



# El Colegio de la Frontera Sur

Búsqueda de atrayentes para *Lutzomyia cruciata* (Diptera:  
Psychodidae)

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de  
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Oscar Fernando Mikery Pacheco

2014

*Se hacen eternas cuando las quieren*

*y siempre viven y nunca mueren.*

*Cuando se duermen son indefensas*

*y se despiertan cuando las piensas.*

*Y las atacan y las defienden*

*Las más valiosas nunca se venden.*

*Alcanzan todo lo que desean*

*así de grande son las ideas.*

*Calle 13. 2014. Así de Grande son las Ideas*

## DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de mejorar personal y académicamente y por su interminable apoyo.

A mi madre Amada Pacheco Gamboa por su incondicional apoyo, cariño y buenos consejos para seguir adelante en mi vida personal y profesional, y a mi Padre Oscar Míkery Juárez, que aunque ya no estas con nosotros, te extrañamos mucho y sé que nos cuidas desde el cielo, LOS QUIERO.

A mi familia: Obed, Katy, Shirley, Joel por su cariño en todo momento, su inigualable apoyo, aunque a veces creían que no venía al lab. Los quiero mucho.

A Karen, por brindarme su apoyo y cariño y alentarme a seguir adelante. Eres lo mejor de mi vida.

A mis amigos incondicionales Santos, Ricardo, Irving, Víctor

## **AGRADECIMIENTOS**

A El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) por permitirme realizar mi formación profesional como maestro en ciencias y hacer uso de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de la maestría.

Al Instituto Tecnológico de Tapachula por permitirme realizar los estudios de campo en el área arbolada de su propiedad.

Esta investigación fue financiada por el proyecto: “Distribución y abundancia de vectores de la Leshmaniasis en zonas cafetaleras del Soconusco”. Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Chiapas (CHIS-2007-C07-77409). Responsable Dr. Alfredo Castillo Vera.

Al Dr. Alfredo Castillo Vera por su apreciable atención, dedicación y apoyo durante el desarrollo de este proyecto de investigación, en todos los ámbitos, que incluyen trabajo de laboratorio, campo, manuscrito final de la tesis y publicación, Dr. Muchas gracias.

Al Dr. Julio Cesar Rojas León por sus valiosos comentarios y consejos durante la investigación y en la versión final de la tesis y publicación.

Al Dr. Eduardo Alfonso Rebollar Téllez por las sugerencias durante la etapa experimental, escrito de la tesis y publicaciones.

A los compañeros de la maestría por esos gratos momentos que pasamos de tareas en equipo y salidas de campo.

# Índice

Índice de cuadros	i
Índice de figuras	ii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Leishmaniasis: epidemiología y problema socio-económico y ambiental	5
2.2. Vectores	8
2.2.1. Biología y ecología de flebotomíneos	9
2.3. Métodos de control y vigilancia entomológica	12
2.3.1. Tipos de control de flebotomíneos	13
2.4. Estímulos químicos y físicos involucrados en la localización de hospedero por flebotomíneos	18
2.5. Comunicación química	19
2.5.1. Quimiorrecepción	20
2.5.2. Atracción intraespecífica (feromonas sexuales en Phlebotominae)	24
2.5.3. Atracción interespecífica (caïromonas)	25
2.6. Compuestos sintéticos evaluados en flebotomíneos	26
2.6.1. Uso de cebo humano: pros y contras	27
2.6.2. CO <sub>2</sub>	29
2.6.3. 1-octen-3-ol (octenol) y otros alcoholes primarios	30
2.6.4. Ácido láctico	31
2.6.5. Amonio	32

2.6.6. Ácido butírico	33
2.6.7. Ciclopentanona	33
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVO GENERAL	36
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	37
5.1. Sitio de estudio	37
5.2. Captura y mantenimiento de insectos en laboratorio	39
5.3. Bioensayos en laboratorio	41
5.3.1. Compuestos sintéticos evaluados	44
5.4. Bioensayos en campo	44
5.4.1. Tasas de liberación	44
5.4.2. Trampa	45
5.4.3. Diseño experimental del experimento de campo	46
5.5. Montaje e identificación de flebotomíneos	47
5.6. Análisis estadístico	47
6. RESULTADOS	48
6.1. Bioensayos en laboratorio	48
6.2. Bioensayos en campo	50
6.2.1. Tasas de liberación	50
6.3. Especies identificadas	55
7. DISCUSIÓN	57
8. CONCLUSIONES	68
9. BIBLIOGRAFÍA	69

<b>10. ANEXO 1 (Acuse de recibo de envío de artículo y artículo)</b>	100
<b>11. ANEXO 2 (Dictamen del Comité de Ética para la Investigación de El Colegio de la Frontera Sur)</b>	113

## Índice de cuadros

**Cuadro 1.** Compuestos y disolventes usados en los bioensayos en laboratorio.

**Cuadro 2.** Número de hembras de *Lu. cruciata* en estado de gravidez y alimentadas observadas en los bioensayos en tubo “Y”.

**Cuadro 3.** Respuesta de hembras de *Lu. cruciata* a diferentes concentraciones de los compuestos evaluados en laboratorio.

**Cuadro 4.** Número de especies de flebotomíneos capturadas en las trampas de luz cebadas con compuestos cairomonales, en un bosque urbano localizado en la ciudad de Tapachula, Chiapas, México

## Índice de figuras

**Figura 1.** Ciclo de vida de *Lu. cruciata* (Castillo, et al., datos no publicados). A) Huevo; B-E) larva I-IV; F) pupa; G) hembra; H) macho

**Figura 2.** Estímulos y factores involucrados en la búsqueda de hospedero por flebotomíneos (Modificado de Torres-Estrada y Rodríguez, 2003 para mosquitos).

**Figura 3.** Esquema del sistema olfativo en insectos. A) cerebro (la flecha indica el protocerebro, sitio que recibe la señal eléctrica); B) transporte de la señal eléctrica hacia los glomérulos; C) composición de una sensila; D) recepción y transferencia de moléculas de olor a la dendrita.

**Figura 4.** Modelos de transducción de una señal química. Una vez cruzado el porotúbulo en la sensila por la molécula de olor, alcanzado el RO, ocurren una serie de etapas bioquímicas para transformar la señal química en eléctrica (Guidobaldi, et al., 2014).

**Figura 5.** Ubicación del sitio de estudio en el municipio de Tapachula, Chiapas, México. Los números dentro de los círculos indican la densidad poblacional.

**Figura 6.** Vista panorámica del interior del sitio de muestreo situado en la zona urbana del municipio de Tapachula, Chiapas, México.

**Figura 7.** Trampa Shannon usada en las capturas de hembras en campo. A) Trampa Shannon; B) Jaula con hembras capturadas; C) Aspirador entomológico; D) Recipiente para mantenimiento en laboratorio.

**Figura 8.** Desarrollo de los bioensayos en laboratorio. A) Esquema general del olfatómetro usado en este estudio; B) Trozo de papel filtro; C) Recipiente para traslado y mantenimiento en laboratorio; D) Vial con alcohol 70% conteniendo al insecto, 1) identificación taxonómica, 2) presencia de huevos, 3) alimentación sanguínea.

**Figura 9.** Instalación y arreglo de las trampas de luz tipo CDC en campo. A) trampa de luz y sus constituyentes; B) dispensador de la cairomona; C) arreglo de las trampas.

**Figura 10.** Tasas de liberación de los compuestos evaluados en campo. Izquierda) porcentaje del peso total perdido por compuesto durante 120 min. Derecha) medias ( $\pm$  E.E.) de los mg perdidos por compuesto. Valores marcados con diferente letra son significativamente diferentes por la prueba Tukey ( $P < 0.01$ ).

**Figura 11.** Medias ( $\pm$  E.E.) de los totales de *Lu. cruciata* capturados con las trampas de luz cebadas y el control, durante las 18 noches de muestreo en un bosque urbano en Tapachula, Chiapas, México. ANOVA (LR Chisq=16.19, g.l.=5,  $P=0.006$ ).

**Figura 12.** Medias de capturas de *Lu. cruciata*. a) hembras (LR Chisq= 25.40, g.l.= 5,  $P= 0.0001$ ); b) machos (LR Chisq= 11.43, g.l.= 5,  $P= 0.04$ ).

**Figura 13.** Fotografías al microscopio compuesto de *Lu. cruciata*. a y b) cibario y espermateca de hembra respectivamente; c) cabeza; d) genital de macho.

**Figura 14.** Fotografías al microscopio compuesto de *Lu. cayennensis*. a y b) cibario y espermateca de hembra respectivamente; c) cabeza; d) genital de macho.

**Figura 15.** Fotografías al microscopio compuesto de la hembra de *Lu. chiapanensis*. a) cibario; b) cabeza; c) espermateca.

**Figura 16.** Fotografías al microscopio compuesto del macho de *Lu. atulapai*. a) cabeza; b) genital

## RESUMEN

*Leishmania mexicana* es el agente causal de leishmaniasis cutánea, y *Lutzomyia cruciata* es el vector con mayor abundancia y distribución geográfica en México. En el presente trabajo se evaluó, en laboratorio y campo, la efectividad de 1-octen-3-ol, ácido butírico, ácido láctico, acetato de amonio y ciclopentanona como atrayentes de *Lu. cruciata*. En laboratorio se usó un olfatómetro tipo “Y” para evaluar la respuesta individual de hembras silvestres a diferentes concentraciones de estos compuestos. Adicionalmente, dentro de un bosque urbano de la ciudad de Tapachula, Chiapas se comparó la efectividad de estos compuestos como cebos en trampas de luz tipo CDC. El experimento fue repetido tres veces, usando un diseño experimental en cuadrado latino 6 x 6, y aceite mineral como diluyente y control. En laboratorio *Lu. cruciata* fue atraída significativamente a la ciclopentanona a 0.1%. En campo se capturaron más hembras que machos de *Lu. cruciata* en los cinco compuestos y el control. El 1-octen-3-ol fue el compuesto más atractivo (n=31♀) y el único que atrajo sólo hembras. Además de *Lu. cruciata*, las trampas CDC cebadas con los compuestos sintéticos capturaron tres especies de flebotomíneos, que representan nuevos registros para la zona. Aunque el 1-octen-3-ol muestra un efecto atrayente en campo para *Lu. cruciata*, en el resto de las especies capturadas no se observó una preferencia hacia ninguno de los compuestos evaluados y tampoco diferencias en las capturas por sexo. Se discute la utilización del 1-octen-3-ol como aditivo a las trampas CDC en métodos de vigilancia y/o control de ésta especie en la zona de estudio y en México.

**Palabras clave:** *Lutzomyia cruciata*, semioquímicos, caïromonas, olfatómetro, monitoreo

## ABSTRACT

*Leishmania mexicana* is the causative agent of cutaneous leishmaniasis, and *Lutzomyia cruciata* is the sandfly vector of greatest abundance and geographical distribution range in Mexico. In this work was evaluated in the laboratory and in the field, the 1-octen-3-ol, butyric acid, lactic acid, ammonium acetate and cyclopentanone effectiveness as attractants to *Lu. cruciata*. In laboratory, wild-caught females were individually tested in a “Y”-tube olfactometer. Different concentrations of synthetic compounds were evaluated. In an urban forest in the city of Tapachula, Chiapas, the effectiveness of these compounds was compared when used as baits in CDC light traps. The experiment was replicated three times, using a Latin square experimental design 6 x 6, and mineral oil was used as diluent and control. In laboratory tests, *Lu. cruciata* females were significantly more attracted to cyclopentanone to 0.1% than in the other concentration. In the field, a greater number of females than males of *Lu. cruciata* were caught on the five test compounds and control. 1-octen-3-ol was the most attractive compound ( $P=<0.05$ ) with the greatest captures ( $n= 31♀$ ). It is important to highlight the fact that the specificity of this compound to capture only females. In addition to *Lu. cruciata*, CDC traps baited with synthetic compounds captured three other sand fly species, which represent new records for the area. Although 1-octen-3-ol shows an attractant effect to *Lu. cruciata* in the field, in the other species are not an attractive effect on any of the tested compounds and also a sexual preference in catches were observed. 1-octen-3-ol utilization as an attractant to the CDC traps in monitoring methods and / or control of this species in the study area and in Mexico is discussed.

**Key words:** *Lutzomyia cruciata*, semiochemicals, kairomones, olfactometer, monitoring

## 1. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), que de acuerdo con el Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales, IET (en inglés, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, RTD), es considerada como emergente y sin control (WHO, 2010; Alvar, et al., 2012). En América, las leishmaniasis son enfermedades zoonóticas causadas por diversas especies de *Leishmania*. La OMS estima que alrededor de 350 millones de personas viven en zonas de riesgo, más de 12 millones de personas podrían estar infectadas y anualmente ocurren uno a dos millones de nuevos casos y de 20 mil a 30 mil muertes en el mundo (WHO, 2010).

A nivel mundial se han descrito cerca de 800 especies de flebotomíneos, 464 especies son Neotropicales, de las cuales 56 son vectores de 15 especies de *Leishmania* (Lane, 1993; Killick-Kendrick, 1999; Galati, 2003; Maroli, et al., 2012). *Lu. cruciata* pertenece al género *Lutzomyia*, subgénero *Tricholateralis* Galati, 1995, el cual agrupa a las especies: *Lu. gomezi* (Nitzulescu); *Lu. diabolica* (Hall); *Lu. legerae* Le Pont, et al. y *Lu. maesi* Le Pont, et al. Esta especie se distribuye ampliamente en América, desde Panamá hasta Estados Unidos (Young y Perkins, 1984; Young y Duncan, 1994). En México, *Lu. cruciata* ha sido reportada en 16 estados (Vargas y Díaz-Nájera, 1953; Ibáñez-Bernal, 1999; Rebollar-Téllez y Manrique, 2001; Ibáñez-Bernal, et al., 2006; Rebollar-Téllez, et al., 2006), entre ellos, el estado de Chiapas, donde están presentes las cuatro formas clínicas de Leishmaniasis (OPS/WHO, 1994). Esta especie ha captado la atención de algunos investigadores por su alta antropofilia (Biagi, et al.,

1966; Rebollar-Téllez, et al., 1996), infección natural con el parásito (Pech-May, et al., 2010; Sánchez-García, et al., 2010), distribución coincidente con los casos de leishmaniasis cutánea (González, et al., 2011) y poseer la capacidad de transmitir el parásito a un hospedero (Williams, 1966). Estas características han sido suficientes para incriminarla con la transmisión de Leishmaniasis Cutánea (*L. mexicana*) en México (Pech-May, et al., 2010).

*Lu. cruciata* muestra cierta plasticidad de adaptación a ambientes modificados por el humano, ocurriendo a lo largo de gradientes altitudinales en ecosistemas con diferentes grados de perturbación, como bosques, agroecosistemas (cafetalero, cacaoero, chiclero), zonas rurales y periurbanas. Recientes hallazgos demuestran que *Lu. cruciata* es la especie predominante en ecosistemas cafetaleros de la Región Soconusco, Chiapas con el 98% (n= 4624) (Mikery-Pacheco, et al., 2012; Pérez, et al., 2014). Se ha observado que esta especie presenta una fluctuación poblacional con un ciclo unimodal entre los meses de enero a mayo, con los picos más altos en los meses de marzo a mayo, y una correlación positiva con la temperatura y la humedad, no así con la presencia de lluvias (Rebollar-Téllez, et al., 1996; Pérez, et al., 2014); tiene hábitos crepusculares a nocturnos con mayores tasas de picadura entre las 18:00 y 20:00 horas (Biagi, et al., 1966; Rebollar-Téllez, et al., 1996; Pérez, et al., 2014) y aunque es antropofílica, puede alimentarse de mamíferos pequeños incluyendo roedores, algunos de ellos reservorios confirmados de *Leishmania mexicana* (Christensen y Herrer, 1973; Stephens, et al., 2009). Sin embargo, faltan más estudios sobre su biología y ecología en ambientes naturales y antrópicos (Rebollar-Téllez, et al., 2012).

Estudios filogenéticos sugieren la existencia de un complejo de especies, dada su división natural en tres linajes (Pech-May, et al., 2013), y también existe evidencia de variación morfométrica (Méndez-Pérez y Rebollar-Téllez, 2013), aunque faltan estudios químicos y comportamentales que lo comprueben.

Los métodos de control y vigilancia de flebotomíneos a nivel de laboratorio y campo son variados y sin resultados satisfactorios, dentro de estos se incluye el control químico (DDT, piretroides, deltametrina, análogos de la hormona juvenil) (Lainson y Rangel, 2005; Mascari, et al., 2007a; b); ambiental (modificación y organización del hábitat) (Amóra, et al., 2009a); biológico (*Bacillus* spp. y hongos entomopatógenos) (Robert, et al., 1997; Wahba, et al., 2000; Zayed, et al., 2013) y etológico (semioquímicos: feromona sexual más insecticidas) (Bray, et al., 2010a; 2014). En México, no existe a la fecha un programa establecido para el control y vigilancia de flebotomíneos.

Para establecer un método adecuado de control y vigilancia de insectos de importancia económica y médica, es necesario conocer aspectos de la biología, ecología y comportamiento de los mismos (Foster y Harris, 1997). Dentro de estos aspectos de comportamiento, se requiere conocer tanto el apareamiento como la búsqueda de alimento. Durante la búsqueda de hospedero, un insecto hematófago usa señales químicas (olores) y físicas (visión, humedad y temperatura) o una combinación de ambos (Ryelandt, et al., 2011). Entre las señales químicas, se encuentran los semioquímicos, los cuales son compuestos volátiles emanados por el cuerpo o respiración de los huéspedes vertebrados que modifican el comportamiento y fisiología del insecto. De acuerdo al tipo de respuesta, estos pueden clasificarse como atrayentes (cairomonas) o como repelentes (alomonas) (Logan y Birkett, 2007). Los semioquímicos

actúan principalmente como estímulos de larga distancia y pueden ser utilizados para el control y vigilancia de insectos vectores (Foster y Harris, 1997; Logan y Birkett, 2007).

En la subfamilia Phlebotominae no están bien definidos los factores que influyen en el proceso de búsqueda de hospedero. Algunos autores señalan que la hembra percibe olores emanados tanto por flebotomíneos machos (feromona sexual) como por el hospedero (caimonomas) para orientarse hacia el hospedero (Hamilton y Ramsondar, 1994; Oshaghi, et al., 1994; Dougherty, et al., 1999; Rebollar-Tellez, et al., 1999). Cuando se presentan en conjunto ambos estímulos, el hospedero se vuelve preferencial entre otros (Nigam y Ward, 1991). Por otra parte, se han demostrado otros factores importantes en la búsqueda de hospedero como: los físicos, que son principalmente los gradientes de temperatura y humedad (Nigam y Ward, 1991) e intrínsecos como la sensibilidad espectral para el reconocimiento de formas, contrastes y tonalidades (Quinnell, et al., 1992; Mellor, et al., 1996,) y el aprendizaje a través de la localización de sitios de alimentación recientes mediante mapas asociativos generados por señales odoríficas y visuales (Kelly y Dye, 1997). El éxito del proceso le proporciona a la hembra una oportunidad de apareamiento y alimentación sanguínea en un mismo sitio (Bray y Hamilton, 2007).

Las investigaciones en ecología química de Phlebotominae se han limitado al análisis químico de la feromona sexual y su aplicación en combinación con insecticidas químicos en campo (Bray, et al., 2014). Recientemente se ha evidenciado la atracción de *Nyssomyia neivai*, *Phlebotomus papatasi*, *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani*, *Lu. longipalpis* y *Lu. shannoni* hacia componentes de olor del hospedero (Pinto, et al., 2001; Beavers, et al., 2004; Andrade, et al., 2008; Mann, et al., 2009; Pareja, 2010; Pinto, et

al., 2011), indicando su posible importancia en la biología, ecología y sobrevivencia de estas especies.

Aunque recientemente se tuvo un primer acercamiento a la ecología química de *Lu. cruciata* a nivel feromonal (Serrano, 2013), no hay registro de estudios en laboratorio o en campo cuyo objetivo sea evaluar la atracción de esta especie y otros flebotomíneos de importancia médica en México a sustancias volátiles kairomonales, con el objetivo final de diseñar estrategias para la vigilancia y/o control de sus poblaciones.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Leishmaniasis: epidemiología y problema socio-económico y ambiental**

*Leishmania* es un parásito protozoario con ciclo de vida dimórfico que consiste de una fase extracelular (promastigote), en la cual se multiplica y desarrolla dentro del tracto alimenticio del flebotomíneo y una fase intracelular (amastigote) en vacuolas fagolisosomales de macrófagos del hospedero vertebrado (Sacks y Kamhawi, 2001). Este parásito es el agente etiológico de la leishmaniasis, un grupo de enfermedades que causan daños en las regiones cutánea, mucocutánea y visceral en humanos y otros mamíferos.

El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, a los que pertenecen 22 especies patogénicas para el humano, de las cuales 15 se presentan en América (PAHO, 2013). La transmisión de estos parásitos ocurre por la picadura de insectos del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae).

Ambos ocurren en zonas geográficas y hábitats distintos, en los bosques de Sudamérica (Nuevo Mundo) predomina *Lutzomyia*, mientras que en zonas áridas y semi áridas de Europa (Viejo Mundo) *Phlebotomus*.

Las leishmaniasis se registran actualmente en cinco continentes alrededor del mundo, con endemia en 98 países, incluido México (PAHO, 2013). La enfermedad se ha reportado en 25 estados de la República Mexicana (78% del territorio), localizados en cinco regiones: Península (Yucatán, Quintana Roo y Campeche), Golfo (Veracruz, Tabasco y Tamaulipas), Pacífico (Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa), Centro (Puebla, Morelos, Hidalgo, Distrito Federal, San Luis Potosí y Tlaxcala) y Norte (Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Durango y Nuevo León) (Becker, et al., 2005; Sánchez-García, et al., 2010; InDRE, 2012; Alvar, et al., 2012). En el país, únicamente se tienen registros de *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* y *L. infantum*, agentes etiológicos de Leishmaniasis Cutánea (LC), Mucocutánea (LMC) y Visceral (LV), respectivamente. La población en riesgo de contraer LC es de 7.6 millones de personas distribuidas en 11 estados del sureste de México principalmente (Alvar, et al., 2012), y para la LV se consideran casi un millón de personas de los estados de Guerrero y Chiapas (Alvar, et al., 2012). La mayor prevalencia de LC y LV se registra en el estado de Chiapas (Sánchez-Tejeda, et al., 2001; Becker, et al., 2005). Entre el 2006 - 2011 se reportaron 3,657 casos de leishmaniasis en México, y Chiapas registró el mayor número de defunciones a causa de LV (Sosa, et al., 2014). Recientemente, se localizó un foco de leishmaniasis en la parte central del estado de Chiapas, el cual incluye a 23 municipios, 2,687 localidades y 1.2 millones de habitantes en la zona de riesgo (Ruiz, et al., 2013).

Las leishmaniasis esta asociada con malnutrición, migración, viviendas precarias, analfabetismo, discriminación de género, debilidad del sistema inmunológico y la falta de recursos, todas estrechamente vinculadas con la pobreza (Alvar, et al., 2006). Por su parte, los cambios ambientales, como la deforestación, la construcción de presas y sistemas de riego, migración de personas inmunológicamente débiles a zonas endémicas y la urbanización también mantienen esa asociación (WHO, 2014).

En México, la leishmaniasis es considerada como enfermedad ocupacional, dado que la población residente en zonas agrícolas es la más afectada por la LC y LV (Chongo y García, 2010). A escala nacional este padecimiento es un problema oculto, puesto que las personas afectadas viven en sitios remotos con poco o nulo acceso a servicios de salud y donde el desconocimiento de la enfermedad conlleva diagnósticos erróneos (Desjeux, 1996; Becker, et al., 2005; Chongo y García, 2010). Pese a los reportes de leishmaniasis en agroecosistemas cafetaleros, cacaoteros y chicleros principalmente (Sánchez-Tejeda, et al., 2001; Pérez, et al., 2014), no se descartan otros agroecosistemas que proporcionen las condiciones ecológicas propias para el desarrollo de los vectores y ocasionar un foco de la enfermedad. La urbanización y desarrollo agrícola conllevan cambios en el nicho del vector e incrementan la exposición de humanos hacia el mismo, originando la aparición de casos de LC en zonas periurbanas (Sánchez-García, et al., 2010) y LV en zonas urbanas (Pastor-Santiago, et al., 2012).

En el estado de Chiapas, la presencia de LV ha sido vinculada con ciertas características sociodemográficas como la infraestructura y arreglo del hogar (paredes de ladrillo, separación entre techo y pared, número de cuartos), número de personas

por casa y la presencia de animales domésticos (Pastor-Santiago, et al., 2012). Estas condiciones le proporcionan al flebotomíneo sitios de descanso, desarrollo y alimento (recurso sanguíneo) (Pastor-Santiago, et al., 2012). Además, el hacinamiento de personas y la presencia de gallineros cercanos a la construcción genera emisiones de olores que promueven la atracción de flebotomíneos hacia la casa (Pastor-Santiago, et al., 2012), acentuando la asociación entre pobreza y leishmaniasis. Por otra parte, la migración continua de personas desde países de Sudamérica hacia México juega un papel importante, puesto que se han encontrado casos de LC donde el agente etiológico es *L. panamensis* y *L. guayanensis*, especies endémicas de esos países, en los estados de la frontera sur de México (Alvar, et al., 2012).

