

Cambios en el extremo carboxilo terminal de citocromo b como carácter taxonómico en *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae)

Changes in the carboxyl-terminal domain of cytochrome b as a taxonomic character in *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae)

RAFAEL JOSÉ VIVERO¹, MARÍA ANGÉLICA CONTRERAS-GUTIÉRREZ² y EDUAR ELÍAS BEJARANO³

Resumen: Los caracteres morfológicos se emplean para la determinación taxonómica tradicional de flebotómíneos del género *Lutzomyia*, sin embargo, su utilidad es limitada en algunas especies. En este trabajo se caracterizó la región del genoma mitocondrial que codifica para el extremo carboxilo terminal de la proteína citocromo b en siete especies de *Lutzomyia*: *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangeliana* y *L. evansi*. Se detectaron 134 sitios polimórficos (40,9%) en el gen y 29 sitios (26,6%) en la proteína. El alto polimorfismo en citocromo b comprendió el reemplazo de aminoácidos, empleo de distintos codones de parada y diferencias en el tamaño de la proteína. Se discute la utilidad de la región estudiada en la identificación de especies de *Lutzomyia*.

Palabras clave: Phlebotominae. ADN mitocondrial. Leishmaniasis. Colombia.

Abstract: Morphological characters have been traditionally used for identification of sand flies of the genus *Lutzomyia*; however, their utility is limited in some species. In this work, we characterized the mitochondrial DNA region coding for the carboxyl-terminal domain of cytochrome b protein in seven species of *Lutzomyia*: *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangeliana* and *L. evansi*. A total of 134 polymorphic sites were detected in the gene (40.98%) and 29 sites in the protein (26.6%). The very high level of polymorphism observed in cytochrome b, included replacement of amino acids, use of alternative stop codons, and differences in the size of the protein. The utility of the studied region in the identification of *Lutzomyia* species is discussed.

Key-words: Phlebotominae. Mitochondrial DNA. Leishmaniasis. Colombia.

Introducción

Los flebotómíneos son insectos nematóceros ubicados en la subfamilia Phlebotominae Rondani, 1840, la cual está integrada por los géneros *Phlebotomus* Rondani y Berté, 1840, *Sergentomyia* França & Parrot, 1920, *Chinius* Leng, 1987, *Brumptomyia* França y Parrot, 1921, *Warileya*, Hertig, 1948, y *Lutzomyia* França, 1924 (Bejarano 2006). A la fecha se han descrito casi 500 especies de *Lutzomyia* que se encuentran distribuidas principalmente en las zonas tropicales y subtropicales de América. Más del 10% de estas especies son transmisores de *Leishmania* Ross, 1903, protozoo causante de las enfermedades denominadas leishmaniasis (Killick-Kendrick 1999; Lainson y Shaw 2005), las cuales han recobrado su importancia epidemiológica en los últimos años por el aumento del número de casos registrados tanto en áreas rurales como urbanas de Latinoamérica (Bejarano *et al.* 2002; Shaw 2007).

Un aspecto primordial en el estudio ecoepidemiológico de la leishmaniasis es la identificación de las especies de *Lutzomyia* presentes en cada foco de transmisión, porque facilita la dirección de las medidas de control vectorial hacia los responsables de la transmisión del parásito. Esta determinación taxonómica se fundamenta en los caracteres morfológicos del insecto adulto debido a las dificultades para localizar los estados preimaginales en la naturaleza (Montoya-Lerma y Ferro 1999). En la actualidad los flebotómíneos ameri-

canos se identifican con las descripciones y la clave morfológica de Young y Perkins (1984) y Young y Duncan (1994), basadas en la propuesta de Lewis *et al.* (1977), que acepta la presencia de tres géneros en el Nuevo Mundo, o la clave de Galati (2003a), que sigue en parte el planteamiento de Forattini (1973), y propone 23 géneros americanos (Galati 2003b; Galati *et al.* 2003).

Más allá de las divergencias en el tratamiento taxonómico al nivel supraespecífico, estas claves no permiten separar las hembras o los machos de algunas especies con alta similitud morfológica, como en la serie *townsendi* del grupo *verrucarum* Theodor, 1965, la serie *squamiventris* del subgénero *Psychodopygus* Mangabeira, 1941, y los subgéneros *Helcocyrtomyia* Barretto, 1962, *Trichophoromyia* Barretto, 1962, y *Trichopygomyia* Barretto, 1962, entre otros grupos taxonómicos (Young y Duncan 1994; Galati 2003a). Esto podría ser particularmente problemático para la incriminación de especies simpátricas que presentan la misma morfología pero diferente capacidad vectorial. Las variaciones en los rasgos morfológicos usados tradicionalmente para la determinación taxonómica tornan imperiosa la necesidad de nuevos caracteres con mayor capacidad de discriminar especies.

