

**UTILIDAD DE LOS GENES MITOCONDRIALES CITOCROMO B, NAD 1 Y ARN
DE TRANSFERENCIA PARA SERINA EN LA DETERMINACIÓN TAXONÓMICA
DEL GÉNERO *Lutzomyia*.**

**MARÍA ANGÉLICA CONTRERAS GUTIÉRREZ
RAFAEL JOSÉ VIVERO GÓMEZ**

**Director
Éduar Elías Bejarano Martínez
M.Sc. Ciencias Básicas Biomédicas**

**GRUPO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2007**

**UTILIDAD DE LOS GENES CITOCROMO B, ARN DE TRANSFERENCIA PARA
SERINA y NAD 1 EN LA DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO
Lutzomyia.**

**MARÍA ANGÉLICA CONTRERAS GUTIÉRREZ
RAFAEL JOSÉ VIVERO GÓMEZ**

**Trabajo de grado como requisito para optar el título de
Biólogo con énfasis en Biotecnología**

**Director: Éduar Elías Bejarano Martínez
M.Sc Ciencias Básicas Biomédicas**

**GRUPO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2007**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Primer Jurado

Segundo Jurado

Tercer Jurado

Ciudad y fecha: _____

Dedicatoria.

Con todo el corazón y esfuerzo para mi madre Ana Cristina Gómez R quien mantuvo firme el propósito de vivir para formarme como persona y profesional con su constante apoyo y amor.

A mi padre Jaime Arturo Vivero por estar siempre atento de mi futuro profesional. A mis hermanas Viviana y Sandra, y a mis sobrinos César Andrés y María Alejandra, fuente de inspiración y alegría para mis metas.

A mi tía Norma por colaborarme y creer en mi. A mi tía del alma Eunice por su ejemplo de vida y superación en el trabajo, y mis primos Edwin, Jarol y Kimberfy.

A María Angélica, mi novia y amiga del alma que tanto Amo, por su constancia y esfuerzo para lograr salir adelante en esta etapa de mi vida.

Rafael José Vivero G.

Dedicatoria.

A mis padres María Gutiérrez y Jorge Contreras por su apoyo y esfuerzo para mi formación personal y profesional, a mis hermanos Andrea, Katia, Javier, Jorge Andrés y Juan Carlos.

A Paita y Nicoll mis abuelas, a mis tías Amparo y Rosita por su constante apoyo y atención.

A mi primas Ella y Mcfe por creer en mi. A mi primo Miguel Ángel, que aunque no esté en estos momentos, me motivo por el camino de la investigación.

A mi niño Rafael José, quien me enamoró y cautivo, por su valor y perseverancia en este trabajo, un objetivo más en mi vida.

Maria Angelica Contreras G.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A Dios por permitirnos cumplir una meta más en nuestras vidas.

A nuestras familias por su respaldo, confianza y estimulación en nuestra formación como personas de bien.

A nuestro maestro Eduar Elías Bejarano por su constante respaldo, orientaciones y permitirnos trabajar en esta investigación.

Al profesor Pedro Blanco Tuirán por su colaboración y consejos en el transcurso de nuestra formación académica.

A la Universidad de Sucre por su colaboración durante nuestra formación profesional.

A nuestros amigos de Unisucre: Elkin Prieto, Paola Berthel, Jorge Osorio, Elvis B, Jesús Carmona, Azael C, Sergey, Oscar Jaraba, Julio G, Luis Zapata, Jear Luis Bravo, Alex y Ana Gonzáles, Oscar Mario, Cristiano Garrido, Luís Lens, Ever García, Shirley Patricia, Luis Villegas, los compañeros, Carmen B, José Pió y Raúl Marulanda, quienes compartieron satisfacciones y momentos de lucha.

A los compañeros del Grupo de Investigaciones Biomédicas, Alveiro Pérez, Luz Fernanda Lambraño, Anais Castellar, Richard Hoyos, Lisandro Pacheco, Edgar Acuña, Kelly, Katia, Tania y Llasminth Ramona, por su apoyo incondicional en el transcurso de nuestro trabajo de laboratorio.

A las personas que laboran en el Centro de Diagnóstico Médico por hacer nuestra estadía en ese lugar más agradable.

Únicamente los graduandos son responsables de las ideas expuestas en este trabajo. Artículo 12 Resolución 02 – 03.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE ANEXOS	XII
RESUMEN	XIII
SUMMARY	XIV
INTRODUCCIÓN	15
TAXONOMÍA CLÁSICA	18
TAXONOMÍA MOLECULAR Y GENES MITOCONDRIALES.....	21
3. OBJETIVOS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. METODOLOGÍA	26
ÁREA DE ESTUDIO	26
COLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS FLEBOTOMÍNEOS.	27
DETERMINACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIE	28
MONTAJE DE ESPECIES FLEBOTOMÍNEAS.....	28
DETERMINACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIE	28
DETERMINACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES	31

EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO CON ALTA CONCENTRACIÓN DE SALES.....	31
ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA.....	31
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	33
SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR PCR	37
ANÁLISIS GENÉTICO.....	38
5. RESULTADOS	42
6. DISCUSIÓN	64
7. CONCLUSIONES	72
8. RECOMENDACIONES.....	74
9. REFERENCIAS	75
ANEXOS.....	82

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

	Página
Fotografía 1. <i>Lutzomyia</i> spp succionando sangre de un mamífero.	17
Fotografía 2. Sitio de recolección de los especímenes de <i>Lutzomyia</i> spp.	26
Fotografía 3. Trampa de luz tipo CDC.	27
Fotografía 4. Patrones morfológicos de determinación taxonómica para las especies: <i>L. evansi</i> , <i>L. trinidadensis</i> , <i>L. dubitans</i> , <i>L. gomezi</i> .	29
Fotografía 5. Patrones morfológicos de determinación taxonómica para las especies: <i>L. rangeliana</i> , <i>L. cayennensis cayennensis</i> , <i>L. panamensis</i> .	30
Fotografía 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para la verificación de la extracción del ADN.	32
Fotografía 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, para estandarizar la concentración óptima de MgCl ₂ en la PCR de hembras adultas del género <i>Lutzomyia</i> .	36
Fotografía 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, para determinar el volumen óptimo de la solución de ADN en la PCR de hembras adultas del género <i>Lutzomyia</i> .	36
Fotografía 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con las concentraciones estándar de ADN (8µl -10µl) y de MgCl ₂ (3mM) para la amplificación de genes mitocondriales con los cebadores NINFR y CB3FC.	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Patrones morfológicos exhibidos por <i>Lutzomyia</i> spp.	19
Figura 2. Cromatograma obtenido usando el sistema de electrofóresis capilar con el cebador trasero NINFR a partir del aislado Lcacsin1.	41
Figura 3. Alineamiento múltiple entre la secuencias de genes mitocondriales compuesta por el extremo 3' gen citocromo <i>b</i> , ARNt que codifica para serina, espaciador intergénico 1 y 2 (IG1, IG2) y extremo 3' del gen NAD1 obtenido a partir de hembras de <i>L. trinidadensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. cayennensis cayennensis</i> , <i>L. dubitans</i> , <i>L. gomezi</i> , <i>L. rangeliana</i> y <i>L. evansi</i> .	44
Figura 4. Alineamiento múltiple entre las secuencias aminoacídicas parciales del gen citocromo <i>b</i> aisladas a partir de los flebotomíneos analizados.	52
Figura 5. Árbol de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de sustitución HKY con distancias de tasas desiguales de transición/transversión y diferentes tasas de composición nucleotídica.	56
Figura 6. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen ARNt mitocondrial para Serina, aislado a partir de hembras de especies de <i>Lutzomyia</i> .	58
Figura 7. Predicción de las estructuras secundarias del ARN de transferencia mitocondrial que codifica para Serina basado en 70 posiciones nucleotídicas obtenidas a partir de hembras de <i>Lutzomyia</i> spp.	60
Figura 8. Alineamiento múltiple entre las secuencias parciales de aminoácidos pertenecientes a la proteína NAD1 aislado a partir de hembras de <i>Lutzomyia</i> spp.	63

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Esquema de clasificación taxonómica de Young y Duncan (1994) y Galati <i>et al.</i> (2003).	21
Tabla 2. Secuencia y posición de alineamiento de los cebadores utilizados para amplificar el extremo 3' del gen Citocromo <i>b</i> , Espaciador intergenico 1 y 2, ARN de transferencia para Serina y el extremo 3' del gen NAD 1.	33
Tabla 3. Condiciones programa "CYT B PCR" utilizado para la amplificación del extremo 3' del gen Citocromo <i>b</i> , Espaciador intergenico 1 y 2, ARN de transferencia para Serina y el extremo 3' del gen NAD 1.	33
Tabla 4. Condiciones para estandarizar la amplificación de 520 pb del extremo 3' del gen Citocromo <i>b</i> , Espaciador intergenico 1 y 2, ARN de transferencia para Serina y el extremo 3' del gen NAD 1.	34
Tabla 5. Registro de Haplotipos, código de los aislados nucleotídicos por especie, número de acceso en GenBank y códigos de referencia de los especímenes depositados en la Colección de Artrópodos de Importancia Médica de la Universidad de Sucre – CAIMUS	43
Tabla 6. Caracterización y delimitación de los genes mitocondriales: extremo 3' gen Citocromo <i>b</i> , ARNt mitocondrial que codifica para serina, espaciador intergénico 1 y 2 (IG1, IG2) y extremo 3' del gen NAD1 obtenidos a partir de hembras de <i>Lutzomyia</i> analizadas.	50
Tabla 7. Frecuencia y composición de nucleótidos del fragmento mitocondrial analizado desde el extremo 3' del gen Citocromo <i>b</i> hasta el extremo 3' del gen NAD 1 a partir de <i>Lutzomyia</i> spp.	51
Tabla 8. Valores de distancia genética neta (p) entre los haplotipos derivados del extremo 3' del gen citocromo <i>b</i> en hembras de <i>Lutzomyia</i> spp.	55

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Registro de las secuencias de genes mitocondriales de <i>L. trinidadensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. cayennensis</i> , <i>L. dubitans</i> , <i>L. gomezi</i> , <i>L. rangeliana</i> y <i>L. evansi</i> en GenBank (ANEXO 1-11).	83
ANEXO 2. Análisis de la estructura secundaria del RNA de transferencia mitocondrial para Serina (UCN) en siete especies de <i>Lutzomyia</i> (Diptera: Psychodidae).	94

RESUMEN

Los flebotomíneos del género *Lutzomyia* Franca, 1924, tienen importancia médico veterinaria por estar involucrados en la transmisión del protozoo *Leishmania* Ross, 1903, agente etiológico de la leishmaniasis. Estos dípteros se reconocen morfológicamente por su cuerpo hirsuto y pequeño, alas lanceoladas con diez venas longitudinales, patas relativamente largas y aparato bucal adaptado a la hematofagia. En los machos la determinación de especie se realiza a partir de las estructuras pareadas de la genitalia y cabeza, mientras que las hembras pueden separarse por los apéndices cefálicos, la armadura cibarial y la forma y ornamentación de las espermatecas. Si bien estos caracteres permiten distinguir la mayoría de los taxones, la similitud morfológica al interior de algunos subgéneros y grupos de especies, pone límites a la identificación por criterios morfológicos. No obstante, la mayor parte de los estudios moleculares de flebotomíneos parten de la identificación taxonómica a partir de caracteres morfológicos, la cual en el género *Lutzomyia* se realiza, principalmente, con las claves taxonómicas de Young y Duncan (1994) o Galati (2003). En el presente estudio se realizó una caracterización molecular basada en la secuencia nucleotídica de la región mitocondrial comprendida entre el extremo 3' gen citocromo *b* y el extremo 3' del gen NAD1, incluyendo el ARNt para serina y los espaciadores intergénicos uno y dos, con el objetivo de contrastar la clasificación morfológica tradicional con la filogenia derivada de los datos moleculares de siete especies del género *Lutzomyia* presentes en la ciudad de Sincelejo, colectadas usando trampas de luz tipo CDC. Los resultados de las distancias genéticas pareadas del gen citocromo *b* y el agrupamiento monofilético observado en la topología inferida, ratifican el tratamiento taxonómico sugerido por Young y Duncan (1994). Adicionalmente, las variaciones detectadas en la estructura secundaria del tRNA mitocondrial codificante para Serina, confirman la utilidad de los genes mitocondriales para la determinación específica del género *Lutzomyia*.

Palabras claves: Psychodidae, *Lutzomyia evansi*, *Lutzomyia trinidadensis*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia cayennensis cayennensis*, *Lutzomyia dubitans*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia rangeliana*, taxonomía molecular, genoma mitocondrial, citocromo *b*, tRNA^(ser) mitocondrial.

SUMMARY

Phlebotomine sandflies *Lutzomyia* of the genus *Lutzomyia* Franca, 1924, sand flies has importance veterinary medical be involved in the transmissions of protozoa *Leishmania* Ross, 1903, agent etiologic of leishmaniases. Sand flies exhibit morphology a body hirsute and small, spear-shaped wings with ten longitudinal veins, relatively long legs and buccal apparatus adapted to the haematophagy. In the males the determination of species is performed from of the paired structures of genitally and head, whereas the females can be separate for the head appendices, cibarial armature, form and ornamentation of a spermathecae. Although these character allow to distinguish the mostly of the taxa, the morphologic similarity within of some subgenera and groups of species, it puts limits to the identification for morphologic criteria. Despite, most of the molecular studies of phlebotomines leave from the taxonomic identification from morphologic characters, which in the genus *Lutzomyia* is made, mainly, with the taxonomic keys Young and Duncan (1994) or Galati (2003). In the present study it was performed a molecular characterization based on the nucleotidics sequence of the mitochondrial region included between the 3' end of the cytochrome b gene, 3' end of the NAD1 gene, including the tRNA for serine and the intergenic spacers (IG1 and IG2), with the aim to contrast the traditional morphologic classification with filogenetic derived from the molecular data of seven species the interior of the genus *Lutzomyia* presents in the city of Sincelejo, captured using CDC light traps. The results of the genetic twin distances of gene cytochrome *b* and the monophyletic group observed of the inferred topology, ratify the suggested taxonomic treatment by Young and Duncan (1994). Additionally, the nucleotidic variations detected in the secondary structure of tRNA mitochondrial coding for serine confirm the utility of the mitochondrials genes for the specific determination of genus *Lutzomyia*.

Key words: Psychodidae, *Lutzomyia evansi*, *Lutzomyia trinidadensis*, *Lutzomyia panamensis*, *Lutzomyia cayennensis cayennensis*, *Lutzomyia dubitans*, *Lutzomyia gomezi*, *Lutzomyia rangeliana*, molecular taxonomy, mitochondrial genome, cytochrome b, mitochondrial tRNA^(ser).

INTRODUCCIÓN

Los flebotomíneos del género *Lutzomyia* Franca, 1924, tienen importancia médico veterinaria por estar involucrados en la transmisión del parásito *Leishmania* Ross, 1903, agente etiológico de la leishmaniasis, una de las enfermedades tropicales más importantes en América Latina, que exhibe una variedad de formas clínicas, incluidas la cutánea, mucocutánea, visceral y difusa (1). Adicionalmente estos dípteros, son transmisores de *Bartonella bacilliformis* (Strong *et al.*, 1913), del virus de la estomatitis vesicular, de algunos *Phlebovirus* y *Orbivirus* (2).

Las especies de *Lutzomyia* Franca, 1924 (Barreto, 1943; Forattini, 1954; Fraiha *et al.*, 1971; Martins *et al.*, 1972) están clasificadas en la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae y son reconocidas morfológicamente por su cuerpo hirsuto y pequeño, alas lanceoladas con diez venas longitudinales, patas relativamente largas y aparato bucal adaptado a la hematofagia (3). Su taxonomía está basada, casi exclusivamente, en los caracteres morfológicos que exhiben los adultos, debido a las dificultades para localizar los estados inmaduros en la naturaleza. En los machos la determinación de especie se realiza a partir de las estructuras pareadas de la genitalia y cabeza, mientras que las hembras pueden separarse por los apéndices cefálicos, la armadura cibarial, la forma y ornamentación de las espermatecas, como también la pigmentación del tórax y los índices del ala (4).

La fauna de los flebotomíneos de Colombia consiste aproximadamente de 149 especies, algunas de éstas vectores comprobadas o sospechosas de *Leishmania* (5), distribuidas en 15 subgéneros, 8 grupos de especies y 3 especies no agrupadas (6). En la zona urbana de la ciudad de Sincelejo, departamento de Sucre, se registró la presencia de seis especies de *Lutzomyia* durante un estudio de determinación taxonómica usando caracteres morfológicos, tendiente a

establecer las especies asociadas a la aparición de casos urbanos de leishmaniasis cutánea y visceral (7), hecho que parece estar relacionado con la continua deforestación y la expansión urbana, que se ha intensificado en los últimos años, lo cual pone en evidencia un nuevo ciclo de transmisión doméstica urbana hasta ahora desconocido (8).

Entre estas especies de *Lutzomyia*, se encuentran algunas que pertenecen a subgéneros o grupos de especies que tradicionalmente han presentado dificultades para su determinación taxonómica, debido a la similitud de caracteres morfológicos, la gran diversidad de especies y las complejas relaciones evolutivas que exhiben algunos taxones (9), tales como *L. panamensis* (Shannon, 1926), *L. rangeli* (Ortiz, 1952), *L. gomezi* (Nitzulescu, 1931), *L. evansi* (Nunez-Tovar, 1924), *L. cayennensis cayennensis* (Floch y Abonnenc, 1941), *L. dubitans* (Sherlock, 1962) y *L. trinidadensis* (Newstead, 1922).

Uno de los componentes más importantes en el estudio ecoepidemiológico de las enfermedades transmitidas por insectos vectores radica en el conocimiento del estatus específico de los taxones en los distintos subgéneros. Esto implica determinar si las relaciones filogenéticas moleculares entre especies, son congruentes con los caracteres morfológicos usados en la taxonomía convencional. En este trabajo se utilizaron técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el secuenciamiento automatizado de nucleótidos, complementado con herramientas de bioinformática, para examinar la divergencia nucleotídica de los genes mitocondriales Citocromo *b*, NAD 1 y el ARN de transferencia mitocondrial codificante para Serina y su utilidad para el diagnóstico taxonómico específico de las especies de *Lutzomyia* de la ciudad de Sincelejo, potencialmente vectoras de leishmaniasis.

2. ESTADO DEL ARTE

El nombre de flebotómíneos es otorgado a un grupo de dípteros nematóceros, pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae (Psychodidae), insectos colonizadores de un amplio rango de hábitats tropicales y subtropicales del mundo (4). Se conocen seis géneros de Phlebotominae: *Chinius* (Leng), *Phlebotomus* (Rondani & Berté) y *Sergentomyia* (França & Parrot) en el Viejo Mundo; *Brumptomyia* (França & Parrot), *Warileya* (Hertig) y *Lutzomyia* (França) en el Nuevo Mundo, cuya organización jerárquica taxonómica se ilustra a continuación (10).

Categorización taxonómica

Phylum: Arthropoda

Orden: Diptera

Clase: Insecta

Suborden: Nematocera

Familia Psychodidae

Género: *Lutzomyia*



Fotografía 1: Flebotómíneo succionando sangre de un mamífero.
Fuente: http://www.ctegd.uga.edu/symposium_pages/sandfly.jpg

La hembra es hematófaga y necesita la sangre para el desarrollo y maduración de los huevos, circunstancia que le confiere el carácter de vector al transmitir el agente patógeno a través de picaduras sucesivas (Fotografía 1) (11). Entre las 800 especies descritas de flebotómíneos, aproximadamente el 10% son vectores probados ó sospechosos de leishmaniasis.

TAXONOMÍA CLÁSICA

La definición de especie obedece esencialmente a criterios de tipo morfológico, permaneciendo aún sin explorar el concepto de especie biológica en los flebotomíneos, por lo tanto su taxonomía está sustentada por el principio de morfoespecies (12). Esta distinción es generalmente realizada en el estado adulto del género *Lutzomyia* utilizando patrones morfológicos de estructuras de la cabeza y la genitalia de ambos sexos, así como la pigmentación del tórax y venación del ala, útil en ocasiones para separar especies estrechamente relacionadas.

En la cabeza se destaca el tamaño de los ojos, la longitud de los palpómeros y flagelómeros ubicados en los palpos y antenas respectivamente; así como la presencia de espinas en la faringe (Figura 1a, 1b). El cibario constituye una estructura bucal esclerosada con dientes horizontales y verticales, cuya forma y número es característico de cada especie (Figura 1c). Algunas especies presentan un arco cibarial completo o incompleto, mientras que otras carecen de él, siendo éste elemento importante como carácter taxonómico (10,13).

El abdomen es largo y está formado por 10 segmentos esclerotizados. Los tres últimos segmentos sufren modificaciones para conformar los genitales externos, (10). En la genitalia masculina, se utiliza el número de espinas distales del estilo, que por lo general se encuentran en número de tres a seis en el género *Lutzomyia* (Figura 1d). La presencia de setas y tufos localizados en la base de la coxita, parámero y lóbulo lateral (apéndices pareados), es tomada en cuenta entre especies (12). Además, la longitud de los conductos eyaculadores y la forma de la bomba genital es útil en la determinación morfológica.

Entre tanto, órganos internos de la genitalia femenina, como las espermatecas, exhiben grandes variaciones morfológicas y son utilizadas como criterio taxonómico de gran importancia (Figura 1e). Sumado a esto, la longitud y el grosor

del ducto común con relación a la presencia o ausencia de los ductos individuales es un rasgo colectivo que ayuda a incriminar la posición de un taxón (Figura 1e) (12).

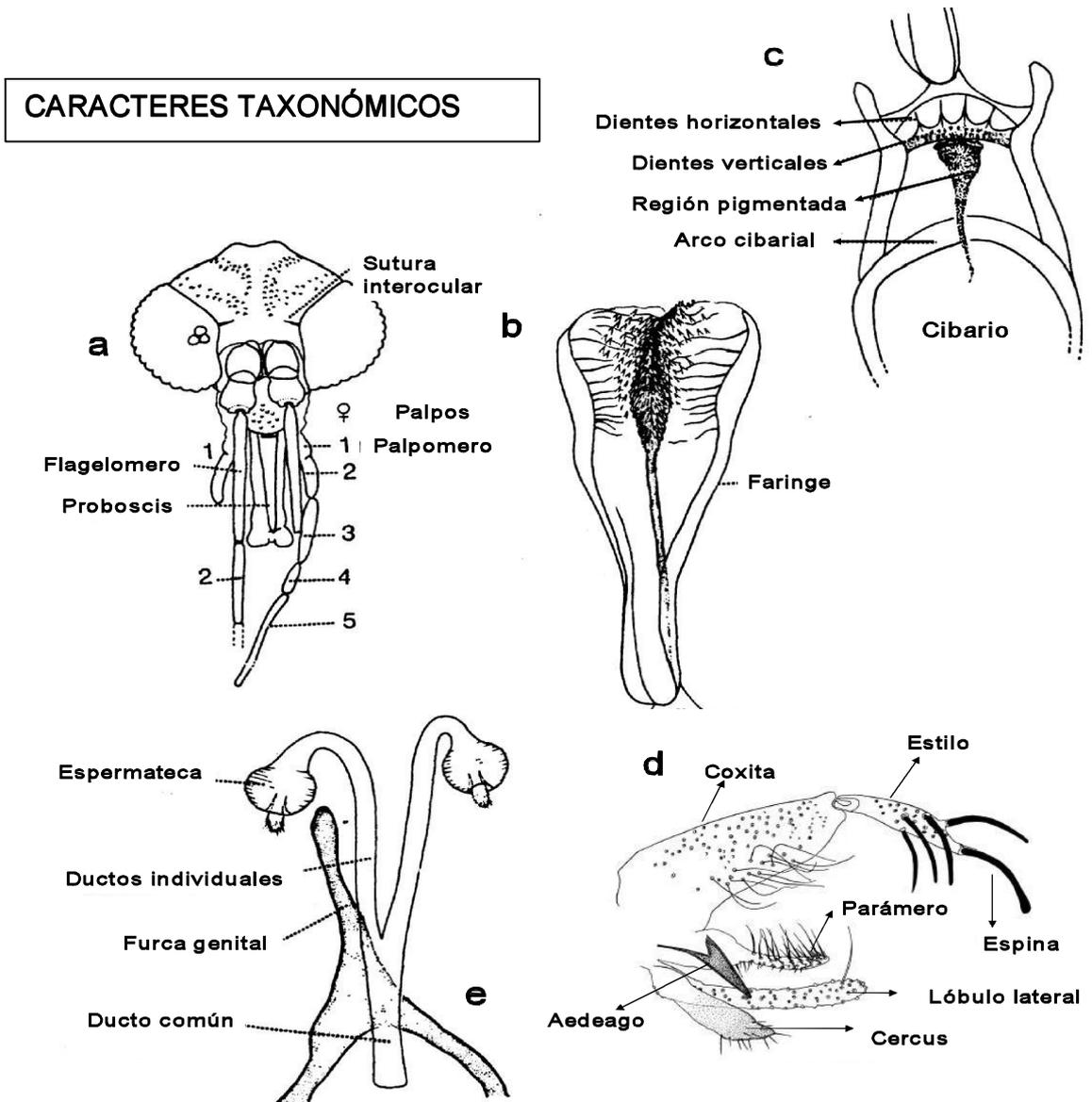


Figura 1: Estructuras anatómicas de interés taxonómico en *Lutzomyia* spp. a) Cabeza, b) Faringe, c) Cibario, d) Genitalia masculina, e) Genitalia femenina.