## 2.2. Vectores

Las especies de flebotomíneos están agrupados taxonómicamente en dos tribus: Hertigiini y Phlebotomina, la primera se divide en las subtribus Hertigiina e Idiophlebotomina, mientras que la segunda se divide en seis subtribus: Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Psychodopygina y Lutzomyiina. Dentro de este último se agrupan los géneros *Castromyia*, *Hecocyrtomyia*, *Lutzomyia* y *Tricholateralis* (Galati, 1995; 2003).

La República Mexicana alberga alrededor de 45 especies de flebotomíneos, incluyendo algunas de importancia médica tales como *Lutzomyia olmeca olmeca* (Vargas y Díaz-Nájera), *Lutzomyia evansi* (Nuñez-Tovar), *Lutzomyia panamensis* (Shannon), *Lutzomyia shannoni* (Dyar), *Lutzomyia ovallesi* (Ortíz) y *Lutzomyia cruciata* (Coquillett) (Ibáñez-Bernal, et al., 2004; 2006; 2010; 2011; Pech-May, et al., 2010;

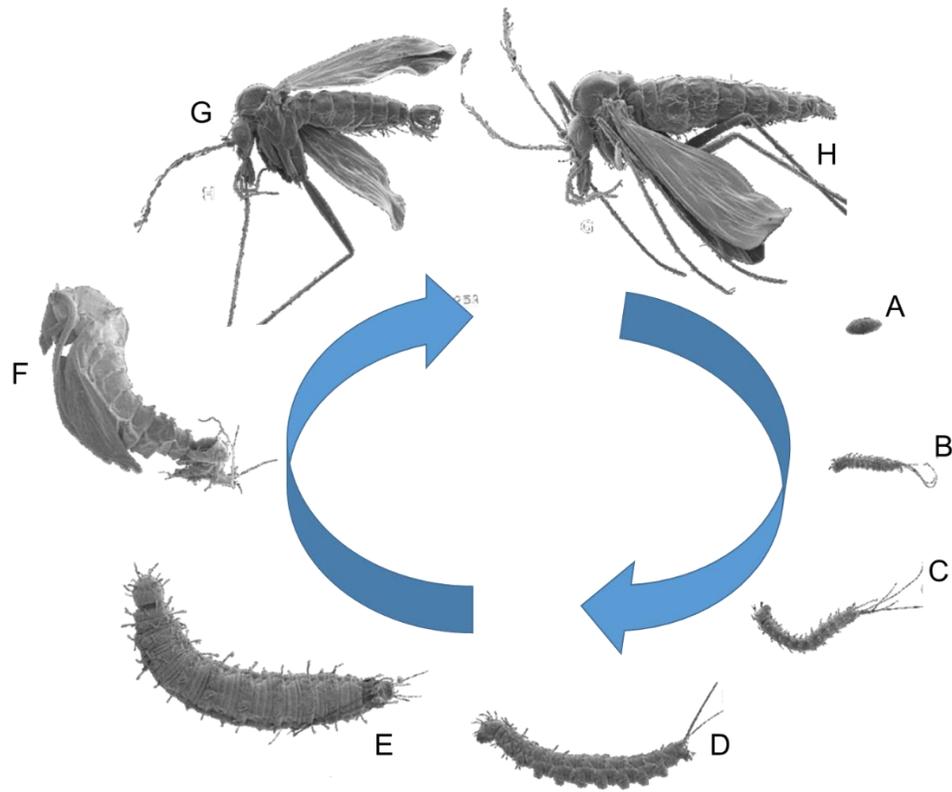
Sánchez-García, et al., 2010). En Chiapas se han reportado 27 especies de flebotomíneos (60% de la fauna nacional), 6 de ellas reportadas para la región Soconusco, de las cuales tres son de importancia médica, incluyendo *Lu. cruciata* (Mikery-Pacheco, et al., 2012; Pérez, et al., 2014). En resumen, la presencia de los insectos vectores y el agente causal de la leishmaniasis en un área determinada hacen necesaria la implementación de alternativas de control y vigilancia.

### **2.2.1. Biología y ecología de flebotomíneos**

Los flebotomíneos son pequeños insectos holometábolos cuyo desarrollo consta de cuatro estados biológicos: Huevo, larva con cuatro estadios, pupa y adulto (Figura 1). Los estados inmaduros son terrestres y los adultos semi-voladores (desplazamiento a base de pequeños saltos), ambos requieren de ambientes de clima relativamente cálido-húmedo. La larva se alimenta de materia orgánica depositada en el suelo y los adultos de ambos sexos de carbohidratos que obtienen de plantas, frutos maduros o depósitos melíferos de otros insectos, p. ej. áfidos (Hemiptera: Aphididae) (Moore, et al., 1987; Alexander y Usma, 1994). Las hembras necesitan de un recurso sanguíneo para completar la maduración de los huevos (Forattini, 1973). Dependiendo de la calidad proteica de la sangre y de los nutrientes adquiridos durante el estado larvario, la hembra ovípara de 21 a 70 huevos (Lane, et al., 1994; Ximenes, et al., 2001; Noguera, et al., 2006). La mayoría de los adultos son de hábitos crepusculares-nocturnos.

En la región Neotropical, los criaderos naturales y sitios de descanso de flebotomíneos se localizan probablemente en la base de árboles, estos microhábitats proporcionan alimento, humedad, temperatura, así como protección contra

inundaciones, lluvia, luz directa y viento. Estas condiciones incrementan las tasas de desarrollo y sobrevivencia de los estados inmaduros (Alencar, et al., 2011). Algunas especies tienen comportamiento dendrobático, esto es, que habitan en troncos y ramajes de árboles (Cabanillas y Castellón, 1999), otras se encuentran en madrigueras, termiteros, establos, áreas con vegetación densa, entre rocas, cuevas, letrinas y, en ambientes urbanizados pueden encontrarse en bodegas y hogares. El sitio de descanso de los flebotomíneos en estos lugares determinará si es exofílico o endofílico, esto es si su estancia ocurre fuera o dentro de la construcción, respectivamente.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Lu. cruciata* (Castillo, et al., datos no publicados). A) huevo; B-E) larva I-IV; F) pupa; G) macho; H) hembra

Las larvas poseen desplazamiento limitado, mientras que los adultos pueden desplazarse hasta 300 m (Morrison, et al., 1993). La pupa asemeja una crisálida de mariposa. Los adultos son pequeños (<3.5 mm de longitud) con el cuerpo cubierto de setas, patas largas y delgadas y las alas en forma de “V” cuando están en reposo (Lane, et al., 1994). La duración del ciclo de vida de estos insectos varía de 38 a 58 días aproximadamente, dependiendo de la especie y hábitat. El tiempo de desarrollo en días por estadio consta de 6.5-11.2 como huevo; 8.6-9.8 en larva I (L1); 9.2-9.8 en L2; 7.1-11.8 en L3; 8.0-19.9 en L4 y; 8.0-15.2 en pupa. Los adultos machos se distinguen fácilmente de las hembras por el tamaño de los genitales expuestos.

De acuerdo a la necesidad de obtener un recurso sanguíneo para ovipositar, las hembras se dividen en anautógenas, autógenas y partenogenéticas (Brazil y Oliveira, 1999; Lawyer y Perkins, 2004; Alves, et al., 2011). Las hembras anautógenas necesitan de una alimentación sanguínea obligada; las autógenas ovipositan sin alimentación sanguínea previa [P. ej. *Lu. lichéyi* Floch y Abonnenc, *Lutzomyia gomezi* (Nitzulescu), *Lu. cruciata* entre otras] (Johnson, 1961) y; las partenogenéticas pueden desarrollar los huevos en ausencia de machos y sin alimentación sanguínea (Brazil y Oliveira, 1999; Alves, et al., 2011). Sin embargo, cada fenómeno reproductivo tiene un costo, reflejado en el número de oviposiciones (referente a la esperanza de vida post-oviposición), número de huevos puestos y cantidad de larvas que eclosionan (Johnson, 1961). De acuerdo al comportamiento de alimentación sanguínea se clasifican en exofágicas (la alimentación ocurre al aire libre) y endofágicas (alimentación intradomiciliar) (Killick-Kendrick, 1999).

La abundancia de flebotomíneos adultos varía a lo largo del año dependiendo de la región biogeográfica y climatológica. Las fluctuaciones estacionales en la

temperatura repercuten sobre la abundancia en las zonas templadas (Región Paleártica), observando una correlación positiva, i.e. a mayor temperatura mayor abundancia (Belen y Alten, 2011). Mientras que la precipitación tiene afecciones en las zonas cálidas-húmedas (Región Neotropical), describiendo una correlación negativa, i.e. a mayor precipitación menor abundancia (Pérez, et al., 2014). Sin embargo, la densidad poblacional de flebotomíneos no siempre se correlaciona con la presencia de lluvias o fluctuación de temperatura (Condino, et al., 1998).

### **2.3. Métodos de control y vigilancia entomológica**

La modificación ecológico-ambiental antropogénica ha alterado los ciclos de transmisión de la leishmaniasis, dejando de ser ciclos selváticos para convertirse en peridomiciliares o urbanos. Las especies de flebotomíneos de importancia médica parecen adaptarse a estas modificaciones ecológicas, cambiando sus hábitos alimenticios (Monteiro, et al., 2005). En años recientes, la distribución urbana de la leishmaniasis en países latinoamericanos ha sido evidenciada por brotes epidémicos (Maroli y Khoury, 2004). Sin embargo, no existe algún método o programa de control de leishmaniasis que sea efectivo, aunque algunas sociedades de salud han ido modificando sus guías para el control de LC, modificando las temporadas de aplicación de químicos y el control tanto del vector como del reservorio (Costa, et al., 2007).

## 2.3.1. Tipos de control de flebotomíneos

### 2.3.1.1. Control químico

El control químico de flebotomíneos se ha basado en el uso de pesticidas como el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y piretroides como la deltametrina. En algunos casos ambos han resultado inviables debido a fallas en los tiempos de aplicación (Lainson y Rangel, 2005). Sin embargo, las aplicaciones intra y peridomiciliares de deltametrina sí impactan negativamente la densidad poblacional de flebotomíneos, además de presentar un alto efecto residual (Falcão, et al., 1991). Por su parte, los collares caninos impregnados con deltametrina son muy efectivos en el control de flebotomíneos, porque los insectos mueren al intentar alimentarse de los perros (David, et al., 2001), aunado a esto, es necesaria la dedicación de las personas para disminuir el ciclo de transmisión doméstico.

Recientemente se ha incursionado en la implementación de inhibidores e insecticidas químicos y análogos de la hormona juvenil (AHJ) sobre larvas y adultos de *Ph. papatasi*. Estos compuestos previenen la pupación y emergencia de adultos, matan a los adultos por daños al sistema nervioso y disminuyen la sobrevivencia larvaria. También se han evaluado los efectos de las heces de roedores alimentados con dieta adicionada con ivermectina, imidacloprid, fipronil, diflubenzuron, novaluron, así como heces adicionadas con los análogos de la hormona juvenil Piriproxifen y metopreno e inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa sobre adultos de flebotomíneos asociados con estos mamíferos (Mascari, et al., 2007a; 2007b; 2008; 2011; Swale, et al., 2013; Wasserberg, et al., 2011; Derbali, et al., 2014)

### **2.3.1.2. Control ambiental**

El manejo ambiental lleva como principio hacer inviable el ambiente para que el vector sobreviva y se reproduzca (Kishore, et al., 2006). La modificación del hábitat a través de la poda de árboles disminuye la sombra y evita las condiciones favorables de temperatura y humedad (Ministério da Saúde, 2007); la reorganización y limpieza de las áreas peridomiciliares (ubicación de los refugios de los animales domésticos) (Amóra, et al., 2009a) y; la destrucción completa del hábitat por deforestación o cambio de uso de suelo también han resultado efectivos para la extinción de especies selváticas o control de las poblaciones de flebotomíneos (Esterre, et al., 1986; Kumar, et al., 1995). Sin embargo, aun falta investigación sobre las interacciones entre las modificaciones ambientales y las poblaciones de flebotomíneos en zonas endémicas de leishmaniasis (França-Silva, et al., 2005), con la finalidad de desarrollar e implementar estrategias de prevención y control sin efectos residuales (Gontijo y Melo, 2004).

### **2.3.1.3. Control biológico**

El control biológico consiste en el uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas (Greathead y Waage, 1983). Es una alternativa para reducir los efectos negativos del uso indiscriminado de insecticidas como, la inducción de resistencia en insectos y la afeción de organismos no blanco. En este campo entran los denominados bioinsecticidas, los cuales son más específicos, con baja o nula toxicidad a animales no blanco y son ambientalmente amigables (Hynes y Boyetchko, 2006).

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *B. sphaericus* mostraron ser eficientes en el control de los estados inmaduros en *Ph. papatasi*, *Lu. longipalpis* y *Ph. martini* y ocasionar reducción de la fecundidad de las hembras en *Ph. papatasi* (De Barjac, et al., 1981; Robert, et al., 1997; Wahba, et al., 2000).

La efectividad de hongos entomopatógenos en el control biológico de Phlebotominae también ha sido demostrada. *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) y *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin var. *acridum* (Hypocreales: Clavicipitaceae) en *Lu. longipalpis* y *Ph. papatasi*, redujeron el porcentaje de eclosión de los huevos (>40%) con respuesta dosis-dependiente, decremento en la longevidad de las hembras, transferencia vertical (hembras infectadas - huevos puestos) con efectos negativos en los huevos y, reducción en la emergencia de adultos cuando se aplicó en la dieta larvaria (Amóra, et al., 2009b; 2010; Zayed, et al., 2013).

#### **2.3.1.4. Control etológico**

El control etológico hace referencia a la protección de un recurso de valor para el humano a través de la manipulación del comportamiento de una plaga. Entendiendo por manipulación, al uso de estímulos que inducen o inhiben un comportamiento y además cambian su expresión (Foster y Harris, 1997). La búsqueda y alimentación sobre el recurso son los comportamientos más útiles en el manejo de plagas, ya que están muy relacionados al comportamiento de plaga. Aunque, la manipulación del apareamiento (no relacionado al comportamiento pestilente) puede ser igualmente efectiva. Sin

embargo, la elección de un determinado comportamiento dependerá de la disponibilidad de un método apropiado para su manipulación (Foster y Harris, 1997).

La diversidad de estímulos usados en la manipulación comportamental incluye a los visuales (color y forma de la trampa), mecánicos (táctil y acústico) y químicos (semioquímicos). El estímulo debe ir inmerso en el contexto de un método para lograr la manipulación del insecto de una forma efectiva. Un método consiste de una estrategia para la manipulación comportamental y el mecanismo que implementa dicha estrategia. Por ejemplo, en el método atraer-matar, la estrategia es atraer a la plaga a un determinado sitio (por estímulos) y removerla del ambiente, y el mecanismo puede ser un dispositivo adicionado con agentes de control biológico o químico (Foster y Harris, 1997). Existen dos tipos de métodos, aquellos que actúan a larga distancia (comportamiento de búsqueda) y los que actúan a corta distancia (comportamiento de aceptación), los cuales, en base a la descripción del resultado final de una respuesta comportamental, se dividen en atrayentes y repelentes para estímulos a larga distancia y estimulante y deterrente para estímulos a corta distancia (Foster y Harris, 1997).

#### **2.3.1.4.1. Semioquímicos**

Durante la localización de su hospedero, un insecto hematófago utiliza diversas señales físicas y químicas como los olores, visión, humedad y temperatura por separado o en combinación (Ryelandt, et al., 2011). Dentro de las señales químicas se encuentran los semioquímicos, estos son compuestos volátiles emanados por el cuerpo o respiración de los hospederos vertebrados y que modifican el comportamiento y fisiología del insecto receptor. Este tipo de estímulos actúan a larga distancia y su actividad puede relacionarse con la búsqueda de hospedero (caïromona), apareamiento

o agregación (feromona) (Foster y Harris, 1997), y pueden ser utilizados para el control y monitoreo de insectos vectores (Logan y Birkett, 2007).

Ante la inexistencia de medidas preventivas para el control de vectores de leishmaniasis en la República Mexicana, se ha sugerido la inclusión de un enfoque basado en la eliminación de vectores o de la reducción del contacto entre humano–vector, lo cual se puede lograr mediante aplicaciones de insecticidas intra y peridomiciliares y/o empleo de materiales impregnados (cortinas, mosquiteros o ropa) (Sosa, et al., 2014). La NOM-032-SSA2-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector, indica la realización de vigilancia entomológica mensual si hay casos detectados de leishmaniasis o trimestrales para las áreas de información. Los estudios entomológicos se realizan en el domicilio y peridomicilio para LV y selva, cacaotales o cafetales en las áreas de riesgo de LC y los debe llevar a cabo personal estatal y local del área de entomología. Los indicadores entomológicos para la leishmaniasis son:

1. número de flebotomíneos hembra capturadas por hora;
2. índice de domiciliación; índice de peridomicilio;
3. proporción mensual de flebotomíneos hembra;
4. determinación taxonómica de especies;
5. tasa de infección de flebotomíneos.

En la norma también se sugiere el manejo integrado de los vectores de esta enfermedad, en suma con medidas anteriores, se debe realizar un manejo de reservorios.

## **2.4. Estímulos químicos y físicos involucrados en la localización de hospedero por flebotomíneos**

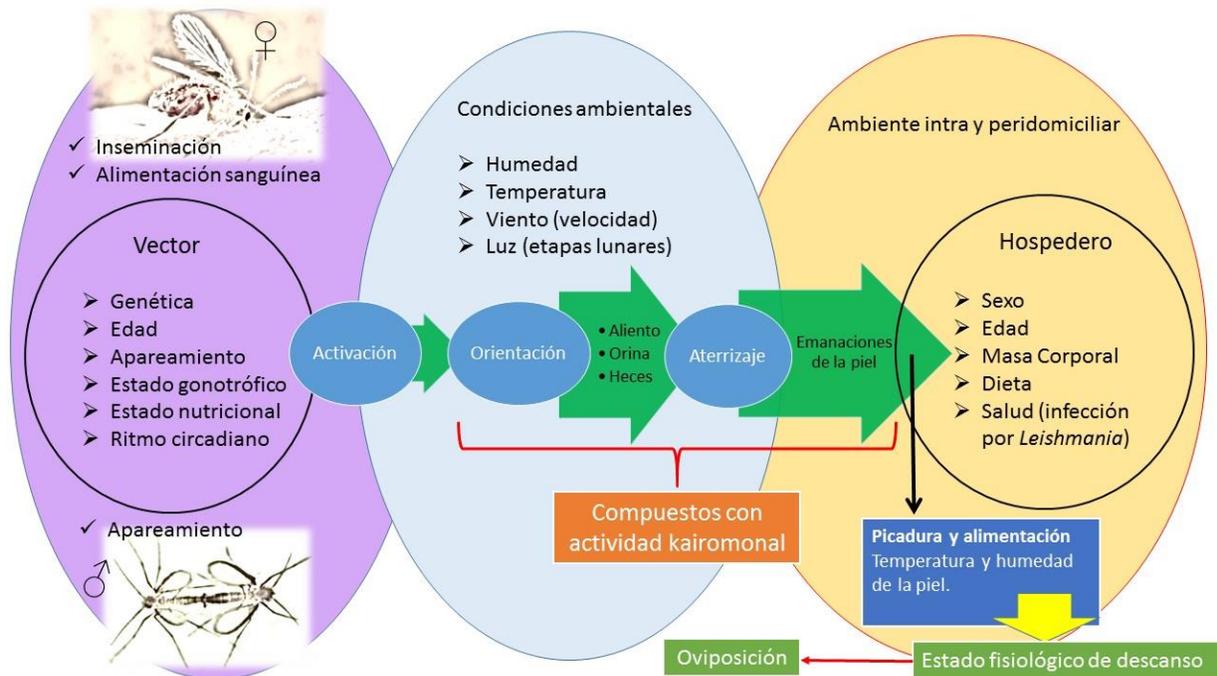
Como parte vital en la biología reproductiva de los insectos hematófagos, principalmente mosquitos, la alimentación sanguínea es el hábito esencial para la obtención de nutrientes como las proteínas para la producción de huevos y aptitud reproductiva. Además, es otra fuente de energía metabólica en adición a los azúcares de las plantas (Takken y Verhulst, 2013). Desde el punto de vista adaptativo, en el momento que la sangre se vuelve el recurso nutricional más importante de los insectos hematófagos, también ocurre una evolución parasítica paralela entre el hospedero vertebrado y el insecto, creando una fuerte dependencia hacia las señales específicas del hospedero para identificarlo exitosamente dentro de ambientes heterogéneos (Takken y Verhulst, 2013).

La búsqueda de hospedero es el proceso por el cual un insecto hematófago localiza un hospedero (Knols, 1996) e involucra una serie de factores tanto intrínsecos (propios del vector) como extrínsecos (ambientales y del hospedero). Las fases que conforman este proceso, son resumidas por Rebollar-Téllez (2005) en cuatro etapas: 1) Necesidad de alimentación (procesos fisiológicos internos), 2) activación, 3) orientación, y 4) aterrizaje (insectos voladores).

En la subfamilia Phlebotominae, aún no están bien definidos los factores que influyen en el proceso de búsqueda de hospedero, pero tratamos de resumirlo en la Figura 2.

## 2.5. Comunicación química

La comunicación química en insectos esta mediada por compuestos químicos volátiles denominados semioquímicos, dentro de los cuales se incluyen las feromonas y aleloquímicos como las kairomonas. Las feromonas son compuestos mediadores en la comunicación intraespecífica para fines reproductivos, agregación, alarma y oviposición (Kelly y Dye, 1997), mientras que las kairomonas son sustancias químicas que favorecen al receptor pero no al emisor en relaciones interespecíficas y cuyo fin es la obtención de alimento (Takken y Knols, 1999).



**Figura 2.** Estímulos y factores involucrados en la búsqueda de hospedero por flebotomíneos (Modificado de Torres-Estrada y Rodríguez, 2003 para mosquitos).

### 2.5.1. Quimiorrepción

En insectos, la detección de señales químicas (quimiorrepción) del ambiente se da a través de dos sistemas quimio-sensoriales: el gusto y el olfato. Los receptores gustativos se encuentran distribuidos en el cuerpo incluyendo palpos (órgano de Newstead) y otras partes de la boca; estos se encargan de la detección de compuestos no volátiles. Mientras que la olfacción conlleva una serie de niveles, iniciando con la percepción de semioquímicos (compuestos volátiles) en la periferia (antena, palpos bucales y maxilares), procesado de señales en el lóbulo antenal, integración olfatoria en el cerebro, y finalmente la conversión de señales olfatorias en comportamiento (Leal, 2013). Este mismo autor menciona que en el sistema olfativo, el código olfatorio pasa de un lenguaje químico del ambiente externo a un lenguaje eléctrico en el cerebro a través de diferentes tipos de receptores localizados en la periferia olfativa, neuronas receptoras olfativas (llamadas NROs) y una serie de eventos que incluyen, en orden de sucesión, la captación, unión, transporte e inactivación de odorantes, así como la activación del receptor y finalmente la transducción de la señal. Las NROs se encuentran dentro de “pelos olfativos” innervados denominados sénsulos olfativos, distribuidos sobre la antena y partes bucales (múltiples poros en la pared). Se han reportado varios tipos de sensilas, que de acuerdo a su función sensorial son clasificadas en olfativas, gustativas, mecanosensoriales, higrorreceptoras y termorreceptoras. Las NROs poseen dendritas que a su vez contienen receptores específicos para cada molécula odorífica. Para que una molécula de olor alcance la membrana de la dendrita, esta necesita atravesar los poros de la pared de la sensila, un sistema de canales o túbulos y posteriormente cruzar el espacio linfático acuoso interno que rodea a la dendrita (Steinbrecht, 1997; Steinbrecht y Stankiewicz, 1999). Para que

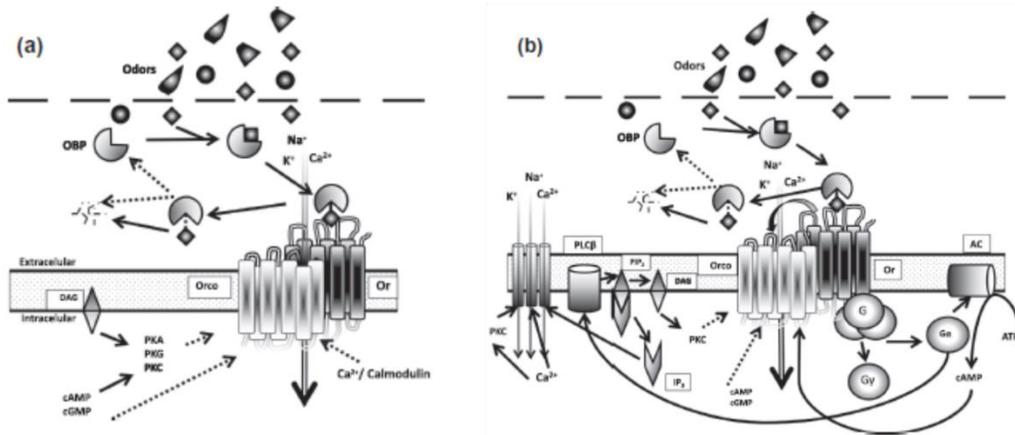
llegue al cerebro del insecto, las NROs poseen axones que forman dos nervios por antena, las cuales se fusionan para dirigirse hacia el cerebro (Figura 3).