Las secuencias de nucleótidos son una herramienta molecular que se ha usado en los flebotómíneos para identificar especies indistinguibles en uno de los sexos (Testa *et al.* 2002), estudiar las relaciones filogenéticas (Torgerson *et al.* 2003; Beati *et al.* 2004; Vivero *et al.* 2007) y analizar la estructu-

¹ B. Sc. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales - PECET, Universidad de Antioquia. Calle 62 No. 52-59, Medellín, Colombia. rajovigo2001@yahoo.com.

² B. Sc. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales - PECET, Universidad de Antioquia. Calle 62 No. 52-59, Medellín, Colombia. mayito-contreras@hotmail.com.

³ Autor para correspondencia: M. Sc. Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre. Carrera 14 No. 16 B-32, Sincelejo, Colombia. eduardelias@yahoo.com.

ra genética de las poblaciones (Ready *et al.* 1997; Ishikawa *et al.* 1999), en especial cuando se sospecha la existencia de complejos de especies (Uribe *et al.* 2001; Arrivillaga *et al.* 2002; Hodgkinson *et al.* 2003). Aunque por su costo, las secuencias están aún distantes de implementarse en el diagnóstico rutinario de especie, son una alternativa que permite, además de sortear las limitaciones inherentes a los caracteres morfológicos, establecer las bases para el futuro desarrollo de claves moleculares. El propósito de este estudio fue caracterizar el polimorfismo de la región del genoma mitocondrial que codifica para el extremo carboxilo de la proteína citocromo b en siete especies de flebotomíneos del género *Lutzomyia* y evaluar su potencial utilidad como carácter taxonómico.

Materiales y Métodos

Flebotomíneos. Los muestreos entomológicos se desarrollaron en la ciudad de Sincelejo (9°18'N, 75°25'W), capital del departamento de Sucre, Colombia, en la que se registra en promedio por año una temperatura de 28°C y precipitación de 1050 mm, que corresponde, según la clasificación de Holdridge (1967), a bosque seco tropical. Los insectos se recolectaron cuatro veces por semana, entre los meses de febrero y noviembre de 2005, con dos trampas de luz tipo CDC instaladas en el intradomicilio y peridomicilio entre las 18:00 y 06:00 horas.

Cada flebotomíneo se diseccionó separando la cabeza, un ala y los segmentos terminales del abdomen, los cuales fueron aclarados por 24 horas en lactofenol y montados en una lámina portaobjeto con el medio de Hoyer. La determinación de especie se efectuó con las claves taxonómicas de Young y Duncan (1994) y Galati (2003a). Los especímenes testigo están depositados en la "Colección de Artrópodos de Importancia Médica de la Universidad de Sucre - CAIMUS", en Sincelejo, Colombia.

Extracción del material genético. El ADN se extrajo siguiendo el protocolo de Collins *et al.* (1987), con algunas modificaciones. El tórax, un ala, las patas y los segmentos iniciales del abdomen se maceraron en 60 µl del tampón de lisis (0,08 NaCl, 0,16 M sacarosa, 0,06 M EDTA, 0,5% SDS, 0,1 M Tris-HCL a pH de 7,5), e incubaron a una temperatura de 65°C por 30 minutos. Las proteínas se precipitaron con 14 µl de acetato de potasio 8M durante 30 minutos sobre hielo, seguido por centrifugación a 12000 x g durante 10 minutos. La precipitación del ADN del sobrenadante se realizó con 200 µl de etanol absoluto e incubación a -20°C durante 24 horas. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 20 minutos y el ácido nucleico precipitado se lavó con 200 µl de etanol al 70% y luego con 200 µl de etanol absoluto. Finalmente, el ADN extraído se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de agua.