La determinación taxonómica de especie de los estados adultos de los flebotomíneos es una base indispensable tanto para estudios biológicos y bionómicos, como de control vectorial de la leishmaniasis (14). Sin embargo, persisten las controversias respecto a la posición de algunas especies, lo que se refleja en la existencia de dos disímiles tratamientos taxonómicos correspondientes a las claves de Young y Duncan, (1994) y Galati (2003) (Tabla 1). Estas propuestas son el reflejo de la búsqueda de caracteres inequívocos que soporten clasificaciones estables. Según Galati (2003) *L. panamensis* (Shannon, 1926) pertenece al subgénero *Psychodopygus* (Mangabeira, 1941), pero continúa el debate de si realmente representa un género distinto a *Lutzomyia* teniendo en cuenta su diferencias morfológicas (15,16).

La especie *L. rangeliana* (Ortiz, 1952), permanece sin ubicación subgénerica (17), debido a que se desconoce a qué grupo de especies se encuentra relacionada, aunque Galati (2003) propone agruparla en el subgénero *Pifanomyia* del género *Pintomyia*, (12). *L. evansi* (Nunez-Tovar, 1924) recibe en la actualidad dos tratamientos taxonómicos a nivel genérico y subgenerico: subgénero *Pifanomyia* del subgénero *Pifanomyia*, categorización propuesta por Ortiz y Scorza (1963) y Galati (2003), con *P. serana* como especie tipo; y grupo *verrucarum* Theodor (1965) de *Lutzomyia*, siendo esta última propuesta la aceptada por los sistematicos (18). Young y Duncan (1994) incluyen a *L. gomezi* (Nitzulescu, 1931) en el subgénero *Lutzomyia*, mientras que Galati (2003) la ubica en el subgénero *Tricholateralis* (12).

Asimismo, *L. trinidadensis* (Newstead, 1922) y *L. dubitans* (Sherlock, 1962), pertenecen, respectivamente, a los grupos de especies *cswaldoi* y *migonei* según Young y Duncan (1994), pero Galati (2003), propone que estas especies deben ser llevadas a los géneros *Micropygomyia* y *Evandromyia*, respectivamente (10,12).

TRATAMIENTO TAXONÓMICO		
Especie	Young y Duncan (1994)	Galati (2003)
<i>L. evansi</i> (Nunez-Tovar, 1924)	Género: <i>Lutzomyia</i> Grupo: <i>verrucarum</i>	Género: <i>Pintomyia</i> Subgénero: <i>Pifanomyia</i>
<i>L. panamensis</i> (Shannon, 1926)	Género: <i>Lutzomyia</i> Subgénero: <i>Psychodopygus</i>	Género: <i>Psychodopygus</i> Subgénero: <i>Psychodopygus</i>
<i>L. rangeliana</i> (Ortiz, 1952)	Género: <i>Lutzomyia</i> No agrupada	Género: <i>Pintomyia</i> Subgénero: <i>Pifanomyia</i>
<i>L. trinidadensis</i> (Newstead, 1922)	Género: <i>Lutzomyia</i> Grupo: <i>oswaldoi</i>	Género: <i>Micropygomyia</i> Subgénero: <i>Sauromyia</i>
<i>L. cayennensis c.</i> (Floch y Abonnenc, 1941)	Género: <i>Lutzomyia</i> Subgénero: <i>Micropygomyia</i>	Género: <i>Micropygomyia</i> Subgénero: <i>Micropygomyia</i>
<i>L. dubitans</i> (Sherlock, 1962)	Género: <i>Lutzomyia</i> Grupo: <i>migonei</i>	Género: <i>Evandromyia</i> Subgénero: <i>Aldamyia</i>
<i>L. gomezi</i> (Nitzulescu, 1931)	Género: <i>Lutzomyia</i> Subgénero: <i>Lutzomyia</i>	Género: <i>Lutzomyia</i> Subgénero: <i>Tricholateralis</i>

Tabla 1: Esquema de clasificación taxonómica según Young y Duncan, (1994) y Galati *et al.*; (2003) de las especies presentes en Sincelejo.

TAXONOMÍA MOLECULAR Y GENES MITOCONDRIALES.

Los genes mitocondriales hacen parte de un genoma extracromosomal de ADN de doble cadena, con una longitud aproximada de 16,6 kilobases (kb). Este genoma contiene 13 genes que codifican para proteínas involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa a las funciones celulares, representados por tres subunidades del complejo Citocromo C oxidasa (COI, COII y COIII), dos unidades de ATPasa (ATPasa 6, ATPasa 8), siete subunidades del complejo NADH deshidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) y una subunidad

del complejo citocromo *c* oxidoreductasa III del sistema de fosforilación mitocondrial esencial para garantizar la viabilidad de las células eucariotas denominada citocromo *b*. (19,20,21).

Adicionalmente, este genoma contiene 22 genes que codifican para ARN de transferencia (ARNt) usados para la traducción de los ARN mensajeros mitocondriales y dos genes ARN que codifican para la subunidad larga y subunidad pequeña ribosomal (LRU y SRU) relacionadas con el ensamblaje de proteína (22).

En insectos se encuentra una región control no codificante rica en adenina y timina (23), que permite controlar la replicación, transcripción y traducción (21). El ARNt juega un rol central en la biosíntesis proteica e interactúa con un número de proteínas y ácidos nucleicos para llevar a cabo su función, además interviene en la regulación metabólica, diferenciación celular y neoplasia (24, 25). Asimismo, es un componente esencial para todos los sistemas biológicos y una herramienta atractiva para estudios de evolución molecular (26). Estos tienen unos 70-80 nucleótidos; se sintetizan en el núcleo celular, aunque inicialmente se sintetizan como moléculas monocatenarias de ARN, sufren complejas modificaciones que favorecen la formación de estructuras secundarias de cadena doble con apariencia de hoja de trébol en la que se distinguen motivos conservados como el brazo aceptor del aminoácido, el brazo y la lupa del anticodón, y estructuras que pueden cambiar como el brazo y la lupa dihidrouridina (DHU), la lupa variable, y el brazo y la lupa T pseudouridine C (T ψ C).

El gen Citocromo *b* tiene un contenido aproximado 1140 pb, los fragmentos de secuencias nucleotídicas codificantes para la región del extremo 3' de este gen han presentando gran variabilidad en genomas mitocondriales de insectos, lo que confiere gran utilidad para estudios filogenéticos (23).

Esta secuencia codifica para una proteína de electro transferencia que participa en reacciones químicas para la producción de energía de la célula y que se encuentra incorporada en las membranas internas de la mitocondria y se caracteriza por su alto contenido de hierro (25).

El gen NAD deshidrogenasa subunidad uno (NAD 1), juega un papel importante para la codificación de la proteína NADH 1, primer complejo en la cadena de la transferencia de electrones de la mitocondria y cataliza la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q (CoQ), además proporciona el potencial electroquímico usado para producir el ATP (23).

El número de estudios con secuencias de genes mitocondriales en especies del género *Lutzomyia* es muy limitado, cuando se compara con los trabajos llevados a cabo en otros grupos taxonómicos. El gen mitocondrial que codifica para la proteína Citocromo *b*, fue usado por Montoya *et al.* (1999) para explorar poblaciones de *L. evansi* de Colombia y Venezuela, confirmando la posición taxonómica de la especie en la serie *verrucarum* (27). El análisis realizado por Cáceres *et al.* (1999), reportó el uso de las secuencias del gen Citocromo *b* y de unidades pequeñas ribosomales (SRU) para discriminar especies del subgénero *Heiccoctomyia* Barreto, 1962 y del subgénero *Fifanomyia*. Las regiones SRU mostraron menor porcentaje de divergencia nucleotídica que la secuencia de Citocromo *b* entre y dentro de cada subgénero, concluyendo que este último es el mejor marcador para distinguir especies estrechamente relacionadas en ambos subgéneros (28).

Ready *et al.* (1997) encontraron 18 haplotipos del gen Citocromo *b* en *L. whitmani* (Antunes y Coutinho, 1939) de Brasil, y sugirieron la existencia de tres linajes en el taxón asociados a zonas geográficas distintas. Ishikawa *et al.* (1999), utilizó 31 secuencias del mismo gen para análisis filogenético y demostró el origen monofilético de las poblaciones de *L. whitmani* (29). Las secuencias de los genes

subunidades 1 y 4 de NAD deshidrogenasa, citocromo *b* y ARNt para serina fueron usadas para estudiar las relaciones filogenéticas y la evolución de *L. columbiana*, *L. ovallesi*, *L. spinicrassa*, *L. yourgi*, *L. iorgiilocosa*, *L. nuneztovari*, *L. pia* entre otros taxa (30). Los datos moleculares reflejan que el grupo *verrucarum* ha experimentado por lo menos dos procesos evolutivos en la región de los Andes y que es posible diferenciar algunas especies mediante estos marcadores moleculares.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la utilidad de las secuencias nucleotídicas mitocondriales codificantes para los genes Citocromo *b*, NAD 1 y ARNt para serina, en el diagnóstico de las especies del género *Lutzomyia* presentes en el área urbana de la ciudad de Sincelejo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el polimorfismo de las secuencias nucleotídicas de los genes mitocondriales citocromo *b*, NAD 1 y ARNt para serina entre las especies de *Lutzomyia* presentes en Sincelejo.

Inferir la estructura secundaria del gen ARNt codificante para serina con el fin de detectar diferencias especie-específicas que puedan ser útiles para la distinción de especies del género *Lutzomyia*.

Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Lutzomyia* con base en las secuencias de los genes mitocondriales Citocromo *b*, NAD 1 y ARNt codificante para serina.

Contrastar la clasificación morfológica tradicional de *Lutzomyia* con la filogenia derivada de los datos moleculares de los flebotomíneos presentes en la ciudad de Sincelejo.

4. METODOLOGÍA

ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio escogida para la captura de los flebotomíneos fue la zona urbana de Sincelejo, donde las características geográficas y ecológicas, además de la presencia de mamíferos, son esenciales para el mantenimiento y desarrollo del insecto vector (Fotografía 2).



Fotografía 2: Zona urbana de Sincelejo, Departamento de Sucre, Ciudadela Universitaria. Ambiente propicio para el desarrollo de las especies de *Lutzomyia* spp.

La ciudad de Sincelejo se encuentra ubicada a los 9°18' de latitud norte y a los 75°24' al oeste de Greenwich, en el departamento de Sucre, Colombia. Está localizada a 218 m de elevación y con una temperatura promedio de 27°C y posee un área en la que la mayor parte de su territorio es plano con un piso térmico cálido.

COLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS FLEBOTOMÍNEOS.

Para la captura de los especímenes de ambos sexos se utilizaron trampas con atrayente luminoso de tipo CDC. Las trampas se ubicaron en el peridomicilio e intradomicilio (10, 31) (Fotografía 3), ubicadas desde los 30 cm hasta 2 m del suelo y se conectaron a su fuente de energía para iniciar la colecta, que se realizó desde las 18:00 a las 06:00 horas del día, durante los meses de Febrero a Noviembre del año 2005.



Fotografía 3: Trampa de luz tipo CDC ubicada en el peridomicilio en barrios de la zona urbana de la ciudad de Sincelejo.

Una vez capturados los flebotomíneos fueron transportados al laboratorio donde se almacenaron en tubos eppendorf de 1.5 ml a una temperatura de -20°C . Los especímenes fueron conservados secos y protegidos con algodón, para posteriormente ser procesados y sometidos a estudios de determinación morfológica y ensayos moleculares.

DETERMINACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIE

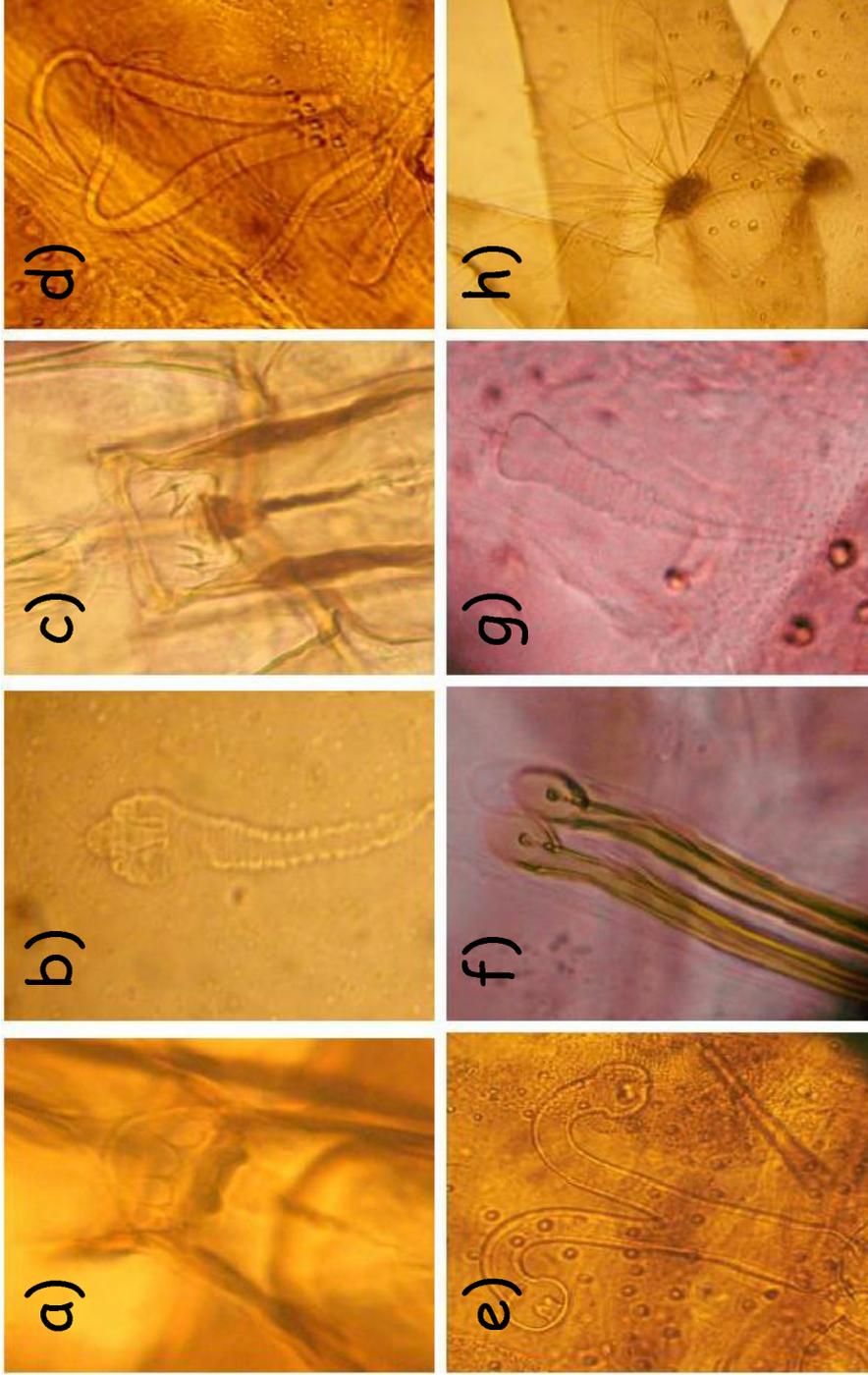
MONTAJE DE ESPECIES FLEBOTOMÍNEAS

Los ejemplares de *Lutzomyia* seleccionados se colocaron en una lámina portaobjetos para su disección. Este proceso se realizó bajo el estereoscopio con ayuda de una lámpara adicional de luz fría con el fin de preservar mejor el espécimen para la extracción de ADN mitocondrial, de la siguiente forma:

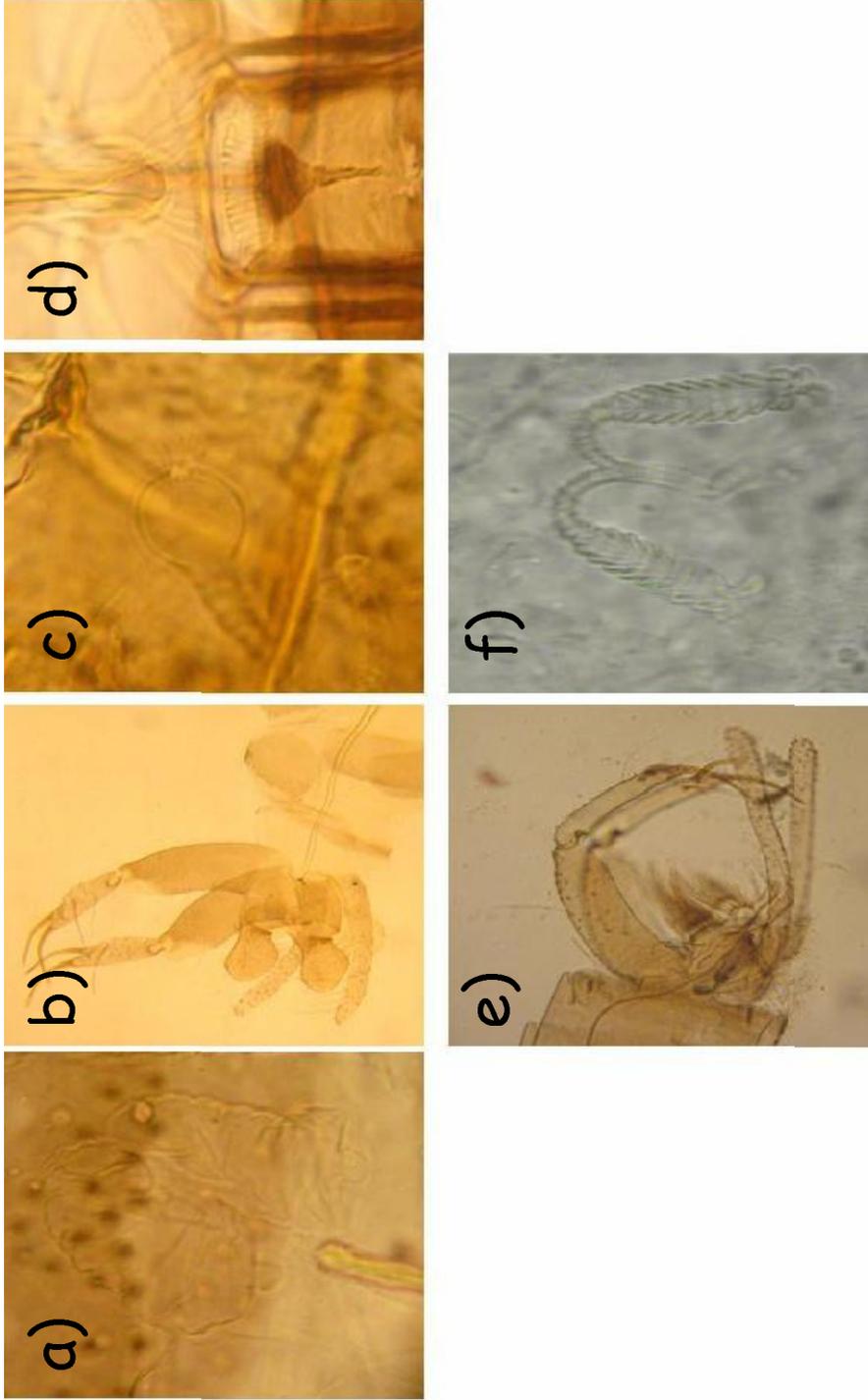
- En el proceso de disección se separó la cabeza y los tres últimos segmentos abdominales requeridos para la identificación del sexo y de la especie.
- El tórax, los primeros segmentos abdominales junto con las patas y las alas se trasladaron a un tubo eppendorf de 1.5ml en presencia de alcohol al 70% para liberarlos de la grasa o escamas que pudieran estar presentes, para una mejor extracción del DNA mitocondrial y fueron rotulados con relación al espécimen identificado (10).
- Se realizaron montajes permanentes con el fin de tener una colección de referencia, aclarando la cutícula para poder visualizar estructuras internas, utilizando lactófenol en proporción 1:1 de ácido láctico y fenol. Como medio de montaje se utilizó medio de Hoyer.

DETERMINACIÓN MORFOLÓGICA DE ESPECIE.

Un total de 512 especímenes fueron determinados taxonómicamente con las claves dicotómicas de Young y Duncan (1994) y Galati; 2003 (12,13), con base en estructuras morfológicas internas de las hembras (cibario-espermatecas) y la genitalia masculina, los cuales fueron fotografiados y permanecen en la colección entomológica del laboratorio de investigaciones biomédicas (Fotografía 4-5).



Fotografía 4: **a)** Armadura cibarial de *L. evansi*, cuatro dientes horizontales y arco cibarial completo **b)** Genitalia femenina de *L. evansi*, espermatecas con estrías transversales y botón terminal prominente. **c)** Armadura cibarial de *L. trinidadensis* con dientes horizontales pareados. **d)** Genitalia femenina de *L. trinidadensis* con espermatecas de cuerpo alargado y liso. **e)** Espermateca de *L. dubitans*: ductos individuales gruesos y ducto común ancho, con botón terminal. **f)** Filamentos genitales de *L. dubitans* con la parte distal en forma de cuchara **g)** Genitalia femenina de *L. gomezi* con espermatecas contraídas con botón terminal. **h)** Genitalia masculina de *L. gomezi* con tufo de setas basales en formas de racimo de uvas ubicadas en la gonocoxita.



Fotografía 5: **a)** Genitalia femenina de *L. rangelifiana*: espermateca en forma de saco con ausencia de ductos individuales **b)** Genitalia masculina de *L. rangelifiana* con el páramero de forma abultada y dos espinas estilares terminales. **c)** Espermatecas de *L. cayennensis* con forma globosa. **d)** Cibario de *L. cayennensis* con 8-9 pares de dientes horizontales y arco cibañal ausente. **e)** Genitalia masculina de *L. panamensis*: tufo de setas largas y abundantes entre la parte basal interna de la coxita y el páramero, además un parámetro complejo con un par de espinas terminales. **f)** Genitalia femenina de *L. panamensis*: espermatecas imbricadas con botón excéntrico.

DETERMINACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO CON ALTA CONCENTRACIÓN DE SALES.

Los especímenes identificados por morfología como *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangeliana* y *L. evansi*, fueron luego analizados molecularmente.

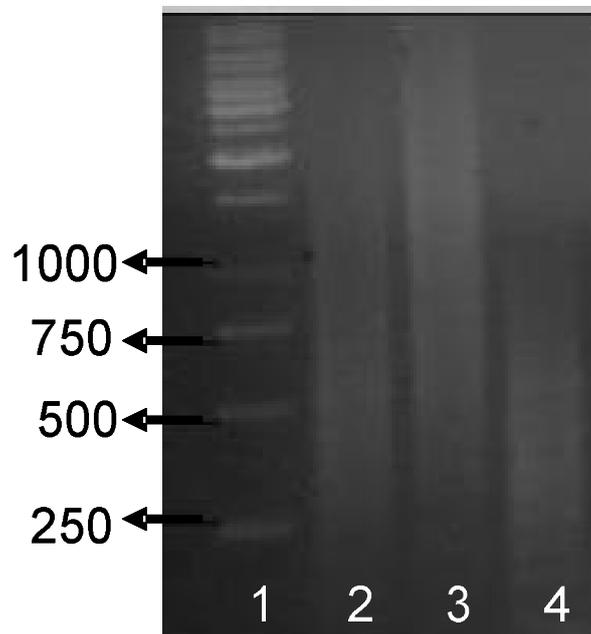
La extracción del ADN se realizó individualmente siguiendo el protocolo de Collins *et al.* (1987) (32), con las siguientes modificaciones. El tórax, las patas, las alas y los primeros segmentos abdominales de cada *Lutzomyia* se maceraron en 60 µl del buffer de lisis (0.08 M NaCl, 0.16M Sacarosa, 0.06M EDTA, 0.5% SDS, 0.1M Tris-HCl a pH de 7.5). Esta maceración se realizó en viales de 1.5 ml usando micropistilos estériles. Una vez macerado el espécimen, el vial se incubó en baño maría a una temperatura de 65°C durante 30 minutos. Posteriormente, se efectuó una precipitación adicionando 14 µl de Acetato de Potasio 8M, e incubó en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 12,000 x g durante 10 minutos a 26°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo vial y luego el ADN se precipitó con 200µl de etanol 100% a -20°C 24 horas. Seguidamente se centrifugó a 12,000 x g durante 20 minutos a 26°C; una vez terminado se decantó el sobrenadante. El ADN precipitado en el fondo del vial, se lavó con 200 µl de Etanol al 70% y luego con 200µl de Etanol absoluto. Finalmente, se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente y se resuspendió en 30 µl de agua ultra pura.

ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA.

A partir de la solución del ADN extraído de cada espécimen, se sometieron 10 µl a electroforesis en gel de agarosa al 1% tendiente a constatar que se obtuvo ADN, además de verificar su cantidad y calidad con base a la intensidad de las

muestras, comparado con el marcador de peso molecular utilizado, con el fin de escoger los mejores productos para la estandarización de la PCR y la secuenciación de nucleótidos (33).

La electroforesis se corrió en buffer TBE 0.5X (Tris-Borato-EDTA), durante cincuenta minutos a 85 voltios, El ADN fue teñido con Bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 mg/ml. Además de las muestras, se incluyó un marcador de peso molecular Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder (FERMENTAS, Life sciences). Para visualizar el ADN, se expuso a luz ultra violeta (UV) a 254/352 nm de longitud de onda en el transiluminador (Sigma, USA), registrando con una cámara digital los resultados obtenidos (Fotografía 6).