A nivel molecular, existen diversos genes especializados en la expresión de proteínas involucradas en la recepción y procesamiento de olores en insectos dentro de las sensilas (Vogt, 2003). Las proteínas son: las enlazantes a olores, PEOs (en inglés, odorant binding proteins, OBPs); receptoras de olor, ROs (en inglés, olfactory receptor proteins, ORs); enzimas degradadoras de olor, EDOs (en inglés, odorant-degrading enzymes, ODEs); receptoras ionotrópicas, RIs (en inglés, ionotropic receptors, IRs); proteína neuronal sensorial de membrana, PNSMs (en inglés, sensory neuron membrane proteins, SNMPs); proteínas quimiosensoriales, PQS (en inglés, chemosensory proteins, CSPs) y; co-receptor de OR, CRRO (en inglés, olfactory receptor protein co-receptor, ORCO) (Leal, 2013). El proceso inicia con la entrada de moléculas al pelo sensorial vía poro-túbulo accediendo al espacio linfático interno donde se encuentran presentes las PEOs, las cuales solubilizan el semioquímico en cuestión (feromona, cairomona, alomona o sinomona) en la linfa a causa de la alta concentración de las proteínas, ayudando así, al transporte y a la presentación de las moléculas de olor a las ORs localizadas en la membrana de las dendritas o en su defecto una enzima. La molécula tiene un determinado tiempo de vida durante el cual se activan los receptores repetidamente hasta que es degradada por la ODE, ante esto, la dinámica de la respuesta es dependiente de la concentración de la proteína. La interacción entre las ROs y el olor disparan la cascada de transducción de señales que generarán una señal eléctrica que será transmitida al cerebro (Leal, 2005).



La señalización inicia en el complejo PEO-RO, a partir de ahí se han sugerido tres hipótesis para las siguientes etapas, resumidas por Guidobaldi y colaboradores (2014):

a) hipótesis ionotrópica, el heterómero RO-CROR forma un ligando no selectivo con el canal catiónico y lo activa estimulando la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  provocando un proceso de transducción de la señal ionotrópica (Nakagawa y Vosshall, 2009); b) ionotrópica en paralelo con la cascada metabotrópica, aquí el CRRO por sí mismo es el canal catiónico, el cual es activado en dos rutas. En la primera ruta, los ligandos de olor activan al RO el cual, posteriormente activa el canal CRRO. En la segunda ruta, la activación del RO resulta en activación de una proteína trimérica G y la adenilato ciclasa (AC), esto incrementa la concentración de AMPc (adenocil monofosfato cíclico) la cual provoca una corriente iónica solo después de la fosforilación previa de CRRO vía PKC (Proteína Kinasa C) (Wicher, et al., 2008); c) metabotrópica, el complejo olor-RO activa una proteína G y la fosfolipasa  $\text{C}\beta$  ( $\text{PLC}\beta$ ), generando un incremento de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) el cual incrementa la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de la activación del canal  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de  $\text{IP}_3$  (Stengl y Funk, 2013) (Figura 4). En las tres hipótesis se produce una despolarización local a causa de la apertura del canal  $\text{Ca}^{2+}$  o canales de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , produciendo un cambio en el potencial de la célula neuronal y la señal eléctrica es transmitida al sistema nervioso central por medio de potenciales de acción.



**Figura 4.** Modelos de transducción de una señal química. Una vez cruzado el poro-túbulo en la sensila por la molécula de olor, alcanzado el RO, ocurren una serie de etapas bioquímicas para transformar la señal química en eléctrica (Guidobaldi, et al., 2014).

### 2.5.2. Atracción intraespecífica (feromonas sexuales en Phlebotominae)

El término feromona deriva del griego *Pherein* (transferir) y *horman* (excitar), y se refiere a la producción y secreción al ambiente externo de una sustancia por un organismo, la cual provoca una reacción en el organismo receptor conoespecífico. Las feromonas son clasificadas de acuerdo a la respuesta que provocan. El estímulo químico que genera un cambio inmediato e irreversible en el comportamiento del receptor se denomina feromona conductual (en inglés, *releaser pheromone*) y aquel que induce un retraso y por lo tanto la respuesta tardía, se denomina feromona fisiológica (en inglés, *primer pheromone*). Así también, las feromonas pueden clasificarse en base al tipo de interacción que modulan, como feromona sexual, de

agregación, de alarma, de ruta y de marcaje, estas se agrupan dentro de las feromonas conductuales. Las feromonas son producidas por glándulas exocrinas y liberadas al exterior a través de conductos (Noirot y Quenedey, 1974). La distancia efectiva entre emisor y receptor es importante, porque dependerá de la volatilidad del compuesto, su estabilidad en el aire, la velocidad de difusión, la eficiencia del receptor y las corrientes de aire para que el mensaje sea recibido (Spiegel, et al., 2005).

Las feromonas sexuales tienen como objetivo final la reproducción. En flebotomíneos, se han identificado al menos tres grupos de feromonas sexuales producidas por diferentes poblaciones de *Lu. longipalpis*: i) 9-metil-germacreno-B (en Centro y Sudamérica), ii) 3-metil- $\alpha$ -himachaleno (en Brasil y Venezuela) y iii) isómeros de cembreno (en el Noreste de Brasil) (Hamilton, et al., 1994; Hamilton, et al., 1996a; b).

### **2.5.3. Atracción interespecífica (caiomonas)**

La palabra cairomona deriva del vocablo griego *Kairos*, que significa oportunista, explotador. Las cairomonas son sustancias químicas volátiles producidas, adquiridas o liberadas por un organismo como resultado de sus actividades (emisor), que al ser contactada por un organismo de otra especie en el contexto natural (receptor), provocará una reacción comportamental o fisiológica que será favorable para éste pero no para el emisor (Nordlund y Lewis, 1976). Ruther y colaboradores (2002) propusieron una clasificación de cairomonas de acuerdo a la función desempeñada y su efecto en el organismo beneficiado, catalogándolas como sigue:

- a) De forrajeo: localización de alimento. P. ej. búsqueda de hospedero por un insecto hematófago para obtener alimentación sanguínea.
- b) De evasión del enemigo: reducción del impacto negativo de un enemigo natural. P. ej. la respuesta de escape del zooplancton ante la presencia de predadores potenciales (larvas de mosquitos o peces planctívoros).
- c) Sexuales: propósito sexual. P. ej. uso de volátiles emitidos por el huésped para la localización de pareja.
- d) De agregación: atracción y/o arresto de ambos sexos de un organismo. P. ej. la atracción de machos y hembras de flebotomíneos a volátiles emitidos por el huésped.

De acuerdo al efecto sobre el organismo beneficiado, las caimonomas también se dividen en comportamentales (*releaser*) y fisiológicas (*primer*), con el mismo significado que en feromonas.

## **2.6. Compuestos sintéticos evaluados en flebotomíneos**

La quimiorrecepción caimonomal en flebotomíneos se da a través de receptores localizados en las antenas y palpos principalmente (Dougherty, et al., 1999), con la finalidad de hallar un hospedero vertebrado (recurso sanguíneo) en campo (Cambell-Lendrum, et al., 1999). Entre los compuestos químicos producidos por un huésped vertebrado destacan el CO<sub>2</sub>, 1-octen-3-ol, ácido láctico, ácido butírico, ácido caproico y amonio como los más importantes para atraer a insectos hematófagos (Logan y Birkett, 2007). Sin embargo, dado el carácter generalista de algunos estímulos (p. ej. CO<sub>2</sub>), es improbable la atracción de individuos de una sola especie, edad o sexo (Ryelandt, et

al., 2011). La atracción de flebotomíneos hacia un hospedero se da primeramente por las concentraciones de CO<sub>2</sub> (Cambell-Lendrum, et al., 1999). Aunque se ha reportado la atracción hacia otros olores emanados por el hospedero (Andrade, et al., 2008; Bray, et al., 2010b; Pinto, et al., 2001; 2011).

### **2.6.1. Uso de cebo humano: pros y contras**

La técnica de recolección de mosquitos con cebos humanos ha resultado útil en muestreos de campo debido a su alta eficiencia de captura (Moreno, et al., 2002). En flebotomíneos, ha permitido realizar la búsqueda de hospederos preferenciales de varias especies de *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, mediante la exposición de varios mamíferos, incluido el humano (Quinnell, et al., 1992; Bongiorno, et al., 2002). Los cebos humanos son usados principalmente cuando se necesita identificar las especies antropofílicas presentes y la fluctuación en sus tasas de picaduras anuales (Rebollar-Téllez, et al., 1996; 1999; Pérez, et al., 2014). Sin embargo, aunque la tasa de infección sea muy baja, el cuantificar el número de picaduras por unidad de tiempo incrementa el riesgo de contraer la enfermedad (Pérez, et al., 1988). Por diversas razones, la efectividad del uso de cebo humano en investigaciones de especies de importancia médica es éticamente cuestionable. La exposición de humanos en ambientes de transmisión de leishmaniasis u otra enfermedad transmitida por vector (ETV) conlleva ciertas consideraciones éticas que se han ido incrementando en países donde las ETVs son realmente un problema de salud, p. ej. Brasil (Andrade, 2006).

La trampa tipo Shannon con cebos humanos se ha empleado siempre en asociación con trampas de luz tipo CDC y trampas Disney en estudios faunísticos de Phlebotominae. Inicialmente, la trampa tenía un compartimento central donde se

localizada el cebo humano inmóvil, y la trampa era suspendida con cuerdas atadas a los árboles cercanos (Shannon, 1939). Posteriormente, Pérez y colaboradores (1988) modificaron la técnica, dándole movilidad al cebo, facilitando la recolección de los insectos, aunque debidamente protegido con un mosquitero para la cabeza, mangas largas y guantes.

El uso de trampas de luz en campo son una forma mucho más práctica y útil de sustituir el problema ético de la exposición de humanos, como cebo para el monitoreo de flebotomíneos. A través de estas trampas se puede conocer la diversidad y abundancia relativa de varias especies, así como determinar la necesidad de aplicar algún programa de control al medir la tasa de inóculo con *Leishmania*, valorar los mejores tiempos y lugares para la aplicación de insecticidas y evaluar las medidas de control y vigilancia, y medir la tasa o número de flebotomíneos capturados por tiempo de exposición (Alexander, et al., 1995a; b; Davies, et al., 1995).

Las trampas de luz pueden ser las más adecuadas para varias especies de mosquitos, mientras que para los flebotomíneos las capturas son variables por el nivel de antropofilia y fototaxia entre especies, p. ej. hembras de *Lu. cruciata* son mayormente atraídas a cebos humanos (antropofilia) que a cebos luminosos (fototropismo) como *Lu. verrucarum*. También el estado fisiológico del insecto tiene un papel importante (Davies, et al., 1995). Otra desventaja que presenta este tipo de trampa es el rango limitado de atracción (<2.5 m) (Killick-Kendrick, et al., 1985), mientras que el rango de atracción hacia cebos humanos es de aproximadamente 5 m (Davies, et al., 1995). Sin embargo, las trampas de luz pueden ser mejoradas mediante la provisión y combinación de los factores involucrados en la atracción hacia cebos humanos y luminosos (Wheeler, et al., 1996).

Varios autores reportan que las especies de hábitos antropofílicos como *Lu. cruciata* son capturadas en altas cantidades en trampas tipo Shannon con cebos humanos, llegando a registrar capturas de hembras 30 veces más altas que en trampas de luz (Biagi, et al., 1966; Cruz-Ruiz, et al., 1994; Rebollar-Téllez, et al., 1996; Pech-May, et al., 2010; Sánchez-García, et al., 2010; Pérez, et al., 2014). Mientras que los machos son mayormente capturados en trampas de luz (Pérez, et al., 2014). Es probable que la gran cantidad de hembras capturadas sea debido al contexto en que actúa la trampa, capturando las hembras que se encuentren durante el proceso de búsqueda de hospedero (Alexander, 2000).

Pese a la alta diversidad de volátiles presentes en la piel humana (400 compuestos aproximadamente), solo 20 a 90 de ellos se encuentran en la superficie de la piel a la temperatura corporal natural (Dormont, et al., 2013). Sin embargo, solo cinco han sido evaluados con mayor frecuencia en insectos hematófagos por su poder atractivo.

### **2.6.2. CO<sub>2</sub>**

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es el principal compuesto químico liberado constantemente por los vertebrados. El ser humano, a través la respiración, exhala cerca de 4.5% (45000 ppm) de CO<sub>2</sub>, relativamente alto en comparación con los valores ambientales (~300-400 ppm) (Ver referencias en Rebollar-Téllez, 2005). El CO<sub>2</sub> es un poderoso atrayente y activador para muchos insectos hematófagos incluyendo flebotomíneos (Lehane, 1991; Pinto, et al., 2001). El uso de este gas en campo resulta impráctico, difícil de transportar y usar, necesita de recipientes especiales para su

liberación y posee corta vida útil (Beavers, et al., 2004). El empleo del CO<sub>2</sub> como aditivo en las trampas de luz tipo CDC incrementa de manera efectiva (dos a tres veces) las capturas de flebotomíneos de hábitos antropofílicos y zoofílicos principalmente (Chaniotis, 1983; Pareja, 2010). Aunado a este hallazgo, las especies *Lu. intermedia* y *Lu. whitmani* denotan una atracción en dosis-respuesta a trampas de luz cebadas con CO<sub>2</sub>, i.e. a mayor cantidad de CO<sub>2</sub> liberado, mayor número de insectos capturados (Pinto, et al., 2001).

### **2.6.3. 1-octen-3-ol (octenol) y otros alcoholes primarios**

El 1-octen-3-ol es un compuesto volátil presente en bovinos y respiración humana (Hall, et al., 1984; Bernier, et al., 2000). Esta caïromona ha demostrado tener potencial en la atracción de varias familias de dípteros hematófagos zoofílicos, como Tabanidae, Ceratopogonidae, Culicidae y Muscidae (Gibson y Torr, 1999). Por su parte, en la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae, se ha demostrado electrofisiológicamente que existen receptores para 1-octen-3-ol en las antenas de hembras de *Lu. longipalpis*, además de evocar una respuesta concentración-dependiente (Sant´ana, et al., 2002). En campo, se ha evidenciado su efectividad como aditivo en trampas de luz para atraer a flebotomíneos de la especie *Psathyromyia shannoni* (Dyar) (= *Lutzomyia shannoni*) y *Nyssomyia neivai* (Pinto) (= *Lutzomyia neivai*), esta última en concentración-dependencia (Mann, et al., 2009; Pinto, et al., 2011). Andrade, et al. (2008) reportaron mayores capturas de machos que de hembras de *Lu. longipalpis* al 1-octen-3-ol liberado a 15 mg/h, mientras que en *Lu. intermedia* ocurrió de manera inversa pero a 5 mg/h. Aunque estos autores, también demostraron que el 1-

octen-3-ol liberado a 5 mg/h combinado con formulación BG-Mesh-Lure (Biogents GmHb, Alemania) es atractivo para hembras y machos de ambas especies. Por su parte, las especies de flebotomíneos del Viejo Mundo, *Ph. papatasi* y *Ph. argentipes*, parecen no responder al 1-octen-3-ol, observándose una mayor atracción hacia las trampas cebadas con CO<sub>2</sub> (Cameron, et al., 1991; Beavers, et al., 2004).

Además del 1-octen-3-ol se ha demostrado, bajo condiciones de laboratorio, que hembras y machos de *Lu. longipalpis* son atraídos hacia otros alcoholes primarios como 1-nonanol y 1-heptanol (Magalhães-Junior, et al., 2014). El origen de estos alcoholes no está directamente asociado con la respiración u olores de la piel, derivando en la falta de interés como atrayente para insectos vectores (Magalhães-Junior, et al., 2014). El 1-heptanol se ha encontrado en hidrolizados de plumas de pollo (DeMilo, et al., 1997), mientras que el 1-nonanol se halló en sudor humano incubado por 42-52 h (Meijerink, et al., 2000). La actividad del 1-heptanol y 1-nonanol ha sido previamente evaluada en otros insectos de importancia médica como *Triatoma brasiliensis* (Vitta, et al., 2009) y *Haematobia irritans* y *Stomoxys calcitrans* (Birkett, et al., 2004) respectivamente.

#### **2.6.4. Ácido láctico**

El ácido láctico es uno de los principales compuestos químicos constituyentes del sudor de la piel y exhalación humana (Acree, et al., 1968; Geier, et al., 1999). Este compuesto es más abundante en la piel de humanos que en otros mamíferos (Allen y Blight, 1969), dicha diferencia puede deberse a la densidad y actividad de glándulas sudoríparas ecrinas, así como del pH de la piel (Dekker, et al., 2002). El ácido láctico es utilizado por diversos insectos hematófagos durante la búsqueda de hospedero

(Rodríguez-Cotta, 2001). El efecto del ácido láctico sobre flebotomíneos, únicamente se ha estudiado en *Lu. longipalpis* y *Lu. intermedia* (Andrade, et al., 2008; Pareja, 2010). Andrade, et al. (2008), observaron que para la población de *Lu. longipalpis* de Brasil no hubo diferencia significativa de las capturas de machos y hembras con respecto al control, mientras que para *Lu. intermedia*, los machos presentaron mayor atracción hacia este compuesto. En contraste, Pareja (2010) encontró que las hembras de *Lu. longipalpis* de una población de Colombia fueron atraídas hacia la concentración de 1.0% de ácido láctico, destacando que la atracción hacia este compuesto pueda incrementarse a concentraciones menores al 1.0%. Aunque exhibe un efecto sinérgico junto con otros compuestos presentes en la piel humana como el CO<sub>2</sub> y el amonio para atraer a mosquitos de la especie *Aedes aegypti* (Geier, et al., 1999).

#### **2.6.5. Amonio**

El amonio es un compuesto que se encuentra presente en los efluvios de vertebrados, incluida la respiración humana (120 ppm – 1170 ppm) (Larson, et al., 1979; Norwood, et al., 1992), así como en las secreciones de glándulas ecrinas distribuidas en la piel (0.7-25 nmol/l de amonio) (Pareja, 2010) y orina (Putnam, 1971). El amonio ha demostrado actividad atrayente hacia artrópodos hematófagos de las familias Tabanidae (*Hybomitra lasiophthalma*) y Reduviidae (*Triatoma infestans*) (Hribar, et al., 1992; Taneja y Guerin, 1997). En mosquitos de la especie *Aedes aegypti*, el amonio no genera respuesta alguna, sin embargo, resulta ser atractivo cuando se presenta en concentraciones entre 17 ppb y 17 ppm en aire junto con ácido láctico (Geier, et al., 1999).

Para flebotomíneos, evaluado de forma individual en condiciones de laboratorio, Pareja (2010) mostró que hembras de *Lu. longipalpis* provenientes de una población de Colombia fueron atraídas hacia la concentración de 10%. Sin embargo, cuando se evaluó en campo de manera individual, no tuvo efecto atrayente para individuos de *Lu. longipalpis* y *Lu. intermedia* en campo (Andrade, et al., 2008). Mientras que al presentarlo en mezcla (ácido láctico al 0.1% + ácido butírico al 1.0% + amonio al 10%) capturó cantidades similares de *Lu. longipalpis* en campo (Pareja, 2010).

#### **2.6.6. Ácido butírico**

Los ácidos grasos de cadena corta (C1 a C18) únicamente actúan de manera sinérgica con otros compuestos como el ácido láctico, incrementando su respuesta. En mosquitos, no se evoca respuesta cuando se combinan ácido butírico (C4) con ácido láctico, aunque en concentraciones bajas o medias pueden ser más efectivos (Geier, et al., 2002).

En flebotomíneos, Pareja (2010) evaluó la atracción de hembras de *Lu. longipalpis* hacia diferentes concentraciones de ácido butírico en laboratorio, observando que más del 50% de individuos evaluados respondieron a la concentración de 0.1%. Sin embargo, no hubo diferencia significativa con respecto al control.

#### **2.6.7. Ciclopentanona**

La ciclopentanona es un compuesto recientemente descubierto como atrayente para *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Tauxe, et al., 2013). Esta cetona con olor

a menta, usada como saborizante o fragancia y reconocida como segura para el humano, fue capaz de generar respuesta en la neurona receptora olfatoria conocida como cpA, presente en las sensilas claviformes (en inglés, capitata peg) localizadas en los palpos maxilares de estas especies de mosquitos. La neurona cpA de ambos mosquitos respondió a estímulos de ciclopentanona a 0.01%, mientras que en experimentos de semicampo, *Cx. quinquefasciatus* respondió en dosis-dependencia, con capturas similares en trampas usando CO<sub>2</sub> como cebo (Tauxe, et al., 2013). Estos resultados sugieren su factibilidad de usarlo en programas de control y vigilancia para estas especies de mosquitos de importancia médica.

En Phlebotominae no existe evidencia de su evaluación en condiciones de laboratorio y campo.

En base a lo descrito anteriormente, en este trabajo se propositieron las siguientes hipótesis y objetivos.

### 3. HIPÓTESIS

- Hipótesis general

Sí los insectos hematófagos antropofílicos son atraídos a componentes químicos volátiles del huésped, entonces al ser *Lutzomyia cruciata* una especie antropofílica ésta responderá de manera semejante.

- Hipótesis específicas

H<sub>1</sub>: Las caïromonas 1-octen-3-ol (octenol), ácido láctico, ácido butírico, acetato de amonio y ciclopentanona evaluadas individualmente en laboratorio, atraen un mayor número de hembras de *Lu. cruciata* con respecto al control.

H<sub>2</sub>: Las caïromonas 1-octen-3-ol (octenol), ácido láctico, ácido butírico, acetato de amonio y ciclopentanona al ser usadas como cebos pueden mejorar la eficiencia de las trampas de luz CDC para capturar poblaciones silvestres de *Lu. cruciata* y otras especies de flebotomíneos.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar en laboratorio y campo a compuestos cairomonales, reconocidos en otros insectos hematófagos, como atrayentes de *Lutzomyia cruciata*.

#### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

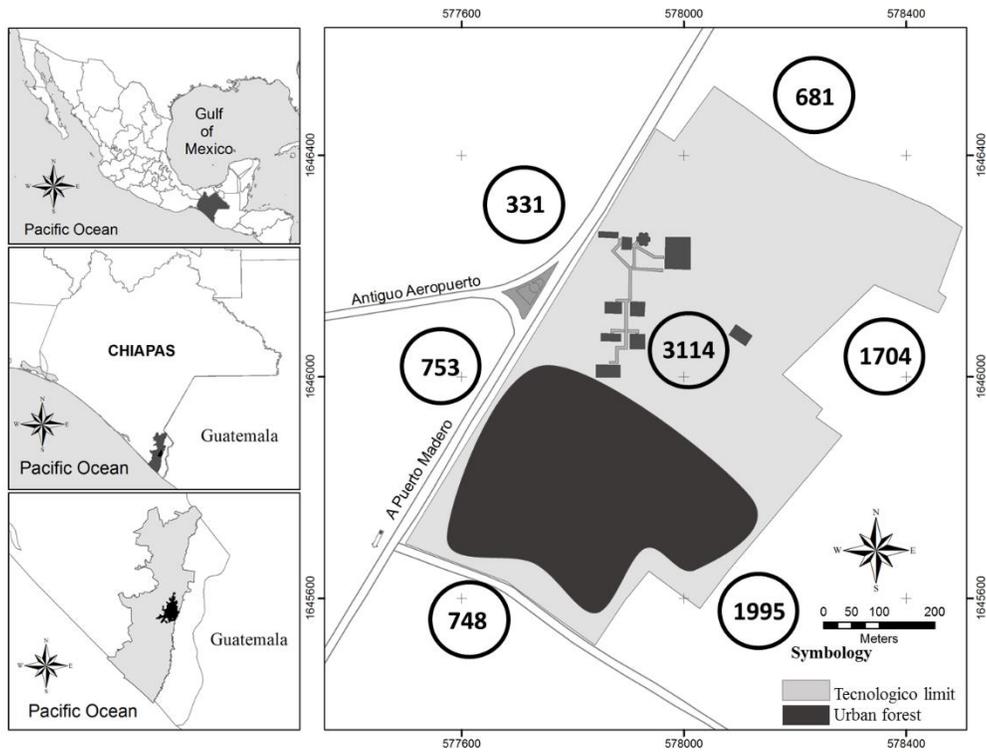
1. Evaluar en laboratorio, la atracción de hembras silvestres de *Lu. cruciata* hacia diferentes concentraciones de 1-octen-3-ol (octenol), ácido láctico, ácido butírico, acetato de amonio y ciclopentanona, compuestos previamente descritos como atrayentes de otras especies de insectos hematófagos antropofílicos.
2. Comparar la eficiencia de diferentes compuestos cairomonales cuando son usados como cebos para capturar poblaciones silvestres de *Lu. cruciata* y otras especies de flebotomíneos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Sitio de estudio

Los experimentos de campo se realizaron en un área arbolada localizada dentro de la zona urbana del municipio de Tapachula, Chiapas, México (160 msnm, 14°53'10.02"N 92°16'36.20"O) (Figura 5). No existen antecedentes previos sobre especies de flebotomíneos presentes en esta ciudad, ni tampoco registro de casos clínicos de leishmaniasis. El sitio forma parte de las áreas verdes del Instituto Tecnológico de Tapachula y está constituido por acahuales de más de 20 años de antigüedad, donde se observan la presencia de árboles y arbustos de varias especies, entre las que predominan *Mangifera indica*, *Theobroma cacao* y *Coffea* sp. (DGEST-SEP, 2011) (Figura 6). Por su parte, la diversidad de vertebrados en el sitio es desconocida, aunque podrían ser un recurso sanguíneo para los flebotomíneos y posibles reservorios de la enfermedad (Young y Arias, 1992; Rotureau, 2006). El sitio está rodeado por casas habitación que poseen condiciones de energía eléctrica, iluminación pública, y animales de crianza como gallinas, cerdos, patos entre otros y mascotas como perros y aves que habitan en los patios.

El clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano, con un rango de temperaturas de 14 a 30°C y precipitación de 1,000 a 5,000 mm anuales. Presenta una temporada de lluvias (mayo-octubre) y una de estiaje (noviembre-abril) (INEGI, 2014).



**Figura 5.** Ubicación del sitio de estudio en el municipio de Tapachula, Chiapas, México.

Los números dentro de los círculos indican la densidad poblacional humana.



**Figura 6.** Vista panorámica del interior del sitio de muestreo situado en la zona urbana del municipio de Tapachula, Chiapas, México.

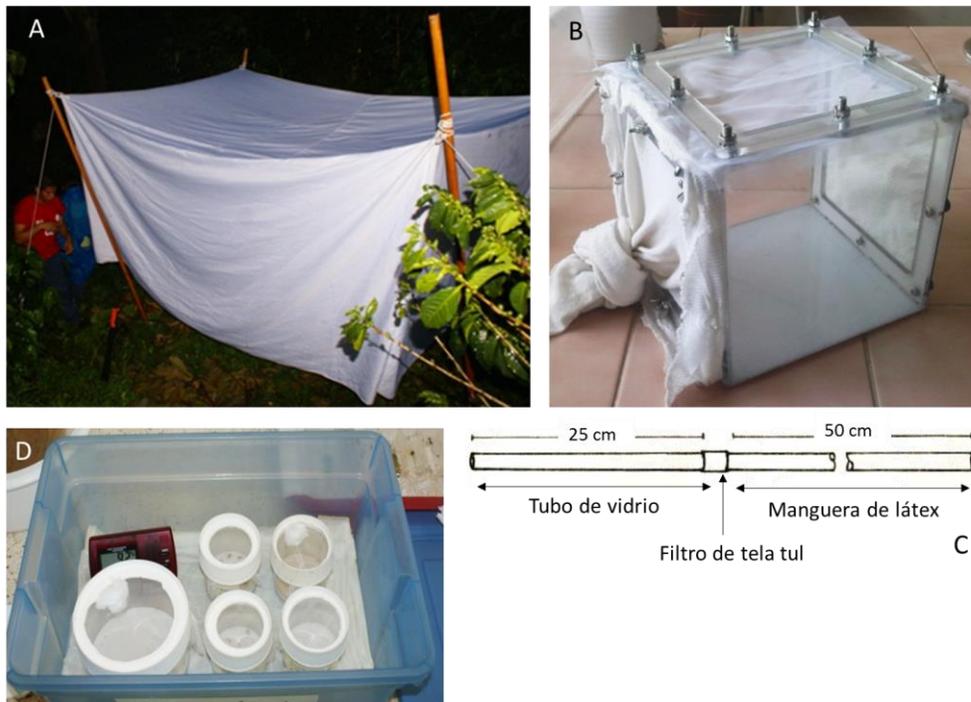
En este trabajo, los experimentos fueron realizados durante los meses de febrero a mayo y octubre a noviembre de 2014. Dado que este es el primer registro de capturas en zonas urbanas en la región, no existen datos de la dinámica poblacional de flebotomíneos. En capturas previas a la realización de los experimentos (trampas CDC y Shannon), *Lu. cruciata* se presentó en alta abundancia (98.8%, n=1424). El 100% de especímenes capturados con la trampa Shannon fueron de esta especie.

## **5.2. Captura y mantenimiento de insectos en laboratorio**

En este estudio se evaluaron hembras silvestres recolectadas por aspiración manual dentro de una trampa tipo Shannon modificada por Pérez, et al. (1988), la cual consiste de una carpa de forma rectangular sin base (2.5 x 1.6 x 1.6 m), confeccionada con manta color blanco, la cual es sujeta a los árboles aledaños para suspenderla a 30-50 cm del suelo (Figura 7A). En su interior permanecieron de dos a tres personas, las cuales actúan como cebo, con vestimentas adecuadas para protegerse de la picadura de flebotomíneos y mosquitos (protección en cabeza y extremidades). El funcionamiento de esta trampa se basa en la combinación de atrayentes de largo y corto alcance que son utilizados por los insectos durante la búsqueda de hospedero, los cuales son principalmente el CO<sub>2</sub> exhalado por humanos, la temperatura corporal y olores corporales (Alexander, 2000; Rebollar-Téllez, 2005). Los insectos atraídos por el cebo ingresan a la trampa por la parte inferior (espacio entre el suelo y la trampa), se dirigen al hospedero en un intento de alimentación y posteriormente se posan en las paredes internas de la trampa, donde fueron recolectados con la ayuda de aspiradores bucales (entomológicos) (Figura 7C) e introducidos en jaulas de plástico (20 x 20 x 20

cm), con base de color blanco y dos aberturas: la parte superior está cubierta con tela tul para proporcionarle agua y azúcares a los adultos y permitir la respiración; la parte frontal está sellada con una manga de tela con una abertura en el centro para permitir la introducción y remoción de los insectos además la sección opuesta a la manga está forrada con papel toalla como sitio de reposo (Figura 7B). Los especímenes fueron recolectados durante la noche (19-21 h), horario de mayor actividad reportado para flebotomíneos de México (Biagi, et al., 1966; Rebollar-Téllez, et al., 1996; Pérez, et al., 2014). Las hembras capturadas se transfirieron a botes de policarbono de 500 ml (Nalgene®, Thermo Fisher Scientific Inc. U.S.A) con fondo de yeso húmedo en cada bote (Figura 7D) para mantener las condiciones de humedad y trasladarlos al insectario de El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Tapachula.

Se les proporcionó una mota de algodón humedecida con una solución de sacarosa al 20%, colocada en la parte superior del bote. En el insectario se mantuvieron a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80 \pm 5\%$  HR y fotoperiodo de 12:12 (L:O) hasta su uso en las evaluaciones de laboratorio.



**Figura 7.** Trampa Shannon usada en las capturas de hembras en campo. A) Trampa Shannon; B) Jaula con hembras capturadas; C) Aspirador entomológico; D) Recipiente para mantenimiento en laboratorio.

### 5.3. Bioensayos en laboratorio

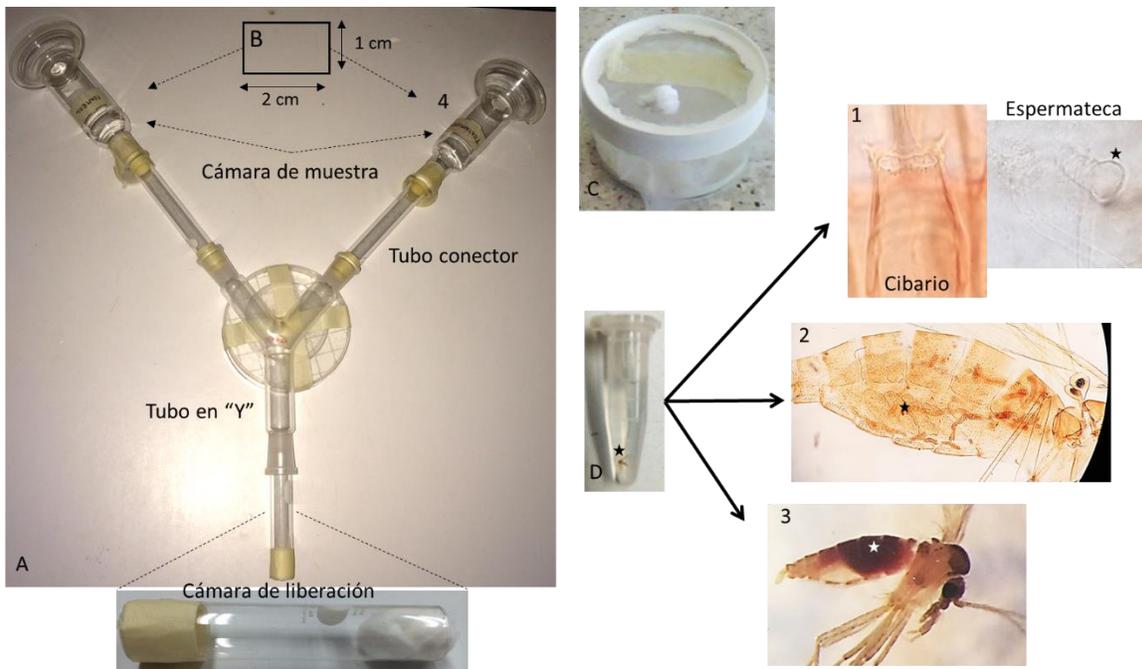
La atracción de hembras hacia las cairomonas se determinó en un olfatómetro tipo “Y”. Este aparato consiste de un tubo de vidrio en forma de “Y” (30 mm, d.i.), con un tallo de 15 cm de largo ramificado en dos brazos de 10 cm de largo separados entre sí por un ángulo de 65°. El olfatómetro fue colocado horizontalmente en superficie sólida de color blanco y evitando cualquier tipo de vibraciones y corrientes de aire que pudieran afectar el bioensayo. En cada uno de los brazos se añadió un tubo de vidrio de 17 cm usado como conector entre el tubo “Y” y la cámara de vidrio (11 cm de longitud) correspondiente, en la cual se colocó el estímulo o control (Figura 8A). El

bioensayo se realizó sin flujo de aire, el transporte del compuesto hacia el insecto ocurrió por difusión simple. Se emplearon 30 hembras, expuestas individualmente al estímulo (30 replicas). La cámara de liberación consistió de un tubo de vidrio (17 mm, d.i.) de 11.5 cm de largo, forrado la base con tela tul para evitar el estrés en el insecto, y en el otro orificio se situaba una mota de algodón para evitar la salida del insecto (Figura 8A).

La evaluación del comportamiento de la hembra de *Lu. cruciata* frente al estímulo se realizó mediante su mantenimiento en el puerto de liberación del olfatómetro para su aclimatación durante 5 minutos pre exposición al compuesto, durante este tiempo se impregnó una pieza de papel filtro Whatman #2 (1 x 2 cm) con 30  $\mu$ l de la sustancia a evaluar, el rectángulo de papel filtro se colocó en uno de los brazos del olfatómetro y en el otro brazo el control correspondiente al solvente del semioquímico (agua destilada o hexano). Finalizado el tiempo de aclimatación de la hembra de *Lu. cruciata*, el puerto de liberación fue conectado al tubo “Y” para la observación y registro del comportamiento de la hembra al estímulo. En cada repetición la hembra fue reemplazada y se alternó cada dos repeticiones la posición del tratamiento en los dos puertos de la “Y” con el fin de evitar sesgos de posición. El tiempo de observación para cada bioensayo fue de 2 minutos, tiempo estimado de saturación del medio interno del tubo “Y”, éste tiempo se definió en base a la duración de saturación del tubo “Y” por humo blanco producto de la reacción de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y  $\text{HCl}$  en el interior de una de las cámaras de muestra. El tubo “Y” y los aditamentos de este fueron lavados con etanol al 96% y secados a  $121^\circ\text{C}$  por 5 minutos para asegurar la evaporación del solvente. Este procedimiento se realizó cada

dos repeticiones, para cada vez que cambiaba de concentración o de compuesto para evitar posible sesgos.

Los experimentos fueron realizados en las horas reportadas de mayor actividad para *Lu. cruciata* en campo, desde las 19:00 hasta las 21:00 horas (Rebollar-Téllez, et al., 1996; Pérez, et al., 2014). Se utilizó un cuarto oscuro con una temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  y humedad relativa de  $65 \pm 5\%$ , respectivamente, tratando de simular las condiciones de campo.



**Figura 8.** Desarrollo de los bioensayos en laboratorio. A) Esquema general del olfatómetro usado en este estudio; B) Trozo de papel filtro; C) Bote de policarbono para traslado y mantenimiento en laboratorio; D) Vial con alcohol 70% conteniendo al insecto, 1) identificación taxonómica, 2) presencia de huevos, 3) alimentación sanguínea.

### 5.3.1. Compuestos sintéticos evaluados

Las caïromonas evaluadas fueron las siguientes: 1) 1-octen-3-ol (octenol); ácido láctico; ácido butírico; acetato de amonio; ciclopentanona. Todas se evaluaron en las concentraciones siguientes: 0.001, 0.01, 0.1 y 10%.

**Cuadro 1.** Compuestos y disolventes usados en los bioensayos en laboratorio.

Compuesto	Marca	Pureza (%)	Disolvente
1-octen-3-ol	Sigma-Aldrich	98	Hexano
Ácido láctico	Sigma-Aldrich	88	Agua
Ácido butírico	Sigma-Aldrich	99	Agua
Acetato de amonio	J.T. Baker	98.1	Agua
Ciclopentanona	Sigma-Aldrich	99	Agua
Hexano	J.T. Baker	95	

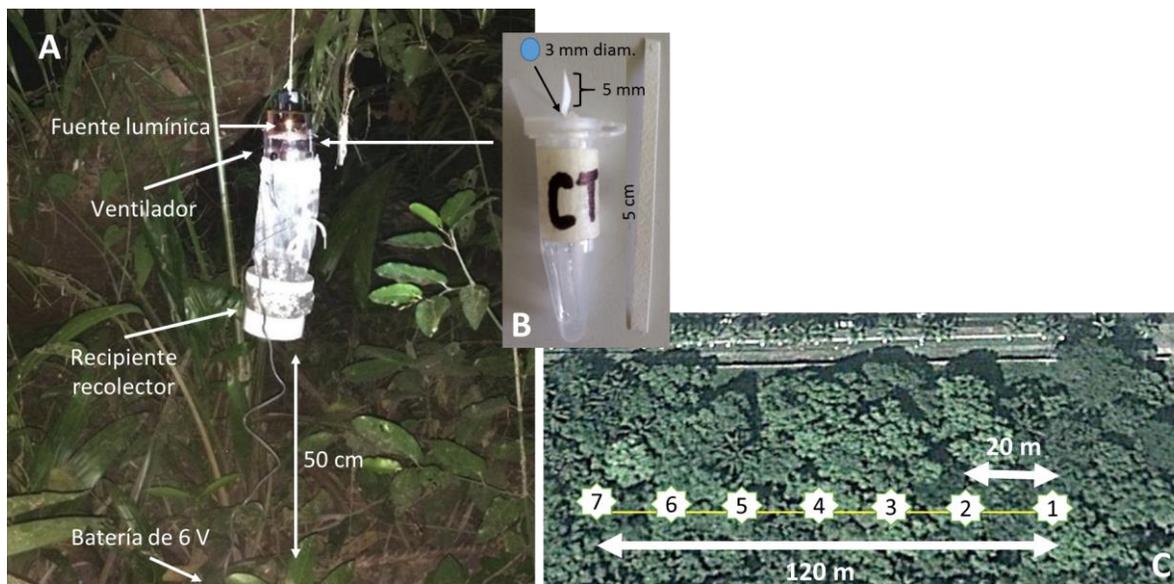
### 5.4. Bioensayos en campo

#### 5.4.1. Tasas de liberación

Se determinaron las tasas de liberación de las caïromonas evaluadas en campo usando el dispositivo diseñado y en condiciones naturales. Se pesó el vial con aceite mineral al iniciar y posteriormente se pesó el vial con aceite mineral más el compuesto en intervalos de 30 minutos durante dos horas (18:30 - 20:30 h). Al peso del vial con aceite más el compuesto se le restó el peso del vial con solo aceite mineral para obtener el peso del compuesto al iniciar la prueba y luego al peso inmediatamente anterior se le restó el siguiente, y así sucesivamente.

### 5.4.2. Trampa

La trampa CDC (Modelo 512; John W. Hock Co., Gainesville, FL, U.S.A) consta de un cuerpo cilíndrico elaborado con dos tipos de tela, una sección con tela tul y otra con tela estilo camuflaje, y termina en un recipiente recolector de plástico con malla metálica en la base para permitir el flujo de aire pero impermeable para los flebotomíneos. Una fuente de luz constituida por un bombillo tubular de luz amarilla y de bajo consumo (6.3 Volts) que atrae a los insectos presentes en los alrededores. La fuente de energía está compuesta por una batería sellada recargable de 6 Volts, que alimenta un motor que a su vez acciona a un ventilador inverso que succiona insectos vivos y los mantiene íntegros y atrapados en el recipiente recolector (Figura 9A).



**Figura 9.** Instalación y arreglo de las trampas de luz tipo CDC en campo. A) trampa de luz y sus constituyentes; B) dispensador de la cairomona; C) arreglo de las trampas.

### 5.4.3. Diseño experimental del experimento de campo

Las trampas fueron suspendidas en arbustos con el recipiente recolector a 50 cm del suelo aproximadamente (Figura 9) (Sudia y Chamberlain, 1962), siendo instaladas de 18:30 a 20:30 h. A cada trampa se le adicionó un dispositivo liberador conteniendo 100  $\mu$ l de una sustancia como cebo y 100  $\mu$ l de aceite mineral y se etiquetó el recipiente recolector y el dispositivo con el motor de acuerdo al compuesto evaluado, para evitar sesgos o posible respuesta cruzada ocasionada por la combinación de olores. Únicamente las concentraciones indicadas en el cuadro 1 se evaluaron en esta etapa. Cada semioquímico fue mezclado con aceite mineral para disminuir su evaporación. Como control se usó una trampa con aceite mineral.

El dispensador constaba de un tubo Eppendorf® de 2.5 ml, con una perforación de 3 mm de diámetro en la tapa en la que se insertó una tira de papel filtro de 5 mm de longitud por 3 mm de ancho que entraba en contacto con la mezcla compuesto-aceite mineral y quedaba expuesto aproximadamente 5 mm para permitir la liberación del compuesto; el dispensador se colocó a un lado del motor de la trampa CDC (Figura 9A). El dispositivo utilizado fue modificado del descrito por Kemme, et al. (1993) (Figura 9B).

En total se evaluaron siete tratamientos en campo (seis semioquímicos y un control) usando un diseño experimental de cuadrado latino 6x6, con este diseño se eliminan dos fuentes de variación (día y sitio) que podrían afectar las capturas, incrementando su eficiencia mediante el bloqueo de los días (Odulaja y Abu-Zinid, 1997), el diseño se usó para asegurar que las medias de las capturas fueran consecuencia de cada uno de los tratamientos. Los tratamientos de los seis sitios fueron alternados cada noche, hasta que cada tratamiento ocupara un sitio diferente de

manera sucesiva, las trampas se rotaron por los seis puntos de muestreo durante 18 noches no consecutivas, ocupando cada trampa tres veces el mismo sitio. Las trampas fueron colocadas separadamente entre sí por 20 m a lo largo de transecto lineal de 100 m (Figura 9C), distancia suficiente considerando el rango de atracción de las trampas de luz (<2.5 m) (Campbell-Lendrum, et al., 1999) y el rango de atracción de los flebotomíneos antropofílicos hacia cebos humanos (<10 m) (Davies, et al., 1995). Los flebotomíneos capturados fueron colocados dentro de viales conteniendo alcohol al 70% hasta su montaje e identificación.

### **5.5. Montaje e identificación de flebotomíneos**

Los insectos fueron procesados mediante el método descrito por Ibáñez-Bernal (2005a) para preparaciones permanentes en resina Euparal® (Bioquip Products, Rancho Domínguez, CA, U.S.A.) y posteriormente identificados morfológicamente usando las claves de Ibáñez-Bernal (1999; 2003; 2005a; 2005b) para Phlebotominae de México.

### **5.6. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron organizados en bases de datos en Microsoft Excel. La respuesta de las hembras de *Lu. cruciata* hacia los semioquímicos en los bioensayos en laboratorio se analizó mediante una prueba G con corrección de Williams (Sokal y Rohlf, 1995) en Microsoft Excel. Los datos del estado fisiológico (gravidez o alimentación) en relación al tipo de respuesta, se insertaron en una tabla de

contingencia de doble entrada y se analizaron mediante una prueba de independencia  $\chi^2$ . Las capturas entre tratamientos fueron analizadas mediante un análisis de varianza ANOVA, empleando el software R (R Core Team, 2014). El valor LR Chisq (Likelihood Ratio Chi-Squared) obtenido del ANOVA, se refiere al coeficiente de probabilidad chi-cuadrado originado del análisis del modelo lineal generalizado para el diseño experimental en cuadrado latino.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Bioensayos en laboratorio

600 hembras de *Lu. cruciata* fueron recolectadas en campo y usadas en pruebas de laboratorio.

Se encontraron 21 hembras con sangre en el abdomen y 275 hembras grávidas (presencia de huevos). Sin embargo, ambos estados fisiológicos no afectaron la respuesta en el olfatómetro tipo “Y” en comparación con hembras no gravidas ( $P>0.05$ ) o no alimentadas ( $P>0.05$ ) (Cuadro 2).

En las pruebas de laboratorio, las hembras silvestres de *Lu. cruciata* fueron atraídas significativamente a la ciclopentanona a 0.1% ( $G=6.06$ , g.l.= 1,  $P= 0.01$ ). La respuesta al ácido láctico a la concentración de 0.1% resultó ser negativa ( $G=6.89$ , g.l.= 1,  $P= 0.008$ ), sugiriendo posible repelencia (Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Número de hembras de *Lu. cruciata* en estado de gravidez y alimentadas observadas en los bioensayos en tubo “Y”.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (%)</b>	<b>Gravidez</b>	<b>Alimentadas</b>	<b>Significancia estadística (P)</b>
<b>1-octen-3-ol</b>	0.01	19	2	0.80
	0.1	21	0	0.72
	1	4	0	0.17
	10	20	2	0.13
<b>Ciclopentanona</b>	0.01	9	3	0.56
	0.1	11	0	0.34
	1	12	1	0.03
	10	14	1	0.76
<b>Ácido láctico</b>	0.01	10	1	0.14
	0.1	7	1	1
	1	21	1	0.52
	10	10	2	0.29
<b>Ácido butírico</b>	0.01	18	1	0.42
	0.1	9	0	0.77
	1	22	1	0.40
	10	16	2	1
<b>Acetato de amonio</b>	0.01	9	1	0.19
	0.1	12	0	0.55
	1	10	1	0.43
	10	21	1	0.37

**Cuadro 3.** Respuesta de hembras de *Lu. cruciata* a diferentes concentraciones de los compuestos evaluados en laboratorio.

Compuesto	Concentración	Atraídas		No atraídas		No respuesta		Total	Prueba G
		n	%	n	%	n	%		
1-octen-3-ol	0.01	7	23.3	8	26.6	15	50	30	0.79
	0.1	14	46.6	6	20	10	33.3	30	0.07
	1	16	53.3	10	33.3	4	13.3	30	0.24
	10	12	40	8	26.6	10	33.3	30	0.37
Ciclopentanona	0.01	10	33.3	9	30	11	36.6	30	0.82
	0.1	13	43.3	3	10	14	46.6	30	0.01*
	1	11	36.6	9	30	10	33.3	30	0.65
	10	9	30	7	23.3	14	46.6	30	0.62
Ácido láctico	0.01	3	10	4	13.3	23	76.6	30	0.71
	0.1	2	6.6	12	40	16	53.3	30	0.008*
	1	6	20	4	13.3	20	66.6	30	0.53
	10	10	33.3	6	20	14	46.6	30	0.32
Ácido butírico	0.01	6	20	4	13.3	20	66.6	30	0.53
	0.1	6	20	1	3.3	23	76.6	30	0.06
	1	7	23.3	3	10	20	66.6	30	0.21
	10	5	16.6	7	23.3	18	60	30	0.57
Acetato de amonio	0.01	6	20	5	16.6	19	63.3	30	0.76
	0.1	7	23.3	6	20	17	56.6	30	0.78
	1	9	30	6	20	15	50	30	0.44
	10	8	26.6	4	13.3	18	60	30	0.25

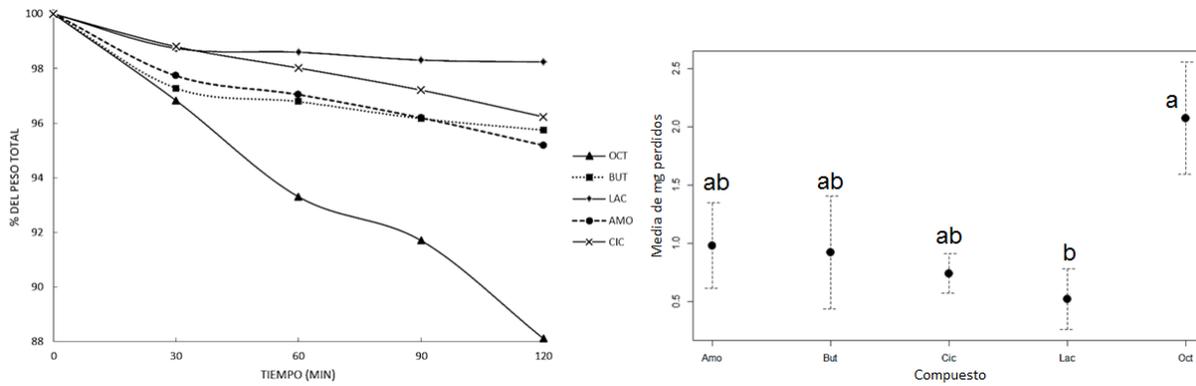
\*Valor significativamente diferente al control aplicando la Prueba G con corrección de Williams ( $P < 0.05$ )

## 6.2. Bioensayos en campo

### 6.2.1. Tasas de liberación

Las tasas de liberación obtenidas por compuesto se muestran en la Figura 10. Se observó diferencia estadística en las tasas de liberación por compuesto ( $F=3.29$ ,

g.l.=4,  $P=0.01$ ). El 1-octen-3-ol fue el compuesto que mayor tasa de liberación tuvo (2.07 mg/h), seguido del acetato de amonio (0.98 mg/h), ácido butírico (0.92 mg/h), ciclopentanona (0.74 mg/h) y el ácido láctico (0.52 mg/h).

