

Caracteres moleculares para la determinación taxonómica de tres especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), vectores potenciales de *Leishmania* presentes en el valle de Aburrá, Colombia

PÉREZ-DORIA, Alveiro*, Eduar Elías BEJARANO*, Diana SIERRA** e Iván Darío VÉLEZ***

*Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 No. 16 B-32, Apartado Aéreo 406, Sincelejo, Colombia; e-mail: eduarelias@yahoo.com

**Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, Central receiving 200 W, Lake Street Campus Delivery 1619, CO 80523, USA; e-mail: dsierra68@yahoo.com

***Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Calle 62 No. 52-59, Apartado Aéreo 1226, Medellín, Colombia; e-mail: idvelez@udea.edu.co

Molecular characters for the taxonomic determination of three species of *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), potential *Leishmania* vectors found in the Aburrá valley, Colombia

■ **ABSTRACT.** To date, 143 species of *Lutzomyia* França are recorded in Colombia, but less than 7% is incriminated in the transmission of *Leishmania* spp. Alternative taxonomic characters are necessary to correctly identify the particular sand fly fauna in each Colombian region, and the separation of morphologically similar vector and non-vector species. In order to detect useful molecular characters for the taxonomic determination of three potential vectors of *Leishmania* present in the Valle de Aburrá, Colombia, the present work sequenced the 3' end of the mitochondrial cytochrome b gene in *Lutzomyia hartmanni* (Fairchild and Hertig), *L. columbiana* (Ristorcelli and Van Ty), and *L. tihuiensis* Le Pont, Torrez-Espejo and Dujardin. Polymorphic sites, pairwise genetic distances (p), and entropy were determined from the multiple alignment of the nucleotide sequences. Numbers of silent and non silent substitutions were calculated from the amino acid sequences deduced from the nucleotide sequences of the gene. In the multiple alignment of the cytochrome b nucleotide sequences from *Lutzomyia hartmanni*, *L. columbiana* and *L. tihuiensis*, 83 polymorphic sites were detected. A total of 18 amino acid replacements were found in the partial nucleotide sequences of the protein. Genetic distances varied from 0,137 between *L. tihuiensis* and *L. columbiana*, to 0,215 among *L. columbiana* and *L. hartmanni*. Nucleotide and amino acid sequence polymorphisms within the cytochrome b gene and protein, respectively, constitute molecular characters potentially useful for the taxonomic determination of these sand fly species.

KEY WORDS. Psychodidae. *Lutzomyia*. *Verrucarum*. *Helcocyrtomyia*. Cytochrome b. Colombia.

■ **RESUMEN.** En Colombia están registradas 143 especies de *Lutzomyia* França, pero menos del 7% de éstas se encuentran incriminadas

como vectores de *Leishmania* spp. Debido a la alta semejanza morfológica de algunas especies vectoras con otras no vectoras, se necesitan caracteres taxonómicos alternativos para identificar correctamente los flebotomíneos de cada zona geográfica del país. Con este objetivo, en el presente trabajo se secuenció el extremo 3' del gen mitocondrial que codifica para la proteína citocromo b en tres vectores potenciales de *Leishmania* presentes en el valle de Aburrá, Colombia, *Lutzomyia hartmanni* (Fairchild y Hertig), *L. columbiana* (Ristorcelli y Van Ty) y *L. tihuiensis* Le Pont, Torrez-Espejo y Dujardin. A partir del alineamiento múltiple de nucleótidos se determinaron los sitios polimórficos, las distancias genéticas pareadas netas (p) y la entropía. Las secuencias de nucleótidos fueron trasladadas a aminoácidos para estimar el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas. En el alineamiento múltiple de 321 nucleótidos del gen citocromo b de *L. columbiana*, *L. hartmanni* y *L. tihuiensis* se detectaron 83 sustituciones. En la secuencia parcial de la proteína se encontraron 18 reemplazos de aminoácidos. Las distancias genéticas interespecíficas fluctuaron en un rango mínimo de 0,137 entre *L. tihuiensis* y *L. columbiana*, y un máximo de 0,215 entre *L. columbiana* y *L. hartmanni*. Los polimorfismos detectados en la secuencia de nucleótidos del gen y de aminoácidos de la proteína constituyen caracteres moleculares potencialmente útiles para la determinación taxonómica de estas especies de flebotomíneos.

PALABRAS CLAVE. Psychodidae. *Lutzomyia*. *Verrucarum*. *Helcocyrtomyia*. Citocromo b. Colombia.