Fotografía 6: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Validación del protocolo de extracción del ADN con altas concentraciones de sales. Carriles: **1:** MPM: marcador de peso molecular (1Kb Gene Ruler™, MBI Fermenta). **2:** *L. evansi*. **3:** *L. dubitans*. **4:** *L. evansi*

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación del ADN se realizó utilizando 100ng de cada uno de los iniciadores CB3FC y NINFR (30) (Tabla 1). Estos cebadores amplifican desde el extremo 3' del gen citocromo *b* hasta el extremo 3' del gen NAD 1, incluyendo el ARNt para serina, generando en total un fragmento de aproximadamente 540 pb.

Cebador	Secuencia / Posición de alineamiento	% GC	Longitud (pb)
CB3FC Delantero	CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAATGATA Extremo 5' del gen citocromo <i>b</i>	35	20
NINFR Reverso	GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA Extremo 5' del gen NAD 1	42	26

Tabla 2: Secuencia y posición de alineamiento de los cebadores utilizados para amplificar la secuencia parcial del extremo 3' del gen Citocromo *b*, Espaciador intergénico 1 y 2, ARN de transferencia para serina y la porción final del extremo 3' del gen NAD 1.

La amplificación se realizó en un termociclador (HIBRAID PCR Express) bajo las condiciones registradas en la tabla 3.

Ciclo	Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
1	Desnaturalización	94°C	3 min.	1
2	Desnaturalización	93°C	1 min.	35
	Alineamiento	50°C	1 min.	
	Extensión	72°C	1 min.	
3	Extensión final	72°C	10 min.	1

Tabla 3: Condiciones del programa "CYT B PCR" utilizado para la amplificación del extremo 3' del gen Citocromo *b*, Espaciador intergenico 1 y 2, ARN de transferencia codificante para serina y el extremo 3' del gen NAD 1.

Para la estandarización del ensayo de PCR, se realizaron variaciones de los volúmenes de la solución de ADN (4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl) y de las concentraciones del Cloruro de Magnesio (MgCl₂) (1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM, 3.0 mM, 3.5 mM) con un volumen constante de reacción de 50 µl (Tabla 3), hasta obtener bandas definidas y nítidas correspondientes al fragmento aproximado de 540 pb.

Reactivo	Concentración evaluada	Volumen equivalente evaluado (µl).
Buffer PCR-Mgcl2	1x	5
MgCl2	1.5 a 3.5 mM	1.5 - 2 - 2.5 - 3 - 3.5
DNTP's	10 mM	5
Cebadores	100ng	5
Taq pol	2µ/ reacción	0.3
ADN		4,6,8,10
H2O para PCR		
Volumen final		50

Tabla 4: Ensayos de estandarización para la amplificación óptima del producto de 540 pb del extremo 3' del gen Citocromo *b* hasta el extremo 3' del gen NAD 1.

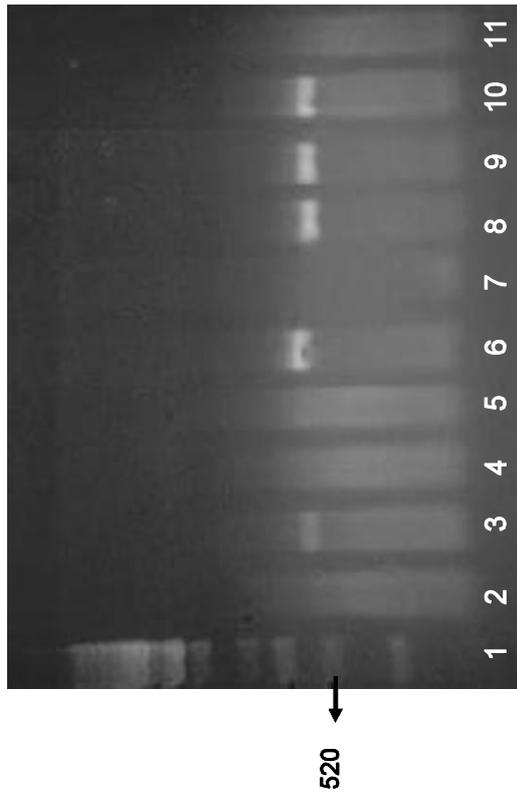
Electroforesis en condiciones similares a las descritas, se realizaron con el fin de verificar los resultados de la PCR, con base en la intensidad de la banda y el tamaño del fragmento amplificado comparado con el marcador de peso molecular. Se mezcló un volumen de 10 µl del producto de PCR en solución, con 1/5 de volumen del tampón de carga Orange G (Sigma, USA) y se depositó en los pozos del gel de Agarosa al 1%.

En el primer pozo se adicionó 6 µl del marcador de peso molecular ADN Ladder de 1 Kb Gene Ruler™ (MBI Fermentas). Posteriormente se corrieron las muestras y el marcador en un tanque de electroforesis horizontal Sub-Cell model 96 de Biorad. Se esperó el tiempo necesario hasta que las muestras hubieran llegado al frente de corrido del gel, luego de someterlo a 85 voltios de intensidad. Para visualizar el ADN, se expuso el gel a luz ultra violeta (UV) de 254/352nm de longitud de onda en el transiluminador (Sigma, USA) y de igual forma se registró el corrido de cada uno de los ensayos con una cámara digital. Para interpretar los

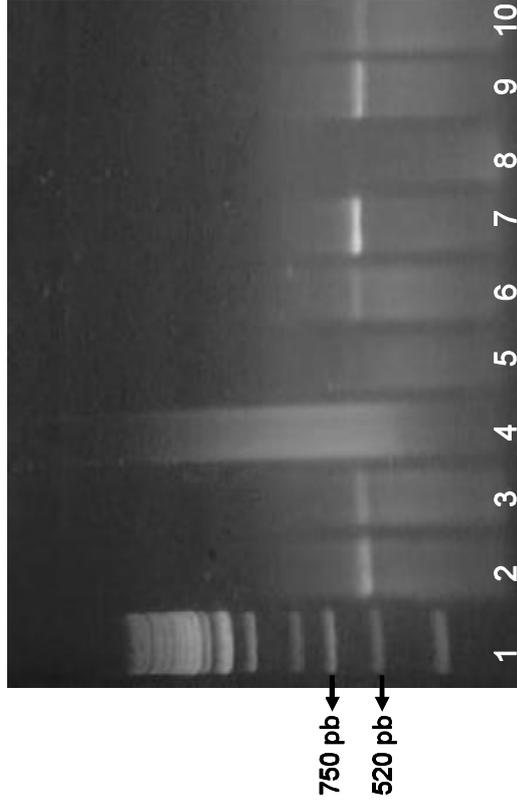
resultados observados en el gel de agarosa al 1%, se calculó el tamaño de los fragmentos a partir del tamaño en pares de bases (pb) de las bandas del marcador de peso molecular. Para lograr esto se realizó una gráfica en una hoja de calculo Microsoft Excel con el logaritmo de la distancia de corrido en centímetro de cada una de las muestras contra cada uno de los fragmentos del marcador.

En la fotografía 7 se ilustran bandas de 540 pb correspondientes a los genes Citocromo *b*, ARNt para Serina, NAD 1, presentes en los carriles 3, 6, 8, 9,10, entre los cuales las bandas mas definidas fueron las pertenecientes a los carriles 8 y 9 cuya concentracion de MgCl₂ es equivalente a 3mM, convirtiéndose en la concentración optima para el desempeño de la enzima *Taq polimerasa I*, que necesita de una concentración estable de MgCl₂, el cual actúa como catalizador enzimático y permite una mejor afinidad del sitio activo de la enzima .

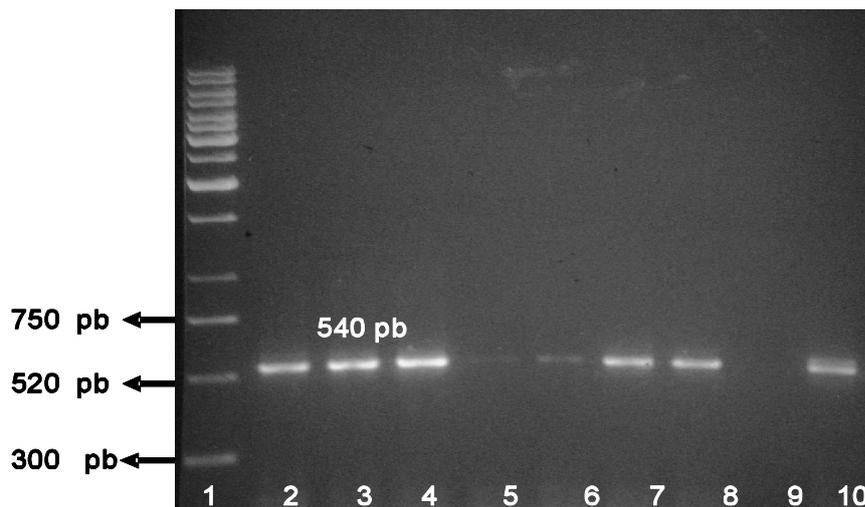
Los volúmenes de la solución de ADN de 8 µl y 10 µl correspondientes a las bandas observadas en los carriles 7 y 9 (Fotografía 8) fueron los más apropiados en la estandarización. Como resultado, la concentración de 3mM para MgCl₂ y el volumen de ADN de 8 µl fueron las condiciones seleccionadas en la PCR para obtener el fragmento aproximado de 540 pb (Fotografía 9, Carriles 2, 3, 4).



Fotografía 7: Gel de agarosa al 1%, variación de $MgCl_2$ para la ampliación de genes mitocondriales correspondientes a 540 pb en especies de *Luzoromyia* presentes en Sincelajo: **1.** MPM marcador de peso molecular (1Kb Gene Ruler™, MBI Fermentas); **2.** ADN de *L. gomezi* y $MgCl_2$ 1.5mM; **3.** ADN de *L. cayennensis cayennensis* y $MgCl_2$ 1.5 mM; **4.** ADN de *L. gomezi* y $MgCl_2$ 2mM; **5.** ADN de *L. cayennensis cayennensis* y $MgCl_2$ 2mM; **6.** ADN de *L. gomezi* y $MgCl_2$ 2.5mM; **7.** ADN de *L. cayennensis* y $MgCl_2$ 2.5mM; **8.** ADN de *L. gomezi* y $MgCl_2$ 3mM; **9.** ADN de *L. cayennensis cayennensis* y $MgCl_2$ 3mM; **10.** ADN de *L. gomezi* y $MgCl_2$ 3.5mM; **11.** ADN de *L. cayennensis cayennensis* y $MgCl_2$ 3.5Mm.



Fotografía 8: Gel de agarosa al 1%, variación de volumen de ADN para la ampliación de genes mitocondriales correspondientes a 540 pb en especies de *Luzoromyia* presentes en Sincelajo: **1.** marcador de peso molecular (1Kb Gene Ruler™, MBI Fermentas); **2.** 4µl de ADN de *L. dubitans*; **3.** 4µl de ADN de *L. cayennensis cayennensis*; **4.** 6µl de ADN de *L. dubitans*; **5.** 6µl de ADN de *L. cayennensis cayennensis*; **6.** 8µl de ADN de *L. dubitans*; **7.** 8µl de ADN de *L. cayennensis cayennensis*; **8.** Control negativo; **9.** 10µl de ADN de *L. dubitans*; **10.** 10µl de ADN de *L. cayennensis cayennensis*.



Fotografía 9: Gel de agarosa al 1%, variación de volumen de ADN (8µl - 10µl), y concentración estándar de 3mM de MgCl₂ para la ampliación de genes mitocondriales correspondientes a 540 pb en especies de *Lutzorhynchus* de Sincelejo: 1. marcador de peso molecular (1Kb Gene Ruler™, MBI Fermentas); 2. 8µl de ADN de *L. dubitans*; 3. 8µl de ADN de *L. cayennensis cayennensis*; 4. 8µl de ADN de *L. gomezi*; 5. 8µl de ADN de *L. trinidadensis*; 6. 10µl de ADN de *L. dubitans*; 7. 10µl de ADN de *L. cayennensis cayennensis*; 8. 10µl de ADN de *L. gomezi*; 9. Control negativo 10. 10µl de ADN de *L. trinidadensis*.

SECUENCIAMIENTO DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR PCR

La secuencia nucleotídica del fragmento amplificado de 540 pb, se determinó directamente en un secuenciador automático de electroforesis capilar ABI 3730xl, utilizando los mismos cebadores empleados para la amplificación de acuerdo al método ideado por Sanger *et al.* 1977 (34) y modificado por Smith *et al.* 1986, que utiliza los cuatro dideoxinucleótidos terminadores marcados con diferentes grupos fluorescentes (35).

Inicialmente cada uno de los productos fue sometido a PCR con BigDye (Perkin Elmer Applied Biosystems), que contiene la mezcla de reacción lista, incluyendo ddNTPs, Buffer con MgCl₂, pirofosfatasa y AmpliTaq Polimerasa (FS Perkin Elmer).

Los fragmentos producidos fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 4.8% page Plus (Amresco) durante siete horas en el secuenciador automatizado, usando los respectivos módulos de corrida. Se realizaron reacciones de secuenciamiento con cada uno de los cebadores, con el fin de obtener la secuencia de nucleótidos en ambos sentidos de la cadena. El color de cada banda presente en el gel de poliacrilamida corresponde al emitido por el dideoxinucleótido 3' terminal de ese fragmento.

Posteriormente, se generó un registro informático de los cuatro perfiles de color, que combinados se interpretan como una secuencia. Los respectivos cromatogramas obtenidos de cada especie flebotomínea, como el ilustrado en la figura 2, arrojaron luego de su edición un total de aproximadamente 540 pb pertenecientes a la secuencia parcial del extremo 3' del gen Citocromo *b*, Espaciador intergenico 1 y 2, ARN de transferencia para Serina y el extremo 3' del gen NAD 1 respectivamente.

ANÁLISIS GENÉTICO.

El análisis filogenético se realizó usando el programa MEGA versión 3.1 (Kumar *et al.* 2004) (36) de la siguiente manera: con los cromatogramas se preeditaron cada una de las secuencias obtenidas para verificar que no se presentaran ambigüedades entre las secuencias de cada sentido de la doble cadena de ADN y corroborar cada una de las sustituciones encontradas, logrando una secuencia consenso por individuo. El alineamiento múltiple con las secuencias de los flebotomíneos se realizó usando el algoritmo Clustal W integrado en MEGA, teniendo como base la región homóloga del genoma mitocondrial reportado para *Aedes albopictus*. Estas secuencias fueron trasladadas a aminoácidos a través del programa MEGA 3.1 con base al código genético mitocondrial estándar de *Drosophila melanogaster* (36), obteniendo los datos genéticos básicos como: los sitios variables, la composición tanto nucleotídica como aminoacídica. Además, se

determinaron las distancias genéticas pareadas (ρ), bajo el modelo de sustitución del parámetro dos de Kimura (37).

La topología se infirió utilizando el programa PUZZLE 5.0 (38) aplicación usada para reconstruir árboles filogenéticos a partir de secuencias nucleotídicas por máxima verosimilitud. El programa implementa un algoritmo de búsqueda rápida de árbol (*quartet puzzling*) que permite el análisis de grandes conjuntos de datos y la asignación automática de estimaciones de soporte para cada rama interna que maximicen la probabilidad de los datos, sustentado en la tasa de heterogeneidad (sitios invariables más tasas de distribución Gamma) incorporada al modelo de sustitución HKY implementado para nucleótidos (39). También se computa la relación transición/transversión y la razón transición de pirimidinas / transición de purinas, de acuerdo al modelo seleccionado.

El método del *quartet puzzling* se ocupa de los subconjuntos de cuatro elementos del sistema del conjunto de secuencias consideradas. Para cada subconjunto la topología del árbol apropiado se construye y se determina el árbol filogenético completo usando estos árboles generados (40). La búsqueda de árboles por *quartet puzzling* (QP) en principio estima valores que tienen el mismo significado práctico que los valores de *bootstrap*, esto implica que las ramas muestran un QP de 90 a 100% bien soportado, valores 50% y 60% tomados como moderados, e inferiores a 50% asumidos como bajos. Los límites de confianza de cada una de las filogenias obtenidas, fueron evaluados sobre 1000 réplicas.

En la construcción de los árboles se incluyeron las secuencias derivadas de los especímenes capturados en la zona urbana de la ciudad de Sincelejo y secuencias depositadas en GenBank de especies del género *Lutzomyia* de Venezuela (41) con el fin de evaluar la capacidad del marcador molecular de agrupar individuos de la misma especie de diferentes países. También se incorporaron dos secuencias correspondientes a *Brumptomyia beaupertuyi* y

Phlebotomus beigei, que están registradas en GenBank bajo el número de acceso AF448546 y AF161213, respectivamente. La reconstrucción filogenética obtenida se analizó comparándola con las relaciones de agrupamiento morfológico propuestas por Young y Duncan (12) y Galati *et al* (13).

La estructura secundaria del ARNt mitocondrial codificante para Serina se infirió manualmente a partir del grupo de secuencias alineadas, teniendo en cuenta además las estructuras homólogas descritas previamente en organismos del orden Diptera, con el propósito de definir zonas nucleotídicas conservadas y variables entre los taxones del género *Lutzomyia*.

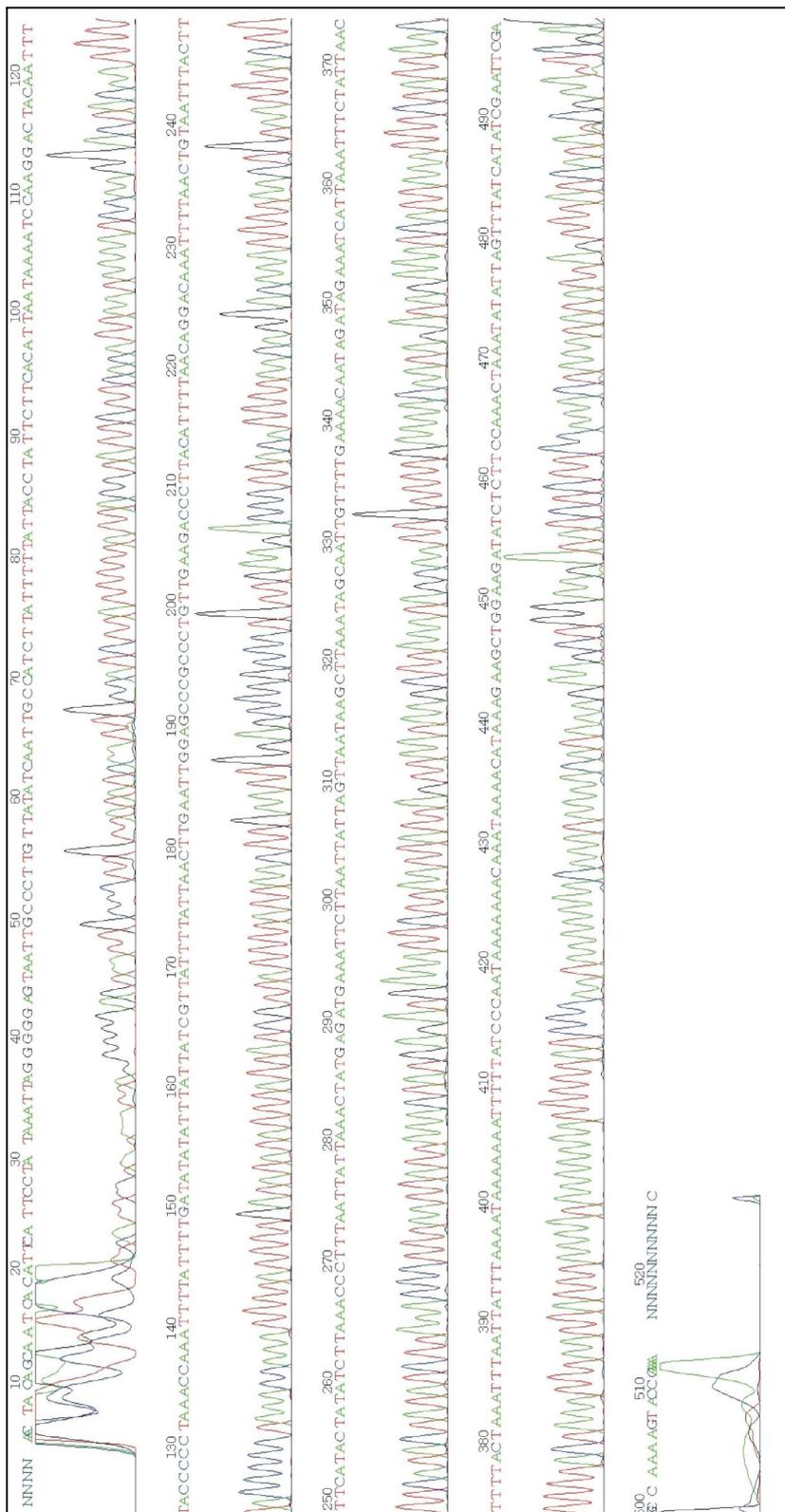


Figura 2: Cromatograma obtenido con sistema de electroforesis capilar ABI 3730 utilizando el cebador trasero NINFR a partir del aislado Lcacin1 correspondiente a la especie *L. cayennensis cayennensis*. Esta técnica se basa en la síntesis interrumpida de nuevas cadenas de ADN con didesoxirribonucleótidos marcados con grupos fluorescentes que emiten luz a diferente longitud de onda cuando son excitados con un rayo láser. Cada nucleótido aparece en un color diferente (verde para adenina, rojo para timina, azul para citosina y negro para guanina) y la altura de cada pico es proporcional a la concentración de los fragmentos del tamaño correspondiente.

5. RESULTADOS

El fragmento nucleotídico de las especies de *Lutzomyia* analizadas fue alineado con la región homóloga de todos los genomas mitocondriales completos de insectos cercanos filogenéticamente al orden Diptera, usando la herramienta BLAST nucleotide-nucleotide (disponible en línea), a partir del cual se obtuvo un mayor porcentaje de similaridad con el genoma de *Aedes albopictus* de 16665 bp registrado en Gene Bank con el número de acceso NC_006817, cuyas posiciones 11262 y 11755 representan la delimitación del fragmento de 493 nucleótidos secuenciado en el presente trabajo.

Para facilitar el manejo de la información, los haplotipos nucleotídicos y aminoacídicos se codificaron de la siguiente forma: el primer carácter representa el nombre genérico, los dos caracteres siguientes la especie, el cuarto carácter el país, las próximas tres letras la localidad y el último número discrimina los individuos de cada especie analizados.

Se obtuvieron 8 haplotipos a partir del alineamiento global de 11 secuencias correspondientes a 7 especies. Las secuencias nucleotídicas de los genes mitocondriales de cada uno de los aislados obtenidos se depositaron en GenBank (ANEXO 1). Cada uno de los números de acceso asignados en esta base de datos moleculares se encuentra relacionado con los códigos de la Colección de Artrópodos de Importancia Médica de la Universidad de Sucre – CAIMUS, donde reposan los montajes entomológicos que se usaron para la determinación morfológica de los especímenes secuenciados (specimen-voucher) (Tabla 5).

Haplotipo	Secuencia	Aislado	Especie	Nº de acceso GenBank	CAIMUS Specimen Voucher
1	Secuencia 1	Ltrcsin1	<i>L. trinidadensis</i>	EF012215	P173
2	Secuencia 2	Lpacsin1	<i>L. panamensis</i>	EF012216	P93
3	Secuencia 3	Lpacsin2	<i>L. panamensis</i>	EF012217	P166
4	Secuencia 4	Lcacsin1	<i>L. cayennensis c.</i>	EF012218	P54
	Secuencia 5	Lcacsin2	<i>L. cayennensis c.</i>	EF012219	P512
5	Secuencia 6	Lducsin1	<i>L. dubitans</i>	EF012220	P158
6	Secuencia 7	Lgocsin1	<i>L. gomezi</i>	EF012221	P5
	Secuencia 8	Lgocsin2	<i>L. gomezi</i>	EF012222	P7
7	Secuencia 9	Lracsin1	<i>L. rangeliana</i>	EF012223	P108
	Secuencia 10	Lracsin2	<i>L. rangeliana</i>	EF012224	P118
8	Secuencia 11	Levcsin4	<i>L. evansi</i>	EF012225	P59

Tabla 5: Registro de Haplotipos, código de los aislados nucleotídicos por especie, número de acceso en GenBank y códigos de referencia de los especímenes depositados en la Colección de Artrópodos de Importancia Médica de la Universidad de Sucre – CAIMUS.

La ilustración del alineamiento nucleotídico presentado en la Figura 3 se interpreta de la siguiente forma: cada nucleótido es representado por la primera letra, así: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T). La numeración de la parte superior debe ser interpretada de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo formando pares o tripletes cuando sea necesario, lo cual representa la posición nucleotídica. Los puntos denotan homología entre los diferentes haplotipos y los guiones indican eventos indel (inserción – delección). Los codones de parada en los genes codificantes de proteínas (TAA y TAG) han sido subrayados.

La secuencia nucleotídica correspondiente a *L. trinidadensis* (Ltrcsin1), fue ubicada en la parte superior del alineamiento y se usó para la delimitación de los genes entre las distintas especies, por presentar el gen citocromo *b* y el ARNt codificante para serina de mayor tamaño, además de poseer los espaciadores Intergénicos 1 y 2 (IGs1-IGs2), característica útil para la diferenciación de cada una de las secuencias por especie.