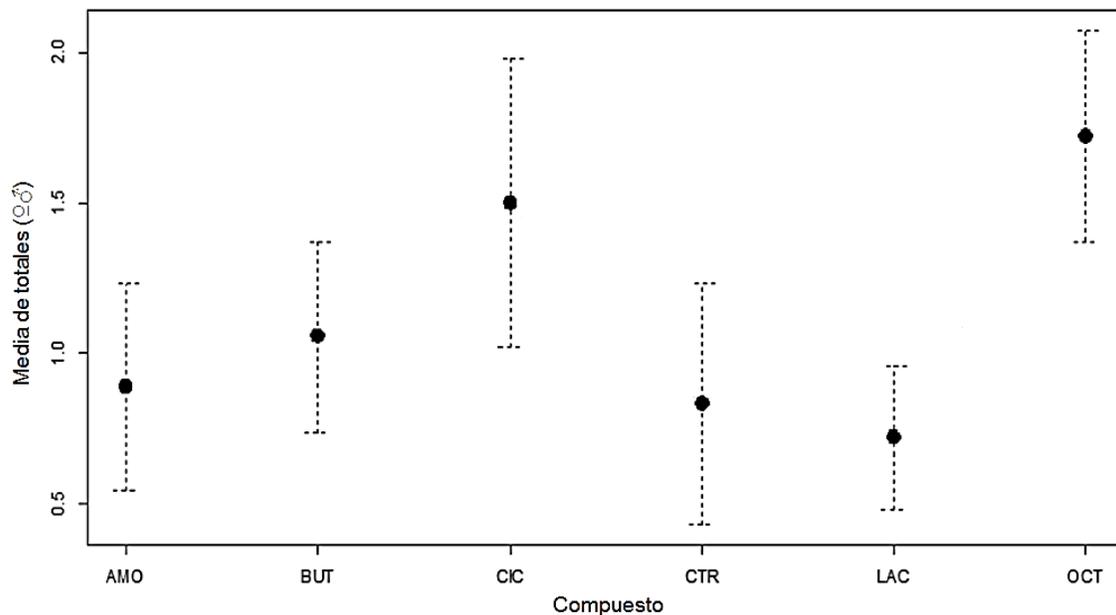


**Figura 10.** Tasas de liberación de los compuestos evaluados en campo. Izquierda) porcentaje del peso total perdido por compuesto durante 120 min. Derecha) medias ( $\pm$  E.E.) de los mg perdidos por compuesto. Valores marcados con diferente letra son significativamente diferentes por la prueba Tukey ( $P < 0.01$ ).

El número de ejemplares de *Lu. cruciata* capturados con cada tratamiento y el control durante los 18 días de trampeo fueron estadísticamente significativos cuando se analizó el total ( $\sigma$  $\eta$ ) de capturas entre compuestos (LR Chisq=16.19; g.l.=5;  $P= 0.006$ ). Detectando significancia en las capturas con 1-octen-3-ol ( $P= 0.005$ ).

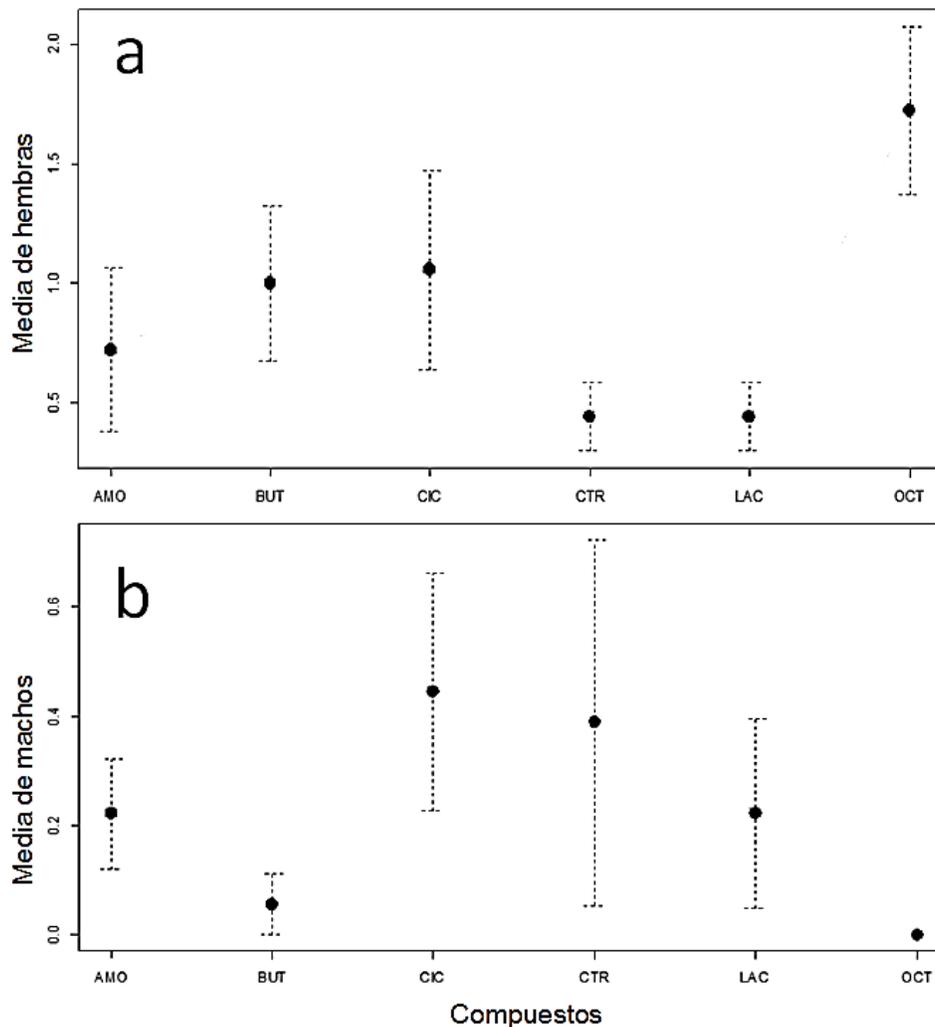
Al realizar el análisis por sexo por compuesto, se encontró que las hembras de *Lu. cruciata* fueron estadísticamente atraídas a las trampas cebadas con 1-octen-3-ol (LR Chisq=25.40; g.l.=5;  $P=0.0001$ ), mientras que los machos fueron estadísticamente atraídos a las trampas cebadas con ciclopentanona (LR Chisq=11.43; g.l.=5;  $P=0.04$ ). En la figura 11 y 12 se presentan las gráficas de los análisis estadísticos de las capturas totales y de ambos sexos de *Lu. cruciata*.

Un total de 121 ejemplares de *Lu. cruciata* fueron capturados en las trampas cebadas con los cinco compuestos evaluados y el control. Con 1-octen-3-ol se capturaron 31 hembras y ningún macho (n=31, 25.6%); con ciclopentanona se capturaron 8 machos y 19 hembras (n=27, 22.3%); con ácido láctico se capturaron 5 machos y 8 hembras (n=13, 10.7%); con ácido butírico se capturó un macho y 18 hembras (n=19, 15.7%); con acetato de amonio se capturaron 4 machos y 13 hembras (n=17, 14.1%) y; en el control se capturaron 7 machos y 8 hembras (n=15, 12.4%) (Cuadro 4). El 1-octen-3-ol fue el único compuesto que capturó únicamente hembras de *Lu. cruciata*.



**Figura 11.** Medias ( $\pm$  E.E.) de los totales de *Lu. cruciata* capturados con las trampas de luz cebadas y el control, durante las 18 noches de muestreo en un bosque urbano en Tapachula, Chiapas, México. ANOVA (LR Chisq=16.19, g.l.=5,  $P= 0.006$ ).

*Lu. cruciata* fue la especie más abundante (81.8%, n=122) en las capturas con los cinco semioquímicos. Además de *Lu. cruciata*, se capturaron las especies *Lu. cayennensis* (n=11), *Lu. chiapanensis* (n=5) y *Lu. atulapai* (n=1). Ninguno de ellos mostró atracción hacia alguno de los compuestos evaluados (Cuadro 4) (LR Chisq=5.59, g.l.=5,  $P=0.34$ ; LR Chisq=7.77, g.l.=5,  $P=0.16$ ; para *Lu. atulapai* no se realizó el análisis porque solo se capturó un espécimen)



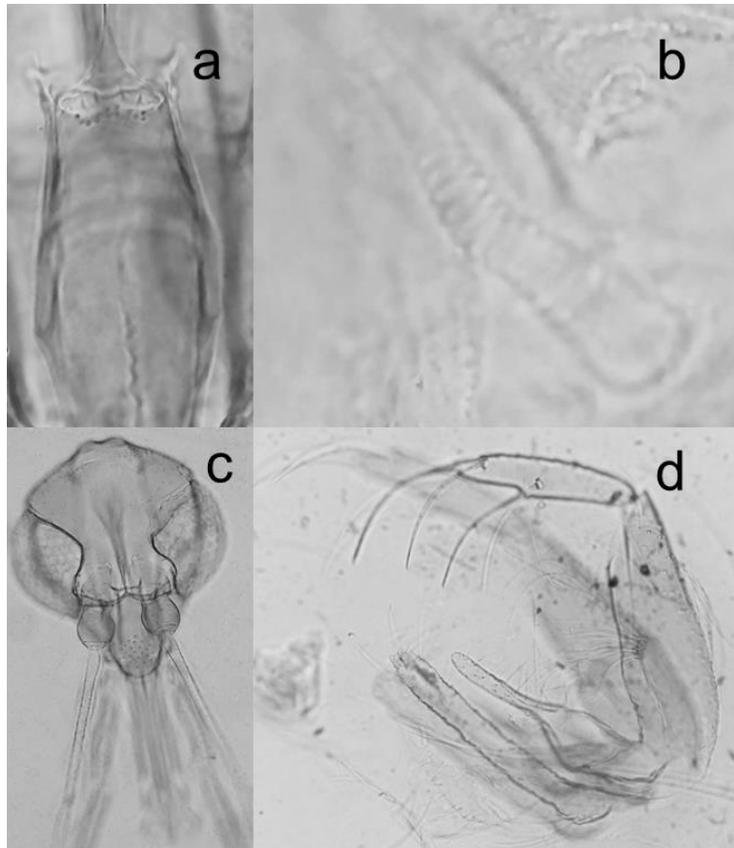
**Figura 12.** Medias de capturas de *Lu. cruciata*. a) hembras (LR Chisq= 25.40, g.l.= 5,  $P= 0.0001$ ); b) machos (LR Chisq= 11.43, g.l.= 5,  $P= 0.04$ ).

**Cuadro 4.** Especies de flebotomíneos capturadas en las trampas de luz cebadas con cinco diferentes compuestos cairaomónicos, en un bosque urbano localizado en la ciudad de Tapachula, Chiapas, México.

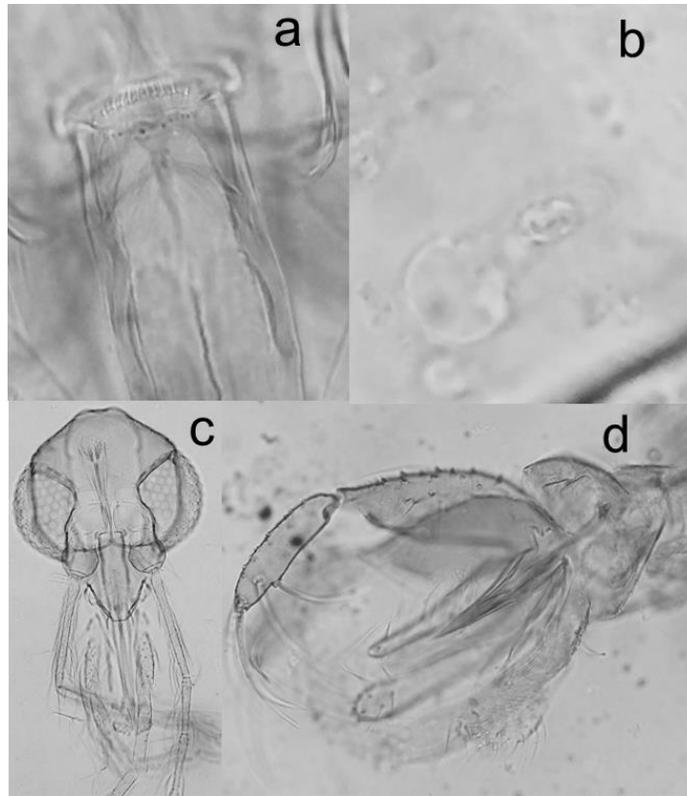
Compuestos	<i>Lu. cruciata</i>		<i>Lu. cayennensis</i>		<i>Lu. chiapanensis</i>		<i>Lu. atulapai</i>		Total	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
1-octen-3-ol	31	0	0	0	2	0	0	0	33	0
Ciclopentanona	19	8	1	1	0	0	0	1	20	10
Ácido láctico	8	5	0	3	2	0	0	0	10	8
Ácido butírico	18	1	1	0	0	0	0	0	19	1
Acetato de amonio	13	4	2	0	1	0	0	0	16	4
Control	8	7	2	1	0	0	0	0	10	8
<b>Total</b>	97	25	6	5	5	0	0	1	108	31

### 6.3. Especies identificadas

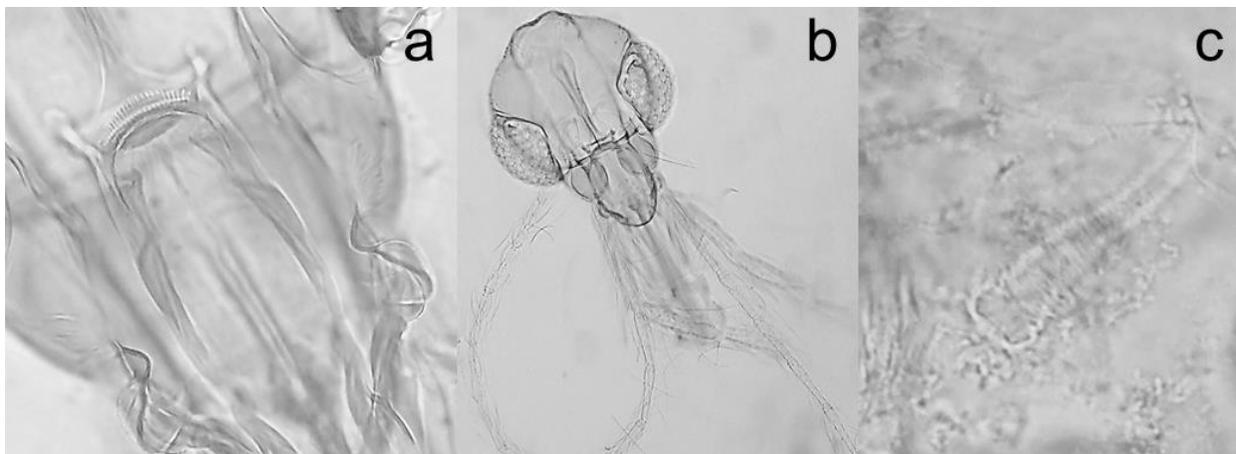
Un total de 139 flebotomíneos, 31 machos y 108 hembras de cuatro especies fueron capturados durante este estudio. La especie más abundante fue *Lu. cruciata* (87%), seguida de *Lu. cayennensis* (7.9%), *Lu. chiapanensis* (3.6%) y *Lu. atulapai* (0.7%) (Cuadro 4).



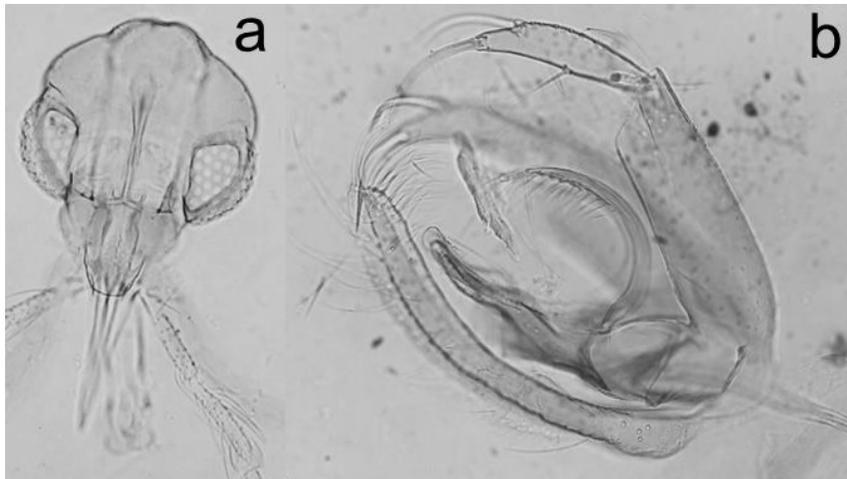
**Figura 13.** Fotografías al microscopio compuesto de *Lu. cruciata*. a y b) cibario y espermateca de hembra respectivamente; c) cabeza; d) genital de macho.



**Figura 14.** Fotografías al microscopio compuesto de *Lu. cayennensis*. a y b) cibario y espermateca de hembra respectivamente; c) cabeza; d) genital de macho.



**Figura 15.** Fotografías al microscopio compuesto de la hembra de *Lu. chiapanensis*. a) cibario; b) cabeza; c) espermateca.



**Figura 16.** Fotografías al microscopio compuesto del macho de *Lu. atulapai*. a) cabeza; b) genital.

## 7. DISCUSIÓN

La disponibilidad de un método eficiente para el monitoreo y vigilancia de las poblaciones de insectos vectores de enfermedades humanas es primordial para establecer programas de control, así como para conocer aspectos de la biología, ecología y comportamiento de los mismos (Foster y Harris, 1997). Trabajos previos han descrito que algunas especies de flebotomíneos son atraídas a trampas de luz tipo CDC de manera natural, puesto que la luz es un estímulo importante para estos insectos. Algunos autores sugieren que las especies antropofílicas muestran bajo fototropismo (Alexander, et al., 1995b; Travi, et al., 1998), aunque algunas especies como *Lu. verrucarum* son más fototrópicas que antropofílicas (Davies, et al., 1995). La atracción hacia fuentes lumínicas esta asociada con la orientación en lugares oscuros, además de tener un efecto sinergista o aditivo sobre la atracción a trampas cebadas (Andrade, et al., 2008). Sin embargo, las capturas de flebotomíneos se incrementan cuando las

trampas son cebadas con caíromonas porque las ponen aun más en el contexto biológico que experimenta el insecto, como la búsqueda de hospedero (Andrade, et al., 2008; Ryelandt, et al., 2011). Las trampas cebadas con atrayentes son importantes para diversos tipos de investigación con insectos hematófagos como, estudios de densidad y distribución de especies, taxonómicos, captura de especímenes vivos y para la evaluación de trampas control (Maroli, et al., 1997).

La presente investigación es pionera en la búsqueda de olores sintéticos presentes en humanos como atrayentes de *Lu. cruciata*. En México, la falta de este tipo de estudios en esta especie y otros flebotomíneos, se debe a que los registros de la leishmaniasis son mínimos comparados con la incidencia de otras enfermedades tropicales, como el dengue y paludismo (PAHO, 2007). Sin embargo, fenómenos como el cambio climático y la migración, representan un riesgo potencial en el incremento de este tipo de enfermedades tropicales (Maroli, et al., 2013). En este sentido, los hallazgos obtenidos en el presente trabajo son importantes desde el punto de vista epidemiológico, especialmente porque *Lu. cruciata* ha sido recientemente incriminada en la transmisión de leishmaniasis cutánea en México (Pech-May, et al., 2010). Los estudios comportamentales con flebotomíneos también pueden ser limitados por la complejidad en el mantenimiento de una cría en laboratorio, poseer un ciclo de vida largo (50-60 días) y producción de pocos individuos de la misma edad (Andrade, Galati y Falcão, 2004; Castillo, et al., en preparación).

Recientemente se ha demostrado que el uso de flebotomíneos silvestres es viable para estudios de laboratorio, facilitando los estudios comportamentales con estos insectos (Pinto, et al., 2012). Los resultados en laboratorio con hembras de *Lu. cruciata* silvestres en el presente estudio, corroboran la factibilidad de usar insectos silvestres,

previamente demostrado por Pinto y colaboradores (2012). Sin embargo, una gran cantidad de hembras no respondieron a los estímulos ofrecidos, lo cual puede atribuirse a varios factores como: 1) el diseño del bioensayo, donde el transporte del compuesto químico hacia el insecto fue por difusión simple; 2) Edad desconocida de las hembras silvestres; 3) limitado número de hembras evaluadas (n=30), dado que en otros bioensayos con flebotomíneos han evaluado más de 40 insectos (Pareja, 2010; Pinto, et al., 2012) y; 4) baja volatilidad de algunos compuestos como el ácido láctico o simplemente que los compuestos evaluados no son atractivos individualmente para esta especie, faltaría evaluarlos en mezclas binarias y/o terciarias dado que el ácido láctico, amonio y ácido butírico actúan mejor como sinergistas (Kline, et al., 1990).

En laboratorio, *Lu. cruciata* presentó atracción significativa hacia la ciclopentanona al 0.1%, un compuesto descubierto recientemente con actividad atrayente para hembras de *Ae. aegypti* y evaluado por primera vez en flebotomíneos. Las características de este compuesto lo hacen completamente seguro de manipular y pertenece a las sustancias GRAS: Generally Recognized As Safe (Generalmente reconocido como seguro) (Tauxe, et al., 2013). *Lu. cruciata* no presentó una respuesta concentración-dependiente tal como se observó con hembras de *Ae. aegypti* (Tauxe, et al., 2013). La respuesta hacia la ciclopentanona sugiere que *Lu. cruciata* podría contener una neurona receptora olfativa de tipo CpA en los palpos maxilares u otra región encargada de expresar el receptor de CO<sub>2</sub>, a la cual se adhiere la molécula de ciclopentanona y provocar una respuesta, tal como se observó en hembras de *Ae. aegypti* (Tauxe, et al., 2013).

El ácido láctico ha sido escasamente evaluado en flebotomíneos por su baja o nula atractividad. En este estudio, *Lu. cruciata* mostró repelencia hacia éste compuesto

cuando se le expuso al 0.1%. Dicho comportamiento ha sido reportado para mosquitos cuando se exponen al ácido láctico en concentraciones mayores a las presentes en el sudor humano (350-3,600 ppm) (Shirai, et al., 2001). Sin embargo, la concentración repelida (0.1%, 1,209 ppm) por *Lu. cruciata* se encuentra en el rango, indicando que otros factores influenciaron en la respuesta. La respuesta en otros flebotomíneos hacia el ácido láctico ha sido variable. Pinto y colaboradores (2012) tuvieron una respuesta débil de *Ny. neivai* hacia 100 µl de ácido láctico al 85%. Mientras que Pareja (2010) observó cierta atracción de *Lu. longipalpis* al 1% con decremento en la respuesta a concentraciones menores, sugiriendo que la concentración más atractiva se encuentra en valores cercanos a éste, inverso a lo encontrado en este trabajo para *Lu. cruciata*.