Secuenciación de nucleótidos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se desarrolló con los oligonucleótidos sentido (CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAATGATA) y antisentido (GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA (T/A)TTCG(T/A)TATGA) (Ready *et al.* 1997). El gen citocromo b se amplificó en un volumen final de 50 µl que contenían 0,3 mM de cada cebador, buffer de PCR 1x, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de la mezcla de desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs), 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa y 8 µl de la solución con el ADN extraído. El perfil térmico incluyó una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, una segunda etapa de 35 ciclos, consistente en desnaturalización a 93°C por 1 minuto, alineamiento a 50°C por

1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, y una tercera etapa de elongación a 72°C durante 10 minutos. El producto amplificado se purificó usando Wizard PCR Preps (Promega) y se secuenció automáticamente por electroforesis capilar con distintos fluorocromos, para marcar los didesoxinucleótidos terminadores de cadena.

Análisis molecular. La secuencia nucleotídica del gen citocromo b se determinó en ambos sentidos de la doble hebra de ADN mitocondrial. Los cromatogramas fueron editados con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versión 3.1 para generar la secuencia consenso de cada espécimen (Kumar *et al.* 2004). El alineamiento nucleotídico se realizó con el algoritmo Clustal W incorporado en MEGA 3.1, y se usaron los valores por defecto para la penalización por apertura y extensión de gaps (Thompson *et al.* 1994). A partir del alineamiento se determinó la composición nucleotídica del gen, se tradujeron las secuencias de nucleótidos a aminoácidos y se calcularon las distancias genéticas pareadas bajo el modelo biparamétrico de Kimura (1980) que otorga tasas diferentes de mutación a las transiciones y transversiones. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína se realizó con base en el código genético mitocondrial de *Drosophila* integrado a MEGA 3.1. La distribución de la variabilidad dentro del fragmento mitocondrial secuenciado se examinó determinando la entropía H(x) de cada posición nucleotídica con el programa Bioedit (Hall 1999). Las secuencias de nucleótidos generadas durante la presente investigación están depositadas en Genbank (National Center for Biotechnology Information - NCBI) bajo los códigos de acceso EF012215, EF012216, EF012217, EF012218, EF012219, EF012220, EF012221, EF012222, EF012223, EF012224 y EF012225.

Resultados y Discusión

Se obtuvo un fragmento nucleotídico de 327 pares de bases (pb) del extremo 3' del gen mitocondrial citocromo b, que codifica para 108 aminoácidos del dominio carboxilo terminal de la proteína homónima localizada en la membrana interna de la mitocondria, la cual es un componente indispensable dentro de la cadena respiratoria (Figs. 1 y 2). En el alineamiento múltiple se incluyeron además nueve posiciones nucleotídicas correspondientes al espaciador intergénico 1 (IG1), que separa, en algunas especies, a los genes citocromo b y ARN de transferencia mitocondrial para serina (UCN) (ARNt^{Ser}).

Las secuencias se aislaron a partir de siete especies de *Lutzomyia* integrantes de igual número de subgéneros o grupos, las cuales fueron identificadas como *L. trinidadensis* (Newstead, 1922) del grupo *oswaldoi*, *L. panamensis* (Shannon, 1926) del subgénero *Psychodopygus*, *L. cayennensis* (Floch y Abonnenc, 1941) del subgénero *Micropygomyia*, *L. dubitans* (Sherlock, 1962) del grupo *migonei*, *L. gomezi* (Nitzulescu, 1931) del subgénero *Lutzomyia*, *L. rangeli* (Ortíz, 1952), especie no agrupada y *L. evansi* (Núñez-Tovar, 1924) del grupo *verrucarum*. Con la excepción de *L. dubitans*, todas las especies tienen antecedentes en salud pública. *L. evansi* es un reconocido vector de *Le. infantum* Nicolle, 1908, *L. panamensis* y *L. gomezi* son transmisoras de *Le. panamensis* Lainson y Shaw, 1972, *L. rangeli* y *L. trinidadensis* se han encontrado con *Leishmania*, y *L. cayennensis* ha sido hallada infectada con parásitos tripanosomatídeos (Bonfante-Garrido *et al.* 1990, 1999; Travi *et al.* 1990; Santamaría *et al.* 2006; Cochero *et al.* 2007).