La caracterización genética de los taxones estudiados se basó en 494 posiciones nucleotídicas resultantes del alineamiento de las distintas secuencias. El tamaño e ilustración de los genes en este alineamiento corresponde al: extremo 3' del gen Citocromo *b*, alrededor de 324 y 327 nt, seguido en algunas especies del Espaciador Intergénico 1 (5 - 10 nt), ARNt para serina con 66 a 69 nt, Espaciador Intergénico 2 con 15-16nt y la porción final de 72 nt del extremo 3' del gen NAD 1, que es uno de los transcritos de la cadena L que tienen como cadena codificadora la cadena H, por ello la secuencia de RNA transcritos a partir de ésta cadena tienen la secuencia complementaria y dirección contraria a la que se asigna por convenio al conjunto del genoma mitocondrial, por lo tanto, su correspondiente codón de parada se halla comprendido entre la posición 492-494 (Figura 3).

POSICIONES NUCLEOTÍDICAS

	5'-----																															
				111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444																
Aislado	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678																
Ltrcsin1	GAA	TGA	TAC	TTC	TTA	TTT	GCC	TAT	GCT	ATT	TTA	CGG	TCA	ATT	CCT	AAT																
Lpacsin1T	..TC	..T	C.C	..AC	..A	...																
Lpacsin2T	..TC	..T	C.T	..AC	..A	...																
Lcacsin1	CG.T	..T	C.TT	C.T	..CA	...																
Lcacsin2	CG.T	..T	C.TT	C.T	..CA	...																
Lducsin1T	..TC	...	C.T	..A	..T	..C	..A	...																
Lgocsin1T	..T	C.TTCT	..C																
Lgocsin2T	..T	C.TTCT	..C																
Lracsin1TC	C.C	..AC	..A	...																
Lracsin2TC	C.C	..AC	..A	...																
Levcsin4TA	...	C.T	..AA	...																

				455	555	555	556	666	666	666	777	777	777	788	888	888	888	889	999	999											
Aislado	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456															
Ltrcsin1	AAA	CTA	GGT	GGA	GTA	ATT	GCT	CTT	GTT	ATA	TCA	ATT	GCT	ATT	TTA	TTC															
Lpacsin1T	..ATA	..C	C..	..T															
Lpacsin2T	..ATA	..C	C..	..T															
Lcacsin1	..G	T..	..AA	T.ATT	...															
Lcacsin2	..G	T..	..AA	T.ATT	...															
Lducsin1	...	T..	..ATTAT	...															
Lgocsin1	...	T..	..GATC															
Lgocsin2	...	T..	..GATC															
Lracsin1T	..A	T.A	..CTA															
Lracsin2T	..A	T.A	..CTA															
Levcsin4	...	T..	..GCC	T.A	..CA															

```

-----
          111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111
Aislado  999 000 000 000 011 111 111 112 222 222 222 333 333 333 344 444
Ltrcsin1 TTT CTT CCA ATT CTT CAT AAT AGA AAA TTC CAA GGT CTT CAA TTT TAT
Lpacsin1 ... .. .CA ... .. AAT ... ..A T.A ... ..
Lpacsin2 ... .. .CA ... .. AAT ... ..A T.A ... ..
Lcacsin1 ... T.A ..C T.. T.A ..C C.A ... .. A.A ... ..A T.A ... ..C
Lcacsin2 ... T.A ..C T.. T.A ..C C.A ... .. A.A ... ..A T.A ... ..C
Lducsin1 ... .. .T ..C T.A ... TTA ..T ..T .CT ... ..A ... ..C ..C
Lgocsin1 ..C T.A ..C ..C ACC ... .TA ... .. AGT ... ..C ... ..C
Lgocsin2 ..C T.A ..C ..C ACC ... .TA ... .. AGT ... ..C ... ..C
Lracsin1 ..C T.A ..T TC. ..A ..C TT. ... .. AAT ... ..A T.A ... ..
Lracsin2 ..C T.A ..T TC. ..A ..C TT. ... .. AAT ... ..A T.A ... ..
Levcsin4 ..A ..C ..T ... .. .TA ... .. A.A ... ..A ..A ... ..

```

```

-----
          111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111
Aislado  444 445 555 555 555 666 666 666 677 777 777 778 888 888 888 999
Ltrcsin1 CCT TTA AAT CAG ATT TTA TTT TGG TAT ATA TTA ATA ATT GTA ATC TTA
Lpacsin1 ..A ... ..A ..C ... ..A ... ..T ..T ... ..T ...
Lpacsin2 ..A ... ..A ..C ... ..A ... ..T ..T ... ..T ...
Lcacsin1 ... ..A ... C.. ..A ... ..T G.T ... ..T C.T
Lcacsin2 ... ..A ... C.. ..A ... ..T G.T ... ..T C.T
Lducsin1 ... A.T GC. ..A ... C.. ..A ... ..T ... ..T ...
Lgocsin1 ..A G.. ... ..A ... ..A ... ..T G.T ... ..T ... C..
Lgocsin2 ..A G.. ... ..A ... ..A ... ..T G.T ... ..T ... C..
Lracsin1 ..A C.C ... ..A ... ..A ... ..C ... ..T ...
Lracsin2 ..A C.C ... ..A ... ..A ... ..C ... ..T ...
Levcsin4 ... ..A ... C.. ..A ... ..A ... ..T ... ..T ...

```

```

-----
          111 111 122 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222
Aislado  999 999 900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233 333 333 334
Ltrcsin1 TTA ACT TGA ATT GGA GCA CGA CCT GTA GAA GAC CCT TAT ATT TTA ACA
Lpacsin1 ... ..A ... ..C ... ..A ..T ... .CA ... ..C A.T ..T
Lpacsin2 ... ..A ... ..C ... ..A ..T ... .CA ... ..C A.T ..T
Lcacsin1 ... ..A ... ..T ..T ..C ... ..C ... ..C ... ..
Lcacsin2 ... ..A ... ..T ..T ..C ... ..C ... ..C ... ..
Lducsin1 ... ..A ... ..C ... ..C ... ..C ... ..C ..T ..T
Lgocsin1 ... ..G ... ..C ... ..T ... ..C ... ..A.T ..T
Lgocsin2 ... ..G ... ..C ... ..T ... ..C ... ..A.T ..T
Lracsin1 ... ..A ... ..C ... ..C ... ..ACT ... ..C ... ..
Lracsin2 ... ..A ... ..C ... ..C ... ..ACT ... ..C ... ..
Levcsin4 ... ..A ... ..T ... ..C ... ..C ... ..C ... ..T

```

```

-----
222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222 222
444 444 444 555 555 555 566 666 666 666 667 777 777 777 888 888 888
Aislado 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678
Ltrcsin1 GGA CAG ATT TTA ACA GTT GTT TAC TTT TTA TAC TAT ATT CTC AAT CCA
Lpacsin1 ..C ..A T.A ..G ... A.. A.. ..T ... A.. ..T ... .. T.A ..C ..T
Lpacsin2 ..C ..A T.A ..G ... A.. A.. ..T ... A.. ..T ... .. T.A ..C ..T
Lcacsin1 ... ..A ..C C.C ..T A.. A.. ..T ... A.. ..T ..C ... A.. ... ..T
Lcacsin2 ... ..A ..C C.C ..T A.. A.. ..T ... A.. ..T ..C ... A.. ... ..T
Lducsin1 ... ..A ..C C.T ..T ..A A.. ... .. T ..T ... A.A ..C T.T
Lgocsin1 ..T ..A ..C ... .. A.. ... ..C ... A.T ... ..
Lgocsin2 ..T ..A ..C ... .. A.. ... ..C ... A.T ... ..
Lracsin1 ..T ..A ... .. A A.. ..T ... .. A.T ..C ..T
Lracsin2 ..T ..A ... .. A A.. ..T ... .. A.T ..C ..T
Levcsin4 ..G ..A ..C C.. ..T ... A.. ..C ... ..T ... .. A.. ..C ...

```

```

----->3'
222 222 222 223 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333
899 999 999 990 000 000 000 111 111 111 122 222 222 223 333 333
Aislado 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456
Ltrcsin1 GTA ATT ACC TAT TTA TGA GAT AAA ATT CTT GAC GCA TAA ACT AAT ATA
Lpacsin1 A.. G.. T.A A.A A.T ... .. ..T TA. T.A TCA AAT ... --. ... TA-
Lpacsin2 A.. G.. T.A A.A A.T ... .. ..T TA. T.A TCA AAT ... --. ... TA-
Lcacsin1 T.. ... T.T .TA .AT ... .. T.A A.T AAT ..A --- --- ---
Lcacsin2 T.. ... T.T .TA .AT ... .. T.A A.T AAT ..A --- --- ---
Lducsin1 A.C .GA T.T A.A A.T ... .. .T. ..C T.A A.T AAT ... --. T.. T--
Lgocsin1 ... G.C T.T A.A A.T ... ..C ... ..C T.A A.T AAT ..G --- --- ---
Lgocsin2 ... G.C T.T A.A A.T ... ..C ... ..C T.A A.T AAT ..G --- --- ---
Lracsin1 A.. ... T.T A.A A.T ... .. ..G ... ..T TAA --- --- ---
Lracsin2 A.. ... T.T A.A A.T ... .. ..G ... ..T TAA --- --- ---
Levcsin4 T.. ... T.T A.A A.T ... .. ..C. T.A A.T TA. ... .T. .T. T--

```

```

5' ◆-----
333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333
333 444 444 444 455 555 555 556 666 666 666 777 777 777 788 888
Aislado 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234
Ltrcsin1 AGT TAA TAA GCT TTA -AT AGC AAT TGT TTT GAA AAC ATT AGA TAG AAA
Lpacsin1 ... .. A. A.A ... ..
Lpacsin2 ... .. A. A.A ... ..
Lcacsin1 -.. ... A. T.C ... ..
Lcacsin2 -.. ... A. T.C ... ..
Lducsin1 ... .. -.. ... ..
Lgocsin1 --. ... ..
Lgocsin2 --. ... ..
Lracsin1 -.. ... A. A.. ... .T. ... ..AA .T. ... ..
Lracsin2 -.. ... A. A.. ... .T. ... ..AA .T. ... ..
Levcsin4 ... .. -.. ... ..

```

```

----->3'-----3'←-----
      333 333 333 333 333 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444
      888 889 999 999 999 000 000 000 011 111 111 112 222 222 222 333
Aislado 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012
Ltrcsin1 TTT AAA AAT TTT CTA TTA ACT TTA CTA ATT TTT ATT ATT TAA AGT GAA
Lpacsin1 ... --. ... .. TA. ... .. -... .A. A..
Lpacsin2 ... --. ... .. TA. ... .. -... .A. A..
Lcacsin1 ..- --. ... A.. ... .. .A. ... .. A... .A. A..
Lcacsin2 ..- --. ... A.. ... .. .A. ... .. A... .A. A..
Lducsin1 ... --. .CC ... .. .. .. .A ..G .AC ... .A. A..
Lgocsin1 ..- --. ..C ... .. .. .. .A. ..A ... .. .A. A..
Lgocsin2 ..- --. ..C ... .. .. .. .A. ..A ... .. .A. A..
Lracsin1 ... --. ... .. .. .. ..T .AA .A. ... -... .AC A..
Lracsin2 ... --. ... .. .. .. ..T .AA .A. ... -... .AC A..
Levcsin4 C.C --. ... .. .. .. ..AA A.A ... .. .A. A..

```

```

-----
      444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444
      333 333 344 444 444 445 555 555 555 666 666 666 677 777 777 778
Aislado 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890
Ltrcsin1 AAA ATT TCC TCT CAT CTC ACA CGA CAA ATA TAT CAT AAA GAA TTC GAG
Lpacsin1 ... .A. .TT AA. .CA A.A .A. AAT A.. ... A.A ... .. CCA .GT
Lpacsin2 ... .A. .TT AA. .CA A.A .A. AAT A.. ... A.A ... .. CCA .GT
Lcacsin1 ... .A. .TT AAA .CA A.A .A. AAT AT. ... A.A ... ..T GAA .GT
Lcacsin2 ... .A. .TT AAA .CA A.A .A. AAT AT. ... A.A ... ..T GAA .GT
Lducsin1 ... .. .TT AA. .C. A.A .A. AAG ..T .A. A.A A.. ...T AAA .GA
Lgocsin1 ... ..C .TT AAC .C. AAA .A. AA. ... .. A.A ... ..T ... GCA .GT
Lgocsin2 ... ..C .TT AAC .C. AAA .A. AA. ... .. A.A ... ..T ... GCA .GT
Lracsin1 ... ..C .TT AA. .CC A.A .A. AA. ... .. A.A ... .. GCA .GT
Lracsin2 ... ..C .TT AA. .CC A.A .A. AA. ... .. A.A ... .. GCA .GT
Levcsin4 ... ..C .TT AA. .CA A.A .A. AA. ..T ... A.A ... ..T GCA .GC

```

```

----->5'
      444 444 444 444 44
      888 888 888 999 99
Aislado 123 456 789 012 34
Ltrcsin1 GCA ATA TCC TCT CA
Lpacsin1 AA. TAT CTT .T. ..
Lpacsin2 AA. TAT CTT .T. ..
Lcacsin1 AA. TAT CTT .T. ..
Lcacsin2 AA. TAT CTT .T. ..
Lducsin1 AG. TAT CTT .T. ..
Lgocsin1 AAG TA. CTT .T. ..
Lgocsin2 AAG TA. CTT .T. ..
Lracsin1 AA. .AT CTT .T. ..
Lracsin2 AA. .AT CTT .T. ..
Levcsin4 AAG TA. CTT .T. ..

```

Figura 3: Alineamiento múltiple entre las secuencias de los genes mitocondriales: el extremo 3' de Citocromo *b* en color azul, espaciador intergénico 1 (IG1) en color morado, el gen ARNt Serina en color rojo, espaciador intergénico 2 (IG2) en color fucsia y el extremo 3' de del gen NAD 1 en color verde, a partir de hembras adultas de *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangeliana* y *L. evansi*. Los codones terminales de cada gen se encuentran subrayados. Los puntos indican homología. Los guiones indican eventos indel (inserción- deleción).

Al momento de realizar la comparación nucleotídica, se observó la ausencia del espaciador intergénico 1 (IG1) en *L. cayennensis cayennensis*, *L. gomezi* y *L. rangeliana*, por consiguiente, el tamaño del fragmento secuenciado es más corto. Por su parte el espaciador intergénico 2, se presentó en todas los aislados de *Lutzomyia* oscilando en un tamaño de 15 pb a 16 pb. Es importante resaltar la adición de un segundo codón de parada en especies como *L. panamensis* y *L. evansi* que parece tener un efecto puntuacional (42).

Las características descriptivas del alineamiento global se resumen en la Tabla 6, donde se detalla la ubicación y el tamaño de cada uno de los genes mitocondriales en el fragmento amplificado, los cuales son útiles al momento de identificar las especies del género *Lutzomyia*.

La frecuencia nucleotídica del fragmento secuenciado, muestra un alto contenido en Adenina 37,49% y Timina 39,44%, teniendo un porcentaje de GC sólo el 23,05% (Tabla 7). Esta característica es particular del ADN mitocondrial en insectos, donde el contenido de Adenina-timina puede representar el 80% de la composición nucleotídica de toda la molécula (22). Como consecuencia, la composición aminoacídica está dominada por aminoácidos no polares como isoleucina. Esto se evidencia en especies como *L. dubitans* donde este aminoácido representa el 17.59% y en *L. trinidadensis* y *L. rangeliana* donde el contenido de Leucina alcanza márgenes del 17.59% y 17.76%, respectivamente.

Cada una de las posiciones nucleotídicas son consideradas como un carácter para la comparación de especies, el cual puede presentar cuatro estados A, T, G, C. Basados en el criterio de especiación y sustitución, estos son definidos como un patrón que se puede describir independientemente, además, cumple con las características de ser comparables al momento de relacionar varias secuencias, más exactamente, que se pueden reconocer como una posición homóloga entre varios taxones.

Partiendo de la utilidad de la región final del gen Citocromo *b*, como marcador molecular para la identificación de especies del género *Lutzomyia* (9,43), se realizó un alineamiento adicional basado en la secuencia de este fragmento con el fin de resaltar las diferencias y similitudes entre los individuos analizados, el cual permitió encontrar 8 haplotipos, con 134 sitios polimórficos nucleotídicos que representan el 40,9% de variación y 29 sitios variables aminoacídicos obtenidos a partir de 109 aminoácidos codificados.

Especies del género <i>Lutzomyia</i> encontradas en Sincelajo							
GEN- (Sentido cadena)	<i>L. trinidadensis</i> Ltrcsin1	<i>L. evansi</i> Levcsin4	<i>L. panamensis</i> Lpacsin1-2	<i>L. dubitans</i> Lducsin1	<i>L. cayennensis</i> Lcacsin1-2	<i>L. gomezi</i> Lgocsin1-2	<i>L. rangelifiana</i> Lracsin1-2
Citocromo b (+)							
Posición	1 – 327	1 – 324	1 – 327	1 – 327	1 – 327	1 – 327	1 – 324
Tamaño (nt)	327	324	327	327	327	327	324
Terminación (Nº)	TAA	TAA (2)	TAA (2)	TAA	TAA	TAG	TAA
# Nt solapados IGs1	0	0	0	0	0	0	0
# Nt solapados ARNts	0	0	0	0	1(A)	2(AG)	1 (A)
IG1 (+)							
Posición	328 – 336	325 – 334	328 – 333	328- 332			
Tamaño (nt)	9	10	6	5	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
ARNt para serina (+)							
Posición	337 – 405	335 – 401	334 – 401	333 – 399	327 – 393	326 – 391	324 – 391
Tamaño (nt)	69	67	68	67	67	66	68
Iniciación	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT
Terminación	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT	CTT
IG2 (+)							
Posición	406 – 421	402 – 417	402 – 416	400 – 415	394 – 409	392 – 407	392 – 406
Tamaño (nt)	16	16	15	16	16	16	15
NAD 1 (-)							
Posición	422 – 493	418 – 489	417 – 488	416 – 487	410 – 481	408 – 479	407 – 478
Tamaño	72	72	72	72	72	72	72
Terminación	TTA	TTA	TTA	CTA	TTA	TTA	TTA

Tabla 6: Caracterización y delimitación de los genes mitocondriales: extremo 3' gen Citocromo b, ARNt mitocondrial que codifica para serina, espaciador intergénico 1 y 2 (IG1, IG2) y extremo 3' del gen NAD1 obtenidos a partir de hembras adultas de las especies de *Lutzomyia* analizadas.

INDIVIDUO	A		C		G		T		TOTAL(ACGT)	
	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Ltrcsin1	169	34,28	73	14,81	53	10,75	198	40,16	493	100
Lpacsin1	191	39,14	61	12,50	42	8,61	194	39,75	488	100
Lpacsin2	191	39,14	60	12,30	42	8,61	195	39,96	488	100
Lcacsin1	181	37,63	59	12,27	43	8,94	198	41,16	481	100
Lcacsin2	181	37,63	59	12,27	43	8,94	198	41,16	481	100
Lducsin1	175	35,93	66	13,55	46	9,45	200	41,07	487	100
Lgocsin1	173	36,12	72	15,03	51	10,65	183	38,20	479	100
Lgocsin2	173	36,12	72	15,03	51	10,65	183	38,20	479	100
Lracsin1	186	38,91	68	14,23	42	8,79	182	38,08	478	100
Lracsin2	186	38,91	68	14,23	42	8,79	182	38,08	478	100
Levcsin4	189	38,65	69	14,11	45	9,20	186	38,04	489	100
Total (Avg)	181	37,49	66	13,66	45	9,39	191	39,44	484	100

Tabla 7: Frecuencia y composición de nucleótidos del fragmento mitocondrial analizado, desde el extremo 3' del gen Citocromo *b* hasta el extremo 3' del gen NAD 1, obtenido de hembras de *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangelifana* y *L. evansi*.

Los sitios que presentaron mayor variación entre los distintos haplotipos del alineamiento estuvieron en las posiciones 39, 42, 60, 94, 97 y 105 sombreadas en gris en la Figura 4. Entre éstas se destaca la posición 39, por presentar un aminoácido distintivo para cada haplotipo: Ltrcsin1(N= Asparagina), Lpacsin1-Lpacsin2 (T= Treonina), Lcacsin1- Lcacsin2 (Q= Glutamina), Lducsin1 (L= Leucina), Lracsin1- Lracsin2 (F= Fenilalanina), a excepción de Lgocsin1-Lgocsin2 y Levcsin4 que presentan el aminoácido (M= Metionina). Las posiciones 42 y 60 expresan diferencias significativas para *L. trinidadensis*.

POSICIONES AMINOACÍDICAS

	1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445
Aislado	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
Ltrcsin1	EWYFLFAYAI	LR SIPNKLGG	VIALVMSIAI	LFFLPILHNS	KFQGLQFYPL
Lpacsin1T.N.....
Lpacsin2T.N.....
Lcacsin1	R.....F..Q.M.....
Lcacsin2	R.....F..Q.M.....
Lducsin1L.	NS.....I
Lgocsin1T.M.S.....V
Lgocsin2T.M.S.....V
Lracsin1S..F.N.....
Lracsin2S..F.N.....
Levcsin4L.....M.M.....

	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	9999999990
Aislado	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
Ltrcsin1	NQILFWYMLM	IVILLTWIGA	RPVEDPYILT	GQILTVVYFL	YYILNPVITY
Lpacsin1FIA...I.L..II..MM VSK
Lpacsin2FIA...I.L..II..MM VSK
Lcacsin1FVII..MI..L.SL
Lcacsin2FVII..MI..L.SL
Lducsin1	A.....II...F.M.SISSK
Lgocsin1FVI.I...I..VSK
Lgocsin2FVI.I...I..VSK
Lracsin1IT.....I...I..M.SK
Lracsin2IT.....I...I..M.SK
Levcsin4II...I..L.SK

	111111111
Aislado	000000000
Ltrcsin1	LWDKILDA*
Lpacsin1	I..NY.SN.
Lpacsin2	I..NY.SN.
Lcacsin1	Y.....NN.
Lcacsin2	Y.....NN.
Lducsin1	I..M..NN.
Lgocsin1	I.....NN.
Lgocsin2	I.....NN.
Lracsin1	I...-LD.
Lracsin2	I...-LD.
Levcsin4	I...T.N*-

Figura 4: Alineamiento múltiple entre las secuencias parciales de la proteína Citocromo *b* aisladas a partir de hembras adultas de *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangeli* y *L. evansi*. Las letras representan al respectivo aminoácido según el código genético de *Drosophila melanogaster*. Los puntos homología, los asteriscos el codón de parada y los guiones eventos indel (inserción- deleción).

Los aislados del género *Lutzomyia* presentes en el área urbana de Sincelejo, expresaron valores de distancia genética (p) que fluctuaron entre 0.161 y 0.240 (Tabla 8). Estas distancias muestran valores normales que reflejan las diferencias entre las especies de este género. Sorpresivamente, los valores mas bajos se presentaron entre las especies *L. evansi* (Lvc4) y *L. cayennensis cayennensis* (Lcacsin1-2) especies que pertenecen a subgéneros diferentes. Las mayores distancias se registraron al comparar *L. trinidadensis* (Ltrcsin1) frente a *L. dubitans* (Lduc1), los cuales superan ampliamente a los valores encontrados entre los demás taxones evaluados al interior de *Lutzomyia*. Estos resultados indican que *L. trinidadensis* podría, presumiblemente, corresponder a una de las especie más divergentes.

Los valores detectados de los aislados Lpacsin1-2, los cuales hacen mención a la especie *L. panamensis*, exhibieron un buen grado de divergencia al ser comparados con los otros taxones de *Lutzomyia* sin sobrepasar las distancias genéticas límites de dicho género. Estas oscilaron entre 0.186 cuando se relaciona con los aislados Lracsin1-2 y 0.229 respecto a Ltrcsin1 (Tabla 8).

Al momento de analizar las distancias genéticas pareadas intraespecíficas, determinadas a partir de los aislados de *Lutzomyia* obtenidos en Venezuela (41) y los haplotipos de Colombia (Sincelejo), se observó un patrón de valores de distancias pareadas inferiores a 0.1 (Tabla 8), dato que demuestra la utilidad que tiene este marcador molecular para el diagnóstico específico de cada taxón. Más aún, esto refleja que dichas secuencias mantienen su poder de resolución de especies a pesar de tratarse de individuos provenientes de poblaciones geográficamente distantes.

El examen de las distancias genéticas entre las especies de géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* presentes en Nuevo Mundo y el Viejo Mundo, respectivamente, permiten distinguir ambos taxones, con divergencias entre 0.201 y 0.251,

superando ampliamente a los valores encontrados entre dos de los géneros presentes en América, *Lutzomyia* y *Brumptomyia*, cuyos valores de distancia genética fluctuaron entre 0.201 y 0.244, sugiriendo que el género *Lutzomyia* se ha diferenciado fuertemente al nivel genético del resto de géneros (Tabla 8).

Al construir el árbol filogenético con Máxima verosimilitud (Puzzle) basado en NJ los datos de Citocromo *b* se ajustan a un modelo HKY (Hasegawa et al. 1985) con los siguientes parámetros estimados de los datos: Tasa de transición/ transversión = 1.40 (Desviación estándar 0.16), Frecuencias nucleotídicas: $\pi(A) = 32.5\%$, $\pi(C) = 15.9\%$, $\pi(G) = 10.4\%$, $\pi(T) = 41.2\%$; La tasa transición/ transversión esperada = 1.13. Tasa de pirimidinas / transición purinas esperada = 1.94.

La topología inferida con Máxima verosimilitud de los once aislados mitocondriales del gen citocromo *b* descritos a partir hembras de *Lutzomyia* de la ciudad de Sincelejo, muestra una agrupación monofilética, soportada por un valor *quartet puzzling* (QP) del 88%, es decir, que son un grupo de especies que mantienen entre ellas la estrecha relación de parentesco, con un componente de variación del 12% que puede ser atribuido a diferencias entre los aislados ubicados en diferentes grupos subgenéricos (Figura 5).