En campo, *Lu. cruciata* fue capturada en todos los tratamientos, pero los registros fueron mayores en el 1-octen-3-ol, que exhibió una especificidad en la atracción de hembras. En la naturaleza, el 1-octen-3-ol es un componente volátil presente en hongos (Matzui, et al., 2003), respiración humana (Bernier, et al., 2000) y piel de ganado (Hall, et al., 1984). Mediante estudios de laboratorio y campo se ha demostrado que *Lu. longipalpis*, *Ny. neivai* y *Psathyromyia shannoni* son atraídas hacia el 1-octen-3-ol con respuesta concentración-dependiente (Sant´ana, et al., 2002; Andrade, et al., 2008; Pinto, et al., 2011; 2012), con cierta variabilidad de capturas en campo entre sexos, ya que los machos de *Lu. longipalpis* son más atraídos hacia este compuesto que las hembras, pero en *Lu. intermedia* la respuesta se invierte. Los altos números de machos capturados en otros estudios pueden deberse al comportamiento reproductivo de estos, dado que los machos son los primeros en localizar un hospedero para posteriormente formar grupos de apareamiento y liberar una feromona sexual, la

cual incrementara la atracción de hembras hacia un hospedero potencial (Kelly y Dye, 1997; Bray y Hamilton, 2007).

La atracción hacia el 1-octen-3-ol concuerda con los hábitos altamente antropofílicos de esta especie, ya que este compuesto es uno de los más probados en dipteros hematófagos (Gibson y Torr, 1999), por lo que, el uso de esta caïromona en trampas de luz incrementará las capturas del vector cuando la densidad poblacional sea baja o se necesiten realizar estudios de infección, distribución y dispersión en lugares con desconocimiento de la presencia del parásito. Sin embargo, las capturas de *Lu. cruciata* en trampas cebadas con este compuesto aun son bajas en comparación con las obtenidas para otras especies (Pareja, 2010; Pinto, et al., 2011). Las capturas de ejemplares pueden incrementarse mediante la adición de otros tipos de atrayentes (Ryelandt, et al., 2011). Pinto, et al. (2001) y Silva, et al. (2013) demostraron que la adición de CO<sub>2</sub> a trampas cebadas con 1-octen-3-ol y otras caïromonas humanas incrementó las capturas de flebotomíneos antropofílicos *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia* y *Lu. umbratilis*, mientras que en flebotomíneos del Viejo Mundo no se observó el mismo efecto (Beavers, et al., 2004). El carácter antropofílico de *Lu. cruciata* hace pensar que la adición de CO<sub>2</sub> a trampas cebadas con 1-octen-3-ol podría tener resultados similares a los observados en especies Neotrópicas. Así mismo, el uso de mezclas de compuestos más atractivos en laboratorio (1-octen-3-ol al 0.1% + ciclopentanona al 0.1% + ácido butírico al 0.1% en proporción 1:1:1) también podría mejorar las capturas. Dado que Pareja (2010) evaluó la mezcla: 0.1% ácido láctico + 1.0% ácido butírico + amonio 10% (1:1:1) y Andrade, et al. (2008) la formulación: BG-Mesh Lure™ (ácido láctico, ácido caproico y amonio), incrementando las respuestas en laboratorio y campo; la adición de la feromona sexual de *Lu. longipalpis* a cebos caïromonales incrementa

considerablemente la atracción de esta especie en laboratorio y en campo (Morton y Ward, 1989; Nigam y Ward, 1991; Bray, et al., 2007; Pareja, 2010). Esto sugiere que el suplemento de 1-octen-3-ol con la feromona sexual de *Lu. cruciata* tendrá resultados similares.

Por otra parte, las trampas cebadas con ácido butírico y acetato de amonio también muestran especificidad para capturar hembras de *Lu. cruciata*, aunque sus capturas no son significativas. Similar a lo reportado por Andrade, et al. (2008), donde capturaron más hembras que machos de *Lu. intermedia* en las trampas cebadas con amonio, difiriendo con *Lu. longipalpis*, donde los machos fueron más atraídos. Por su parte, el ácido butírico únicamente había sido evaluado en mezcla en campo (Pareja, 2010), dado que se ha reportado como un componente sinergista con otras feromonas o como inhibidor de los receptores para otras moléculas, por ejemplo, CO<sub>2</sub> (Tauxe, et al., 2013). El acetato de amonio es un compuesto empleado como cebo en trampas para moscas de la fruta, pero en este estudio se consideró por el componente amonio, dado que el amonio está presente en el sudor humano en forma de sales.

Las bajas capturas de *Lu. cruciata* en las trampas cebadas con ácido láctico y el control son comunes en insectos hematófagos cuando se evalúan individualmente. *Lu. intermedia* y *Lu. longipalpis* tienen un patrón de capturas similar a lo reportado aquí (Andrade, et al., 2008). Sin embargo, Andrade, et al. (2008) encontraron que las trampas cebadas con este compuesto atraían más machos que hembras de *Lu. longipalpis* pero igual proporción entre sexos de *Lu. intermedia*. El ácido láctico ha sido evaluado principalmente en mezcla, como sinergista al lado del CO<sub>2</sub> para lograr un efecto atractivo hacia mosquitos hematófagos (Kline, et al., 1990).

La formulación y las tasas de liberación de semioquímicos son factores que también influyen en la eficiencia de este método dentro de una estrategia de manejo integrado de plagas (Heuskin, et al., 2011). Investigar las tasas de liberación, resuelve tres preguntas: ¿se está liberando el compuesto?, ¿a qué velocidad se está liberando? y ¿Cuánto compuesto se debe usar para que la trampa funcione en tiempo?. En este trabajo, únicamente se determinó para resolver las dos primeras preguntas, aunque nuestros resultados pueden servir para futuros estudios con los compuestos y el dispositivo usados en este estudio. La tasa de liberación entre compuestos fue muy variable debido al nivel de volatilidad entre ellos y al tipo de dispensador usado. Para el caso del 1-octen-3-ol, la tasa de liberación observada fue mayor en relación a los otros compuestos, con una media de 2 mg/h. Un incremento de este valor quizá pueda aumentar el número de insectos capturados. Dado que Andrade (2006) manejó una tasa de liberación de  $4.5 \pm 0.3$  mg/h a través de capilaridad por medio de un rectángulo de papel filtro con dimensiones de 3.5 x 4 cm y 0.5 cm de exposición al aire libre y fue una de las tasas que tuvo mayores capturas junto con la de 15 mg/h. Aunque la temperatura media descrita por este autor fue más baja a la observada en este estudio. Las tasas de liberación también dependen de las características del dispensador (forma, espesor y distribución del semioquímico en la matriz) y de otros parámetros ambientales como la velocidad del viento, humedad relativa y las propiedades físicas del compuesto (Stipanovic, et al., 2004; Alfaro y Cid, et al., 2009). Durante las evaluaciones en campo del presente estudio, la velocidad del aire nunca sobrepasó los 0.1 m/s, la temperatura se mantuvo constante (29-30°C) y la humedad relativa entre 70 y 80%.

Por su parte, las condiciones ambientales durante los experimentos si tuvieron un efecto sobre las capturas, puesto que durante los meses anteriores a las lluvias (febrero-mayo) se capturaron ambos sexos y la densidad de insectos fue relativamente alta, mientras que en los meses posteriores a las lluvias se capturaron únicamente hembras en las trampas cebadas y la cantidad de especímenes disminuyeron considerablemente. Sin embargo, debido a la falta de sistematicidad, no es posible realizar algún análisis estadístico que permita avalar esto. El impacto negativo de la lluvia y la temperatura sobre las poblaciones de *Lu. cruciata* ha sido previamente reportado por Rebollar-Téllez, et al. (1996) y Pérez, et al. (2014). Aunque sus efectos sobre la variación en la proporción sexual post-lluvias detectada aquí son desconocidos. Únicamente se tienen registros sobre la densidad y riqueza de especies de flebotomíneos (Guimarães, et al., 2012). Sin embargo, la presencia de hembras en ambos tiempos de muestreo es de importancia epidemiológica porque podrían mantener un foco de transmisión durante todo el año (Oliveira, et al., 2013).

*Lu. cruciata* es una especie que se captura muy poco en trampas de luz (Pérez, et al., 2014), probablemente a causa de su comportamiento antropofílico y anemotaxico y no fototactico como otras especies de flebotomíneos (Davies, et al., 1995). Por lo que el incremento en las capturas en las trampas CDC como consecuencia del efecto atrayente del 1-octen-3-ol, adquiere especial relevancia. Otro aspecto que es importante mencionar es el incremento en la captura de machos y hembras en las trampas cebadas en comparación con capturas anuales de esta especie (Pérez, et al., 2014), permitiendo así la obtención de machos silvestres para realizar diversos estudios en laboratorio. Por su parte, el tratamiento control (aceite mineral) también registró capturas, indicando una posible atracción al aceite mineral. Estudios con ratones

demonstraron que éstos tienen la capacidad de detectar e incluso discriminar entre marcas de aceite mineral solos o en mezcla, revelando que el aceite mineral no es un diluyente inodoro y su uso en experimentos de olfacción debe tomarse con reservas (Gamble y Smith, 2009). Este hallazgo hace necesario la realización de futuros experimentos que demuestren que la atracción al control se debió al estímulo lumínico y no al aceite.

En el presente trabajo, los contrastes de los resultados de laboratorio y campo quizá pudieron ser provocados por un bajo número en las repeticiones de las pruebas de laboratorio. Sin embargo, la disponibilidad estacional de *Lu cruciata*, impidió disponer de material suficiente para aumentar el número de estos ensayos (Pérez, et al., 2014). Por otra parte, los bioensayos en laboratorio con insectos hematófagos generalmente se hacen controlando factores extrínsecos e intrínsecos. Dentro de los intrínsecos se encuentra el estatus fisiológico del insecto, el cual puede influenciar el comportamiento de búsqueda de hospedero (Klowden, 1996).

Durante las evaluaciones en campo, también se capturaron las especies *Lu. cayennensis*, *Lu. chiapanensis* y *Lu. atulapai*. Considerando el total de flebotomíneos capturados de las cuatro especies, es evidente la gran cantidad de hembras capturadas. Es imposible notar alguna diferencia estadística entre sexos en las tres especies por el escaso número de individuos.

La atracción de *Lu. cayennensis* hacia estos compuestos, puede ser atribuida a su comportamiento alimenticio antropofílico y endofílico (Cochero, et al., 2007). Sin embargo, también puede alimentarse de vertebrados de sangre fría, como los lagartos (Young y Duncan, 1994).

Por su parte, *Lu. chiapanensis* fue capturada en las trampas cebadas con 1-octen-3-ol, ácido láctico y ciclopentanona, únicamente hembras. Este hallazgo también podría estar ligado hacia la posible antropofilia de esta especie (Dampf, 1947), aunque este comportamiento aun esta en duda.

*Lu. atulapai*, fue la especie que registró la menor captura en los experimentos en campo y sólo se capturó un macho en la trampa cebada con ciclopentanona. Los hábitos alimenticios de esta especie aun están en duda, pero se deduce que se alimenta de pequeños mamíferos al igual que todos los miembros de su grupo taxonómico (Young y Duncan, 1994).

Este trabajo también constituye la primera descripción de la composición poblacional flebotomínea dentro de un área urbana en esta región de Mexico, destacando la presencia de *Lu. cruciata*, la cual había sido registrada en ecosistemas cafetaleros de dicha región (Mikery-Pacheco, et al., 2012; Pérez, et al., 2014). *Lu. chiapanensis* y *Lu. atulapai* también se reportan por primera vez en una zona urbana. *Lu. cayennensis* ya había sido previamente encontrada en áreas urbanas en Colombia (Cortes y Fernández, 2008). Los registros de las especies *Lu. c. cayennensis*, *Lu. chiapanensis* y *Lu. atulapai* en la República Mexicana son escasos y en el estado de Chiapas son aún más raros. En 1959, *Lu. c. cayennensis* fue recolectada en el hueco de un árbol del municipio de Acacoyahua, Chiapas, coexistiendo con murciélagos y otros reptiles (Vargas y Díaz-Nájera, 1959). *Lu. chiapanensis*, fue recolectada en 1938 en el municipio de Chiapa de Corzo (Ibáñez-Bernal, 2003), mientras que *Lu. atulapai* fue capturada en el Río Sabinal en el municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (Ibáñez-Bernal, 2001). Los registros previos sobre la presencia de estas especies en Chiapas son muy antiguos y limitan hacer conclusiones, aunque también podría tratarse de

registros geográficos en áreas nuevas como una consecuencia de la alta modificación antropológica. Un registro geográfico nuevo para estas especies constituye un alto riesgo de contacto humano-vector y de posibles focos de infección, por la importancia médica de estas especies (Cochero, et al., 2007) y por las condiciones que favorecen su incremento poblacional durante la estación seca de esta región (Pérez, et al., 2014).

Sobre la importancia médica de las especies, se tiene que *Lu. cruciata* es reconocida como vector de *Leishmania mexicana*, vector de leishmaniasis cutánea en México; *Lu. cayennensis* es una especie que se alimenta principalmente de lagartos, y se le ha encontrado infectada con flagelados, atacando a humanos pero solo en altas densidades en Sudamérica, presenta alta plasticidad ecológica y se distribuye desde Centroamerica hasta el norte de Sudamerica (Gallego, et al., 1995; Cochero, et al., 2007), por estas razones esta especie podría ser incriminada como vector de *Leishmania* sp.; *Lu. chiapanensis*, a pesar de la presunción del carácter antropofílico de esta especie (Dampf, 1947), ocurrencia en áreas peridomiciliares con casos de Leishmaniasis cutánea y coexistencia con especies de flebotomíneos vectores como *Lu. longipalpis* y *Lu. evansi* (Herrero, et al., 1991) su papel en la transmisión de leishmaniasis es desconocido y; *Lu. atulapai* únicamente se deduce que se alimenta de pequeños mamíferos (Young y Duncan, 1994).

La alta abundancia de *Lu. cruciata* y del resto de especies capturadas, aunque en bajas cantidades, su capacidad de alimentarse de mamíferos u otros animales domésticos, representan un riesgo de transmisión de leishmaniasis mediante la interacción entre los posibles ciclos zoonóticos y antroponóticos que pudieran originarse (Chaves y Añez, 2004).

## 8. CONCLUSIONES

1. Las hembras silvestres de *Lu. cruciata* son viables para usarlas en bioensayos comportamentales en laboratorio. El estado fisiológico (gravidez o alimentación) de las mismas no influyó en la respuesta hacia los compuestos evaluados;

2. Se enmarca el posible uso del 1-octen-3-ol como atrayente para la vigilancia de especies endémicas de Chiapas y del resto del país.

3. Se presenta un primer registro de *Lu. cruciata* en un hábitat urbano, lo que sugiere su gran capacidad de adaptación a este tipo de ambientes. Así como nuevos registros geográficos para las especies *Lu. cayennensis*, *Lu. chiapanensis* y *Lu. atulapai* para el estado de Chiapas. Estos hallazgos representan riesgos de transmisión de leishmaniasis mediante la interacción entre posibles ciclos zoonóticos y antroponóticos.

4. Finalmente, estos hallazgos hacen necesaria la exploración de otros sitios con las mismas condiciones, así como estudios de fluctuación poblacional de estos insectos, con la finalidad de establecer medidas que reduzcan el contacto humano-vector y el riesgo de posibles focos de infección.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Acree, F.J., Turner, R.B., Gouck, H.K., Bezora, M. y Smith, N., 1968. L-Lactic acid: a mosquito attractant isolated from humans. *Science*, 161, pp. 1346-1347.

Alencar, R.B., Queiroz, R.G. y Barrett, T.V., 2011. Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas State, Brazil. *Acta Tropica*, 118, pp. 204-208.

Alexander, B. y Usma, M.C., 1994. Potential source of sugar for the phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88, pp. 543-549.

Alexander, B., Usma, M.C., Cadena, H., Quesada, B.L., Solarte, Y., Roa, W. y Travi, B.L., 1995a. Evaluation of deltamethrin-impregnated bednets and curtains against phlebotominae sandflies in Valle del Cauca, Colombia. *Medical and Veterinary Entomology*, 9, pp. 279-283.

Alexander, B., Jaramillo, C., Cadena, H., Usma, M.C., Roa, W. y Travi, B.L., 1995b. An attempt to control phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by residual spraying with permethrin in a Colombian village. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90, pp. 421-424.

Alexander, B., 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 14, pp. 109-122.

Alfaro-Cid, E., Esparcia-Alcázar A.I., Moya, P., Femenia-Ferrer, B., Sharman, K. y Merelo, J.J., 2009. Modeling pheromone dispensers using genetic programming. En: M. Giacobini, A. Brabazon, S. Cagnoni, G.A. Di Caro, A. Ekárt, A.I. Esparcia-Alcázar, M. Farooq, A. Fink y P. Machado, eds. 2009. *Applications of Evolutionary Computing*. Berlin, Germany; Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. pp. 635-644.

Allen, T.E. y Blight, J., 1969. A comparative study of the temporal patterns of cutaneous water vapour loss from some domesticated mammals, with epitrichial sweat glands. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 31, pp. 347-363.

Alvar, J., Yactayo, S. y Bern, C., 2006, Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology*, 22, pp. 552-557.

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer M. y the WHO Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7, e35671.

Alves, V.R., Freitas, R.A., Santos, F.L. y Barrett, T.V., 2011. Diversity of sandflies (Psychodidae: Phlebotominae) captured in sandstone caves from Central Amazonia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, pp. 353-359.

Amóra, S.S.A., Bevilaqua, C.M.L., Feijó, F.M.C., Alves, N.D. y Maciel, M.V., 2009a. Control of phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotropical entomology*, 38, pp. 303-310.

Amóra, S.S.A., Bevilaqua, C.M.L., Feijó F.M.C., Silva, M.A., Pereira, R.H.M.A., Silva, S.C., Alves, N.D., Freire, F.A.M. y Oliveira, D.M., 2009b. Evaluation of the fungus

*Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes), a potential biological control agent of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Biological Control*, 50, pp. 329-335.

Amóra, S.S.A., Bevilaqua, C.M.L., Feijó F.M.C., Pereira, R.H.M.A., Alves N.D., Freire, F.A.M., Kamimura, M.T., Oliveira, D.M., Lima, E.A.L. y Rocha, M.F.G., 2010. The effects of the fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* on different stages of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Acta Tropica*, 113, pp. 214-220.

Andrade, F.J.D., Galati, E.A.B. y Falcão, A.L., 2004. Biology of the first generation of a laboratory colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, pp. 597-601.

Andrade, A.J., 2006. *Avaliação de cairomônios na atratividade de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em Brejo do Mutambal, município de Varzelândia, MG.* Mestre em parasitologia. Universidade Federal de Minas Gerais.

Andrade, A.J., Andrade, M.R., Dias, E.S., Pinto, M.C. y Eiras A.E., 2008. Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, pp. 337-343.

Beavers, G.M., Hanafi, H.A. y Dykstra, E.A., 2004. Evaluation of 1-octen-3-ol and carbon dioxide as attractants for *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) in

southern Egypt. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20, pp.130-133.

Becker, I., Carrada-Figueroa, G., Gudiño-Zayas, M., González, C., Berzunza-Cruz, M., Rivas-Sánchez, B. y Velasco-Castrejón, O., 2005. *Análisis de la leishmaniasis en México. Consulta de expertos OPS/OMS sobre la leishmaniasis visceral en las Américas*. Informe Final. Brasilia, Brasil. Noviembre del 23-25.

Belen, A. y Alten, B., 2011. Seasonal dynamics and altitudinal distributions of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Cukurova region of Turkey. *Journal of Vector Ecology*, 36, pp. S87-S94.

Bernier, U.R., Kline, D.L., Barnard, D.R., Schreck, C.E. y Yost, R.A., 2000. Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry: 2: identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Analytical Chemistry*, 72, pp. 747-756.

Biagi, F., De Biagi, A.M. y Beltran, F., 1966. Actividad horaria de Phlebotomus antropofílicos en la península de Yucatan. *Revista de investigación en salud pública (México)*, 26, pp. 73-77.

Birkett, M., Agelopoulos, N., Jensen, K., Jespersen, J.B., Pickett, J., Prijs, H., Thomas, G., Trapman, J., Wadhams, L. y Woodcock, C., 2004. The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 18, pp. 313-322.

- Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C. y Maroli, M., 2002. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica*, 88, pp. 109-116.
- Bray, D.P. y Hamilton, J.G., 2007. Host odor synergizes attraction of virgin female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44, pp. 779-87.
- Bray, D.P., Alves, G.B., Dorval, M.E., Brazil, R.P. y Hamilton, J.G.C., 2010a. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. *Parasites and Vectors*, 11, pp. 3-16.
- Bray, D.P., Ward, R.D. y Hamilton, J.G.C., 2010. The chemical ecology of sandflies (Diptera: Psychodidae). En: W. Takken, B.G.J. Knols, eds. 2010b. *Ecology and Control of Vector-Borne Diseases. Volume 2. Olfaction In Vector-Host Interactions*. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers. pp. 203-216.
- Bray, D.P., Carter, V., Alves, G.B., Brazil, R.P., Bandi, K.K. y Hamilton, J.G.C., 2014. Synthetic Sex Pheromone in a Long-Lasting Lure Attracts the Visceral Leishmaniasis Vector, *Lutzomyia longipalpis*, for up to 12 Weeks in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, pp. e2723.
- Brazil, R.P. y Oliveira, M.P., 1999. Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 13, pp. 463-464.

- Cabanillas, M.R.S. y Castellón, E.G., 1999. Distribution of sandflies (Diptera: Psychodidae) on tree-trunks in a non-flooded area of the Ducke Forest Reserve, Manaus, AM, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, pp. 289-296.
- Cameron, M.M., Amerisinghe, F.P. y Lane, R.P., 1991. The field response of Sri Lanka sandflies and mosquitoes to synthetic cattle-derived attractants. *Parassitologia*, 33, pp. 119-126.
- Campbell-Lendrum, D.H., Pinto, M.C. y Davies, C.R., 1999. *Lutzomyia intermedia* (Lutz and Neiva, 1912) more endophagic than *Lutzomyia whitmani* (Antunes and Coutinho, 1939) because it is more attracted to light? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, pp. 21-22.
- Chanotis, B.N., 1983. Improved trapping of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in light traps supplemented with dry ice in a neotropical rain forest. *Journal of Medical Entomology*, 20, pp. 222-223.
- Chaves, L.F. y Añez, N., 2004. Species co-occurrence and feeding behavior in sand fly transmission of American cutaneous leishmaniasis in western Venezuela. *Acta Tropica*, 92, pp. 219-224.
- Chongo, A.M.L. y García, E.R., 2010. Leishmaniasis y transfusión. *Revista Mexicana de Medicina Transfusional*, 3, pp. S42-S47.
- Christensen, H.A. y Herrer., 1973. Attractiveness of sentinel animals to vectors of leishmaniasis in Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 22, pp. 578-584.

- Cochero, S., Anaya, Y., Díaz, Y., Paternina, M., Luna, A., Paternina, L. y Bejarano E.J., 2007. Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59, pp. 35-39.
- Condino, M.L.F., Sampaio, S.M.P., Henriques, L.F., Galati, E.A.B., Wanderley, D.M.V. y Corrêa, F.M.A., 1998. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31, pp. 355-360.
- Cortés, L.A. y Fernández, J.J., 2008. Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomédica*, 28, pp. 433-40.
- Costa, C.H.N., Tapety, C.M.M. y Werneck, G.L., 2007. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, pp. 415-419.
- Cruz-Ruiz, A.L., García-Rejon, J., Manrique-Saide, P. y Perez-Motul, J., 1994. Taxonomical identification of anthropophilic species in Quintana Roo, Peninsula of Yucatan, Mexico. *Revista Biomedica*, 5, pp. 127-131.
- Dampf, A., 1947. Notas sobre flebotomídeos mejicanos. III. Un nuevo flebotomo (*P. chiapanensis*) aparentemente antropofilo. *Medicina, México*, 27, pp. 3-6.
- David, J.R., Stamm, L.M., Bezerra, H.S., Souza, R.N., Killick-Kendrick, R. y Lima, J.W.O., 2001. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent ant feeding

and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, pp. 839-847.

Davies, C.R., Lane, R.R., Villaseca, P., Pyke, S., Campos, P. y Llanos-Cuentas, A., 1995. The relationship between CDC light trap and human bait catches of endophagic sandflies (Diptera: Psychodidae). *Medical and Veterinary Entomology*, 9, pp. 241-248.

De Barjac, H., Larget, I. y Killick-Kendrick, R., 1981. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, serotype H14, to the larvae of phlebotomine sandflies 1981. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 74, pp. 485-489.

Dekker, T., Steib, B., Carde, R.T. y Geier, M., 2002. L-lactic acid: A human signifying host cue for the anthropophilic mosquito *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 16, pp. 91-98.

DeMilo, A., Lee, C.J., Levi, V. y Moreno, D., 1997. Volatile components of a chicken feather hydrolystate that is highly attractive to the West Indian and Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Entomological Science*, 32, pp. 245-256.

Derbali, M., Polyakova, L., Boujaâma, A., Burruss, D., Cherni, S., Barhoumi, W., Chelbi, I., Poché, R. y Zhioua, E., 2014. Laboratory and field evaluation of rodent bait treated with fipronil for feed through and systemic control of *Phlebotomus papatasi*. *Acta Tropica*, 135, pp. 27-32.

Desjeux, P., 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, 14, pp. 417-423.