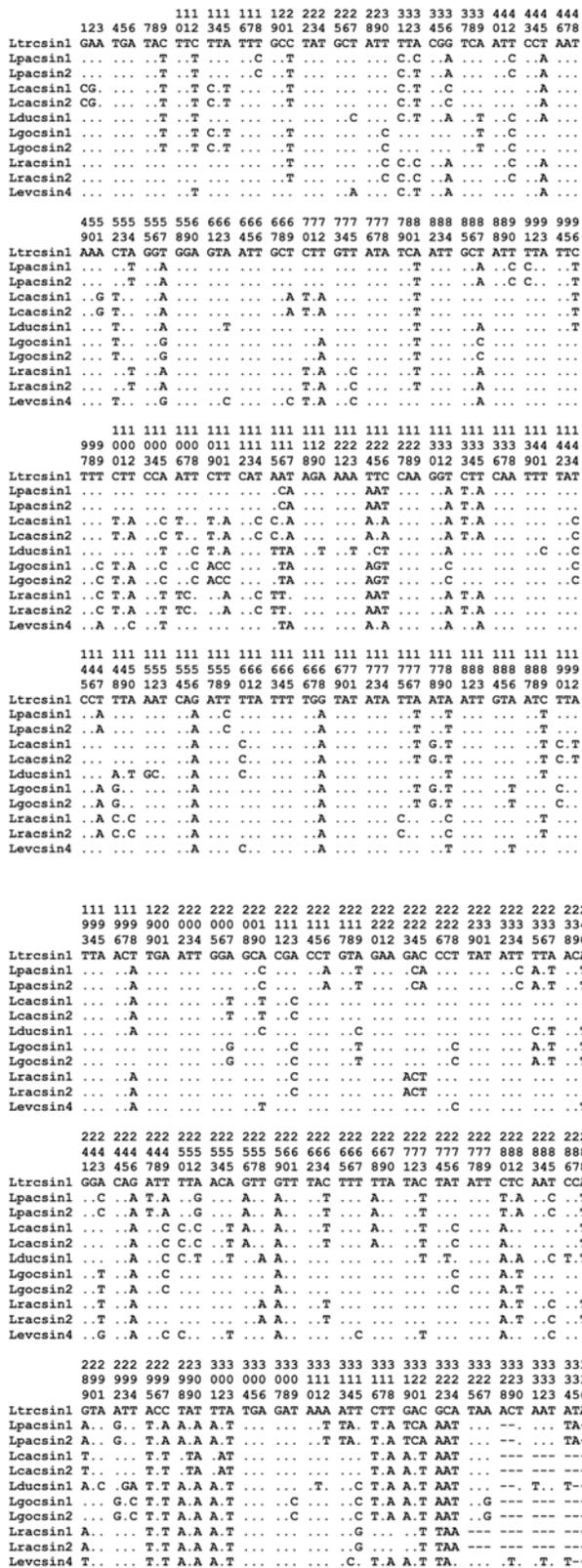


Figura 1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas parciales del gen citocromo b (posiciones 1 a 327) y del espaciador intergénico 1 (posiciones 328 a 336) aisladas de *L. trinidadensis* (Ltrcsin1), *L. panamensis* (Lpacsin1, Lpacsin2), *L. cayennensis* (Lcacsin1, Lcacsin2), *L. dubitans* (Lducsin1), *L. gomezi* (Lgocsin1, Lgocsin2), *L. rangelifiana* (Lracsin1, Lracsin2) y *L. evansi* (Levcsin4). Los nucleótidos se representan con la primera letra de su respectivo nombre, las homologías con puntos y los eventos indel (inserción-delección) con guiones.

En total se obtuvieron 11 secuencias de nucleótidos (dos aisladas de igual número de ejemplares de *L. panamensis*, *L. c. cayennensis*, *L. gomezi* y *L. rangelifiana*, y una de *L. trinidadensis*, *L. dubitans* y *L. evansi*), de las cuales se derivaron ocho haplotipos nucleotídicos (Fig. 1) y siete haplotipos aminoácidos (Fig. 2). La composición nucleotídica estuvo marcada por un alto contenido de adenina y timina equivalente al 73,09% de las bases secuenciadas, mientras que los nucleótidos guanina y citosina alcanzaron sólo el 26,1%. Como era esperarse al nivel proteico prevalecieron los aminoácidos no polares como isoleucina y leucina que representaron en promedio el 16,03% y 15,27%, respectivamente, del contenido aminoácido, lo cual está relacionado con la hidrofobicidad de la proteína citocromo b.