INTRODUCCIÓN

El grupo de enfermedades conocidas como leishmaniasis son causadas por protozoos intracelulares obligados que pertenecen al género *Leishmania* Ross. En América, la transmisión de estos parásitos tripanosomatídeos ocurre a través de la picadura de dípteros hematófagos del género *Lutzomyia* França. En Colombia, este taxón está representado por 143 especies (Bejarano *et al.*, 2006; Bejarano 2006; Cabrera *et al.*, 2006; Flórez & Ferro, 2007), de las cuales, menos del 7% han sido incriminadas como vectores de *Leishmania* spp. (Montoya-Lerma & Ferro, 1999; Santamaría *et al.*, 2006). La determinación taxonómica de especie, en los flebotomíneos, es importante porque en conjunto con sus antecedentes vectoriales, su bionomía y distribución geográfica, permite clasificar las zonas geográficas de acuerdo al riesgo epidemiológico que representan las especies allí presentes, lo que facilita el diseño y la implementación de medidas de control vectorial.

Por tradición, la descripción y determinación de miembros del género *Lutzomyia* se ha basado, casi exclusivamente, en las diferencias que presentan algunas estructuras ubicadas en la cabeza, el tórax y el abdomen del imago, las cuales han sido aceptadas como caracteres diagnósticos para la categorización del taxón en subgéneros, grupos, series, especies y subespecies (Young & Duncan, 1994; Galati, 2003). A pesar de la utilidad de estos caracteres anatómicos en la determinación taxonómica, el concepto morfológico de especie ha sido cuestionado por la aparente subjetividad a la que están expuestas las descripciones, las cuales resultan ambiguas o sutiles en algunos casos (Cazorla & Acosta, 2003). Adicionalmente, algunos taxones agrupan especies isomórficas e isométricas que no pueden ser diagnosticadas diferencialmente por los métodos convencionales, lo que constituye un reto para la taxonomía clásica.

Gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular se ha logrado acceder a una gran cantidad de datos moleculares

que han aportado información básica para la resolución de conflictos taxonómicos (Beati *et al.*, 2004). Los primeros estudios se desarrollaron con marcadores de tipo proteínico (Kreutzer *et al.*, 1990; Lanzaro *et al.*, 1993) y posteriormente con aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como el análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), análisis de los fragmentos de longitud polimórfica amplificados al azar (RAPDs) (Adamson *et al.*, 1993), amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLP) y elementos de número variable repetidos en bloque (VNTR, STR y microsátélites) (Aransay *et al.*, 2003). En la actualidad, las investigaciones se han enfocado en la secuenciación de genes mitocondriales, entre los cuales se destaca el gen citocromo b que es uno de los marcadores más empleados en el análisis genético de poblaciones y el estudio filogenético de especies de *Lutzomyia* (Esseghir *et al.*, 1997; Ready *et al.*, 1997; Ishikawa *et al.*, 1999; Bejarano *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2002; Testa *et al.*, 2002; Hodgkinson *et al.*, 2003; Pesson *et al.*, 2004; Pérez-Doria *et al.*, 2008).

A pesar de lo expuesto, los trabajos realizados con secuencias nucleotídicas en flebotomíneos no superan el 10% de la diversidad de especies conocidas en el planeta, lo que pone en evidencia la necesidad de continuar desarrollando investigaciones moleculares en este grupo de insectos vectores. El presente estudio, es parte del esfuerzo por caracterizar genéticamente las especies flebotomíneas presentes en Colombia, como parte de la búsqueda de herramientas alternativas que permitan superar las limitaciones de los caracteres morfológicos. Con este objetivo, se realizó una caracterización genética de tres potenciales vectores de *Leishmania* presentes en el valle de Aburrá, basados en la divergencia nucleotídica del extremo 3' del gen mitocondrial citocromo b. Aunque las especies seleccionadas pueden distinguirse entre sí con relativa facilidad, se caracterizan por pertenecer a grupos integrados por morfoespecies de difícil determinación taxonómica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección y determinación taxonómica de flebotomíneos.

Se recolectaron especímenes de *Lutzomyia tihuilensis* Le Pont, Torrez-Espejo y Dujardin, *L. hartmanni* (Fairchild y Hertig) y *L. columbiana* (Ristorcelli y Van Ty) con cebo humano protegido en un bosque secundario de la vereda El Vallano, municipio de Envigado (06° 08' N, 75° 34' W), valle de Aburrá, departamento de Antioquia, entre las 18:00 y las 22:00 h. Los individuos recolectados se transportaron secos hasta el Laboratorio de Entomología Médica del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET. Cada espécimen se examinó bajo el estereomicroscopio, revisando el patrón de coloración torácico y luego se diseccionó con una hoja de bisturí estéril, para separar la cabeza, el ala y los últimos segmentos del abdomen que alojan los órganos genitales. Estas estructuras anatómicas fueron maceradas químicamente en lactofenol (ácido láctico/fenol, en proporción 1:1) durante 24 h, posteriormente, se fijaron sobre láminas portaobjeto usando el medio de Hoyer. La determinación de especie se realizó empleando las claves y descripciones pictóricas convencionales (Young & Duncan, 1994; Wolff & Galati, 2002; Galati, 2003; Bejarano *et al.*, 2004). Los montajes entomológicos fueron depositados en la "Colección de Vectores y Hospedadores Intermediarios de Enfermedades Tropicales" (VHET) del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia en Medellín, Colombia.