[DGEST-SEP] Dirección General de Educación Superior Tecnológica - Secretaría de Educación Pública, 2011. *Inventario florístico y faunístico del predio rústico del Tecnológico de Tapachula, Chiapas*. pp. 57.

Dormont, L., Bessièrre J.-M. y Cohuet, A., 2013. Human Skin Volatiles: A Review. *Journal of Chemical Ecology*, 39, pp. 569-578.

Dougherty, M.J., Guerin, P.M., Ward, R.D. y Hamilton, J.G.C., 1999. Behavioural and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. *Physiological Entomology*, 24, pp. 251-262.

Esterre, P., Chippaux, J.P., Lefait, J.F. y Dedet, J.P., 1986. Evaluation d'un programme de lutte contre la leishmaniose cutanée dans un village forestier de Guyane Française. *Bulletin de l'Organization Mondiale de la Santé*, 64, pp. 559-565.

Falcão, A.L., Falcão, A.R., Pinto, C.T., Gontijo, C.M. y Falqueto, A., 1991. Effect of deltamethrin spraying on the sandfly populations in a focus of American cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, pp. 399-404.

Forattini, O.P., 1973. *Entomologia Médica, Psychodidae; Phlebotominae; Leishmanioses; Bartoneloses*. Vol. 4. São Paulo: Edgard Bluncher/Edusp.

Foster, S.P. y Harris, M.O., 1997. Behavioral manipulation methods for insect pest-management. *Annual Review of Entomology*, 42, pp. 123-46.

França-Silva, J.C., Barata, R.A., Costa, R.T., Monteiro, E.R.M., Machado-Coelho, G.L.L. y Vieira, E.P., 2005. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of

- transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 131, pp. 213-220.
- Galati, E.A.B., 1995. Phylogenetic Systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with Emphasis on American Groups. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 35, pp. 133-141.
- Galati, E.A.B., 2003. Classificação de phlebotominae. En: E.F. Rangel, R. Lainson, eds. 2003. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro, Brazil: FIOCRUZ. pp. 23-51.
- Gallego, J., Trujillo, G., Alzate, A. y Vélez, I., 1995. Distribución espacial de la fauna de flebotomíneos en la Isla de Santa Cruz de Mompox, departamento de Bolívar, Colombia. *Colombia Médica*, 26, pp. 47-50.
- Gamble, K.R. y Smith, D.W., 2009. Discrimination of “Odorless” Mineral Oils Alone and as Diluents by Behaviorally Trained Mice. *Chemical Senses*, 34, pp. 559–563.
- Geier, M., Bosh, O.J. y Boeckh, J., 1999. Ammonia as an attractive of host odour for the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Chemical Senses*, 24, pp. 647-53.
- Geier, M., Bosch, O., Steib, B., Rose, A. y Boeckh, J., 2002. Odour-guided host finding of mosquitoes: identification of new attractants on human skin. En: *Proceedings of the 4th International Conference on Urban Pests*. Blacksburg, Virginia.
- Gibson, G. y Torr, S.J., 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Medical and Veterinary Entomology*, 13, pp. 2-23.
- Gontijo, C.M.F. y Melo, M.N., 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7, pp. 338-349.

- González, C., Rebollar-Téllez, E.A., Ibáñez-Bernal, S., Becker-Fauser, I. y Martínez-Meyer, E., Peterson, A.T. y 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, pp. 839-846.
- Greathead, D.J. y Waage, J.K., 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. Washington, D.C.: The World Bank.
- Guidobaldi, F., May-Concha, I.J. y Guerenstein, P.G., 2014. Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *Journal of Physiology – Paris*.
- Guimarães, V.C.F.V., Costa, P.L., Silva, F.J., Silva, K.T., Silva, K.G., Araújo, A.I.F., Rodrigues, E.H.G. y Filho, S.P.B., 2012. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45, pp. 66-70.
- Hall, D., Beevor, P., Cork, A., Nesbitt, B. y Vale, G., 1984. A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. *Insect Science and its Application*, 5, pp. 335-339.
- Hamilton, J.G. y Ramsoondar, T.M., 1994. Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. *Medical and Veterinary Entomology*, 8, pp. 375-80.
- Hamilton, J.G.C., Dougherty, M.J. y Ward, R.D., 1994. Isolation and identification of sex pheromone activity in components from tergal gland extract of *Lutzomyia*

- longipalpis* (Lutz and Neiva) (Diptera: Psychodidae) from north Eastern Brazil. *Journal of Chemical Ecology*, 20, pp. 141-151.
- Hamilton, J.G.C., Dawson, G.W., Ward, R.D. y Pickett, J.A., 1996a. 3-Methyl- $\alpha$ -himachalene: proposed structure for novel homosesquiterpene sex pheromone of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Jacobina, Brazil. *Journal of Chemical Ecology*, 22, pp. 2331-2340.
- Hamilton, J.G.C., Dawson, G.W. y Pickett, J.A., 1996b. 9-methylgermacrene-B: proposed structure for novel homosesquiterpene from sex pheromone glands of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Lapinha, Brazil. *Journal of Chemical Ecology*, 22, pp. 1477-1491.
- Herrero, M.V., Urbina, A., Gutiérrez, H., Jiménez, A., Pereira, R. y Rivera, C., 1991. Peridomiciliary latrines and Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae) in a focus of Leishmaniasis in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 39, pp. 155-157.
- Heuskin, S., Verheggen, F. J., Haubruge, E., Wathélet, J. P. y Lognay, G., 2011. The use of semiochemical slow-release devices in integrated pest management strategies. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15, pp. 459-470.
- Hribar, L.J., Leprince, D.J. y Foil, L.D., 1992. Ammonia as an attractant for adult *Hybomitra lasiophthalma* (Diptera: Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*, 29, pp. 346-348.

- Hynes, R.K. y Boyetchko, S.M., 2006. Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, pp. 845-849.
- Ibáñez-Bernal, S., 1999. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. I.- *Bruptomyia* França y Parrot; *Lutzomyia* França, las especies de *L.* (*Lutzomyia*) França y del grupo *Verrucarum*. *Folia Entomológica Mexicana*, 107, pp. 61-116.
- Ibáñez-Bernal, S., 2001. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. II. Las especies de *Lutzomyia* (*Coromyia*) Barreto, del grupo *Delpazoi* y de *Lutzomyia* (*Dampfomyia*) Addis. *Folia Entomológica Mexicana*, 40, pp. 17-46.
- Ibáñez-Bernal, S., 2003. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. IV.- Las especies de *Lutzomyia* (*Psychodopygus*) Mangabeira, *L.* (*Micropygomyia*) Barreto, *Lutzomyia* grupo *oswaldoi*, *L.* (*Helicocyrtomyia*) Barreto y especies del género sin agrupar. *Folia Entomológica Mexicana*, 42, pp. 109-152.
- Ibáñez-Bernal, S., Rodríguez-Domínguez, G., Gómez-Hernández, C.H. y Ricardez-Esquinca, J.R., 2004. First record of *Lutzomyia evansi* (Nuñez-Tovar 1924) in Mexico (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, pp.127-129.
- Ibáñez-Bernal, S., 2005a. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. V.- Clave ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia* França. *Folia Entomológica Mexicana*, 44, pp. 49-66.
- Ibáñez-Bernal, S., 2005b. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI.- Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia* França. *Folia Entomológica Mexicana*, 44, pp. 195-212.

Ibáñez-Bernal, S., Hernández-Xoliot, R.A., Mendoza, F., 2006. Collections of Bruchomyiinae and Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) from the northcentral portion of the state of Veracruz, Mexico, with the description of a new species. *Zootaxa*, 1270, pp. 19-33.

Ibáñez-Bernal, S., May-Uc, E. y Rebollar-Tellez, E., 2010. Two new species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from Quintana Roo, Mexico. *Zootaxa*, 2448, pp. 26–34.

Ibáñez-Bernal, S., Suárez-Landa, T. y Mendoza, F., 2011. An updated checklist of the phlebotomine sand flies of Veracruz, Mexico (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Zootaxa*, 2928, pp. 29–40.

[InDRE] Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 2012. Leishmaniasis en México. [en línea] Disponible en: [http://www.indre.salud.gob.mx/interior/leishmaniasis\\_en\\_mexico.html](http://www.indre.salud.gob.mx/interior/leishmaniasis_en_mexico.html) [Acceso 24 de Septiembre de 2014].

[INEGI] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2014. [pdf] INEGI. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/07/07089.pdf>>[Acceso 26 de Septiembre de 2014].

Johnson, P.T., 1961. Autogeny in Panamanian *Phlebotomus* Sandflies (Diptera: Psychodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 54, pp. 116-118.

Kelly, D.W. y Dye, C., 1997. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Animal Behaviour*, 53, pp. 721-731.

- Kemme, J.A., Van Essen, P.H., Ritchie, S.A. y Kay, B.H., 1993. Response of mosquitoes to carbon dioxide and 1-octen-3-ol in southeast Queensland, Australia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9, pp. 431-435.
- Killick-Kendrick, R., Wilkes, T.J., Alexander, J., Bray, R.S., Rioux, J.-A. y Bailly, M., 1985. The distance of attraction of CDC light traps to phlebotomine sand flies. *Annales de Parasitologie et Humaine Comparée*, 60, pp. 763-767.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17, pp. 279-289.
- Kishore, K., Kumar, V., Kesari, S., Dinesh, D.S., Kumar, A.J., Das, P. y Bhattacharya, S.K., 2006. Vector control in leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, 123, pp. 467-472.
- Klowden, M.L., 1996. Endogenous factors regulating mosquito host-seeking behaviour. *Ciba Foundation symposium*, 200, pp. 212-223.
- Kline, D.L., Takken, W., Wood, J.R. y Carlson, D.A., 1990. Field studies on the potential of butanona, carbon dioxide, honey extracts, 1-octen-3-ol, L-lactic acid and phenols as attractant and control. *Medical and Veterinary Entomology*, 4, pp. 383-391.
- Knols, B.G.J., 1996. *Odour-mediated host-seeking behaviour of the Afro-tropical malaria vector Anopheles gambiae Giles*. Ph.D. Agricultural University Wageningen.
- Kumar, V., Kesari, S.K., Sinha, N.K., Palit, A., Ranjan, A., Kishore, K., Saran, R. y Kar, S., 1995. Field trail of an ecological approach for the control of *Phlebotomus*

*argentipes* using mud & lime plaster. *Indian Journal of Medical Research*, 101, pp. 154-156.

Lainson, R. y 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, pp. 811-827.

Lane, R.P., 1993. Sandflies (Phlebotominae). En: R.P. Lane, R.W. Crosskey, eds. 1993. *Medical Insects and Arachnids*. London: Chapman & Hall. pp. 78-119.

Lane, R., Alexander, B., Ferro, C., Montoya-Lerma, J. y Palma, G., 1994. Leishmaniasis. En: B.L. Travi, J. Montoya-Lerma, eds. 1994. *Manual de entomología médica para investigadores de AL. Fund. CIDEIM*, Cali, Colombia. pp. 5-84.

Larson, T.V., Covert, D.S. y Frank, R., 1979. A method for continuous measurement of ammonia in respiratory airways. *Journal of Applied Physiology*, 46, pp. 603-607.

Lawyer, P.G. y Perkins, P.V., 2004. Leishmaniasis and Trypanosomiasis. En: B.F. Eldridge, J.D. Edman, J. Edman, eds. 2004. *Medical Entomology: A Textbook on Public Health and Veterinary Problems Caused by Arthropods: The Netherlands*: Kluwer Academic Publishers.

Leal, W.S., 2005. Pheromone reception. *Topics in Current Chemistry*, 240, pp. 1-36.

Leal, W.S., 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58, pp. 373-391.

Lehane, M., 1991. *Biology of blood-sucking Insects*. London: Harper Collins Academic.

- Logan, J.G. y Birkett, M.A., 2007. Semiochemicals for biting fly control: their identification and exploitation. *Pest management science*, 63, pp. 647-657.
- Magalhães-Junior, J.T., Barrouin-Melo, S.M., Corrêa, A.G., Silva, F.B.R., Machado, V.E., Govone, J.S. y Pinto, M.C., 2014. A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *Parasites & Vectors*, 7, pp. 60.
- Mann, R.S., Kaufman, P.E. y 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, pp. 1052-1061.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D. y Arias, J., 1997. *Métodos de captura, conservacion y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodidae)*, OPS/OMS/HCP/HCT/95/97: Washington, 72 pp.
- Maroli, M. y Khoury, C., 2004. Prevention and control of leishmaniasis vectors: current approaches. *Parasitologia*, 46, pp. 211-215.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R.N. y Gradoni, L., 2012. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, pp. 123-147.
- Maroli, M., Feliciangeli, M.D., Bichaud, L., Charrel, R. N. y Gradoni, L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, pp. 123-147.

- Mascari, T.M., Mitchell, M.A., Rowton, E.D. y Foil, L.D., 2007a. Laboratory evaluation of diflubenzuron as a feed-through for control of immature sand flies (Diptera:Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44, pp. 171-174.
- Mascari, T.M., Mitchell, M.A., Rowton, E.D. y Foil, L.D., 2007b. Evaluation of novaluron as a feed-through insecticide for control of immature sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44, pp. 714-717.
- Mascari, T.M., Mitchell, M.A., Rowton, E.D. y Foil, L.D., 2008. Ivermectin as a rodentfeed-through insecticide for control of immature sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of the American Mosquito Control Association*, 24, pp. 323-326.
- Mascari, T.M., Mitchell, M.A., Rowton, E.D. y Foil, L.D., 2011. Evaluation of juvenilehormone analogues as rodent feed-through insecticides for control of immature phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 25, pp. 227-231.
- Matsui, K., Sasahara, S., Akakabe, Y. y Kajiwara, T., 2003. Linoleic acid 10-hydroperoxide as an intermediate during formation of 1-octen-3-ol from linoleic acid in *Lentinus decadetes*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, pp. 2280-2282.
- Meijerink, J., Braks, M., Brack, A., Adam, W., Dekker, T., Posthumus, M., Van Beek, T. y Van Loon, J., 2000. Identification of olfactory stimulants for *Anopheles gambiae* from human sweat samples. *Journal of Chemical Ecology*, 26, pp. 1367-1382.

- Mellor, H.E., Hamilton, J.G. y Anderson, M., 1996. Spectral sensitivity in the eyes of male and female *Lutzomyia longipalpis* sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 10, pp. 371-374.
- Méndez-Pérez, C., Rebollar-Téllez, E.A., 2012. Análisis morfométrico de poblaciones alopatricas de *Lutzomyia olmeca olmeca* y *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vectores principales de la leishmaniasis cutánea en el sureste de México. *Revista Biomédica*, 23, pp. 7-21.
- Mikery-Pacheco, O., Marina-Fernández, C., Ibáñez-Bernal, S., Sánchez-Guillen, D. y Castillo-Vera, A., 2012. Infección natural de *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) con *Wolbachia* en cafetales de Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana Nueva Serie*, 28, pp. 401-413.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2007. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana*. [pdf] Brasília: Ministério da Saúde. Disponible en: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_lta\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf). [Acceso 25 de septiembre de 2014].
- Monteiro, E.M., França-Silva, J.C., Costa, R.T., Costa, D.C., Barata, R.A., Paula, E.V., Machado-Coelho, G.L.L., Rocha, M.F., Fortes-Dias, C.L. y Dias, E.S., 2005. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, pp. 147-152

- Moore, J.S., Kelly, T.B., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Wallbanks, K.R. y Molyneux, D.H., 1987. Honeydew sugars in wild-caught *Phlebotomus ariasi* detected by high-performance liquid-chromatography (hplc) and gas-chromatography (gc). *Medical and Veterinary Entomology*, 1, pp. 427–434.
- Moreno, J., Rubio-Paliis, Y., Pérez, E., Sánchez, V. y Páez, E., 2002. Evaluación de tres métodos de captura de anofelinos en un área endémica de malaria del estado Bolívar, Venezuela. *Entomotropica*, 17, pp. 157-165.
- Morrison, A.C., Ferro, C., Morales, A., Tesh, R.B. y 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, pp. 427-435.
- Morton, I.E. y Ward, R.D., 1989. Laboratory response of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. *Medical and Veterinary Entomology*, 3, pp. 219-223
- Nakagawa, T. y Vosshall, L.B., 2009. Controversy and consensus: noncanonical signaling mechanisms in the insect olfactory system. *Current Opinion in Neurobiology*, 19, pp. 284-292.
- Nigam, y. y Ward, R.D., 1991. The effect of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Physiological Entomology*, 16, pp. 305-312.

Noguera, P., Rondón M. y Nieves, E., 2006. Effect of blood source on the survival and fecundity of the sand fly *Lutzomyia ovallesi* Ortiz (Diptera: Psychodiadae) vector of *Leishmania*. *Biomedica*, 26, pp. 57-63.

[NOM-032-SSA2-2010] Norma Oficial Mexicana, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. México: Diario Oficial de la Federación.

Noirot, C. y Quennedey, A., 1974. Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology*, 19, pp. 61-80.

Nordlund, D.A. y Lewis, W.J., 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2, pp. 211-220.

Norwood, D.M., Wainman, T., Lioy, P.J. y Waldman, J.M., 1992. Breath ammonia depletion and its relevance to acidic aerosol exposure studies. *Archives of Environmental Health*, 47, pp. 309-313.

Odulaja, A. y Abu-Zinid, I.M., 1997. The relative efficiencies of Latin square and randomized complete block designs for insect trapping experiments: an investigation using field data on tsetse flies. *Ecological Entomology*, 22, pp. 184-188.

Oliveira, E.F., Fernandes, C.E.S., Silva, E.A., Brazil, R.P. y Oliveira, A.G., 2013. Climatic factors and population density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in an urban endemic area of visceral leishmaniasis in midwest Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 38, pp. 224-228.

Oshaghi, M.A., McCall, P.J. y Ward ,R.D., 1994. Response of adult sandflies, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), to sticky traps baited with host odour and tested in the laboratory. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88, pp. 439-44.

[OPS/WHO] - Secretaría de Salud, 1994. *Informe técnico de la I Conferencia Interamericana para el control de la Leishmaniasis*. México: OPS/WHO.

[PAHO] Pan American Health Organization, 2007. Health in the Americas, Volume II – Countries - Mexico. Scientific and Technical Publication No. 622. pp. 466-485

[PAHO] Pan American Health Organization, 2013. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas, Report Leishmaniasis N° 1, PAHO.

Pareja, P.X.L., 2010. *Evaluación en laboratorio y campo de semioquímicos como atrayentes en una población de Lutzomyia longipalpis (Lutz y Neiva) (Diptera: Psychodidae) de la vereda El Callejón del municipio de Ricaurte, Cundinamarca, Colombia*. Magister en Infecciones y Salud en el Trópico. Universidad Nacional de Colombia.

Pastor-Santiago, J.A., Chávez-López, S., Guzmán-Bracho, C., Flisser, A. y Olivo-Díaz, A., 2012. American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, pp. 108-114.

Pech-May, A., Escobedo-Ortegón, F.J., Berzuna-Cruz, M. y Rebollar-Téllez, E.A., 2010. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 24, pp. 150-161.

- Pech-May, A., Marina, C.F., Vázquez-Domínguez, E., Berzunza-Cruz, M., Rebollar-Téllez, E.A., Narvaez-Zapata, J.A., Moo-Llanes, D., Ibáñez-Bernal, S., Ramsey, J.M. y Becker, I., 2013. Genetic structure and divergence in populations of *Lutzomyia cruciata*, a phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) vector of *Leishmania mexicana* in southeastern Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 16, pp. 254-262.
- Pérez, J.E., Villaseca, P., Llanos-Cuentas, A., Campos, M. y Guerra, H., 1988. Técnicas para recolectar "titiras" (*Lutzomyia* spp., Diptera: Psychodidae) en ambientes altoandinos peruanos. *Revista Peruana de Entomología*, 30, pp. 77-80.
- Pérez, J., Virgen, A., Rojas, J.C., Rebollar-Téllez, E.A., Castillo, A., Infante, F., Mikery, O., Marina, C.F. y Ibáñez-Bernal, S., 2014. Species composition and seasonal abundance of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109, pp. 80-86.
- Pinto, M.C., Campbell-Lendrum, D.H., Lozovei, A.L., Teodoro, U. y Davies, C.R., 2001. Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Medical and veterinary entomology*, 15, pp. 132–139.
- Pinto, M.C., Barbieri, K., Silva, M.C.E., Graminha, M.A.S., Casanova, C., Andrade, A.J. y Eiras, A.E., 2011. Octenol as attractant to *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the field. *Journal of Medical Entomology*, 48, pp. 39-44.

- Pinto, M.C., Bray, D.P., Eiras, A.E., Carvalheira, H.P. y Puertas, C.P., 2012. Attraction of the cutaneous leishmaniasis vector *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to host odour components in a wind tunnel. *Parasites & Vectors*, 5, pp. 210-217
- Putnam, D.F., 1971. Composition and concentrative properties of human urine. NASA CR-1802, National Aeronautics and Space Administration, Washington, D.C. 20546.
- Quinnell, R.J., Dye, C. y Shaw, J.J., 1992. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, 6, pp. 195-200.
- R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. [programa de computadora] R Foundation for Statistical Computing. Disponible en: <<http://www.R-project.org/>> [Acceso, 10 de Octubre de 2014].
- Rebollar-Téllez, E.A., Reyes-Villanueva, F., Fernández-Salas, I. y Andrade-Narváez, F.J., 1996. Population dynamics and biting rhythm of the anthropophilic sand fly *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae) in southeast Mexico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38, pp. 29-33.
- Rebollar-Téllez, E.A., Hamilton, J.G.C. y Ward, R.D. 1999. Response of female *Lutzomyia longipalpis* to host odour kairomones from human skin. *Physiological Entomology*, 24, pp. 220-226.
- Rebollar-Téllez, E.A. y Manrique, P., 2001. New distributional record of *Lutzomyia cruciata* in the state of Yucatan, Mexico. *Entomological News*, 117, pp. 21-23.

- Rebollar-Téllez, E.A., 2005. Human body odor, mosquito bites and the risk of disease transmisión. *Folia Entomológica Mexicana*, 44, pp. 247-265.
- Rebollar-Téllez, E.A., Orilla, H., Dzul, F., Che, A., Manrique, P. y Zapata, A., 2006. An update on the phlebotomid sand fly (Diptera: Phlebotomidae) fauna of Yucatan, Mexico. *Entomological News*, 117, pp. 21-23.
- Rebollar-Tellez, E.A., Castillo-Vera, A. y Ibáñez-Bernal, S., 2012. Ecología Química de Phlebotominae (Diptera: Psychodidae). En: J.C. Rojas y E.A. Malo, eds. *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. México: El Colegio de la Frontera Sur. pp. 120-140.
- Robert, L.L., Perich, M.J., Schlein, Y., Jacobson, J.L., Wirtz, R.A., Lawyer, P.G. y Githure, J.I., 1997. Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide's *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 13, pp. 140-144.
- Rodríguez-Cotta, E., 2001. *Evaluación del efecto atrayente de 2-butanona, acetona y L-ácido láctico sobre la alimentación de hembras de Anopheles albimanus Wiedemann (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio*. Tesis licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas.
- Rotureau, B., 2006. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, pp. 81-96.
- Ruiz, H.C.E., Culebro, C.C., Edelmann, L.D., Corzo, M.J. y Morales, E.J., 2013. Leishmaniasis en México foco de leishmaniasis visceral en Chiapas. En: RePLeish (Reunión de los Programas nacionales de Leishmaniasis en las

- Américas), 2ª Reunión. Ciudad de Panamá, Panamá, 08-10 de octubre de 2013. RePLeish.
- Ruther, J., Meiners, T. y Steidle, J.L.M., 2002. Rich in phenomena-lacking in terms. A classification of kairomones. *Chemoecology*, 12, pp. 161-167.
- Ryelandt, J., Noireau, F. y Lazzari, C.R., 2011. A multimodal bait for trapping blood-sucking arthropods. *Acta Tropica*, 117, pp. 131-136.
- Sacks, D. y Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual Review of Microbiology*, 55, pp. 453-83.
- Sánchez-García, L., Berzunza-Cruza, M., Becker-Fausera, I. y Rebollar-Téllez, E.A., 2010. Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104, pp. 406-411.
- Sanchez-Tejeda, G., Rodríguez, N., Parra, C.I., Hernandez-Montes, O., Barker, D.C. y Monroy-Ostria, A., 2001. Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania braziliensis* complex in Nayarit, State of Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, pp. 15-19.
- Sant'ana, A.L., Eiras, A.E. y Cavalcante, R.R., 2002. Electroantennographic responses of the *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) to 1-octen-3-ol. *Neotropical Entomology*, 31, pp. 13-17.
- Serrano Domínguez, A.K., 2013. *Búsqueda de la feromona sexual de Lutzomyia cruciata (Diptera: Psychodidae)*. Licenciatura en Ingeniero Biotecnólogo. Universidad Autónoma de Chiapas.