A lo largo del extremo 3' del gen analizado se detectaron 134 sitios polimórficos que arrojaron una variación global del 40,98%, con porcentajes de divergencia entre especies del 16,51% al 23,55%. Consecuentemente, los valores de distancia genética de Kimura fluctuaron entre 0.1889 y 0.2868 (Tabla 1). El valor más bajo se registró al comparar *L. evansi* y *L. dubitans*, mientras que el más alto se presentó entre *L. trinidadensis* y *L. dubitans*. De otro lado, los aislados de *L. panamensis* mostraron entre sí una transición en la posición 33 del alineamiento nucleotídico (Fig. 1), mientras que en *L. c. cayennensis*, *L. gomezi* y *L. rangelifiana* no se observaron sustituciones intraespecíficas. Por lo anterior, las distancias genéticas intraespecíficas oscilaron entre 0 y 0.0031. El análisis de entropía reveló que, salvo por el ligero aumento registrado en algunas posiciones nucleotídicas (Fig. 3), la variabilidad estuvo distribuida

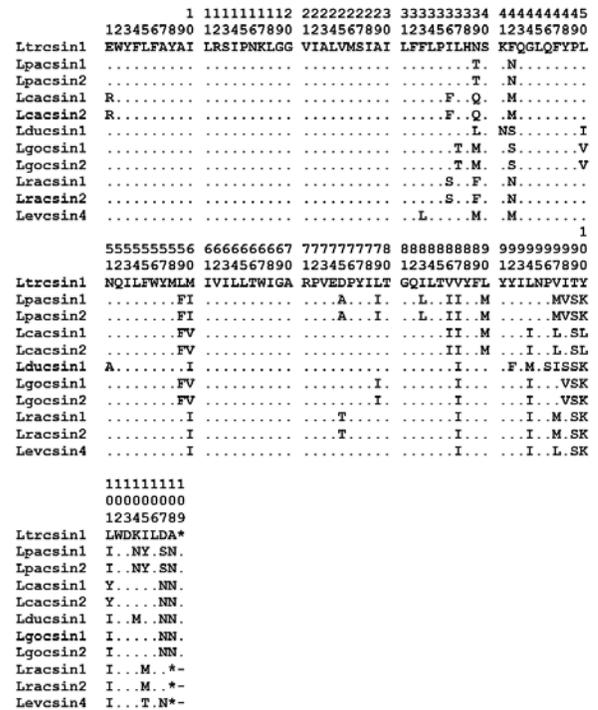


Figura 2. Alineamiento de secuencias aminoácidas del dominio carboxilo terminal de la proteína citocromo b de *L. trinidadensis* (Ltrcsin1), *L. panamensis* (Lpacsin1, Lpacsin2), *L. c. cayennensis* (Lcacsin1, Lcacsin2), *L. dubitans* (Lducsin1), *L. gomezi* (Lgocsin1, Lgocsin2), *L. rangelifiana* (Lracsin1, Lracsin2) y *L. evansi* (Levcsin4). Los aminoácidos se representan con su código universal de una letra, las homologías con puntos, los eventos indel (inserción-delección) con guiones y los codones de parada con asteriscos.

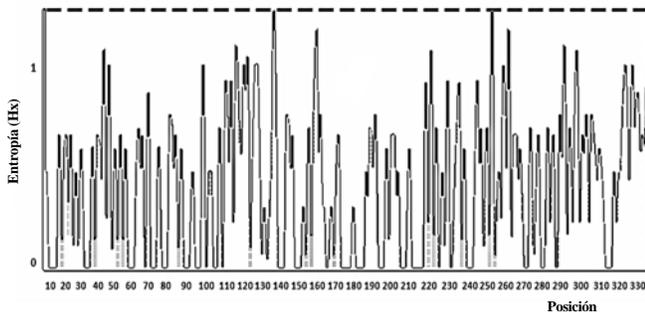


Figura 3. Entropía $H(x)$ en la secuencia de nucleótidos parcial del gen citocromo b de *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. c. cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangelifiana* y *L. evansi*.

casí homogéneamente a lo largo de todo el fragmento secuenciado.

Es importante anotar que las últimas bases del extremo 3' del gen citocromo b exhibieron polimorfismos importantes en la distinción de cada una de las siete especies de *Lutzomyia*. *L. gomezi* mostró la tripleta de nucleótidos timina-adenina-guanina, que corresponde a un codón de parada tipo UAG, en lugar del codón UAA usado por las demás especies. *L. evansi* y *L. panamensis* se caracterizaron por tener repetida la secuencia timina-adenina-adenina (Fig. 1), que transcribe para dos codones de parada consecutivos tipo UAA, lo que podría estar asociado a una reconfirmación de la señal de terminación durante la síntesis proteica.