Extracción, amplificación y secuenciación del ADN.

A partir del tórax y los segmentos proximales del abdomen de cada espécimen se realizó una extracción del ADN total de acuerdo al protocolo descrito previamente (Collins *et al.*, 1987) con los siguientes ajustes: maceración en 60 µl de la solución 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), precipitación con 200 µl de etanol absoluto y resuspensión en 30 µl de agua ultrapura.

	111111	1111111111	1111222222	2222222222	2222223333	333
	112223	3344566788	8999000111	1223444557	7789001112	2233344445
	3679251570	6968169514	5346358134	9098127341	6702470782	5913734690
Haplotipo 1	CTCTCCACCA	CCCTAAAATT	CTCTCTTAGA	TATTTTCTA	TTATCTAAAC	TCTCTCCTAA
Haplotipo 2
Haplotipo 3
Haplotipo 4
Haplotipo 5	T . . T . T . T	TTTA . TTT . .	TATATA . . .	AT TA .	C . TAGATG . T	. TA . TTAT .
Haplotipo 6	. CTATTTTAT	TTTAGTT . CC	TATA . CTAT	. CACCCT . T	. CT . CTG . T	CTA . ATTATG
Posición	3313333133	3313333333	1313133323	2333313313	2333333123	3132331331
Sustitución	IIIVIIIVIV	IIIVIVVVII	IVIVIVIVIV	VVVI IIIIVV	IIVVVVVI	IIVVVVVVI
Tipo	SSSSSSSS	SSSSSSSS	SNSSSSNN	NNSSSSNN	NNSSSSNN	SSSSSSSS

Fig. 1. Resumen del alineamiento múltiple de la secuencia parcial de nucleótidos del gen mitocondrial citocromo b de *L. columbiana* (haplotipos 1 al 4), *L. tihuiensis* (haplotipo 5) y *L. hartmanni* (haplotipo 6). Haplotipo 1 = aislados Lcocenv1, Lcocenv2 y Lcocenv5, números de acceso en Genbank EF033636, EF033637 y EF033638, respectivamente. Haplotipo 2 = aislado Lcocenv3, número de acceso EF033639. Haplotipo 3 = aislado Lcocenv4, número de acceso EF033640. Haplotipo 4 = aislado Lcocenv6, número de acceso EF033641. Haplotipo 5 = aislados Lticens1 y Lticens2, números de acceso EF033647 y EF033648, respectivamente. Haplotipo 6 = aislado Lhacenv1, número de acceso EF033635. Los nucleótidos se representan con la primera letra del respectivo nombre. Posición del nucleótido: 1) primera posición, 2) segunda posición, 3) tercera posición. Sustituciones nucleotídicas: Transiciones (i: A->G, C->T), Transversiones (v: A->C, A->T, G->C, G->T). Tipo de sustituciones: sinónimas (S), no sinónimas (N).

Tabla I. Composición nucleotídica de la secuencia parcial del gen citocromo b de *L. columbiana* (haplotipos 1 al 4), *L. tihuiensis* (haplotipo 5) y *L. hartmanni* (haplotipo 6).

	Adenina	Citosina	Guanina	Timina
Haplotipo 1	32.40	18.38	9.35	39.88
Haplotipo 2	32.09	18.38	9.35	40.19
Haplotipo 3	32.40	18.07	9.35	40.19
Haplotipo 4	32.09	18.69	9.35	39.88
Haplotipo 5	33.96	13.71	9.03	43.30
Haplotipo 6	31.15	17.13	9.66	42.06
Promedio	32.53	17.20	9.31	40.28

La amplificación del ADN se realizó mediante la técnica de PCR, utilizando el cebador delantero 5'-CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAATGATA-3' y el cebador reverso 5'-GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCCG(T/A)TATGA-3' (Ready *et al.*, 1997). La PCR fue llevada a cabo en 50 µl de mezcla de reacción que contenía solución tampón de PCR 10x (Promega Corporation, Madison, WI), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de la mezcla de desoxirribonucleótidos (Promega), 0,3 µM de

cada cebador, 1,5 U de Taq ADN polimerasa (Promega) y 6 µl de solución de ADN. Se usó un perfil térmico de amplificación de tres etapas: la primera, de desnaturalización a 94°C por tres minutos, la segunda, 35 ciclos: desnaturalización por un minuto a 90°C, alineamiento durante un minuto a 50°C y extensión a 72°C por un minuto. Finalmente, un ciclo de extensión terminal a 72°C durante diez minutos.