No	Aislados	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	Ltrcsin1																		
2	Lpacsin1	0.229																	
3	Lpacsin2	0.229	0.000																
4	Lcacsin1	0.226	0.215	0.215															
5	Lcacsin2	0.226	0.215	0.215	0.000														
6	Lducsin1	0.240	0.204	0.204	0.201	0.201													
7	Lgocsin1	0.208	0.215	0.215	0.190	0.190	0.204												
8	Lgocsin2	0.208	0.215	0.215	0.190	0.190	0.204	0.000											
9	Lracsin1	0.211	0.186	0.186	0.190	0.190	0.211	0.197	0.197										
10	Lracsin2	0.211	0.186	0.186	0.190	0.190	0.211	0.197	0.197	0.000									
11	Levcin4	0.176	0.204	0.204	0.161	0.161	0.172	0.168	0.168	0.176	0.176								
12	AY316733	0.229	0.215	0.215	0.004	0.004	0.201	0.186	0.186	0.190	0.190	0.161							
13	AY316735	0.240	0.208	0.208	0.219	0.219	0.032	0.204	0.204	0.219	0.219	0.176	0.219						
14	AF448540	0.233	0.004	0.004	0.219	0.219	0.208	0.219	0.219	0.190	0.190	0.208	0.219	0.211					
15	AY316734	0.204	0.219	0.219	0.186	0.186	0.204	0.208	0.014	0.201	0.201	0.176	0.190	0.211	0.222				
16	AF448544	0.065	0.233	0.233	0.211	0.211	0.237	0.208	0.208	0.215	0.215	0.179	0.215	0.233	0.237	0.208			
17	AF161213	0.237	0.201	0.201	0.244	0.244	0.247	0.251	0.251	0.237	0.237	0.222	0.247	0.251	0.204	0.251	0.226		
18	AF448546	0.244	0.215	0.215	0.219	0.219	0.215	0.240	0.240	0.219	0.219	0.201	0.219	0.226	0.219	0.244	0.244	0.194	

Tabla 8: Valores de distancia genética neta (p) calculadas entre los haplotipos obtenidos a partir del extremo 3' gen citocromo *b* en hembras adultas de *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangelliana* y *L. evansi*. Los aislados de la población venezolana se encuentran en color verde, en color azul se encuentra representada la especie *Phlebotomus bergetori* y en color rojo la especie *Brumptomyia beaupertuyi*. Los valores en negrita corresponden al rango de valores superiores e inferiores entre las especies de *Lutzomyia* presentes en Sincelejo, las distancias en (), pertenecen a las divergencias intraespecíficas.

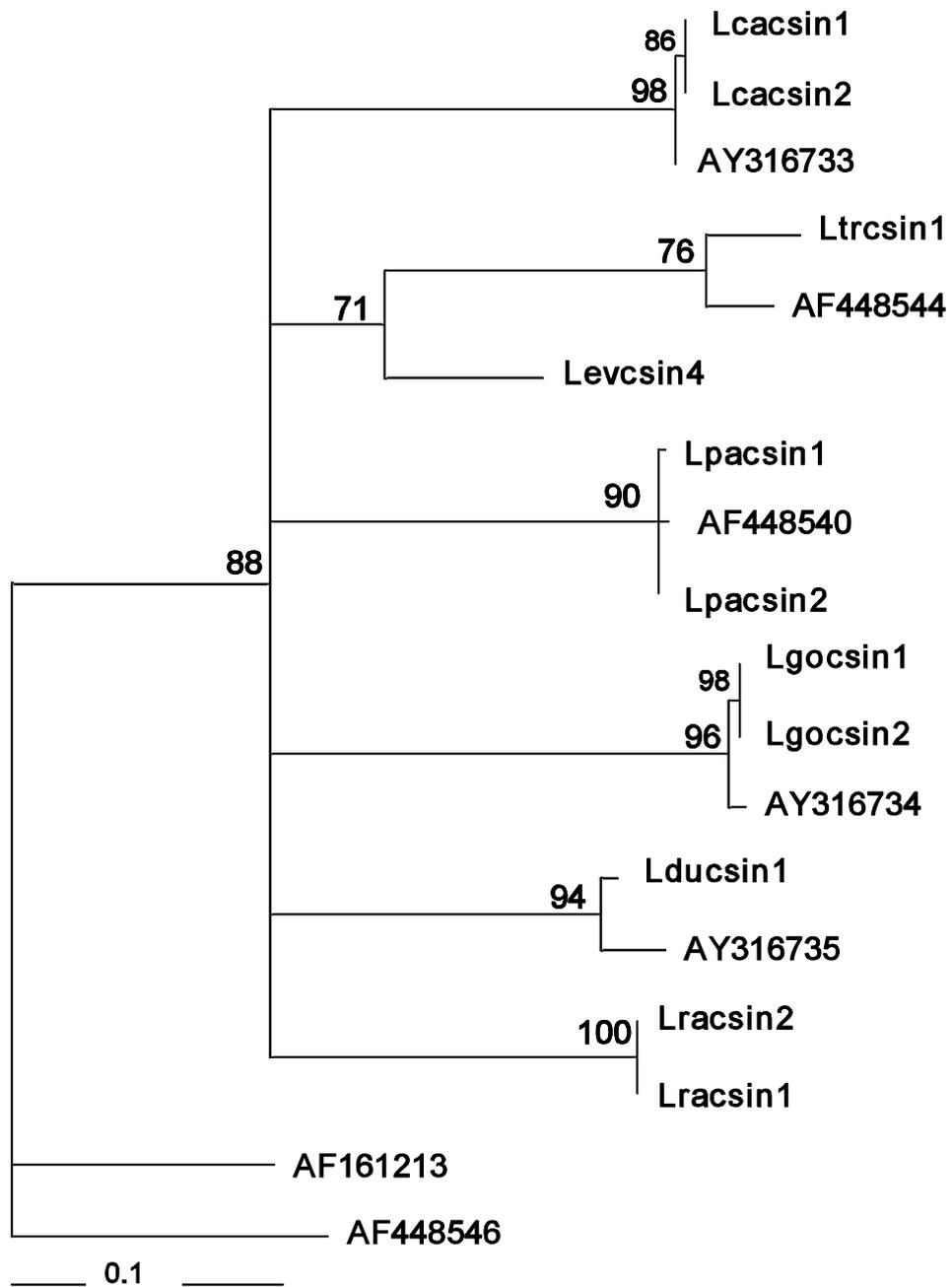


Figura 5. Árbol de Máxima Verosimilitud (Puzzle) basado en el modelo de sustitución HKY con distancias con tasas desiguales de transición/ transversión y diferentes tasas de composición nucleotídica. El valor de *quartet puzzling* (QP) es mostrado para cada rama y su respectiva longitud interna.

En esencia, la variación intraespecífica observada al comparar las especies del género *Lutzomyia* de Colombia (Sincelejo) y de Venezuela apoya la asignación específica que se otorgó a estos taxones inicialmente con patrones morfológicos con los siguientes valores de *quartet puzzler*: *L. cayennensis cayennensis* (QP = 98%), *L. trinidadensis* (QP = 76%), *L. panamensis* (QP = 90 %), *L. gomezi* (QP = 96 %), *L. dubitans* (QP = 94%) y los aislados de *L. rargeliana* (QP = 100 %) (Figura 5).

Las relaciones filogenéticas corroboran los resultados obtenidos por las distancias genéticas previamente observadas, destacando que *L. trinidadensis* muestra la rama más larga, lo que reitera su divergencia genética con respecto al resto de especies de *Lutzomyia* analizadas, aunque aparece con valores QP del 71% con el aislado *L. evansi*.

La caracterización genética del gen ARNt mitocondrial codificante para Serina de los aislados de *Lutzomyia*, estuvo sustentado en 70 posiciones nucleotídicas en el alineamiento múltiple (Figura 6), a partir del cual se observaron 14 sitios nucleotídicos polimórficos, incluyendo cuatro eventos indel (inserción-delección), que corresponden a una tasa de variación del 20%, lo que permite establecer diferencias entre las distintas especies analizadas.

El carácter económico de la molécula mitocondrial se manifiesta en *L. cayennensis cayennensis* y *L. rargeliana* por el solapamiento de la primera base nucleotídica, adenina, del gen tRNA^{Ser} (UCN), con la última base del codón de terminación del gen citocromo *b*, y se acentúa más en *L. gomezi* donde estos genes comparten dos nucleótidos, adenina y guanina.

POSICIONES NUCLEOTÍDICAS

	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333			
Aislado	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789
Ltrcsin1	AGT	TAA	TAA	GCT	TTA	-AT	AGC	AAT	TGT	TTT	GAA	AAC	ATT
Lpacsin1A.	A.A
Lcacsin1A.	T.C
Lducsin1	-
Lgocsin1	-
Lracsin1A.	A.T.AA
Levcsin4	-

	444	444	444	455	555	555	556	666	666	666	7
Aislado	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	0
Ltrcsin1	AGA	TAG	AAA	TTT	AAA	AAT	TTT	CTA	TTA	ACT	T
Lpacsin1	--
Lcacsin1	--	..	A..
Lducsin1	--	.CC
Lgocsin1	--	.C
Lracsin1	.T.	--
Levcsin4	C.C	--

Figura 6: Alineamiento múltiple de las secuencias del gen mitocondrial tRNA^{Ser} (UCN), aislados a partir de los especímenes *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangeliana* y *L. evansi*. Los puntos indican homología. Los guiones indican eventos indel (inserción-delección). Los nucleótidos subrayados ilustran los sitios variables detectados.

La frecuencia nucleotídica en todas las especies se caracterizó por un alto contenido de adenina (42,4 %) y timina (39%), contrastando con un bajo porcentaje de guanina (10,2%) y citosina (8,4%). Aunque se secuenció más de un individuo de *L. panamensis*, *L. cayennensis*, *L. gomezi* y *L. rangeliana*, se detectó un solo haplotipo nucleotídico por especie.

La secuencia del gen tRNA^{Ser} osciló en tamaño entre 66pb en *L. gomezi* y 69pb en *L. trinidadensis*, manteniéndose en este rango *L. dubitans*, *L. evansi* y *L. cayennensis* con una extensión de 67pb, además de *L. panamensis* y *L. rangeliana* con un tamaño de 68pb. La longitud superior del tRNA^{Ser} de *L.*

trinidadensis se debe al tamaño de la lupa T ψ C que aparece constituida por nueve bases (Figura 7A), a diferencia de las demás especies cuya extensión se mantuvo en el rango de 6 y 8 bases. Del mismo modo, la reducción en el tamaño del tRNA^{Ser} de *L. gomezi* es producto de la pérdida de una base en la lupa DHU y tres bases en la lupa T ψ C (Figura 7F).

El número de apareamientos en el grupo de taxones fluctuó entre 4 y 5 en el brazo del anticodón, 7 en el brazo aceptor, 3 y 4 en el brazo DHU, y 4 y 5 en el brazo T ψ C (Figura 7A-G). Todas las especies se caracterizaron por la presencia de dos bases entre el brazo aceptor y el brazo DHU, una base entre este último y el brazo del anticodón y cuatro bases en la lupa variable.

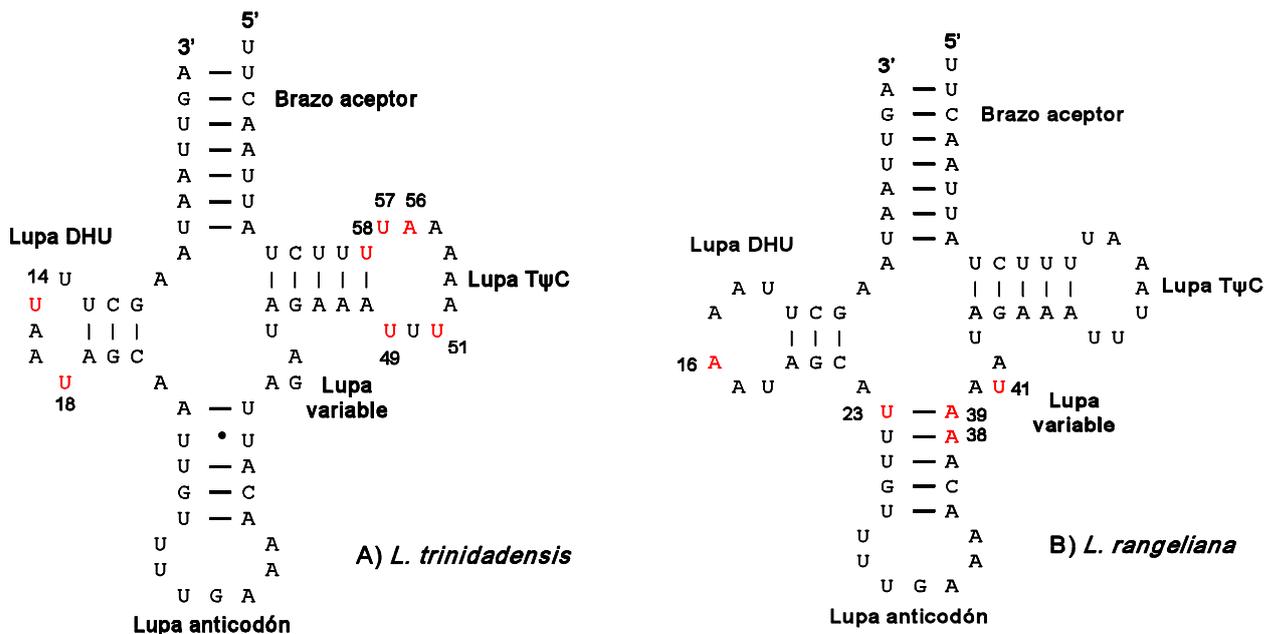
La mayoría de las sustituciones correspondieron a las lupas DHU, T ψ C y variable, así como al extremo basal del brazo anticodón, en los cuales se encontraron posiciones con nucleótidos propios de cada especie flebotomínea.

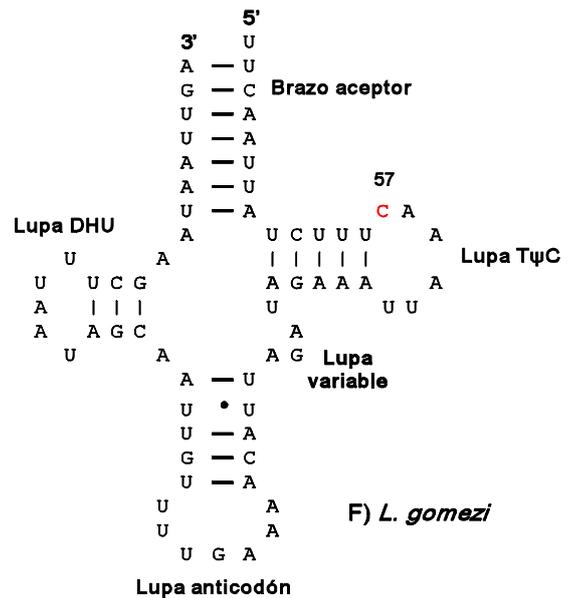
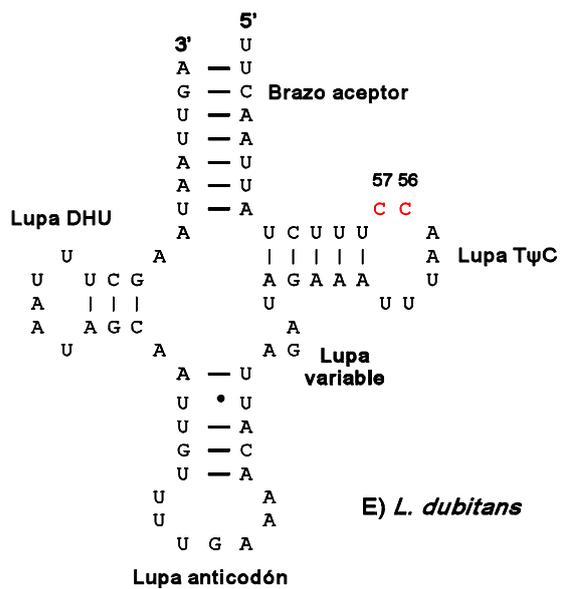
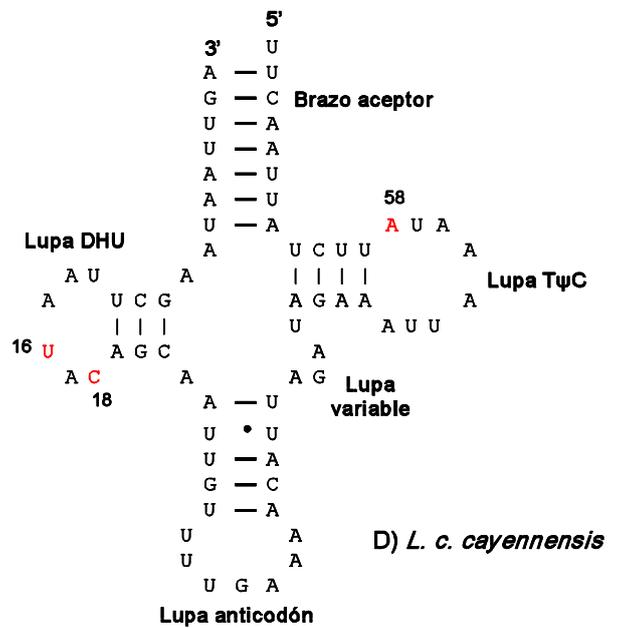
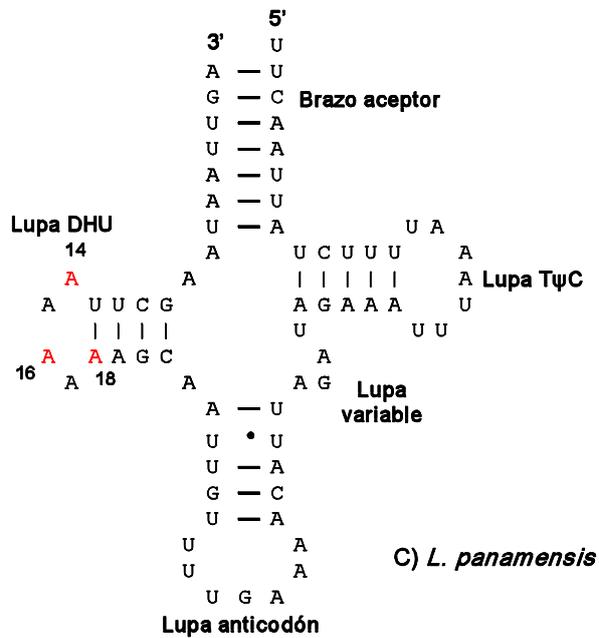
En *L. iargeliana* es notoria la ocurrencia de cinco apareamientos en el brazo del anticodón, derivado de la sustitución de la timina por adenina en la posición 38 (Figura 7B), en tanto que las demás especies poseen cuatro apareamientos y un desapareamiento. Esta especie también se destaca por la presencia de los nucleótidos timina, adenina y timina en las posiciones 23, 39 y 41, del mismo brazo (Figura 7B).

A diferencia de los otros taxones que exhiben cinco apareamientos en el brazo T ψ C, *L. cayennensis cayennensis* posee sólo cuatro apareamientos (Figura 7D), como producto del reemplazo de la timina de la posición 58 por adenina, la cual genera un desapareamiento al interior de dicha estructura. Igualmente, esta especie se distingue por la presencia de timina y citosina en los sitios 16 y 18, respectivamente, de la lupa DHU.

L. panamensis tiene el brazo DHU más largo, con 4 pb y la lupa DHU más corta, con sólo 4 bases (Figura 7C), mientras los otros taxones exhiben tres apareamientos en dicho brazo y 5 o 6 bases en la misma lupa. Esta especie se caracteriza, adicionalmente, por mostrar una adenina en la posición 18 de la lupa DHU (Figura 7C), además de compartir la adenina de las posiciones 14 y 16 con *L. rangeliana* y de la posición 14 con *L. cayennensis cayennensis*. En *L. evansi* es exclusiva la ocurrencia de la base citosina en los sitios 49 y 51 de la lupa TψC (Figura 7G). De otro lado, la presencia de dos citosinas de forma consecutiva en las posiciones 56 y 57 de la lupa TψC es una característica distintiva de *L. dubitans* (Figura 7E), que comparte a su vez esta última base con *L. gomezi*.

Como era de esperarse, se encontraron caracteres nucleotídicos conservados a lo largo de la corta secuencia del ARNt codificante para serina evidentes en la estructura secundaria, como en el caso de la lupa del brazo anticodón con su triplete TGA (UGA) y los siete apareamientos del brazo aceptor en cada una de las especies de *Lutzorhiza* examinadas.





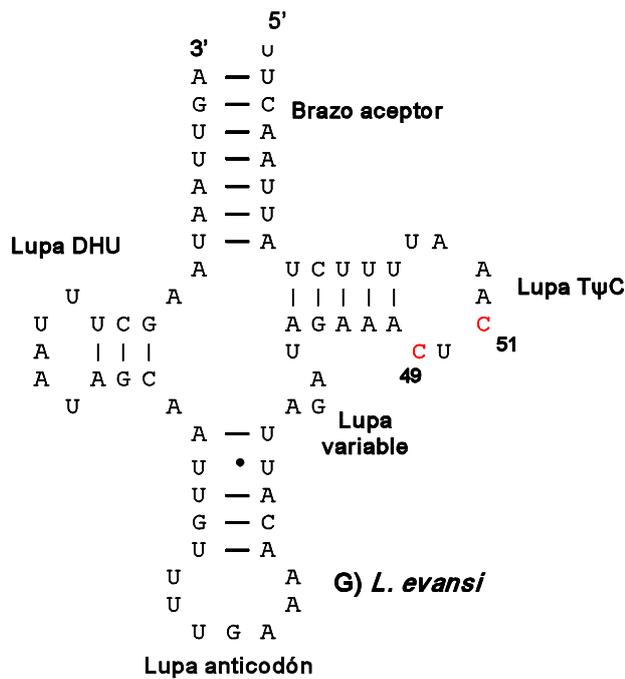


Figura 7. Predicción de la estructura secundaria del gen tRNA^{Ser} (UCN) de siete especies del género *Lutzomyia*: A) *L. trinidadensis*, B) *L. rangelifana*, C) *L. panamensis*, D) *L. cayennensis cayennensis*, E) *L. dubitans*, F) *L. gomezi*, G) *L. evansi*. Las letras en color rojo denotan las bases distintivas de cada especie y el número relaciona la posición en el alineamiento múltiple de las secuencias. Las bases apareadas están representadas por barras y las bases no apareadas están ilustradas con puntos.

El alineamiento parcial de la secuencia del gen NAD 1 contiene 72 pb de extensión y arrojó 44 sitios variables nucleótidos corresponden a 7 haplotipos distintos entre las 11 especies de *Lutzomyia* examinadas. Cabe resaltar, la presencia del codón de parada TAA en casi todas las especies analizadas, con la excepción de *L. dubitans* cuyo codón de parada TAG se convierte en un rasgo distinguible las especies estudiadas.

La secuencia parcial del gen NAD 1 fue reversada y complementada, posteriormente, traducida para determinar las implicaciones de las sustituciones nucleotídicas, codificando así para 24 aminoácidos, de los cuales resultaron 19 sitios variables aminoacídicos.

Los cambios en esta pequeña porción proteica, se originaron principalmente por la divergencia del aislado de *L. trinidadensis*, con respecto al resto de los haplotipos, los cuales mostraron una secuencia aminoacídica altamente conservada (Figura 8).

POSICIONES AMINOACÍDICAS

		1	1111111112	2222
Aislado	1234567890	1234567890	1234	
Ltrcsin1	WEDIASNSLW	YICRVSWEEI	FSL*	
Lpacsin1	.KSYLPG..C	F.LFFIGLKF	.LF.	
Lpacsin2	.KSYLPG..C	F.LFFIGLKF	.LF.	
Lcacsin1	.KSYLPS..C	F.MFFIGLKF	.LF.	
Lcacsin2	.KSYLPS..C	F.MFFIGLKF	.LF.	
Lducsin1	.KSYLPL..F	FL.FFMGLK.	.LF.	
Lgocsin1	.KSYLPA..C	F..FFLGLK.	.LF.	
Lgocsin2	.KSYLPA..C	F..FFLGLK.	.LF.	
Lracsin1	.KSFLPA..C	F..FFMGLK.	.LF.	
Lracsin2	.KSFLPA..C	F..FFMGLK.	.LF.	
Levcsin4	.KSYLPA..C	FM.FFIGLK.	.LF.	

Figura 8: Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de la proteína NADH 1, aisladas a partir de: *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. vargeiana* y *L. evansi*. Los puntos indican homología. Los guiones indican eventos indel (inserción- delección).

Aunque la secuencia parcial del gen codificante para NAD 1 es de menor tamaño que Citocromo *b*, expresó divergencia al interior del género *Lutzomyia* con distancias genéticas *p* que oscilaron de 0.069 a 0.486.

6. DISCUSIÓN

La definición del estatus taxonómico, en razón a la heterogeneidad morfológica que ofrecen algunos subgéneros ubicados al interior del género *Lutzomyia*, y la determinación especie-específica, son relevantes para predecir que especies están en capacidad de actuar como potenciales vectores, considerando que algunos grupos particulares de flebotómíneos parecen haber coevolucionado con el parásito (44,45), lo cual se manifiesta en algunos subgéneros de especies como *Psychodopygus*, *Lutzomyia* y el grupo *verrucarum*.