La sustitución nucleotídica de mayor trascendencia se observó en la posición 322 de *L. rangelifiana* y *L. evansi* (Fig. 1), con el cambio de guanina o adenina por timina, que conlleva a la disminución del tamaño de la proteína citocromo b codificada por estas especies. Es importante resaltar también que en *L. gomezi* las dos últimas bases del gen citocromo b correspondieron, al mismo tiempo, a las dos primeras del gen $ARNt^{Ser}$, en tanto que en *L. c. cayennensis* y *L. rangelifiana* estos genes compartieron una sola base. En las otras especies de este estudio los genes citocromo b y $ARNt^{Ser}$, se encuentran separados por el IG1, que está constituido por 10 pb en *L. evansi*, 9 en *L. trinidadensis*, 6 en *L. panamensis* y 5 en *L. dubitans* (Fig. 1).

La disminución gradual en la longitud del IG1 hasta llegar a la ausencia del mismo y el solapamiento de bases entre los genes citocromo b y $ARNt^{Ser}$, permite inferir que el genoma mitocondrial de estos insectos podría haber experimentado, en algunas especies, un proceso de reducción evolutiva que eliminó aquellos componentes no indispensables para la función que desempeña y disminuyó u optimizó el tamaño de los genes codificadores. Esto se fundamenta, en parte, en la teoría del origen endosimbiótico de la mitocondria (Margulis 1970).

En el extremo carboxilo terminal de la proteína citocromo b se registraron 29 sitios aminoacídicos polimórficos que generaron un porcentaje de divergencia global del 26,6%, útil para la discriminación de especie. Los sitios con mayor variación correspondieron a las posiciones 39, 42 y 97 del alineamiento proteico (Fig. 2). Entre estos se destaca la posición 39 por poseer un aminoácido distinto en cada especie, asparagina en *L. trinidadensis*, treonina en *L. panamensis*, glutamina en *L. c. cayennensis*, leucina en *L. dubitans* y fenilalanina en *L. rangelifiana*, con la excepción de *L. gomezi* y *L. evansi* que presentaron una metionina en la posición referida. No obstante, las dos últimas especies difieren entre sí en otros 10 sitios aminoacídicos distribuidos a lo largo de esta región proteica. El polimorfismo más relevante en la proteína citocromo b fue la disminución del tamaño de la misma en *L. rangelifiana* y *L. evansi* como producto del reemplazo de un codón con sentido por un codón de parada en la posición 108 del alineamiento aminoacídico (Fig. 2).

Aunque en años recientes el gen citocromo oxidasa I se ha propuesto como el "código de barras del ADN" para la identificación de la diversidad animal (Hebert *et al.* 2003), los resultados del presente estudio demuestran que la región mitocondrial aquí secuenciada es un excelente candidato para el diagnóstico molecular de especie en flebotomíneos. Los siete taxones del género *Lutzomyia* analizados exhibieron polimorfismos ostensibles en el extremo 3' del gen citocromo b y la proteína derivada del mismo, que comprendieron sustituciones nucleotídicas, solapamiento de una o más bases con el gen $tRNA^{Ser}$, reemplazo de aminoácidos, empleo de codones de parada distintos y diferencias en el tamaño del producto proteico. A lo anterior se suman los notables cambios en la longitud del IG1 que, incluso, desaparece en algunas especies.

Tabla 1. Valores de distancia genética según el modelo de dos parámetros de Kimura, entre secuencias nucleotídicas parciales del gen citocromo b de *L. trinidadensis* (Ltrcsin1), *L. panamensis* (Lpacsin1, Lpacsin2), *L. c. cayennensis* (Lcacsin1, Lcacsin2), *L. dubitans* (Lducsin1), *L. gomezi* (Lgocsin1, Lgocsin2), *L. rangelifiana* (Lracsin1, Lracsin2) y *L. evansi* (Levcsin4).