	1	2	3	4	5	6
haplotipo 1						
haplotipo 2	0.006					
haplotipo 3	0.003	0.003				
haplotipo 4	0.003	0.003	0.006			
haplotipo 5	0.137	0.143	0.140	0.140		
haplotipo 6	0.209	0.215	0.212	0.212	0.168	

Fig. 2. Distancias genéticas pareadas (p) derivadas de la secuencia parcial de nucleótidos del gen citocromo b de *L. colombiana* (haplotipos 1 al 4), *L. tihuiensis* (haplotipo 5) y *L. hartmanni* (haplotipo 6).

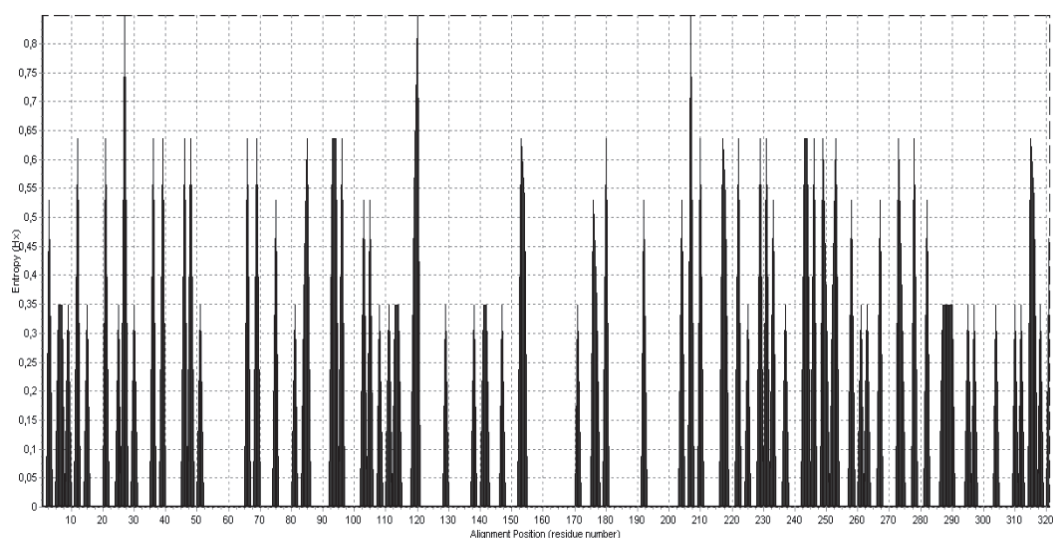


Fig. 3. Distribución y frecuencia del polimorfismo genético en las 321 posiciones del alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica parcial del gen citocromo b de *L. colombiana*, *L. tihuiensis* y *L. hartmanni*.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Posteriormente, los amplificados se purificaron con Wizard® PCR Preps DNA Purification System Kit (Promega) y se secuenciaron, en ambos sentidos, con terminadores de cadena fluorescentes (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA), en un equipo automático de electroforesis capilar ABI Prism® 3730xl (Applied Biosystems).

Análisis de las secuencias. Con el programa Sequin ver. 7.6 del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se recopiló la información descriptiva de cada secuencia, las cuales fueron sometidas a Genbank. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) integrado en DAMBE 4.2.13 (Xia & Xie, 2001). Luego se determinaron los sitios polimórficos y las distancias genéticas pareadas netas (p). La distribución de la variabilidad genética a lo largo del alineamiento múltiple del gen citocromo b se evaluó infiriendo la entropía

con el programa Bioedit (Hall, 1999), empleando la configuración predeterminada. Finalmente, las secuencias de nucleótidos fueron trasladadas a aminoácidos en el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) con el propósito de identificar las sustituciones sinónimas y no sinónimas.

RESULTADOS

Un total de nueve hembras pertenecientes al género *Lutzomyia* fueron identificadas morfológicamente durante el presente trabajo, seis de *L. colombiana*, una de *L. hartmanni* y dos de *L. tihuiensis*. A partir del material genético de estos especímenes se aislaron nueve secuencias nucleotídicas distribuidas en seis haplotipos. Los resultados del presente estudio constituyen el primer y único haplotipo nucleotídico conocido para *L. hartmanni* y *L. tihuiensis*, así mismo, se registran cuatro nuevos haplotipos para *L. colombiana* (Fig. 1).

La composición nucleotídica promedio del gen fue 32,53 % de adenina, 17,20 % de citosina, 9,31 % de guanina y 40,28 % de timina (Tabla I), consistente con lo informado para el genoma mitocondrial de insectos, que parece haberse especializado en la producción de aminoácidos hidrofóbicos tales como leucina (UUA/CUA/CUC/CUG/CUU=17,1%) e isoleucina (AUU/AUC=16,4%) (datos no mostrados), cuyos codones son ricos en adenina y uracilo. Respecto al uso del codón, no se observaron diferencias significativas entre las distintas especies flebotomíneas.