El estudio de secuencias de genes mitocondriales de estos dípteros es una herramienta eficiente por las particularidades que ofrecen, como su abundancia que permite detectar diversidad antes no percibida, discreción que se refleja en estados de carácter no ambiguos, ausencia de efectos ambientales y una dinámica mutacional distintiva. Estos patrones convierten a cada posición de la secuencia nucleotídica en un carácter a comparar, por lo tanto, se dispone de mayor contenido de información que la morfología, siendo útil para elucidar las relaciones filogenéticas y los procesos evolutivos (46,47). En este estudio mostraron su utilidad los haplotipos, el tamaño y el polimorfismo nucleotídico del extremo 3' del gen citocromo *b* hasta la subunidad 1 del gen NAD deshidrogenasa, la presencia y el tamaño de los dos espaciadores intergénicos y los cambios en la estructura secundaria del gen ARNt mitocondrial codificante para Serina.

El rango de las distancias genéticas pareadas evaluadas en el gen Citocromo *b*, fluctuó de 0.161 a 0.240 al interior del género *Lutzomyia*, soportados por un 40,97% de variación nucleotídica, expresada en el 26.85% de la composición aminoacídica, permitiendo la diferenciación interespecífica, lo que ratifica la utilidad del gen Citocromo *b* como marcador molecular (28,30,43,48).

El considerable polimorfismo obtenido se debe a la alta tasa de sustitución que posee este gen codificante de proteína (49), lo que postula su utilidad *a priori* para distinguir especies morfológicamente similares, a través, de posiciones aminoacídicas como la 39, 42 y 60, que pueden ser consideradas sitios diagnósticos especie-específicos.

Los niveles de variación genética observados entre las especies y los diversos subgéneros evaluados es consistente con el árbol filogenético de Máxima Verosimilitud, del cual se aprecia un agrupamiento monofilético con un *quartet puzzler.g* de un 88%, por lo tanto la categorización subgénerica establecida por Young y Duncan (1994) (13), es la mas apropiada al contrastar la clasificación morfológica tradicional de *Lutzomyia* con la filogenia derivada de los datos moleculares de los flebotomíneos presentes en la ciudad de Sincelejo, similar a la topología previamente examinada por Torgerson *et al*, 2003 (41); mediante el análisis de alo enzimas y una porción del gen Citocromo *b* de especies de Venezuela.

A nivel filogenético, el agrupamiento de los clados formados basado en las secuencias de ADN mitocondrial del gen Citocromo *b*, sugiere una estrecha relación entre los individuos representantes del género *Lutzomyia*, característica que no sucede, cuando se compara frente al género *Brumptomyia* presente en América, cuyos valores sobrepasan las distancias genéticas pareadas (0.201 – 0.244), las cuales aumentaron considerablemente al ser comparadas con el género *Phlebotomus*, justificable por su distante relación genética y ubicación geográfica en el Viejo Mundo, tal como se refleja en el árbol filogenético con la longitud de rama aislada del resto de flebotomíneos estudiados.

La verificación otorgada a nivel intraespecífico dada a estos taxones previamente por morfología, esta sustentada por los valores significativamente altos de *quartet puzzler.g* que fluctuaron de 90% al 100%, entre los aislados de *Lutzomyia* obtenidos en Venezuela (41) y los haplotipos de Colombia (Sincelejo).

Ambas evidencias genéticas a nivel interespecifico e intraespecifico resuelven parte de los interrogantes que giran en torno a la flexibilidad y subjetividad que ofrecen los patrones morfológicos, la cual permite que algunos taxónomos como Galati *et al.* (2003) (12), eleven el número de géneros, como sucede al evaluar el rango supraespecifico de *Psychodocygus* (15), dentro del cual se encuentra *L. panamensis* (Shannon, 1926), que difiere de otras especies por su complejidad morfológica (12,16,41), sugiriendo que debe conformar un género distinto a *Lutzomyia*. Sin embargo, la evidencia genética aportada por las distancias pareadas (0.186 y 0.229) y su ubicación en el grupo monofilético, disgrega este postulado por no representar un nivel significativo de diferenciación, apoyando el estatus taxonómico subgenérico de Young y Duncan, (1994) (13) y Carvalho (2003) (16).

Una problemática semejante enfrentan *L. cayennensis cayennensis* y *L. dubitans* ubicadas los géneros *Micropygomyia* y *Evandromyia*, respectivamente, por su ubicación taxonómica según Galati *et al.* (2003) (12), que al ser contrastada con los patrones genéticos exhibidos de los genes mitocondriales examinados en este estudio, sugieren la permanencia de estas especies al interior del género *Lutzomyia*, por los bajos valores de fluctuación de las distancias genéticas pareadas, su posterior ubicación en el grupo monofilético y los escasos niveles de variación nucleotídica apreciados en el gen ARNt mitocondrial codificante para serina.

Para el tratamiento taxonómico de *L. rangeliana*, especie no agrupada a nivel subgenérico por la mayoría de los sistemáticos, las distancias genéticas pareadas reflejan su permanencia en el género *Lutzomyia*, aunque los cálculos detectados de 0.176 sobrepasan los valores genéticos al interior del grupo *verrucarum* (0.107 – 0.111) al comparar *L. evansi* frente a *L. civallesi*. Se deduce que es una especie reciente evolutivamente, debido a que las espermatecas presentan una forma de saco abultada con estriaciones, pero con carencia de ductos individuales, la

genitalia masculina no presenta tufo basal de setas sobre la coxita, el parámero es abultado y carece de una pequeña seta subterminal.

Los datos moleculares encontrados permiten postular a *L. trinidadensis* como la especie más divergente molecularmente e inferir acerca de la historia evolutiva de este insecto. Inicialmente, se examinaron distancias genéticas pareadas con valores de 0.240 al compararse con *L. dubitans*, los cuales exceden el rango comprendido de 0.161 a 0.229, establecido al relacionar el resto de las especies de *Luźomyia*. Por otra parte, el análisis filogenético sugiere la existencia de grandes diferencias a nivel intraespecifico entre las poblaciones de *L. trinidadensis* de Colombia y Venezuela, sustentado por 18 sitios variables nucleotídicos y 3 sitios variables aminoacídicos, el cual se evidencia por el valor de *quartet puzzling* del 76% y los valores de distancia genéticas pareadas de 0.065, los cuales superan ampliamente los valores encontrados a nivel intraespecifico en el resto de taxones estudiados, lo cual pueden sugerir que la población de *L. trinidadensis* de Colombia se ha diferenciado fuertemente al nivel genético del resto de poblaciones suramericanas.

Desde el punto de vista topológico se denotan valores de *quartet puzzling* de un 71% considerado como moderado y la rama interna de su clado de mayor longitud, destacando su relativa cercanía al aislado de *L. evansi*, con el que tuvo la menor distancia genética. En adición, al considerar al genoma mitocondrial como una molécula que tiende a evolucionar perdiendo aquellos componentes no indispensables para la función que desempeña, se hace claro que la ausencia de estas estructuras en las otras especies se puede deber a su origen más reciente (25,50). Esto sucede al interior del género *Luźomyia*, cuando se examina la utilidad del espaciador intergénico 1 (IGs1) en las especies *L. evansi* y *L. trinidadensis*, las cuales aparecen claramente como los taxa más antiquísimos, reflejado en la presencia de un espaciador intergénico integrado por 10 pb y 9 pb, respectivamente, a diferencia de *L. gomezi*, *L. rargeiana* y *L. cayennensis* que perdieron dicha estructura (50).

Acorde con los procesos de especiación la variación en el tamaño del genoma mitocondrial examinada al interior del género *Lutzomyia*, es generalmente una consecuencia de la presencia y de la extensión de las regiones no codificantes y no del número de genes estructurales, lo cual sugiere que estas características genéticas pueden ser buenos indicadores para estudios de relaciones en insectos (51).

En el genoma mitocondrial de los metazoos se encuentran presentes dos genes que codifican para el tRNA^{Ser} (AGN) y tRNA^{Ser} (UCN), el último de los cuales se caracterizó en este estudio. El gen ARNt mitocondrial codificante para Serina, gen ortólogo, mostró una conservación del 82.86% en las siete especies de *Lutzomyia* estudiadas. La limitada variabilidad de este gen pueda ser consecuencia de restricciones operacionales y de elementos reguladores que actúan en RNA-cis que conservan la estructura secundaria (37). Sumado a esto, las regiones evolutivamente conservadas de los motivos de la estructura secundaria pueden sugerir la importancia de estas regiones para el correcto funcionamiento del RNA (25). Sin embargo, la diferencia en el tamaño, como sucede en *L. trinidadensis* con el gen ARNt-Serina mas largo (69nt), origina eventos indel, útiles para sustentar genéticamente la pérdida o ganancia de algunas bases o cambios nucleotídicos determinados en el alineamiento múltiple (52), que según Lynch, M. (1996 – 1997) es debido a las mutaciones acumulativas deletorias que este sufre, basado en comparaciones de fuerzas de enlace y la tasa de sustitución versus ARNts nucleares (53,54).

Como era de esperarse, la mayoría de los caracteres nucleotídicos variables se expresaron a lo largo de las lupas DHU, T ψ C y variable, con la excepción de los cambios observados en las primeras bases del brazo del anticodón de *L. ravigeliana* que originaron un apareamiento adicional (47). Esto permite deducir que tales regiones gozan de mayor libertad para mutar, particularmente las lupas DHU y T ψ C que sufrieron la mayor parte de las sustituciones y que en general se

comparten dos clases de motivo en el brazo aceptor CTT y CTA, consistente con nuestros hallazgos al revisar las secuencias nucleotídicas de otros dípteros.

Adicionalmente, llama la atención que las divergencias en longitud entre las especies tengan origen en estas lupas y no en la lupa variable, cuyo tamaño fue constante en todos los taxones, aunque en la mayoría de los animales es la directa responsable de las diferencias de tamaño entre los tRNA mitocondriales.

Las sustituciones nucleotídicas observadas en la secuencia del gen tRNA^{Ser} y los rearrreglos estructurales ocasionados por estas, son útiles para la correcta distinción de cada uno de los flebotomíneos estudiados, sumado a las diferencias en el tamaño del gen por la pérdida o ganancia de bases.

Dentro de la escala zoológica se ha observado un acortamiento gradual de algunos tRNA mitocondriales como la desaparición del brazo DHU en el tRNA^{Ser} (AGY) (54). Desde el punto de vista del tamaño, *L. trinidadensis* debería considerarse entonces como la especie más ancestral dentro del grupo de flebotomíneos estudiados por presentar el gen tRNA^{Ser} más largo.

Los patrones de cambio genético examinados en este estudio parecen inclinarse a favor de la teoría de la evolución reduccional, en relación al número de bases nucleotídicas y por consiguiente de los elementos que integran el genoma mitocondrial conllevando a la disminución de su tamaño, que podría estar aconteciendo en los flebotomíneos, el cual empieza a evidenciarse por la extensión y ausencia del espaciador Intergénico 1, que al sufrir procesos de especiación al interior del género *Luízomyia* ha venido desapareciendo, provocando consecuentemente, la intensificación de la señal de terminación durante la síntesis de algunas proteínas, originando un segundo codón de parada, descrito al igual en otras especies de insectos, con efecto puntuacional (55). Posteriormente, la pérdida total de IGs1 empieza a presenciarse, tal como ocurre en *L. gomezi*, *L. cayennensis cayennensis* y *L. rargeiana*, originando el solapamiento de una o dos bases en la porción final del gen Citocromo *b* con el

codón 5'-P del gen ARNt-Serina, algo que parece ser característico del rol recursivo de la molécula mitocondrial (46).

También se ha sugerido que los tRNAs adyacentes a genes codificadores de proteínas pueden desempeñar un papel de puntuación en el procesamiento de éstas (56).

Esta base de reconstrucción evolutiva podría sustentarse por los patrones morfológicos examinados, donde la presencia de una espermateca lisa sin anulaciones terminales y la disposición de 5 espinas en la genitalia masculina, se adapta a la propuesta taxonómica de acuerdo a Theodor, 1965 (57), que corresponde a la forma primitiva de la que eventualmente se derivan el resto de especies, lo que en este caso, explicaría la ubicación de *L. trinidadensis*, cerca al nodo basal en la topología examinada y su relación con *L. evansi*.

En adición, las variaciones nucleotídicas detectadas en la estructura secundaria del gen ARNt-Serina de *L. rangeli*, en relación al resto de las especies, se convierte en un aporte descriptivo al momento de realizar su determinación taxonómica, apreciada por la divergencia en posiciones conservadas ubicadas puntualmente en el brazo anticodón y el brazo D en los sitios 23 (T), 38 (A), 39 (A) y en la posición 41(T) presente en la secuencia ATATA. Estos patrones no son similares cuando se compara frente a la estructura secundaria del gen ARNt-Serina de *L. evansi*, que predeciblemente con relación al carácter conservado del gen ARNt-Serina no debería presentar tanta variación.

Aunque el método comparativo para la predicción de estructuras secundarias de los ARNts fue inicialmente demostrado por Holley *et al* en 1965, en el cual infiere variaciones nucleotídicas con sus implicaciones estructurales (56), no se disponía a la fecha, de conocimiento sobre las secuencias de los ARNs de transferencia en flebotomíneos, ni de un campo activo en la predicción de sus estructuras secundarias, a pesar que en Genbank se encuentran depositadas las secuencias

nucleotídicas del gen ARNt mitocondrial para Serina de flebotomíneos del Nuevo y Viejo Mundo, lo que convierte al análisis basado en los aislados de las siete especies del género *Lutzomyia*, en el primer reporte (ver Anexo 2 “Análisis de la estructura secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para Serina en siete especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) ”), que muestra su utilidad para la distinción taxonómica específica.

Teniendo en cuenta que los resultados de esta investigación comprueban la utilidad de la estructura secundaria del tRNA^{Ser}, se sugiere ampliar el análisis incluyendo otros taxones de origen Neotropical. Más aún, por su tasa de conservación evolutiva éste podría ser un marcador molecular apropiado para evaluar las relaciones filogenéticas entre los subgéneros y grupos de especies de flebotomíneos americanos.

Al explorar el fragmento parcial de 72 pb del gen codificante para NAD 1, se detectó una divergencia nucleotídica de 44 sitios polimórficos, señalando cambios entre las diferentes especies a pesar del corto segmento secuenciado, lo que la postula como una región genómica de alta sustitución. Sin embargo, debido a la escasa información derivada de la longitud de la secuencia no se hicieron mayores inferencias.

La potencial utilidad del gen citocromo *b* como marcador molecular es ratificada por la variabilidad genética expresada entre los distintos subgéneros. Además, se manifiesta la predicción de la estructura secundaria del gen ARNt para Serina, como carácter promisorio para la diferenciación de especies isomórficas y para constatar la asignación taxonómica realizada morfológicamente al interior del género *Lutzomyia*.

7. CONCLUSIONES

- La comparación de los valores de distancias genéticas pareadas y el agrupamiento monofilético consistente en la topología inferida al ser contrastados con la clasificación morfológica tradicional del género *Lutzomyia*, apoyan el tratamiento taxonómico sugerido por Young y Duncan (1994), de un menor número de subgéneros para los flebotomíneos americanos.
- Se confirma la importancia del gen Citocromo *b* como marcador molecular por la alta divergencia nucleotídica, la cual permite realizar diagnósticos a nivel interespecíficos e intraespecíficos al interior del género *Lutzomyia*.
- La caracterización de las variaciones nucleotídicas detectadas en el gen ARNt mitocondrial codificante para Serina, revela la utilidad de la predicción y comparación de la estructura secundaria entre distintos taxones, para la determinación específica de especies del género *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), convirtiéndose en un método de estudio ventajoso para establecer implicaciones estructurales que permitan esclarecer patrones funcionales en grupos de secuencias alineadas en flebotomíneos.
- Los patrones genéticos examinados entre las especies del género *Lutzomyia*, apoyan la teoría de la evolución reduccional que eventualmente puede estar aconteciendo en estos dípteros.

- Las altas distancias genéticas, la rama interna de su clado de mayor longitud, la presencia de espaciador Intergénico 1 y el gen ARNt-Serina de fragmento nucleotídico más largo, postulan a *Lutzomyia trinidadensis* del grupo *oswaiaoi*, como la especie más divergente a nivel molecular del resto de subgéneros americanos, sugiriendo que podría corresponder a una especie ancestral
- Aunque *Psychodopygus* se ha propuesto reiteradamente como un género distinto a *Lutzomyia*, las distancias pareadas y el árbol filogenético no soportan un estatus genérico, contradiciendo la propuesta taxonómica de Galati *et al.*; (2003)

8. RECOMENDACIONES

- La presencia de una o más especies antropofílicas del género *Lutzomyia* consideradas vectoras, como *Lu. evansi*, *Lu. gomezi* y *Lu. panamensis*, en algunos de los sitios muestreados, es un factor que se debe tener en cuenta para futuros estudios epidemiológicos.
- Considerando la utilidad de la predicción y caracterización de la estructura secundaria del gen ARNt para Serina, se recomienda como carácter para la diferenciación de especies isomórficas.

9. REFERENCIAS

1. MONTOYA-LERMA J, FERRO C. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. En: Amat G, Andrade MG, Fernández F, editores. Insectos de Colombia. Volúmen II. Colección Jorge Álvarez Lleras. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Santafé de Bogotá: Centro Editorial Javeriano; 1999;13: p.211-45.
2. DAVIES CR, REITHINGER R, CAMPBELL-LENDRUM D, FELICIANGELI D, BORGES R, RODRIGUEZ N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad Saúde Pública. 2000; 16: p. 925-50.
3. FERRO C, ALEXANDER B. Morfología de los Flebótomos. Manual de entomología médica para investigadores en América Latina. 1994. p. 15-22.
4. FERRO C, MONTOYA-LERMA J. Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. Laboratorio de Entomología. Instituto Nacional de Salud. Bogotá.1998. p.219-33.
5. YOUNG D, MORALES A, KREUTZER RD, ALEXANDER JB, CORREDOR A, TESH RB. Isolations of *Leishmania brazieliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopresered Colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). Journal medical Entomology 1987; 24: p. 587-589.
6. WOLFF M, VÉLEZ ID. Leishmaniosis bioecología y distribución de *Lutzomyia sp.* En Colombia. Memorias XXI congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. SOCOLEN: Medellín. Julio 27-29 de 1994.
7. BEJARANO EE, URIBE S, ROJAS W, VÉLEZ ID. Phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: p. 645-647.

8. VÉLEZ ID. La leishmaniosis en Colombia: de la selva a la ciudad. Memorias, XXVIII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, Pereira, Colombia 2001. p.51-57.
9. BEJARANO EE. Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de Leishmaniasis: Utilidad de los genes mitocondriales. Biomédica 2001; 21: p.182-191.
10. Manual de procedimientos de identificación de vectores de Leishmaniosis y enfermedad de Carrión. Serie de Normas Técnicas N° 36. Instituto Nacional de Salud. Lima 2002.
11. DESJEUX P. Urbanización de la leishmaniasis. Vigilancia y respuesta a enfermedades contagiosas, nuevos riesgos para la salud pública, Organización Mundial de la Salud. Ginebra Suiza. 2001.
12. GALATI EAB. Morfología, terminología de adultos e identificação dos táxons da América. En: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio do Janeiro, Brasil: Editora Fiocruz; 2003. p.53-175
13. YOUNG D, DUNCAN M. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Entomol Inst 1994; 54: p.1-881.
14. (WHO) World Health Organization. Scientific working group on leishmaniasis: report of the first meeting. Unpublished document TDR/LEIH-SWG. 1977; (1)/77.3.
15. READY P, FRAIHA R, SHAW J. *Psychodopygus* as a genus: Reasons for a flexible classification of the phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1980; 17, no. 1: p.75-88.
16. CARVALHO G, FALCAO A, ANDRADE J. Taxonomic revision of phlebotomine sand fly species in the series *davisi* and *panamensis* of the subgenus *Psychodopygus* Mangaberia, 1941 (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, March 2006; 101(2): p.129 – 136.

17. YOUNG DA. review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Gainesville, Florida: Technical Bulletin 806, Agricultural Experiment Stations, Institute of Food and Agricultural Sciences 1979. p.1-265.
18. BEJARANO EE, URIBE S, ROJAS W, VÉLEZ ID. Sistemática de especies de *Lutzomyia* del grupo *verrucarum* Theodor, 1965 (Diptera: Psychodidae). Biomédica 2003; 23: p.87-102.
19. LODISH H, BALTIMORE D, BERK A, LAWRENCE S, MATSUDAIRA P, DARNELL J. Molecular Cell Biology. 3rd ed. New York: Scientific American Books, Inc; 1995. p. 1-1344.
20. GODDARD J, WOLSTENHOLME D. Origen and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sti USA 1978; 76: p. 3886-3890.
21. BEARD C, HAMM DM, COLLINS FH. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. Insect Mol Biol. 1993; 2: p.103-24.
22. CROZIER R, CROZIER Y. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. Genetics 1993; 133: p. 97-117.
23. CHANDRA BC, JENNIFER L, KAPATRAL V. Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genome synteny Sathees. Afr J Biotechnol 2006; 5: p.1308-18.
24. BRUCE S. The evolutions of mitochondrial genome structure and funtions in insects, Simon Fraser University. 2005.
25. MASTA S. Mitochondrial Sequence Evolution in Spiders: Intraspecific Variation in tRNAs Lacking the TCC Arm, Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Arizona. Mol. Biol. Evol. 2000; 17(7): p.1091–1100.

26. KLINGLER TM, BRUTLAG DL. Detection of Correlations in tRNA Sequences with Structural Implications. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. 1993;1: p.225-33.
27. MONTOYA-LERMA J, READY P, TESTA J, OVIEDO M, LANE R. Molecular systematics of *Lutzomyia evansi* and the *verrucarum* group. Abstracts, 3rd International Symposium of Phlebotomine Sandflies, Montpellier, France 1999. p. 47.
28. CÁCERES A, REGNERY R, BEATI L. Molecular tools for taxonomic and phylogenetic study of *Lutzomyia spp.* Abstracts, 3rd International Symposium of Phlebotomine sandflies, Montpellier, France; 1999. p. 48.
29. ISHIKAWA E, READY P, DE SOUZA A, DAY J, RANGEL E, DAVIS C. 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. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94: p. 339-345.
30. ROJAS W, BEJARANO EE, URIBE S, VÉLEZ ID, PORTER C. Phylogenetic relationships among *Lutzomyia spp.* Of *verrucarum* group based on molecular characters. Entomol Vect 2002; 9(Supl.1): p. 14-15.
31. MAROLI M, FELICIANGELI D, ARIAS J. Métodos de captura, conservación y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodidae). Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la salud. 1997. p. 38-40.
32. COLLINS F, MENDEZ M, RASMUSSEN M. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. Am. J Trop Med Hyg. 1987; 37: p. 37-41.
33. YABAR A. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Instituto Nacional de Salud Pública. Serie de Normas Técnicas N° 38, Lima, Peru. 2003.
34. SANGER F, NICKLEN S, COULSON A. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 74: p.5463-67.

35. SMITH L, SANDERS JZ, KAISER R. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; 321: p. 674–9.
36. KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5. 2004: p. 150-163.
37. KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Mol. Evol.* 1980; 16: p.111-120.
38. HEIKO A, KORBINIAN S, VINGRON M, VON HAESELER A. PUZZLE 5.0 2000. <http://www.dkfz-heidelberg.de/tbi/>.
39. HASEGAWA M, KISHINO H, YANO K. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 1985; 22: p. 160-174.
40. FELSENSTEIN J. Inerring Phylogenetics. Quartets of species. University of Washington. 2004;12: p. 188.
41. TORGERSON D, LAMPO M, VELAZQUEZ Y, WOO P. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 69(5): p. 484-493.
42. SIMON C, FRATI F, BECKENBACH A, CRESPI B, LIU H, FLOOK P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 1994;87:651-701.
43. ESSEGHIR S, READY P, KILLICK-KENDRICK R, BENISMALL R. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Mol Biol* 1997; 6: p. 211-225.
44. KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med Vet Entomol.* 1990; 4: p. 1-24.
45. BEJARANO EE. Genetic flor between rural and urban populations of *Lutzomyia (verrucarum) evansi* (Nuñez-Tovar, 1924) in Colombia based

- on analysis of mitochondrial nucleotide sequences. *Entomol Vect.* 2002; 9(Supl. 1): p. 18-9.
46. DEPAQUIT J, FERTE H, LEGER N. The subgenus *Paraphlebotomus* (*Phlebotomus* - Phlebotominae - Psychodidae - Diptera): a review. Morphological and molecular studies. *Ann Pharm Fr.* 2000; 58: p. 333-40.
47. DI MUCCIO T, MARINUCCI M, FRUSTERI L, MAROLI M, PESSON B, GRAMICCIA M. Phylogenetic analysis of *Phlebotomus* species belonging to the subgenus *Larroussius* (Diptera, Psychodidae) by ITS2 rDNA sequences. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000; 30: p. 387-93.
48. BEJARANO EE, ROJAS W, URIBE S, PORTER C, VÉLEZ ID. Phylogenetics and evolution of *Lutzomyia* spp. (*verrucarum* group) in the Andean regions of Colombia. Abstracts Vol. 2, XV International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Cartagena. 2000. p.130.
49. URIBE S, PORTER C, VÉLEZ ID. Amplificación y obtención de secuencias de rRNA mitocondrial en *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) vectores de leishmaniosis. *Socolen.* 1998; 24: p. 109-15.
50. BEJARANO, EE, ROJAS W, URIBE S, VÉLES ID, VALLE S, PORTER C. Phylogenetic relationships among natural populations of *Lutzomyia* (*verrucarum*) *evansi* (Nuñez-Tovar, 1924). *Entomol Vect* 2002; 9 (Supl. 1): p.12-3.
51. THAO M, BAUMANN, BAUMANN P. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *BMC Evolutionary Biology.* Published: 4:25 Microbiology Section, University of California, One Shields Ave., Davis, California, USA, 03 August 2004.
52. SIVARAM P, MAYASUNDARI R. Qualitative and quantitative variation of tRNA in certain invertebrates. Department of Genetics, Post-Graduate Institute of Basic Medical Sciences, Taramani, India, Present Address:

Department of Biochemistry, UConn Health Center,
Farmington, Connecticut 06032, USA MS 1987; revised 10 April 1989.