	Ltrcsin1	Lpacsin1	Lpacsin2	Lcacsin1	Lcacsin2	Lducsin1	Lgocsin1	Lgocsin2	Lracsin1	Lracsin2
Lpacsin1	0.2726									
Lpacsin2	0.2726	0.0031								
Lcacsin1	0.2736	0.2505	0.2462							
Lcacsin2	0.2736	0.2505	0.2462	0.0000						
Lducsin1	0.2868	0.2293	0.2251	0.2380	0.2380					
Lgocsin1	0.2486	0.2574	0.2574	0.2213	0.2213	0.2344				
Lgocsin2	0.2486	0.2574	0.2574	0.2213	0.2213	0.2344	0.0000			
Lracsin1	0.2257	0.2131	0.2173	0.2354	0.2354	0.2479	0.2361	0.2361		
Lracsin2	0.2257	0.2131	0.2173	0.2354	0.2354	0.2479	0.2361	0.2361	0.0000	
Levcsin4	0.1969	0.2298	0.2255	0.1891	0.1891	0.1889	0.2142	0.2142	0.1938	0.1938

Si bien estos polimorfismos permiten la distinción de cada uno de los taxones estudiados, se requieren más estudios para inferir las posibles relaciones filogenéticas entre tales grupos. Del mismo modo, es necesario continuar con la valoración del marcador en especies morfológicamente similares (Pérez-Doria *et al.* 2008). Es pertinente mencionar también que el IG1 se encuentra adyacente al gen tRNA^{Ser}, el cual pese a sus restricciones operacionales, exhibe en flebotomíneos una variabilidad genética interespecífica importante. Por su proximidad, estas regiones pueden secuenciarse en una sola reacción con el segmento codificante para el extremo carboxilo terminal de citocromo b (Ready *et al.* 1997; Vivero *et al.* 2007), lo que facilita el análisis integral de esta sección del genoma mitocondrial, con sus diferentes productos y aumenta la utilidad del mismo.

El volumen de secuencias de nucleótidos o aminoácidos derivadas de flebotomíneos del Nuevo Mundo, que reposan en los bancos de datos moleculares, es muy bajo, comparado con el número de especies descritas (Bejarano 2002), por lo tanto se espera que los polimorfismos en la región mitocondrial estudiada puedan servir de base para formular, en el futuro, claves moleculares útiles para la identificación de vectores de *Leishmania*.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de Alveiro Pérez-Doria y Luz Fernanda Lambraño, para la obtención del material entomológico.

Literatura citada

- ARRIVILLAGA, J. C.; NORRIS, D. E.; FELICIANGELI, M. D.; LANZARO, G. C. 2002. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 2 (2): 83-95.
- BEATI, L.; CACERES, A. G.; LEE, J. A.; MUNSTERMANN, L. E. 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 34 (2): 225-234.
- BEJARANO, E. E. 2001. Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniasis: utilidad de los genes mitocondriales. *Biomédica* 21 (2): 182-191.
- BEJARANO, E. E. 2002. Sobre la evolución de los flebotomíneos americanos (Diptera: Psychodidae): un llamado a los sistemáticos moleculares. *Revista Colombiana de Entomología* 28 (2): 211-212.
- BEJARANO, E. E. 2006. Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomológica Mexicana* 45 (1): 47-56.
- BEJARANO, E. E.; URIBE, S.; ROJAS, W.; VÉLEZ, I. D. 2002. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (5): 645-647.
- BONFANTE-GARRIDO, R.; URDANETA, R.; URDANETA, I.; ALVARADO, J. 1990. Natural infection of *Lutzomyia trinidadensis* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85 (4): 477.
- BONFANTE-GARRIDO, R.; URDANETA, R.; URDANETA, I.; ALVARADO, J.; PERDOMO, R. 1999. Natural infection of *Lutzomyia rangelifiana* (Ortiz, 1952) (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania* in Barquisimeto, Lara State, Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (1): 11.
- COCHERO, S.; ANAYA, Y.; DIAZ, Y.; PATERNINA, M.; LUNA, A.; PATERNINA, L.; BEJARANO, E. E. 2007. Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomatídeos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Los Montes de María, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 59(1). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol59_1_07/mtr06107.htm
- COLLINS, F. H.; MENDEZ, M. A.; RASMUSSEN, M. O.; MEHAFFEY, P. C.; BESANSKY, N. J.; FINNERTY, V. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37 (1): 37-41.
- FORATTINI, O. P. 1973. *Entomologia Médica*, 4º vol. Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo, Brasil. 658 p.
- GALATI, E. A. B. 2003a. Classificação de Phlebotominae. p. 23-51. En: Rangel, E. F.; Lainson, R. (eds.). *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. 368 p.
- GALATI, E. A. B. 2003b. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. p. 53-175. En: Rangel, E. F.; Lainson, R. (eds.). *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil. 368 p.
- GALATI, E. A. B.; ANDRADE-FILHO, J. D.; DA SILVA, A. C. L.; FALCÃO, A. L. 2003. Description of a new genus and new species of New World Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47 (1): 63-70.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270 (Suppl.1): S96-S99.
- HODGKINSON, V. H.; BIRUNGI, J.; QUINTANA, M.; DIETZE, R.; MUNSTERMANN, L. E. 2003. Mitochondrial cytochrome b variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (4): 386-392.
- HOLDRIDGE, L. R. 1967. Life zone ecology. Tropical Science Center, San José, Costa Rica. 206 pp.
- ISHIKAWA, E. A. Y.; READY, P. D.; DE SOUZA, A. A.; DAY, J. C.; RANGEL, E. F.; DAVIES, C. R.; SHAW, J. J. 1999. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the rain-forest regions of Amazônia and northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (3): 339-345.
- KILLICK-KENDRICK, R. 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 17 (3): 279-289.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16 (2): 111-120.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5 (2): 150-163.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. 2005. New World leishmaniasis, pp. 313-349. In: Cox, F. E. G.; Wakelin, D.; Gillespie, S. H.; Despommier, D. (eds.) *Parasitology*, Volume 6, Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th Edition. Hodder Arnold, London. 912 p.
- LEWIS, D. J.; YOUNG, D. G.; FAIRCHILD, G. B.; MINTER, D. M. 1977. Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology* 2 (4): 319-332.
- MARGULIS, L. 1970. Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth. Yale University Press, New Haven, Connecticut, USA. 349 pp.
- MONTOYA-LERMA, J.; FERRO, C. 1999. Flebotomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia, pp. 211-245. En: Amat, G.; Andrade-C., G.; Fernández, F. (eds.). *Insectos de Colombia*. Volumen II. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