En el alineamiento múltiple de 321 pb del gen citocromo b de *Lutzomyia colombiana*, *L. hartmanni* y *L. tihuiensis* (Fig. 1) se detectaron 83 diferencias nucleotídicas. Los 83 sitios variables polimórficos están representados por 37 sitios de una sola variante y 46 sitios parsimoniosamente informativos, 43 de dos variantes y tres de tres variantes. Al inferir la secuencia parcial de la proteína citocromo b (datos no mostrados), se encontraron 18 sustituciones aminoacídicas que denotaron una significativa divergencia interespecífica,

especialmente al considerar que se trata de una secuencia codificadora de proteínas.

Más aún, en la longitud del extremo carboxilo terminal de la proteína citocromo b se detectaron importantes cambios entre especies. En *Lutzomyia colombiana*, el extremo 3' del gen homónimo tiene una longitud de 318 nucleótidos, que codifican para 105 aminoácidos y un codón de parada (UAA). A diferencia de esta especie, las secuencias homólogas de *L. hartmanni* y *L. tihuiensis* codifican un aminoácido adicional, extendiéndose hasta el nucleótido 321. En *L. tihuiensis*, el nucleótido 316 está representado por una citosina, conformando el triplete CAA que codifica para el aminoácido glutamina, lo que aumenta a 106 el número de aminoácidos del fragmento proteínico. Similarmente, la posición 318 en *L. hartmanni* es ocupada por una timina, constituyendo el codón UAU que codifica para el aminoácido adicional tirosina (Fig. 1). Estos hallazgos demuestran la existencia de diferencias moleculares, tanto en la secuencia del gen como en la proteína, que presentan potencial utilidad taxonómica para el género *Lutzomyia*.

Los valores de las distancias genéticas pareadas (p) calculadas al interior de las distintas especies, oscilaron entre 0 y 0,006 para el caso de *Lutzomyia tihuiensis* y *L. colombiana*, respectivamente. En contraste, los valores interespecíficos fluctuaron en un rango mínimo de 0,137 entre *L. tihuiensis* y *L. colombiana*, y un máximo de 0,215 entre *L. colombiana* y *L. hartmanni* (Fig. 2). La entropía, en el alineamiento múltiple del gen citocromo b, muestra que la variabilidad genética está uniformemente distribuida a lo largo de la secuencia de nucleótidos, salvo por la ausencia de polimorfismo entre las posiciones 52-65 y 155-170 (Fig. 3).

DISCUSIÓN

El interés biomédico en caracterizar las especies flebotomíneas desde el punto de vista genético se origina en la necesidad de encontrar una herramienta que garantice una correcta determinación de especie, la

cual resulta esencial para comprender la ecoepidemiología de la leishmaniasis. Es importante destacar que aunque hasta la fecha no existen registros de casos autóctonos de la enfermedad en el valle de Aburrá, las tres especies encontradas en el área poseen antecedentes epidemiológicos. *Lutzomyia hartmanni* es un vector comprobado de *Leishmania colombiensis* (Kreutzer et al., 1991) y *L. colombiana* es considerada como un transmisor potencial de *Leishmania mexicana* (Kreutzer et al., 1991; Montoya-Lerma et al., 1999). Del mismo modo, *L. tihuiensis* es un probable vector de *Leishmania* en Bolivia y Perú (Le Pont et al., 1997; Cáceres et al., 2001).

Desde el punto de vista de la taxonomía clásica, *Lutzomyia colombiana* y *L. tihuiensis* son incluidas en series diferentes del grupo *verrucarum*. *L. colombiana* pertenece a la serie *verrucarum* caracterizada por agrupar especies que poseen dos espinas mediales pareadas y dos distales en el estilo, con espermatecas estriadas en forma de saco; mientras que *L. tihuiensis* se incluye en la serie *pia* que reúne especies que presentan cinco espinas entre la región media y distal del estilo, y cuyas espermatecas exhiben un prominente botón terminal liso de bordes casi rectos. Al comparar los dos taxones desde el punto de vista genético, se observan distancias pareadas que oscilan entre 0,137 y 0,143, divergencia molecular que es consistente con la diversidad morfológica antes descrita. Los valores obtenidos al confrontar estas especies son similares a los encontrados entre otros miembros del grupo *verrucarum*, de los que se dispone de secuencias homólogas en Genbank, y que oscilan entre 0,111–0,137, 0,111–0,152 y 0,127, para los pares de especies *L. evansi*/*L. ovallesi*, *L. ovallesi*/*L. colombiana* y *L. spinicrassa*/*L. ovallesi*, respectivamente (Rojas et al., 2002). Estos resultados ratifican la utilidad del marcador citocromo b para la determinación genética de especies de flebotomíneos.