53. LYNCH M. Mutation accumulation in transfer RNAs: molecular evidence for Muller's ratchet in mitochondrial genomes. *Mol. Biol. Evol.* 1996;13: p. 209–220.
54. LYNCH M. Mutation accumulation in nuclear, organelle, and prokaryotic transfer RNA genes. *Mol. Biol. Evol.* 1997;14: p. 914–925.
55. OJALA D, MONTOYA J, ATTARDI G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature.* 1981;290: p. 470–474.
56. HOLLEY W, APGAR J, EVERETT A, MADISON T, MARQUISEE M, MERRILL H, PENSWICK R, ZAMIT A. *Science.* 1965; 147: p. 1462-1465.
57. THEODOR O. On the classification of American Phlebotominae. *J Med Entomol* 1965; 2: p. 171-97.

ANEXOS

ANEXO 1. Registro en Gene Bank de las secuencias nucleotídicas mitocondriales del extremo 3' de citocromo *b*, espaciador intergénico 1 (IG1), el gen ARNt Serina, espaciador intergénico 1 (IG2) y el extremo 3' de del gen NAD 1, a partir de hembras adultas de *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangeliana* y *L. evansi*.

```

LOCUS           EF012215             493 bp    DNA     linear     18-SEP-2006
DEFINITION     Lutzomyia trinidadensis isolate Ltrcsin1 cytochrome b gene, partial
                cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase
                subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
ACCESSION     EF012215
VERSION       EF012215
KEYWORDS      .
SOURCE        mitochondrion Lutzomyia trinidadensis (sand fly)
ORGANISM      Lutzomyia trinidadensis
                Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
                Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea;
                Psychodidae; Lutzomyia.
REFERENCE     1 (bases 1 to 493)
AUTHORS       Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
TITLE         Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the
                taxonomic determination of the genus Lutzomyia
JOURNAL       Unpublished
REFERENCE     2 (bases 1 to 493)
AUTHORS       Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
TITLE         Direct Submission
JOURNAL       Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas,
                Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre,
                Colombia

FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..493
                     /organism="Lutzomyia trinidadensis"
                     /organelle="mitochondrion"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /isolate="Ltrcsin1"
                     /sex="female"
                     /dev_stage="adult"
                     /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
                     /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
                     /authority="Lutzomyia trinidadensis (Newstead, 1922)"
     CDS              1..327
                     /codon_start=1
                     /transl_table=5
                     /product="cytochrome b"
                     /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIAILFFLPILHNSKFQG
                     LQFYPLNQLFWYMLMIVILLTWIGARPVEDPYILTGQILTQVYFLYYILNPVITYLW
                     DKILDA"
     tRNA             337..405
                     /product="tRNA-Ser"
     CDS              complement(422..>493)
                     /codon_start=1
                     /transl_table=5
                     /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
                     /translation="WEDIASNSLWYICRVSWEEIFSL"
BASE COUNT       169 a      73 c      53 g      198 t
ORIGIN
1 gaatgatact tcttatttgc ctatgctatt ttacgggtcaa ttctaataa actaggtgga
61 gtaattgctc ttgttatatc aattgctatt ttattccttc ttccaattct tcataataga
121 aaattccaag gtcttcaatt ttatccttta aatcagattt tatttttgga tatattaata
181 attgtaatct tattaacttg aattggagca cgacctgtag aagaccctta tattttaaca
241 ggacagattt taacagttgt ttacttttta tactataatc tcaatccagt aattacctat
301 ttatgagata aaattcctga cgcataaaact aatataagtt aataagcttt aatagcaatt
361 gtttgaaaa cattagatag aaatttaaaa attttctatt aactttacta atttttatta
421 tttaaagtga aaaaatttcc tctcatctca cagcacaat atatcataaa gaattcgagg
481 caatattcctc tca//

```

LOCUS EF012216 488 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION *Lutzomyia panamensis* isolate Lpacsin1 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012216
 VERSION EF012216
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Lutzomyia panamensis* (sand fly)
 ORGANISM *Lutzomyia panamensis*
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; *Lutzomyia*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 488)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus *Lutzomyia*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 488)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..488
 /organism="*Lutzomyia panamensis*"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lpacsin1"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="*Lutzomyia panamensis* (Shannon, 1926)"
 CDS
 <1..327
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALFFLPILHTSKNQGLQFYPLNQILFWYMFILVILLTWIGARPVEAPYIITGQLLTIIYFMYIILNPMVSKIWDNYLSN"
 tRNA
 334..401
 /product="tRNA-Ser"
 CDS
 complement(417..>488)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSYLPGSLCFILFFIGLKFFLF"
 BASE COUNT 191 a 61 c 42 g 194 t
 ORIGIN
 1 gaatgatatt ttttattcgc ttatgctatt ctccgatcaa tcccaaataa acttggagga
 61 gtaattgctc ttgttatatc tattgcaatc ctatTTTTTC ttccaattct tcatacaaga
 121 aaaaatcaag gattacaatt ttatccatta aatcaaatct tattttgata tatattttatt
 181 attgtaattt tattaacatg aattggagcc cgaccagttg aagcacctta tatcattact
 241 ggccaattat tgacaattat ttattttata tattatattt taaaccctat agtttcaaaa
 301 atttgagata attattttatc aaattaataa ttaagttaat aagcttaaaa aagcaattgt
 361 tttgaaaaca ttagatagaa attttaaattt tctattaact ttactatatt ttattattaa
 421 aataaaaaaa attttaatcc aataaaaaat aaaataaaac ataaagaacc aggtaaatat
 431 ctttttca//

LOCUS EF012217 488 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION *Lutzomyia panamensis* isolate Lpacsin2 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012217
 VERSION EF012217
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Lutzomyia panamensis* (sand fly)
 ORGANISM *Lutzomyia panamensis*
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; *Lutzomyia*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 488)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus *Lutzomyia*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 488)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..488
 /organism="*Lutzomyia panamensis*"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lpacsin2"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="*Lutzomyia panamensis* (Shannon, 1926)"
 CDS
 <1..327
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALFFLPILHTSKNQGLQFYPLNQILFWYMFILVILLTWIGARPVEAPYIITGQLLTIIYFMYIILNPMVSKIWDNYLSN"
 tRNA
 334..401
 /product="tRNA-Ser"
 CDS
 complement(417..>488)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSYLPGSLCFILFFIGLKFFLF"
 BASE COUNT 191 a 60 c 42 g 195 t
 ORIGIN
 1 gaatgatatt ttttattcgc ttatgctatt cttcgatcaa tcccaaataa acttggagga
 61 gtaattgctc ttgttatatc tattgcaatc ctatTTTTTC ttccaattct tcatacaaga
 121 aaaaatcaag gattacaatt ttatccatta aatcaaatct tattttgata tatattttatt
 181 attgtaattt tattaacatg aattggagcc cgaccagttg aagcacctta tatcattact
 241 ggccaattat tgacaattat ttattttata tattatattt taaaccctat agtttcaaaa
 301 atttgagata attattttatc aaattaataa ttaagttaat aagcttaaaa aagcaattgt
 361 ttgaaaaaca ttagatagaa attttaaattt tctattaact ttactatatt ttattattaa
 421 aataaaaaaa attttaatcc aataaaaaat aaaataaaac ataaagaacc aggtaaatat
 431 ctttttca//

LOCUS EF012218 481 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION *Lutzomyia cayennensis* cayennensis isolate Lcacsin1 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012218
 VERSION EF012218
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Lutzomyia cayennensis* cayennensis (sand fly)
 ORGANISM *Lutzomyia cayennensis* cayennensis
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; *Lutzomyia*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 481)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus *Lutzomyia*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 481)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..481
 /organism="*Lutzomyia cayennensis* cayennensis"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lcacsin1"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="*Lutzomyia cayennensis* cayennensis (Floch and Abonnenc, 1941)"
 CDS
 <1..327
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="RWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALFFLPFLHQSKMQGLQFYPLNQILFWYMFVIVILLTWIGARPVEDPYILTGQILTIIYFMYIINPLISLYWDKILNN"
 tRNA
 327..393
 /product="tRNA-Ser"
 CDS
 complement(410..>481)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSYPSSLCFIMFFIGLKFFLF"
 BASE COUNT 181 a 59 c 43 g 198 t
 ORIGIN
 1 cgatgatatt ttctttttgc ttatgctatt cttcgctcaa ttccaaataa gttaggagga
 61 gtaattgcat tagttataatc tattgctatt ttattttttt tacccttttt acaccaaaga
 121 aaaatacaag gattacaatt ttacccttta aatcaaattc tattttgata tatattttgtt
 181 attgtaattc ttttaacatg aattggtgct cgccctgtag aagaccctta tattttaaca
 241 ggacaaatcc tcaactattat ttattttata tattacatta tcaatccttt aattttcttta
 301 tattgagata aaattttaaa taattaagtt aataagctta atacagcaat tgttttgaaa
 361 acattagata gaaattaaa atttctattaa ctttactaaa tttttattaat taaaataaaa
 421 aaaattttta accaataaaa aatataataa aacataaaga tgaaggtaaa tatctttttc
 481 a//

LOCUS EF012219 481 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION *Lutzomyia cayennensis* cayennensis isolate Lcacsin2 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012219
 VERSION EF012219
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion *Lutzomyia cayennensis* cayennensis (sand fly)
 ORGANISM *Lutzomyia cayennensis* cayennensis
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; *Lutzomyia*.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 481)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus *Lutzomyia*
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 481)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..481
 /organism="*Lutzomyia cayennensis* cayennensis"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lcacsin2"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="*Lutzomyia cayennensis* cayennensis (Floch and Abonnenc, 1941)"
 CDS
 <1..327
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="RWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALFFLPFLHQSKMQGLQFYPLNQILFWYMFVIVILLTWIGARPVEDPYILTGQILTIIYFMYIINPLISLYWDKILNN"
 tRNA
 327..393
 /product="tRNA-Ser"
 CDS
 complement(410..>481)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSYPSSLCFIMFFIGLKFFLF"
 BASE COUNT 181 a 59 c 43 g 198 t
 ORIGIN
 1 cgatgatatt ttctttttgc ttatgctatt cttcgctcaa ttccaaataa gttaggagga
 61 gtaattgcat tagttataatc tattgctatt ttattttttt tacccttttt acaccaaaga
 121 aaaatacaag gattacaatt ttacccttta aatcaaattc tattttgata tatattttgtt
 181 attgtaattc ttttaacatg aattggtgct cgccctgtag aagaccctta tattttaaca
 241 ggacaaatcc tcaactattat ttattttata tattacatta tcaatccttt aattttcttta
 301 tattgagata aaattttaaa taattaagtt aataagctta atacagcaat tgttttgaaa
 361 acattagata gaaatataat attctattaa ctttactaaa tttttattaat taaaataaaa
 421 aaaattttaa accaataaaa aatataataa aacataaaga tgaaggtaaa tatctttttc
 481 a//

LOCUS EF012220 487 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION Lutzomyia dubitans isolate Lducsin1 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012220
 VERSION EF012220
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Lutzomyia dubitans (sand fly)
 ORGANISM Lutzomyia dubitans
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; Lutzomyia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 487)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus Lutzomyia
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 487)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..487
 /organism="Lutzomyia dubitans"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lducsin1"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="Lutzomyia dubitans (Sherlock, 1962)"
 CDS
 <1..327
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIAILFFLPILHLSNSQG LQFYPIAQILFWYMLIIVILLTWIGARPVEDPYILTGQILTVIYF'LYF'LMNSISSKIW DMILNN"
 tRNA
 333..399
 /product="tRNA-Ser"
 CDS
 complement(416..>487)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSYLPLSLFFLCFFMGLKIFLF"
 BASE COUNT 175 a 66 c 46 g 200 t
 ORIGIN
 1 gaatgatatt ttttatttgc ctatgccatt cttcgatcta tcccaaataa attaggagga
 61 gttattgctc ttgttatatc tattgcaatt ttatTTTTtTc ttoctatcct acatttaagt
 121 aattctcaag gacttcaatt ctaccttatt gctcaaatc tatttttgata tatattaatt
 181 attgtaattt tattaacatg aattggagcc cgacctgtcg aagaccctta tattcttact
 241 ggacaaatcc ttactgtaat ttacttttta tattttatta taaactctat cagatctaaa
 301 atttgagata taactctaaa taattaatta ttagttaata agctttaata gcaattggtt
 361 tgaaaacatt agatagaaat ttaacctttc tattaacttt actaatttta atgaactaaa
 421 ataaaaaaat ttttaatcct ataaaaaagc ataaaaaaaa taaagataaa ggaagatatac
 431 tttttca//

LOCUS EF012221 479 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION Lutzomyia gomezi isolate Lgocsin1 cytochrome b gene, partial cds; trRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012221
 VERSION EF012221
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Lutzomyia gomezi (sand fly)
 ORGANISM Lutzomyia gomezi
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; Lutzomyia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 479)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus Lutzomyia
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 479)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..479
 /organism="Lutzomyia gomezi"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lgocsin1"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="Lutzomyia gomezi (Nitzulescu, 1931)"
 CDS
 <1..327
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALFFFLPITHMKSQGLQFYFPVNQILFWYMFVIVILLT'WIGARPVEDPYIITGQILTVIYF'LYYIINPVVSKIWDKILNN"
 trRNA
 326..391
 /product="tRNA-Ser"
 CDS
 complement(408..>479)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSYPASLFCFFLGLKIFLF"
 BASE COUNT 173 a 72 c 51 g 183 t
 ORIGIN
 1 gaatgatatt ttctttttgc ttatgctatc ttacgggtcta tcctaataa attaggggga
 61 gtaattgctc tagttatatac tattgccatt ttattcttct taccatcac ccatataaga
 121 aaaagtcaag gccttcaatt ttaccagta aatcaaat tttttgata tatatttgg
 181 attgttatcc tattaacttg aattggggca cgccctgttg aagaccoccta tattattact
 241 ggtcaaatct taacagttat ttacttttta tactacatta ttaatccagt agtctctaaa
 301 attgagaca aaatcttaaa taattagtta ataagcttta atagcaattg ttttgaaaac
 361 attagataga aattaaactt tctattaact ttactaaatt taattattta aaataaaaaa
 421 atctttaacc ctaaaaaaaaa acaataaaa cataatgaag caggtaagta actttttca//

LOCUS EF012222 479 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION Lutzomyia gomezi isolate Lgocsin2 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012222
 VERSION EF012222
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Lutzomyia gomezi (sand fly)
 ORGANISM Lutzomyia gomezi
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; Lutzomyia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 479)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus Lutzomyia
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 479)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..479
 /organism="Lutzomyia gomezi"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lgocsin2"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="Lutzomyia gomezi (Nitzulescu, 1931)"
 CDS
 <1..327
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALFFFLPITHMKSQGLQFYFVNQILFWYMFVIVILLTWIGARPVEDPYIITGQILTVIYFYYIINPVVSKIWDKILNN"
 tRNA
 326..391
 /product="tRNA-Ser"
 CDS
 complement(408..>479)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSYPASLFCFFLGLKIFLF"
 BASE COUNT 173 a 72 c 51 g 183 t
 ORIGIN
 1 gaatgatatt ttctttttgc ttatgctatc ttacgggtcta tcctaataa attaggggga
 61 gtaattgctc tagttatatac tattgccatt ttattcttct taccatcac ccatataaga
 121 aaaagtcaag gccttcaatt ttaccagta aatcaaat tttttgata tatatttgg
 181 attgttatcc tattaacttg aattggggca cgccctgtg aagaccocct tattattact
 241 ggtcaaatct taacagttat ttacttttta tactacatta ttaatccagt agtctctaaa
 301 atttgagaca aaatcttaaa taattagtta ataagcttta atagcaattg ttttgaaaac
 361 attagataga aattaaactt tctattaact ttactaaatt taattattta aaataaaaaa
 421 atctttaacc ctaaaaaaaaa acaataaaa cataatgaag caggtaagta actttttca//

LOCUS EF012223 478 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION Lutzomyia rangeliana isolate Lracsin1 cytochrome b gene, partial
 cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase
 subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012223
 VERSION EF012223
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Lutzomyia rangeliana (sand fly)
 ORGANISM Lutzomyia rangeliana
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
 Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea;
 Psychodidae; Lutzomyia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 478)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the
 taxonomic determination of the genus Lutzomyia
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 478)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas,
 Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre,
 Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..478
 /organism="Lutzomyia rangeliana"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lracsin1"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="Lutzomyia rangeliana (Ortiz, 1952)"
 CDS
 <1..324
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALFFLPLSHFSKNQG
 LQFYPLNQILFWYMLIIVILLTWIGARPVEIPYIILTGQILTVIYFLYYIINPMLSKIW
 DKMLD"
 tRNA 324..391
 /product="tRNA-Ser"
 CDS complement(407..>478)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSFLPASLFCFFMGLKIFLF"
 BASE COUNT 186 a 68 c 42 g 182 t
 ORIGIN
 1 gaatgatact tcttatttgc ttatgctatc ctccgatcaa tcccaaataa acttggagga
 61 gtaattgctt tagtcatatc tattgcaatt ttattcttct taccttctct acactttaga
 121 aaaaatcaag gattacaatt ttatccactc aatcaaat ttttttgata tataactaatc
 181 attgtaattt tattaacatg aattggagca cgccctgtag aaactcctta tattttaaca
 241 ggtcaaat ttaacagtaatt ttatttttta tactatatta ttaaccctat aatttctaaa
 301 atttgagata aaatgcttga ttaagttaat aagcttaaaa tagcatttgt tttgaaaaa
 361 aatatagaa atttaaattt tctattaact ttacttaaat atattattaa acaaaaaaaa
 421 tctttaatcc cataaaaaaa caaataaaac ataaagaagc aggtaaaaat ctttttca//

LOCUS EF012224 478 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION Lutzomyia rangeliana isolate Lracsin2 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012224
 VERSION EF012224
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Lutzomyia rangeliana (sand fly)
 ORGANISM Lutzomyia rangeliana
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; Lutzomyia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 478)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus Lutzomyia
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 478)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES
 source Location/Qualifiers
 1..478
 /organism="Lutzomyia rangeliana"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Lracsin2"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="Lutzomyia rangeliana (Ortiz, 1952)"
 CDS
 <1..324
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALFFLPSLHFSKNQG LQFYPLNQILFWYMLIIVILLTWIGARPVEIPYIILTGQILTVIYFYLYIINPMLSKIWDKMLD"
 tRNA
 324..391
 /product="tRNA-Ser"
 CDS
 complement(407..>478)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSFLPASLFCFFMGLKIFLF"
 BASE COUNT 186 a 68 c 42 g 182 t
 ORIGIN
 1 gaatgatact tcttatttgc ttatgctatc ctccgatcaa tcccaaataa acttggagga
 61 gtaattgctt tagtcatatc tattgcaatt ttattcttct taccttctct acactttaga
 121 aaaaatcaag gattacaatt ttatccactc aatcaaat ttttttgata tataactaatc
 181 attgtaattt tattaacatg aattggagca cgccctgtag aaactcctta tattttaaca
 241 ggtcaaat ttaacagtaatt ttatttttta tactatatta ttaaccctat aatttctaaa
 301 atttgagata aaatgcttga ttaagttaat aagcttaaaa tagcatttgt tttgaaaaca
 361 aaatatagaa atttaaattt tctattaact ttacttaaat atattattaa acaaaaaaaaa
 421 tctttaatcc cataaaaaaaaa caaataaaac ataaagaagc aggtaaaaat ctttttca//

LOCUS EF012225 489 bp DNA linear 18-SEP-2006
 DEFINITION Lutzomyia evansi isolate Levcsin4 cytochrome b gene, partial cds; tRNA-Ser gene, complete sequence; and NADH dehydrogenase subunit 1 gene, partial cds; mitochondrial.
 ACCESSION EF012225
 VERSION EF012225
 KEYWORDS .
 SOURCE mitochondrion Lutzomyia evansi (sand fly)
 ORGANISM Lutzomyia evansi
 Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Diptera; Nematocera; Psychodoidea; Psychodidae; Lutzomyia.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 489)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Utility of the Cytochrome b, NAD1 and tRNA-Serine genes for the taxonomic determination of the genus Lutzomyia
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 489)
 AUTHORS Vivero,R.J., Contreras,M.A. and Bejarano,E.E.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (18-SEP-2006) Grupo de Investigaciones Biomedicas, Universidad de Sucre, Carrera 14 # 16-B-32, Sincelejo, Sucre, Colombia
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..489
 /organism="Lutzomyia evansi"
 /organelle="mitochondrion"
 /mol_type="genomic DNA"
 /isolate="Levcsin4"
 /sex="female"
 /dev_stage="adult"
 /country="Colombia: Sincelejo, Sucre"
 /collected_by="Vivero R, Contreras MA"
 /authority="Lutzomyia evansi (Nunez-Tovar, 1924)"
 CDS <1..324
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="cytochrome b"
 /translation="EWYFLFAYAILRSIPNKLGGVIALVMSIALLFLPLHMSKMQG LQFYPLNQLFWYMLLIIVILLTWIGARPVEDPYILTGQILTVIYFLYYIINPLISKIWDKTLN"
 tRNA 335..401
 /product="tRNA-Ser"
 CDS complement(418..>489)
 /codon_start=1
 /transl_table=5
 /product="NADH dehydrogenase subunit 1"
 /translation="WKSYPASLFCMCFFIGLKIFLF"
 BASE COUNT 189 a 69 c 45 g 186 t
 ORIGIN
 1 gaatgatact ttttatttgc ctatgcaatt cttcgatcaa ttccaaataa attaggggga
 61 gtcattgcct tagtcatatc aattgcaatt ttattccttac tcctattctc tcatataaga
 121 aaaatacaag gactacaatt ttatccttta aatcaaattc tattttgata tatattaatt
 131 attgttatct tattaacatg aattggagct cgacctgtag aagaccoccta tattttaact
 241 gggcaaatcc taactgttat ttacttctta tattatatta tcaaccocatt aattttctaaa
 301 attgagata aaactttaaa ttaataaatt atttagttaa taagccttaa tagcaattgt
 361 tttgaaaaca ttagatagaa actcaaattt tctattaact ttactaaaaa taattattta
 421 aaataaaaaa atctttaatc caataaaaaa acatataaaa cataaagatg caggcaagta
 431 actttttca//

ANEXO 2. Manuscrito sometido a publicación a la revista Biomédicas. “Análisis de la estructura secundaria del RNA de transferencia mitocondrial para Serina (UCN) en siete especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae)”

RNA de transferencia para Serina en *Lutzomyia*

Rafael José Vivero, María Angélica Contreras-Gutiérrez, Eduar Elías Bejarano
Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.

Correspondencia:

Eduar E. Bejarano, Centro de Diagnóstico Médico, Universidad de Sucre, Carrera
14 No. 16 B-32, Apartado Aéreo 406, Sincelejo, Colombia. Teléfono: (575) 282
0830; Fax: (575) 282 1240.
eduarelias@yahoo.com

Introducción. Los insectos del género *Lutzomyia* son los responsables de la transmisión del parásito *Leishmania* spp. En América. La taxonomía de estos vectores se fundamenta en los caracteres morfológicos que exhiben los adultos, principalmente, en las estructuras pareadas de la cabeza y genitalia. Aunque estos caracteres permiten distinguir la mayoría de los taxones, la similitud en algunos subgéneros y grupos de especies, pone límites a la identificación por criterios morfológicos.

Objetivo. Evaluar la utilidad la estructura secundaria del RNA de transferencia mitocondrial para Serina (UCN), tRNA^{Ser}, en la determinación taxonómica de *Lutzomyia*.

Materiales y Métodos. Se analizaron siete especies flebotomíneas, *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangeliana* y *L. evansi*. A partir de cada individuo, se extrajo, amplificó y secuenció el gen mitocondrial que codifica para el tRNA^{Ser}, delimitado por los genes citocromo b y NAD deshidrogenasa uno. La estructura secundaria del tRNA^{Ser} se infirió teniendo como base las estructuras homólogas descritas en otros insectos del orden Diptera.

Resultados. La longitud del gen tRNA^{Ser} osciló entre 66pb en *L. gomezi* y 69pb en *L. trinidadensis*. En el alineamiento nucleotídico de 70 posiciones, se detectaron 14 sitios polimórficos, incluyendo cuatro eventos indel. La mayoría de las sustituciones correspondieron a las lupas dihidouridina, ribotimidina-pseudouridina-citosina y variable, así como al extremo basal del brazo anticodón.

Conclusión. Los cambios en la secuencia primaria de nucleótidos y los rearrreglos en la estructura secundaria del tRNA^{Ser}, son potencialmente útiles para la discriminación taxonómica de las especies flebotomíneas estudiadas.