- Shannon, R., 1939. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 19, pp. 131-148.
- Shirai, Y., Kamimura, K., Seki T. y Morohashi, M., 2001. L-Lactic Acid as a Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellent on Human and Mouse Skin. *Journal of Medical Entomology*, 38, pp. 51-54.
- Silva, D.F., Vasconcelos, S.D. y Eiras, Á.E., 2013. Análise de atrativos químicos na coleta de flebotomíneos em uma área de mata atlântica da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. *Boletim do Museu Integrado de Roraima V*, 7, pp. 24-27.
- Sokal, M.R. y Rohlf, F.J., 1995. *Biometry*, 3rd. ed. New York: Freeman.
- Sosa, Á.E.J., Caro, L.J. y Zúñiga, C.I.R., 2014. Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: Una enfermedad olvidada en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 34, pp. 31-36.
- Spiegel, C.N., Jeanbourquin, P., Guerin, P.M., Hooper, A.M., Claude, S., Tabacchi, R., Sano, S. y Mori, K., 2005. (1S, 3S, 7R)-3-methyl- $\alpha$ -himachalene from the male sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) induces neurophysiological responses and attracts both males and females. *Journal of Insect Physiology*, 12, pp. 1-10.
- Steinbrecht, R.A., 1997. Pore structures in insect olfactory sensilla: a review of data and concepts. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 26, pp. 229-245.
- Steinbrecht, R.A., Stankiewicz, B.A., 1999. Molecular composition of the wall of insect olfactory sensilla: the chitin question. *Journal of Insect Physiology*, 45, pp. 785-790.

- Stengl, M. y Funk, N.W., 2013. The role of the coreceptor Orco in insect olfactory transduction. *Journal of Comparative Physiology A*, 199, pp. 897-909.
- Stephens, C.R., Heau, J.G., Gonzalez, C., Ibarra-Cerdena, C.N., Sanchez-Cordero, V. y González-Salazar, C., 2009. Using biotic interaction networks for prediction in biodiversity and emerging diseases. *PLoS ONE*, 4, pp. e5725.
- Stipanovic, A.J., Hennessy, P.J., Webster, F.X. y Takahashi, Y., 2004. Microparticle dispensers for the controlled release of insect pheromones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 2301-2308.
- Sudia, W.D. y Chamberlain, R.W., 1962. Battery-operated light trap an improved model. *Mosquito News*, 22, pp. 126-129.
- Swale, D.R., Tong, F., Temeyer, K.B., Li, A., Lam, P.C-H., Totrov, M.M., Carlier, P.R., Pérez de León, A.A. y Bloomquist, J.R., 2013. Inhibitor profile of bis(n)-tacrine and N-methylcarbamates on acetylcholinesterase from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* and *Phlebotomus papatasi*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106. pp. 1-20.
- Takken, W. y Knols, B.G.J., 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 44, pp. 131-57.
- Takken, W. y Verhulst, N.O., 2013. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, 58, pp. 433-53.
- Taneja, J. y Guerin, P M., 1997. Ammonia attracts the haematophagous bug *Triatoma infestans*: behavioural and neurophysiological data on nymphs. *Journal of Comparative Physiology A*, 181, pp. 21-34.

- Tauxe, G.M., MacWilliam, D., Boyle, S.M., Guda, T. y Rayemil, A., 2013. Targeting a dual detector of skin and CO<sub>2</sub> to modify mosquito host seeking. *Cell*, 155, pp. 1365-1379.
- Torres-Estrada, J.L. y Rodríguez, M.H., 2003. Señales físico químicas involucradas en la búsqueda de hospederos y en la inducción de picadura por mosquitos. *Salud Pública de México*, 45, pp. 497-505.
- Travi, B.L., Montoya, S.Y., Lozano, L. y Jaramilha, C., 1998. Leishmaniasis in Colombia. I. Studies on the phlebotominae fauna associated with endemic foci in the Pacific Coast region. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39, pp. 261-266.
- Vargas, L., Díaz-Nájera, A., 1953. Listado de flebotomos mexicanos y su distribución geográfica (Diptera: Psychodidae). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 8, pp. 309-314.
- Vargas, L. y Díaz-Nájera, A., 1959. *Phlebotomus farilli* n. sp., *Ph. Humboldti* n. sp. y *Ph. olmecus* n. sp. de México (Diptera: Psychodidae). *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, 19, pp. 141-159.
- Vitta, A.C., Bohman, B., Unelius, C.R. y Lorenzo, M.G., 2009. Behavioral and electrophysiological responses of *Triatoma brasiliensis* males to volátiles produced in the metasternal glands of females. *Journal of Chemical Ecology*, 35, pp. 1212-1221.
- Vogt, R.G., 2003. *Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs*. En: G.J. Blomquist, R.G. Vogt, eds. 2003. *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*. London: Elsevier Academic Press. pp. 391-446.

- Wahba, M.M., 2000. The influence of *Bacillus sphaericus* on the biology and histology of *Phlebotomus papatasi*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 30, pp. 315-323.
- Wasserberg, G., Poché, R., Miller, D., Chenault, M., Zollner, G. y Rowton, E., 2011. Imidacloprid as a potential agent for the systematic control of sand flies. *Journal of Vector Ecology*, 36, pp. S148-S156.
- Wheeler, A.S., Feliciangeli, M.D., Ward, R.D. y Maingon, R.D.C., 1996. Comparison of stick-traps and CDC-light traps for sampling phlebotomine sandflies entering houses in Venezuela. *Medical and Veterinary Entomology*, 10, pp. 295-298.
- Williams, P., 1966. Experimental transmission of *Leishmania mexicana* by *Lutzomyia cruciata*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 60, pp. 365-372.
- Wicher, D., Schäfer, R., Bauernfeind, R., Stensmyr, M.C., Heller, R., Heinemann, S.H. y Hansson, B.S., 2008. *Drosophila* odorant receptors are both ligand-gated and cyclicnucleotide- activated cation channels. *Nature*, 452, pp. 1007-1012.
- [WHO] World Health Organization, 2010. *Technical report series no. 949. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases*, Geneva: World Health Organization.
- [WHO] World Health Organization, 2014. Leishmaniasis, Fact sheet N°375. [en línea] Disponible en: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> [acceso el 24 de septiembre de 2014].
- Ximenes, M.F.F.M., Maciel, J.C. y Jerônimo, S.M.B., 2001. Characteristics of the biological cycle of *Lutzomyia evandroi* Costa Lima & Antunes, 1936 (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, pp. 883-886.

- Young, D.G., Perkins, P.V., 1984. Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). *Mosquito News*, 44, pp. 263-304.
- Young, D.A. y Arias, J.R., 1992. *The Phlebotomine sandflies in the Americas*. Washington, D.C: Pan American Health Organization.
- Young, D.A. y Duncan, M.A., 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54, 1-881.
- Zayed, A., Soliman, M.M. y El-Shazly, M.M., 2013. Infectivity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 50, pp. 796-803.

## 10. ANEXO 1 (Acuse de recibo de envío de artículo y artículo)

memorias@fiocruz.br a través de manuscriptcentral.com

23 de  
sept.

para mí, jrojas, eduardo.reboll., acastill

23-Sep-2014

Dear Mr. Mikery:

Your manuscript entitled "Sand Fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species diversity in an urban area of the municipality of Tapachula, Chiapas, Mexico" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Your manuscript ID is MIOC-2014-0351.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Sincerely,  
Prof. Ricardo Lourenço de Oliveira  
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz  
[memorias@fiocruz.br](mailto:memorias@fiocruz.br)

### Submitted Manuscripts

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Created	Date Submitted	Status
MIOC-2014-0351.R1	Sand Fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species diversity in an urban area of the municipality of Tapachula, Chiapas, Mexico <a href="#">[View Submission]</a>	03-Oct-2014	03-Oct-2014	ES: <a href="#">Carvalho, Maria Clara</a> EA: <a href="#">Lisboa, Thaisa</a> SM: <a href="#">Carvalho, Maria Clara</a> • SM Assigns Reviewers

[▲ top](#)

1 For Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

2

3

4 Sand Flies in Urban Area

5

6

7 **Sand fly (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species diversity in an urban area of**  
8 **the municipality of Tapachula, Chiapas, Mexico**

9

10

11 **Oscar Fernando Mikery Pacheco<sup>1\*</sup>, Julio Cesar Rojas León<sup>1</sup>, Eduardo Alfonso**  
12 **Rebollar-Téllez<sup>2</sup> & Alfredo Castillo Vera<sup>1</sup>**

13

14 <sup>1</sup>Ecología de Artrópodos y Manejo de Plagas, El Colegio de la Frontera Sur, Carretera  
15 Antiguo Aeropuerto km 2.5, Tapachula, Chiapas, CP 30700, México.

16 <sup>2</sup>Departamento de Zoología de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL,  
17 Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, CP 66457, México.

18

19

20

21 Financial Support: FOMIX, Chiapas CHIS-2007-C07-77409

22 \* Corresponding author: omikery@ecosur.edu.mx

23 Telephone: 01 962 898 00 ext: 5412

## Summary

Monitoring phlebotomine sand flies in urban areas is key for epidemiological studies in susceptible populations. This paper describes sand fly fauna present in the urban area of the municipality of Tapachula, Chiapas, Mexico, and captured with Shannon and CDC light traps. During February and March of 2014, 1442 sand flies were captured, the total comprised *Lutzomyia cruciata* (Coquillet) (98.8%), *Lu. c. cayennensis* (Floch and Abonnenc) (0.8%), *Lu. chiapanensis* (Dampf) (0.3%) and *Lu. atulapai* (De León) (0.1%). *Lu. cruciata* was the most abundant and the most frequently trapped species. This was the first record of its remarkable ability to adapt to urban green areas. The three other species trapped are new registers of geographic distribution for the study region. The results indicate the need to establish measures for reducing human contact with the vector and the risk of possible sites of infection.

**Key words:** Sand flies, urban area, Mexico, urbanization

Chiapas is one of the states of the Mexican Republic with high incidence of skin and visceral leishmaniasis (Sánchez-Tejeda et al. 2001, Becker et al. 2005). The main risk factors for contracting this disease are urbanization of ecosystems, host immunological stage and lack of effective treatment (Dujardin 2006). Environmental changes, which can also be the product of urbanization, increase human exposure to phlebotomine as a consequence of the alteration in range and density of the vectors (Dujardin 2006). This paper describes, for the first time, the composition of sand fly fauna present in a green area of an urban zone (160 masl) of Tapachula, Chiapas, Mexico (Figure 1). This area is characterized by the presence of a large variety of tree and bush species, among which

47 predominate *Mangifera indica*, *Theobroma cacao* and *Coffea* sp. The availability of  
48 vertebrates, which represent sources of blood for the sand fly and possible reservoirs of the  
49 disease (Young & Arias 1992, Rotureau 2006), is unknown. Seven miniature light traps of  
50 the CDC type and a Shannon trap were placed within the area during 14 inconsecutive  
51 nights (6:30-8:30 PM) of the dry season (February to March, 2014). The captured insects  
52 were deposited in recipients with 70% alcohol. To identify the material, permanent  
53 preparations were made in Euparal<sup>®</sup> resin (BioQuip Products, CA), following the method  
54 described by Ibáñez-Bernal (2005a). The keys of Ibáñez-Bernal (1999, 2003, 2005a and b)  
55 were used for morphological identification of the captured material.

56 A total of 1442 phlebotomine sand flies were captured in the study area using two types  
57 of traps CDC=74; Shannon=1368). The species identified were *Lu. cruciata* (98.8%), *Lu. c.*  
58 *cayennensis* (0.8%), *Lu. chiapanensis* (0.3%) and *Lu. atulapai* (0.1%) (Table 1). This  
59 paper is the first description of the composition of the sand fly population within an urban  
60 area of this region of Mexico. The register of the presence of *Lu. cruciata* in the coffee-  
61 producing region of Soconusco date from 1941 (Ibáñez-Bernal 1999), the oldest geographic  
62 record of the four captured species. This, however, is the first time the species has been  
63 trapped in an urban area. Both types of traps captured mostly specimens of *Lu. cruciata*,  
64 although they were more predominant in the Shannon trap, suggesting the capacity of this  
65 species to adapt to this type of habitat and confirming its anthropophilic habits (Rebollar-  
66 Téllez et al. 1996). Maintenance of this wild population must have required a relatively  
67 nearby food source, considering the limited capacity for dispersion of hematophagous  
68 adults (<100 m). The vertebrates associated with the habitat certainly provide ideal  
69 conditions for its development, repose and reproduction (Salomón et al. 2008, Wasseberg

70 et al. 2003). The approximately 9326 people that live around the study area (INEGI 2010,  
71 DGEST-ITT 2013), however, should not be ruled out as a source of food for *Lu. cruciata*.  
72 This study is the first geographic record of the species *Lu. c. cayennensis*, *Lu. chiapanensis*  
73 and *Lu. atulapai* in this area. Records of these species in Mexico are rare and in the state of  
74 Chiapas, even more so. In 1959, *Lu. c. cayennensis* was collected from a hole in a tree in  
75 the municipality of Acacoyahua, Chiapas, co-existing with bats and reptiles (Vargas &  
76 Díaz-Nájera 1959). *Lu. chiapanensis* was collected in 1938 in the municipality of Chiapa  
77 de Corzo (Ibáñez-Bernal 2003), while *Lu. atulapai* was trapped in the municipality of  
78 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (Ibáñez-Bernal 2001). Previous records of the presence of these  
79 species in Chiapas are very old, a fact that limits conclusions, although there may be  
80 geographic registers in new areas as a consequence of highly modified anthropology. A  
81 new geographic register for this species would constitute high risk of human contact with  
82 the vector and possible focuses of infection because of the medical importance of these  
83 species (Cochero et al. 2007) and because the conditions favor population increases during  
84 the dry season in this region (Pérez et al. 2014).

85 Association of phlebotomine sand flies with patches of vegetation in an urban areas has  
86 also been documented in other parts of the world with endemic leishmaniasis (Salomón et  
87 al. 2008, Cerino et al. 2009). Tapachula is a population of approximately 350 thousand  
88 inhabitants (INEGI 2010), who are mostly people from other parts of Chiapas, other states  
89 of the republic, and mostly from Central America. In some of these places leishmaniasis is  
90 endemic. Modifications in the landscape, together with peridomestic transmission and  
91 domestication of the vector, promote epidemic outbreaks (Solomón et al. 2008). Currently,  
92 there are no clinical cases of the disease recorded in this city, although *Lu. cruciata* is a

93 species that has been incriminated as vector of leishmaniasis in Mexico (Pech-May et al.  
94 2010). A possible immigration of infected humans to urban environments and the  
95 abundance of vector species, together, would threaten the population with outbreaks of  
96 leishmaniasis. In any case, the environmental conditions of urban zones are adverse  
97 compared with those in secondary vegetation patches, although the latter may be  
98 comparable to those observed in peridomestic habitats (Salomón et al 2008). In addition to  
99 the high abundance of *Lu. cruciata*, the other species captured, although in low numbers,  
100 their ability to feed on mammals or other domestic animals, also represents risk of  
101 leishmaniasis transmission through interaction between possible zoonotic and  
102 anthrozoonotic cycles that may arise (Chaves & Añez 2004).

103 This paper is the first description of sand fly population composition within an urban  
104 area in this region of Mexico, and the findings are the first register of *Lu. cruciata* in this  
105 type of habitat, suggesting that it is highly capable of adapting to urbanized environments.  
106 This finding makes it necessary to explore other sites with the same conditions, as well as  
107 to monitor population fluctuations with the objective of establishing measures to reduce  
108 human contact with the vector and the risk of possible focuses of infection.

109

110

111

### **Acknowledgments**

112

113

114

We thank Juan Cisneros, Karen Serrano and Ricardo Toledo for their assistance in  
the field. We are especially grateful to Instituto Tecnológico de Tapachula for allowing us

115 to conduct this study on its land. Funding was provided by CONACyT and the Government  
116 of Chiapas state (FOMIX, CHIS- 2007-C07-77409).

117

118

### 119 **Cited Literature**

120

121 Ashford RW 2007. Disease as a stabilizing factor in the protection of landscape: the  
122 leishmaniasis models. *Eco Health* 4: 99-103.

123 Becker I, Carrada-Figueroa G, Gudiño-Zayas M, González C, Berzunza-Cruz M, Rivas-  
124 Sánchez B, Velasco-Castrejón O 2005. Análisis de la leishmaniasis en México. Consulta  
125 de expertos OPS/OMS sobre la leishmaniasis visceral en las Américas. Informe Final.  
126 Brasilia, Brasil, nov. 23-25.

127 Cerino DA, Teodoro Ueslei, Silveira TGV 2009. Sand flies (Diptera: Psychodidae) in the  
128 urban area of the municipality of Cianorte, Paraná State, Brazil. *Neotrop Entomol* 38:  
129 853-858.

130 Chaves LF, Añez N 2004. Species co-occurrence and feeding behavior in sand fly  
131 transmission of American cutaneous leishmaniasis in western Venezuela. *Acta Trop* 92:  
132 219-224.

133 Cochero S, Anaya Y, Díaz Y, Paternina M, Luna A, Paternina L, Bejarano EJ 2007.  
134 Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos  
135 tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María,  
136 Colombia. *Rev Cubana Med Trop* 59: 35-39.

137 DGEST-ITT 2013. Informe de rendición de cuentas, Instituto Tecnológico de Tapachula.  
138 [http://www.snit.mx/images/areas/c\\_planeacion/2014/IRC2013/Chiapas/IRC\\_de\\_TAPA](http://www.snit.mx/images/areas/c_planeacion/2014/IRC2013/Chiapas/IRC_de_TAPA)  
139 [CHULA.pdf](#), acceso martes 29 de julio 2014.

140 Ibáñez-Bernal S 1999. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de Mexico. I. *Bruptomyia*  
141 França y Parrot; *Lutzomyia* França, las especies de *L. (Lutzomyia)* França y del grupo  
142 *Verrucarum*. *Folia Entomológica Mexicana* 107: 61-116.

143 Ibáñez-Bernal S 2001. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. II. Las especies  
144 de *Lutzomyia (Coromyia)* Barreto, del grupo *Delpozoi* y de *Lutzomyia (Dampfomyia)*  
145 *Addis*. *Folia Entomológica Mexicana*, 40: 17-46.

146 Ibáñez-Bernal S 2003. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. IV. Las especies  
147 de *Lutzomyia (Psychodopygus)* Mangabeira, *L. (Micropygomyia)* Barreto, *Lutzomyia*  
148 grupo oswaldo, *L. (Helicocyrtomyia)* Barreto y especies del género sin agrupar. *Folia*  
149 *Entomológica Mexicana* 42: 109-152.

150 Ibáñez-Bernal S 2005a. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. V.- Clave  
151 ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia* França. *Folia Entomológica*  
152 *Mexicana* 44: 49-66.

153 Ibáñez-Bernal S 2005b. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI.- Clave  
154 ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia* França. *Folia Entomológica*  
155 *Mexicana* 44: 195-212.

156 INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <http://www.inegi.org.mx/>, consultado  
157 el martes 29 de junio de 2014.

158 Mikery-Pacheco O, Marina-Fernández C, Ibáñez-Bernal S, Sánchez-Guillén D, Castillo-  
159 Vera A 2012. Infección natural de *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodiade,

160 Phlebotominae) con *Wolbachia* en cafetales de Chiapas, México. *Acta Zoológica*  
161 *Mexicana* 28: 401-413.

162 Pech-May A, Escobedo-Ortegón FJ, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA 2010.  
163 Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania*  
164 parasites in Mexico. *Med Vet Entomol* 24: 150-161.

165 Pérez J, Virgen A, Rojas JC, Rebollar-Téllez EA, Castillo A, Infante F, Mikery O, Marina  
166 CF, Ibáñez-Bernal S 2014. Species composition and seasonal abundance of sandflies  
167 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in coffee agroecosystems. *Mem Inst Oswaldo*  
168 *Cruz* 109: 80-86.

169 Rebollar-Téllez EA, Reyes-Villanueva F, Fernández-Salas I, Andrade-Narváez FJ 1996.  
170 Population dynamics and biting rhythm of the anthropophilic sandfly *Lutzomyia*  
171 *cruciata* (Diptera: Psychodidae) in southeast Mexico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38:  
172 29-33.

173 Rotureau B 2006. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex.  
174 *Am J Trop Med Hyg* 74: 81-96.

175 Salomón OD, Quintana MG, Zaidenberg M 2008. Urban distribution of Phlebotominae in a  
176 cutaneous leishmaniasis focus, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 282-287.

177 Sánchez-García L, Berzunza-Cruz M, Becker-Fausera I, Rebollar-Téllez EA 2010. Sand  
178 flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal  
179 city, Quintana Roo, Mexico. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 104: 406-411.

180 Sánchez-Tejeda G, Rodríguez N, Parra CI, Hernández-Montes O, Barker DC, Monroy-  
181 Ostría A 2001. Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania braziliensis*  
182 complex in Nayarit, state of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 15-19.

183 Shaw J 2007. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. *Mem Inst*  
184 *Oswaldo Cruz* 102: 541-547.

185 Vargas L, Díaz-Nájera A 1959. *Phlebotomus farilli* n. sp., *Ph. Humboldti* n. sp. y *Ph.*  
186 *olmecus* n. sp. de México (Diptera: Psychodidae). *Rev Inst Salubr Enferm trop* 19: 141-  
187 159.

188 Wassenberg G, Abramsky Z, Kotler BP, Ostfeld RS, Yarom I, Warburg A 2003.  
189 Anthropogenic disturbances enhance occurrence of cutaneous leishmaniasis in Israel  
190 deserts: patterns and mechanisms. *Ecol Appl* 13: 868-881.

191 Young DA, Arias JR 1992. The Phlebotomine sandflies in the Americas. Washington, D.C:  
192 Pan American Health Organization.

193

194

195

196 **Table 1.** Phlebotomine species captured in an urban area of the municipality of Tapachula,  
 197 Chiapas, Mexico.

Species	Shannon		CDC		Total
	♀	♂	♀	♂	
<i>Lutzomyia cruciata</i>	1368	0	28	28	1424
<i>Lutzomyia c. cayennensis</i>	0	0	6	6	12
<i>Lutzomyia chiapanensis</i>	0	0	4	0	4
<i>Lutzomyia atulapai</i>	0	0	0	2	2

198

199

200

201

**Figure legends**

202

203

204 **Figure 1.** Location of the sample site in the municipality of Tapachula, Chiapas, Mexico.

205 Numbers inside the circle indicate population density and the shaded area

206 indicate the sampled forest.

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

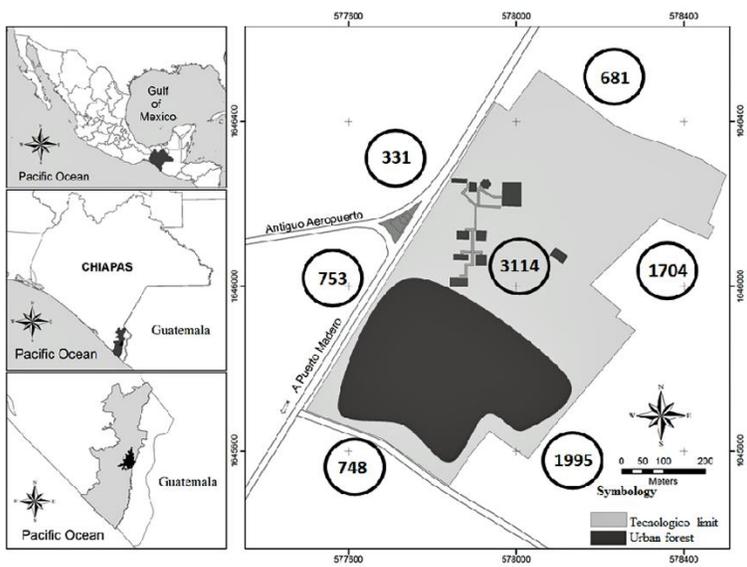
217

218

219

220

221



222  
 223  
 224  
 225  
 226  
 227  
 228  
 229  
 230  
 231

11. ANEXO 2 (Dictamen del Comité de Ética para la Investigación de El Colegio de la Frontera Sur)



**EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR  
COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN**

San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, 5 de febrero 2014

CEI-O-008/14

Vigencia: 5 de febrero 2015

Oscar Fernando Mikery Pacheco  
Estudiante de Maestría  
ECOSUR  
P R E S E N T E

Posterior a la revisión por parte del Comité de Ética para la Investigación (CEI) de su protocolo de investigación: "Búsqueda de atrayentes para *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae)", con base en el capítulo VI, artículo 20 del Reglamento del CEI de El Colegio de la Frontera Sur, el Comité en pleno dictaminó lo siguiente:

APROBARLO

Se extiende la presente para los fines académicos que requiera la solicitante.

Atentamente

Dra. Guadalupe del Carmen Álvarez Gordillo  
Presidenta del CEI

ccp. Austreberta Nazar Beutelspacher (Directora del posgrado)  
ccp. Comité de Ética para la Investigación  
ccp. Archivo

**EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR**

San Cristóbal Tapachula Chetumal Villahermosa Campeche  
Carretera Panamericana y Periférico Sur s/n. Barrio de María Auxiliadora. CP 29290.  
San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. Tel: (967) 674.9000. Fax: (967) 674.9021.

[www.ecosur.mx](http://www.ecosur.mx) [etica@ecosur.mx](mailto:etica@ecosur.mx)