Al confrontar la morfología de las estructuras anatómicas de *Lutzomyia hartmanni*, agrupada en el subgénero *Helcocyratomyia* Barreto, con los taxones

anteriores, se aprecian considerables diferencias interespecíficas. Mientras que las hembras del grupo *verrucarum* exhiben espermatecas estriadas en forma de saco, en *L. hartmanni* estas estructuras son alargadas y con anulaciones completas. Tal diversidad morfológica resulta consistente con la divergencia observada en sus distancias genéticas, que arrojó los valores más altos obtenidos en este estudio, correspondiendo 0,210 entre *L. hartmanni* y *L. colombiana* y 0,168 entre *L. hartmanni* y *L. tihuiensis*. Estas cifras superan ampliamente las distancias genéticas interespecíficas que se presentan al interior de grupo *verrucarum*, mostrando una notable diferenciación subgenérica de *L. hartmanni*, que está de acuerdo con la propuesta taxonómica de Young & Duncan (1994). Los presentes resultados permiten preliminarmente establecer intervalos interespecíficos característicos de diferentes grupos taxonómicos del género *Lutzomyia*, constituyendo referentes genéticos para el diagnóstico de especies basado en caracteres moleculares.

La diversidad genética que exhiben estas especies también se refleja en la presencia de un aminoácido adicional, en el extremo 3' de la proteína citocromo b en *Lutzomyia hartmanni* y *L. tihuiensis*, respecto a *L. colombiana* que carece del mismo. Es probable que la ausencia de este aminoácido en *L. colombiana* corresponda al estado derivado de un carácter, que evolucionó independientemente en diferentes linajes terminales luego de la separación del ancestro del grupo *verrucarum* y el subgénero *Helcocyratomyia*. Lo anterior está respaldado por el hallazgo de tales diferencias entre especies del mismo taxón como *L. colombiana* y *L. ovallesi* del grupo *verrucarum*, y de grupos diferentes como *L. hartmanni* y *L. pia* (Fairchild & Hertig). Es importante señalar además, que en las secuencias de *L. colombiana* aparecieron dos codones de parada consecutivos; se plantea que en algunos animales este hecho puede estar relacionado con una reconfirmación de la señal de terminación durante la síntesis de algunas proteínas.

Al realizar la traducción a proteínas de

la secuencia parcial del gen citocromo b de los flebotomíneos del valle de Aburrá, se evidenciaron 18 sustituciones aminoacídicas, a pesar de las 83 diferencias que se encuentran en su secuencia nucleotídica. Estos resultados están de acuerdo con lo esperado para regiones codificadoras de proteínas, las cuales se caracterizan por presentar una alta tasa de mutación neutral. Del mismo modo, la teoría de la deriva genética plantea que la mayoría de la variación a nivel molecular tiene poco efecto sobre la generación, dado que las diferencias en segundas y terceras posiciones del codón en una secuencia, no implican necesariamente cambios en la proteína (Futuyma, 1998).

Al analizar las características químicas de los aminoácidos implicados en las sustituciones no sinónimas, se determinó que la mayoría fueron de la misma naturaleza eléctrica. No obstante, se encontraron sustituciones no sinónimas que involucraron aminoácidos que difieren en su naturaleza eléctrica, tal es el caso de la metionina ubicada en la posición 73 del segmento proteínico, la cual es reemplazada en *L. hartmanni* por treonina. Lo mismo se observa en la posición 102, ocupada por el ácido glutámico, que es reemplazado por el aminoácido lisina de carácter básico; diferencias que podrían conducir a cambios en la configuración tridimensional de la proteína.

La utilidad potencial de este estudio responde no sólo a la necesidad de diferenciar las especies en la zona de estudio, sino también a las dificultades derivadas del isomorfismo que éstas presentan en el interior de sus correspondientes grupos. En este sentido se aprecia que *Lutzomyia tihuilienis* muestra isometría e isomorfismo con *L. pia* y sólo puede ser diferenciada por un detalle sutil en la pleura, la cual es totalmente pigmentada en *L. pia*, mientras que en *L. tihuilienis* la pigmentación está restringida a la porción basal del catepímero y catepisterno. Es probable que por esta razón haya sido informada inicialmente como *L. pia* en el país (Agudelo *et al.*, 2002). Sin embargo, los análisis morfológicos y

moleculares basados en la pigmentación de la pleura y los genes mitocondriales soportan su estatus específico, demostrando correspondencia entre la morfología y los caracteres moleculares (Bejarano *et al.*, 2006; Pérez-Doria *et al.*, 2008). Se debe destacar que pese a los informes previos de introgresión en otras morfoespecies del grupo *verrucarum*, como *L. youngi* Feliciangeli y Murillo y *L. townsendi* Ortiz (Testa *et al.*, 2002), el gen citocromo b ha demostrado su eficacia en la discriminación de *L. tihuilienis* y *L. pia*.

