Doctorado, Instituto de Biociencias, Universidad de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/T.41.2014.tde-09122014-152748. Recuperado el 20-11-2022, de www.teses.usp.br
83. Hey J, Fitch WM, Ayala FJ. Systematics and the origin of species: an introduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102 Suppl 1(suppl_1):6515–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501939102>

ANEXOS

Anexo 1: Vista dorsal de la cabeza y estructura bucal de una hembra de *Lutzomyia longipalpis*. A. armadura cibarial formada por 8 – 12 dientes, B. arco cibarial completo.



Anexo 2: Bandas de ADN de *Lutzomyia longipalpis* vistas al transiluminador ultravioleta.



Anexo 3: Visualización de los fragmentos CO1 amplificados de *Lutzomyia longipalpis* en un transiluminador ultravioleta.