- Colección Jorge Álvarez Lleras. No. 13. Editora Guadalupe Ltda., Santafé de Bogotá, Colombia. 492 p.
- PÉREZ-DORIA, A.; BEJARANO, E. E.; SIERRA, D.; VÉLEZ, I. D. 2008. Molecular evidence confirms the taxonomic separation of *Lutzomyia tihuilensis* from *Lutzomyia pia* (Diptera: Psychodidae) and the usefulness of pleural pigmentation patterns in species identification. *Journal of Medical Entomology* 45 (4): 653-659.
- READY, P. D.; DAY, J. C.; DE SOUZA, A. A.; RANGEL, E. F.; DAVIES, C. R. 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bulletin of Entomological Research* 87 (2): 187-195.
- SANTAMARÍA, E.; PONCE, N.; ZIPA, Y.; FERRO, C. 2006. Presencia en el peridomicilio de vectores infectados con *Leishmania (Viannia) panamensis* en dos focos endémicos en el occidente de Boyacá, piedemonte del valle del Magdalena medio, Colombia. *Biomédica* 26 (Supl.1): 82-94.
- SHAW, J. 2007. The leishmaniases - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (5): 541-547.
- TESTA, J. M.; MONTOYA-LERMA, J.; CADENA, H.; OVIEDO, M.; READY, P. D. 2002. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: Mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Tropica* 84 (3): 205-218.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673-4680.
- TORGERSON, D. G.; LAMPO, M.; VELÁZQUEZ, Y.; WOO, P. T. K. 2003. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (5): 484-493.
- TRAVI, B. L.; VÉLEZ, I. D.; BRUTUS, L.; SEGURA, I.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. 1990. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84 (5): 676-677.
- URIBE, S.; LEHMANN, T.; ROWTON, E. D.; VÉLEZ, I. D.; PORTER, C. 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18 (1): 456-461.
- VIVERO, R. J.; CONTRERAS-GUTIÉRREZ, M. A.; BEJARANO, E. E. 2007. Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para serina en siete especies de *Lutzomyia*. *Biomédica* 27 (3): 429-438.
- YOUNG, D. G.; 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). *Memories of the American Entomological Institute*, Number 54. Associated Publishers, Gainesville, Florida, USA. 881 pp.
- YOUNG, D. G.; PERKINS, P. V. 1984. Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). *Mosquito News* 44 (2): 263-304.

Recibido: 14-sep-2008 • Aceptado: 5-may-2009