Un caso similar ocurre entre *Lutzomyia colombiana* y *L. disiuncta* Morales, Osorno y Osorno-Mesa, dos miembros de la serie *verrucarum* del grupo *verrucarum*, cuyas hembras no presentan rasgos morfológicos diferenciales. A pesar de ello, en este estudio se pudo confirmar molecularmente la identidad específica de *L. colombiana* gracias al análisis genético, que permitió asociar correctamente las secuencias obtenidas de los especímenes recolectados en el valle de Aburrá, con una secuencia aislada a partir de un individuo de *L. colombiana* (numero de acceso AF403485) capturado en La Cumbre, valle del Cauca; localidad donde se constató la presencia de machos de esta especie (Rojas *et al.*, 2002). Las distancias genéticas obtenidas entre estos aislados oscilaron entre 0 y 0,066, lo cual revela una variación intraespecífica típica de flebotomíneos, comparable a la observada entre poblaciones colombianas de *L. evansi* (Bejarano *et al.*, 2002). Los valores de divergencia genética intraespecífica de *L. colombiana* inferiores al 1% corroboran la eficacia del gen citocromo b, al asociar correctamente individuos de un mismo taxón procedentes de localidades geográficas distantes. Por su tasa de mutación, este gen podría ser tan útil como el gen citocromo oxidasa I (denominado el "código de barras de ADN") para caracterizar la diversidad de la subfamilia Phlebotominae. Considerando lo anterior, el gen citocromo b debería tenerse en cuenta al momento de escoger un marcador molecular para distinguir especies del género *Lutzomyia*.

AGRADECIMIENTOS

A Boris René Zuleta por su ayuda con el trabajo de campo en Antioquia. Este trabajo fue financiado por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (código no. 1606).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- ADAMSON, R. E., R. D. WARD, M. D. FELICIANGELI & R. MAINGON. 1993. The application of random amplified polymorphic DNA for sandfly species identification. *Medical and Veterinary Entomology* 7 (3): 203-207.
- AGUDELO, L. A., J. URIBE, D. SIERRA, F. RUIZ & I. D. VÉLEZ. 2002. Presence of American cutaneous Leishmaniasis vectors surrounding the city of Medellín, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (5): 641-642.
- ARANSAY, A. M., P. D. READY & F. MORILLAS-MÁRQUEZ. 2003. Population differentiation of *Phlebotomus perniciosus* in Spain following postglacial dispersal. *Heredity* 90 (4): 316-325.
- BEATI, L., A. G. CÁCERES, J. A. LEE & L. E. MUNSTERMANN. 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Perú and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 34 (2): 225-234.
- BEJARANO, E. E., W. ROJAS, S. URIBE, I. D. VÉLEZ, S. VALLE & C. PORTER. 2002. Phylogenetic relationships among natural populations of *Lutzomyia (verrucarum) evansi* (Nuñez-Tovar, 1924). *Entomología y Vectores* 9 (Supl.1): 12-13.
- BEJARANO, E. E., D. SIERRA, A. PÉREZ-DORIA & I. D. VÉLEZ. 2006. Primer hallazgo de *Lutzomyia tihuilensis* (Diptera: Psychodidae) en el valle de Aburrá, Colombia. *Biomédica* 26 (Supl.1): 228-231.
- BEJARANO, E. E., P. DUQUE & I. D. VÉLEZ. 2004. Taxonomy and distribution of the series *piá* of the *Lutzomyia verrucarum* group (Diptera: Psychodidae), with a description of *Lutzomyia emberai* n. sp. *Journal of Medical Entomology* 41 (5): 833-841.
- BEJARANO, E. E., P. DUQUE & I. D. VÉLEZ. 2006. Redescrpción de la hembra de *Lutzomyia vattierae* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) de la Serranía de La Macarena, Colombia. *Biomédica* 26 (4): 556-561.
- BEJARANO, E. E. 2006. Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomológica Mexicana* 45 (1): 47-56.
- CABRERA, O. L., L. MOSQUERA, E. SANTAMARÍA & C. FERRO. 2006. Especies de *Lutzomyia* registradas en una Vereda del Municipio de San José del Guaviare, donde se notificaron casos de leishmaniasis cutánea. *En: Memorias, XLI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Quibdó, Chocó*, pp. 28-29.
- CÁCERES, A., L. QUATE, E. A. GALATI & H. BAHT. 2001. Flebotominos (Diptera: Psychodidae) de San Pedro, Distrito Kosñipata, Paucartambo - Cusco, y nuevos reportes para el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 18 (1): 24-26.
- CAZORLA, D. & M. ACOSTA. 2003. Multivariatemorphometric discrimination among three species of *Lutzomyia* subgenus *Micropygomyia* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 40 (6): 750-754.
- COLLINS, F. H., M. A. MÉNDEZ, M. O. RASMUSSEN, P. C. MEHAFFEY, N. J. BESANSKY & V. FINNERTY. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 37 (1): 37-41.
- ESSEGHIR, S., P. D. READY, R. KILLICK-KENDRICK & R. BEN-ISMAIL. 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology* 6 (3): 211-215.
- FLÓREZ, L., & C. FERRO. 2007. Especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) encontradas en el municipio de Inírida, Departamento de Guainía, Colombia. *Biomédica* 27 (Supl.1): 222.
- FUTUYMA, D. J. 1998. *Evolutionary biology*. 3^{ra} ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- GALATI, E. A. B. 2003. Morfología, terminología de adultos e identificación dos táxons da América. *En: Rangel, E. F. & R. Lainson R. (eds.), Flebotomíneos do Brasil*, Editora Fiocruz, Rio do Janeiro, pp. 53-175.
- 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: 95-8.
- HODGKINSON, V. H., J. BIRUNGI, M. QUINTANA, R. DIETZE & L. E. MUNSTERMANN. 2003. Mitochondrial cytochrome b variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (4): 386-392.
- ISHIKAWA, E. A., P. D. READY, A. A. DE SOUZA, J. C. DAY, E. F. RANGEL, C. R. DAVIES & J. J. SHAW. 1999. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the rain-forest regions of Amazonia and northeast Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (3): 339-345.
- KREUTZER, R. D., A. CORREDOR, G. GRIMALDI, JR., M. GROGL, E. D. ROWTON, D. G. YOUNG, A. MORALES, D. MCMAHON-PRATT, H. GUZMÁN & R. B. TESH. 1991. Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44 (6): 662-675.
- KREUTZER, R. D., M. T. PALAU, A. MORALES, C. FERRO, D. FELICIANGELI & D. G. YOUNG. 1990. Genetic relationships among phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the *verrucarum* species group. *Journal of Medical Entomology* 27 (1): 1-8.
- KUMAR, S., K. TAMURA & M. NEI. 2004. MEGA 3.1: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5 (2): 150-163.
- LANZARO, G. C., K. OSTROVSKA, M. V. HERRERO, P. G. LAWYER & A. WARBURG. 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48 (6): 839-847.
- LE PONT, F., M. J. TÓRREZ-ESPEJO & J. P. DUJARDIN. 1997. Phlébotomes de Bolivie: description de quatre nouvelles espèces de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Annales de la Société Entomologique de France* 33 (1): 55-64.
- MONTOYA-LERMA, J., H. CADENA, I. SEGURA & B. L. TRAVI. 1999. Association of *Lutzomyia colombiana* (Diptera: Psychodidae) with a leishmaniasis focus in Colombia due to species of the *Leishmania mexicana* complex. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (3): 277-283.

27. MONTOYA-LERMA, J. & C. FERRO. 1999. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. En: Amat, G., M. G. Andrade & F. Fernández (eds.), *Insectos de Colombia*, Volumen II. Colección Jorge Álvarez Lleras, No. 13, Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Centro Editorial Javeriano, Santafé de Bogotá, pp. 211-245.
28. PÉREZ-DORIA, A., E. E. BEJARANO, D. SIERRA & I. D. VÉLEZ. 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.
29. PESSON, B., J. S. READY, I. BENABDENNBI, J. MARTIN-SANCHEZ, S. ESSEGHIR, M. CADI-SOUSSI, F. MORILLAS-MÁRQUEZ & P. D. READY. 2004. Sandflies of the *Phlebotomus perniciosus* complex: mitochondrial introgression and a new sibling species of *P. longicuspis* in the Moroccan Rif. *Medical and Veterinary Entomology* 18 (1): 25-37.
30. READY, P. D., J. C. DAY, A. A. DE SOUZA, E. F. RANGEL & C. R. DAVIES. 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species. *Bulletin of Entomological Research* 87: 187-195.
31. ROJAS, W., E. E. BEJARANO, S. URIBE, I. D. VÉLEZ & C. H. PORTER. 2002. Phylogenetic relationships among *Lutzomyia* spp. of *verrucarum* group based on molecular characters. *Entomología y Vectores* 9 (Supl.1): 14-15.
32. SANTAMARÍA, E., N. PONCE, Y. ZIPA & C. FERRO. 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.
33. TESTA, J. M., J. MONTOYA-LERMA, H. CADENA, M. OVIEDO & P. D. READY. 2002. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: Mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. *Acta Tropica* 84 (3): 205-218.
34. THOMPSON, J. D., D. J. HIGGINS & T. J. GIBSON. 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.
35. WOLFF, M. & E. A. GALATI. 2002. Description of *Pintomyia limafalcaoae* and *Pintomyia antioquiensis*, two new species of phlebotomine sand fly (Diptera, Psychodidae) from the Colombian Andes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (3): 317-324.
36. XIA, X. & Z. XIE. 2001. DAMBE. Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92 (4): 371-373.
37. YOUNG, D. G. & M. A. DUNCAN. 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* 54: 1-881.