Palabras clave: Psychodidae, clasificación, genética, mitocondria, ADN, ARN de transferencia, leishmaniasis.

Analysis of the secondary structure of the mitochondrial serine transfer RNA (UCN) in seven species of *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae)

Introduction. *Lutzomyia* sand flies are involved in the transmission of the parasite *Leishmania* spp. in America. The taxonomy of these vectors is traditionally based on morphological features of the adult stage, particularly the paired structures of the head and genitalia. Although these characters are useful to distinguish most species of *Lutzomyia*, morphological identification may be complicated, however, by the similarity in some subgenera and species group.

Objective. To evaluate the utility of the secondary structure of the mitochondrial serine transfer RNA (UCN), tRNA^{Ser}, for taxonomic determination of *Lutzomyia*.

Materials and Methods. Seven sand fly species were analyzed including *L. trinidadensis*, *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. dubitans*, *L. gomezi*, *L. rangelliana* and *L. evansi*. The mitochondrial tRNA^{Ser} gene, flanked by the cytochrome b and NAD dehydrogenase subunit one genes, was extracted, amplified and sequenced from each specimen. Secondary structure prediction of the tRNA^{Ser} was performed on the basis of careful examination of the previously described homologous structures from other dipteran species

Results. The tRNA^{Ser} gene ranged in size from 66 pb in *L. gomezi* to 69pb in *L. trinidadensis*. Fourteen polymorphic sites, including four indel events, were observed in the aligned 70 nucleotide positions. The majority of the substitutions were located in the dihydrouridine, ribothymidine-pseudouridine-cytosine and variable loops, as well as in the basal extreme of the anticodon arm.

Conclusion. Changes of primary sequence and secondary structure of the tRNA^{Ser} are potentially useful for taxonomic identification of the sand fly species.

Key words: Psychodidae, classification, genetics, mitochondria, DNA, transfer RNA, leishmaniasis.

Introducción.

Los flebotómíneos son un grupo de insectos de reconocida importancia en el ámbito de la salud pública, debido a su papel fundamental en el mantenimiento del ciclo de vida del parásito *Leishmania* Ross, 1903, agente etiológico de la leishmaniosis (1). Estos dípteros también tienen la capacidad de transmitir bacterias y virus a los humanos (2).

El reconocimiento morfológico de los flebotómíneos se basa en su cuerpo hirsuto y pequeño, alas lanceoladas con diez venas longitudinales y pocas venas transversales, patas relativamente largas y aparato bucal adaptado a la hematofagia. Su taxonomía está soportada, casi exclusivamente, por los caracteres morfológicos que exhiben los adultos, debido a las dificultades para localizar los estados inmaduros en la naturaleza (3). En los machos la determinación de especie se realiza a partir de las estructuras pareadas de la genitalia y cabeza, mientras que las hembras pueden separarse por los apéndices cefálicos, la armadura cibarial y la forma de las espermatecas (4). En ambos sexos también es útil la pigmentación del tórax y los índices del ala, entre otros rasgos (5).

Si bien estos caracteres permiten distinguir la mayoría de los taxones, la similitud morfológica en algunos subgéneros y grupos de especies, pone límites a la identificación por criterios morfológicos. Esto ha propiciado la búsqueda de métodos alternativos de determinación de especie, entre los cuales se encuentran los caracteres moleculares (6,7). Las secuencias de nucleótidos se destacan por su abundancia, que permite detectar diversidad antes no percibida, y discreción, la cual se refleja en estados de carácter no ambiguos (8). No obstante, la mayoría de los estudios moleculares de flebotómíneos parten de la identificación taxonómica derivada de caracteres morfológicos, la cual en las especies americanas se realiza usando las claves taxonómicas de Young y Perkins (9), Young y Duncan (4), y Galati (5).

El genoma mitocondrial es un marcador útil tanto para estudios poblacionales como filogenéticos, debido a que contiene segmentos con diferentes dinámicas de

mutación (7). Éste se compone de una región control, trece genes codificadores de proteínas, dos genes que codifican para las subunidades ribosomales y 22 genes para RNAs de transferencia (tRNAs) (10). En el estudio del género *Lutzomyia* França, 1924, se han usado los genes citocromo b, citocromo oxidasa I, NAD deshidrogenasa 1 y 4 y la subunidad pequeña ribosomal (11-17), que en conjunto representan sólo el 13% de la diversidad de genes de la molécula mitocondrial.

Los tRNAs desarrollan un papel central en la biosíntesis proteica y son un componente esencial altamente conservado en todos los sistemas biológicos, esto los convierte en una herramienta atractiva para estudios de evolución molecular (18-20). Aunque inicialmente se sintetizan como moléculas monocatenarias de RNA, sufren luego complejas modificaciones que favorecen la formación de estructuras secundarias de cadena doble con apariencia de hoja de trébol en la que se distinguen motivos como el brazo aceptor del aminoácido, el brazo y la lupa dihidrouridina (DHU), el brazo y la lupa del anticodón, la lupa variable, y el brazo y la lupa ribotimidina-pseudouridina-citosina (T ψ C) (21).

A pesar que en las bases de datos moleculares disponibles en línea se encuentran depositadas algunas secuencias nucleotídicas de tRNAs de flebotómíneos, no se conocían hasta la fecha estudios sobre la estructura secundaria de tRNAs que operan en la mitocondria de este importante grupo taxonómico. En el presente trabajo se evaluó la utilidad de la estructura secundaria de un tRNA mitocondrial en la discriminación de siete especies del género *Lutzomyia*.

Materiales y Métodos

Recolección y determinación taxonómica de flebotómíneos

Los flebotómíneos se recolectaron en el perímetro urbano del municipio de Sincelejo (9° 18' N, 75° 25' W), departamento de Sucre. La clasificación ecológica de la zona corresponde a bosque seco tropical, con precipitaciones anuales de 1050 mm y una temperatura promedio anual de 28°C. La captura de los insectos

se efectuó entre las 18:00 y 06:00 horas empleando trampas de luz de tipo CDC (Communicable Disease Center) instaladas en el intradomicilio y peridomicilio.

Los ejemplares recolectados se examinaron bajo el estereoscopio con el fin de separar la cabeza, un ala y los tres últimos segmentos abdominales, que se usaron para la identificación taxonómica, luego de ser aclarados en lactofenol y montados en láminas portaobjeto con el medio de Hoyer. La determinación morfológica de especie se realizó con las claves de Young y Duncan (4) y Galati (5). El esquema taxonómico seleccionado corresponde al propuesto por Young y Duncan (4). Los montajes entomológicos se encuentran depositados en la "Colección de Artrópodos de Importancia Médica de la Universidad de Sucre – CAIMUS", en Sincelejo, Colombia.

Extracción del DNA genómico

La extracción del DNA se desarrolló de acuerdo al protocolo de Collins y colaboradores (22), con las siguientes modificaciones. El tórax y los primeros segmentos abdominales de cada flebotómíneo se maceraron con micropistilos estériles en 60 μ l 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), incubando a una temperatura de 65°C por 30 minutos. La precipitación de proteínas se realizó con 14 μ l de acetato de potasio 8M durante 30 minutos sobre hielo, seguido de centrifugación a 12,000 x *g* durante 10 minutos. El DNA presente en el sobrenadante se precipitó con 200 μ l de etanol absoluto, incubando a -20°C durante 24 horas. Cada muestra se centrifugó a 12.000 x *g* durante 20 minutos y el ácido nucleico precipitado en el fondo del vial se lavó con 200 μ l de etanol al 70% y luego con 200 μ l de etanol absoluto. Finalmente, se secó el DNA a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μ l de agua ultra pura. De la solución anterior se extrajeron 10 μ l para una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con el fin de constatar la cantidad y calidad del DNA obtenido.

PCR y secuenciación de nucleótidos

Para el estudio se seleccionó el gen que codifica para el tRNA mitocondrial para Serina (UCN) (tRNA^{Ser}). La amplificación del DNA se realizó con los oligonucleótidos CB3FC (CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAATGATA) y NINFR (GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA), cuya secuencia es complementaria al extremo 3' del gen citocromo b y 3' del gen NAD deshidrogenasa uno, respectivamente, flanqueando el gen tRNA^{Ser} (11).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se desarrolló en un volumen de 50 µl, que contenían 0.3 µM 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* DNA polimerasa y 8 µl de la solución con el DNA extraído. Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, una segunda etapa de 35 ciclos, que incluyó desnaturalización a 93°C por 1 minuto, alineamiento a 50°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, finalizando con una tercera etapa de elongación a 72°C durante 10 minutos. El producto de la PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificó usando Wizard PCR Preps (Promega). La secuencia nucleotídica del fragmento amplificado se determinó en ambos sentidos de la doble hebra de DNA, en un secuenciador automático de electroforesis capilar ABI 3730xl, que emplea cuatro dideoxinucleótidos terminadores de cadena marcados con grupos fluorescentes.

Análisis molecular

El análisis genético se realizó con el programa MEGA 3.1 (23) a partir de la secuencia nucleotídica consenso del gen tRNA^{Ser} por espécimen, la cual se derivó de las secuencias obtenidas de cada hebra de DNA. Para el alineamiento múltiple de las secuencias se usó el algoritmo Clustal W (24) integrado en MEGA 3.1 en la opción Alignment Explorer/CLUSTAL, con el propósito de identificar los sitios nucleotídicos variables en el grupo de especies de *Luizomys* estudiadas. Con la herramienta Nucleotide-nucleotide BLAST (25) disponible en línea, se determinó el

porcentaje de similitud y la posición de las secuencias obtenidas respecto al genoma mitocondrial completo de otros insectos. El programa MEGA 3.1 también se usó para calcular la composición nucleotídica de cada uno de los siete taxones analizados. La hipotética estructura secundaria del tRNA^{Ser} se infirió manualmente a partir del grupo de secuencias alineadas, sugerida como un método apropiado por Klingler y Brutlag (26), teniendo en cuenta además las estructuras homólogas descritas previamente en organismos del orden Diptera (26,27). Finalmente, todas las secuencias nucleotídicas generadas en el presente estudio están depositadas en GenBank con los números de acceso EF012215 al EF012225 (cuadro 1).

Especie	Subgénero o grupo de especies	Cantidad de aislados	Número de acceso GenBank	Número de registro CAIMUS
<i>L. triniaadensis</i>	Grupo <i>oswaldoi</i>	1	EF012215	P173
<i>L. panamensis</i>	Subgénero <i>Psychodopygus</i>	2	EF012216	P93
			EF012217	P166
<i>L. cayennensis c.</i>	Subgénero <i>Micropygomyia</i>	2	EF012218	P54
			EF012219	P512
<i>L. aubitans</i>	Grupo <i>migonei</i>	1	EF012220	P158
<i>L. gomezi</i>	Subgénero <i>Lutzomyia</i>	2	EF012221	P5
			EF012222	P7
<i>L. rangeliana</i>	No agrupada	2	EF012223	P108
			EF012224	P118
<i>L. evansi</i>	Grupo <i>verrucarum</i>	1	EF012225	P59

Cuadro 1. Números de acceso en Genbank y de registro en la colección entomológica CAIMUS de las siete especies del género *Lutzomyia* estudiadas.

Resultados

Se obtuvieron 11 secuencias nucleotídicas completas del gen mitocondrial tRNA^{Ser} de siete especies de *Lutzomyia* determinadas taxonómicamente como *L. trinidadensis* (Newstead, 1922), *L. panamensis* (Shannon, 1926), *L. cayennensis cayennensis* (Floch y Abonnenc, 1941), *L. dubitans* (Sherlock, 1962), *L. gomezi* (Nitzulescu, 1931), *L. rangeliana* (Ortiz, 1952) y *L. evansi* (Núñez-Tovar, 1924) (cuadro 1). El segmento secuenciado es homólogo a la región comprendida entre las posiciones 11585 y 11653 del genoma mitocondrial de *Aedes albopictus* (número de acceso NC_006817, GenBank), con el cual presentó el mayor porcentaje de similitud (75,36% – 79,71%), entre los genomas comparados.

El análisis molecular del gen tRNA^{Ser} de los taxones estudiados se basó en 70 posiciones nucleotídicas producto del alineamiento múltiple (figura 1). El carácter económico de la molécula mitocondrial se manifiesta en *L. cayennensis cayennensis* y *L. rangeliana* por el solapamiento de la primera base nucleotídica, adenina, del gen tRNA^{Ser}, con la última base del codón de terminación del gen citocromo *b*, y se acentúa más en *L. gomezi* donde estos genes comparten dos nucleótidos, adenina y guanina.

La frecuencia nucleotídica en todas las especies se caracterizó por un alto contenido de adenina (42,4 %) y timina (39%), contrastando con un bajo porcentaje de guanina (10,2%) y citosina (8,4%). Aunque se secuenció más de un individuo de *L. panamensis*, *L. cayennensis cayennensis*, *L. gomezi* y *L. rangeliana* (cuadro 1), se detectó un solo haplotipo nucleotídico por especie.

La secuencia del gen tRNA^{Ser} osciló en tamaño entre 66pb en *L. gomezi* y 69pb en *L. trinidadensis*, manteniéndose en este rango *L. dubitans*, *L. evansi* y *L. cayennensis cayennensis* con una extensión de 67pb, además de *L. panamensis* y *L. rangeliana* con un tamaño de 68pb.

Posiciones nucleotídicas

	111	111	111	122	222	222	223	333	333	333			
Especie	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789
<i>L. trinidadensis</i>	AGT	TAA	TAA	GCT	TTA	-AT	AGC	AAT	TGT	TTT	GAA	AAC	ATT
<i>L. panamensis</i>	A.	A.A
<i>L. c. cayennensis</i>	A.	T.C
<i>L. dubitans</i>	-.
<i>L. gomezi</i>	-.
<i>L. rangeliana</i>	A.	A.	...	T.	AA
<i>L. evansi</i>	-.

	444	444	444	455	555	555	556	666	666	666	7
Especie	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	0
<i>L. trinidadensis</i>	AGA	TAG	AAA	TTT	AAA	AAT	TTT	CTA	TTA	ACT	T
<i>L. panamensis</i>
<i>L. c. cayennensis</i>	A.
<i>L. dubitans</i>	CC
<i>L. gomezi</i>	C
<i>L. rangeliana</i>	T.
<i>L. evansi</i>	C.C

Figura 1. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen mitocondrial tRNA^{Ser} (UCN) de siete especies del género *Lutzomyia*. Los puntos indican homología y los guiones corresponden a eventos indel (inserción- delección). Los nucleótidos sombreados resaltan los sitios polimórficos de la secuencias.

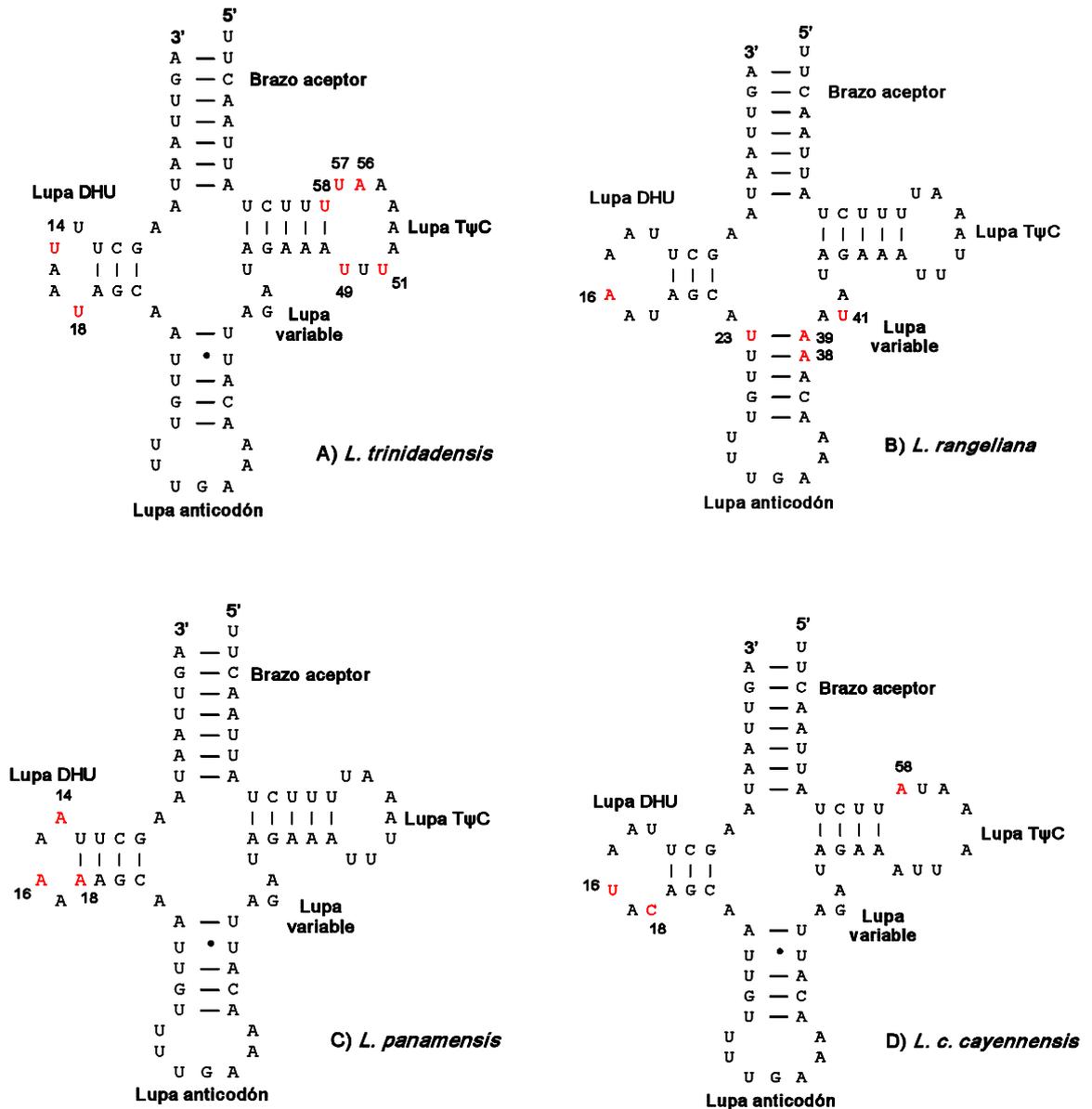
La longitud superior del tRNA^{Ser} de *L. trinidadensis* se debe al tamaño de la lupa TψC que aparece constituida por nueve bases (figura 2A), a diferencia de las demás especies cuya extensión se mantuvo en el rango de 6 y 8 bases. Del mismo modo, la reducción en el tamaño del tRNA^{Ser} de *L. gomezi* es producto de la pérdida de una base en la lupa DHU y tres bases en la lupa TψC (figura 2F). El

número de apareamientos en el grupo de taxones fluctuó entre 4 y 5 en el brazo del anticodón, 7 en el brazo aceptor, 3 y 4 en el brazo DHU, y 4 y 5 en el brazo T ψ C (figura 2A-G). Todas las especies se caracterizaron por la presencia de dos bases entre el brazo aceptor y el brazo DHU, una base entre este último y el brazo del anticodón y cuatro bases en la lupa variable.

En el alineamiento se observaron 14 sitios nucleotídicos polimórficos, incluyendo cuatro eventos indel (inserción-delección), que corresponden a una tasa de variación del 20% (figura 1). La mayoría de las sustituciones correspondieron a las lupas DHU, T ψ C y variable, así como al extremo basal del brazo anticodón, en los cuales se encontraron posiciones con nucleótidos propios de cada especie flebotomínea. En *L. rargeliana* es notoria la ocurrencia de cinco apareamientos en el brazo del anticodón, derivado de la sustitución de la timina por adenina en la posición 38 (figura 2B), en tanto que las demás especies poseen cuatro apareamientos y un desapareamiento. Esta especie también se destaca por la presencia de los nucleótidos timina, adenina y timina en las posiciones 23, 39 y 41, del mismo brazo (figura 2B).

A diferencia de los otros taxones que exhiben cinco apareamientos en el brazo T ψ C, *L. cayennensis cayennensis* posee sólo cuatro apareamientos (figura 2D), como producto del reemplazo de la timina de la posición 58 por adenina, la cual genera un desapareamiento al interior de dicha estructura. Igualmente, esta especie se distingue por la presencia de timina y citosina en los sitios 16 y 18, respectivamente, de la lupa DHU. *L. panamensis* tiene el brazo DHU más largo, con 4 pb y la lupa DHU más corta, con sólo 4 bases (figura 2C), mientras los otros taxones exhiben tres apareamientos en dicho brazo y 5 o 6 bases en la misma lupa. Esta especie se caracteriza, adicionalmente, por mostrar una adenina en la posición 18 de la lupa DHU (figura 2C), además de compartir la adenina de las posiciones 14 y 16 con *L. rargeliana* y de la posición 14 con *L. cayennensis cayennensis*. En *L. evansi* es exclusiva la ocurrencia de la base citosina en los sitios 49 y 51 de la lupa T ψ C (figura 2G). De otro lado, la presencia de dos citosinas de forma consecutiva en las posiciones 56 y 57 de la lupa T ψ C es una

característica distintiva de *L. dubitans* (figura 2E), que comparte a su vez esta última base con *L. gomezi*.



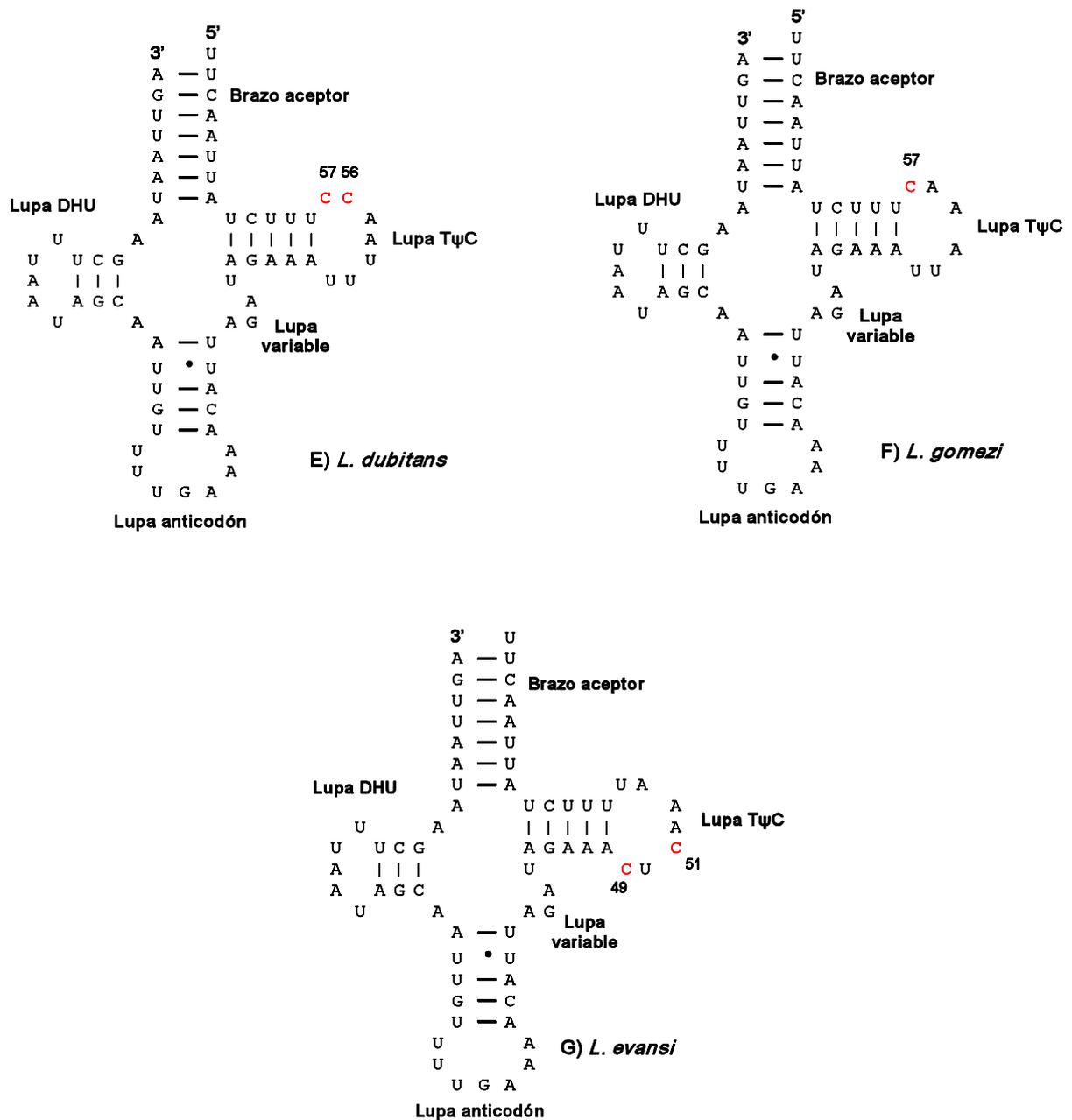


Figura 2. Predicción de la estructura secundaria del gen tRNA^{Ser} (UCN) de siete especies del género *Lutzomyia*: A) *L. trinidadensis*, B) *L. rangeliana*, C) *L. panamensis*, D) *L. cayennensis cayennensis*, E) *L. dubitans*, F) *L. gomezi*, G) *L. evansi*. Las letras en color rojo denotan las bases distintivas de cada especie y el número relaciona la posición en el alineamiento múltiple de las secuencias. Las bases apareadas están representadas por barras y las bases no apareadas están ilustradas con puntos.

Discusión

En el genoma mitocondrial de los metazoos se encuentran presentes dos genes que codifican para el tRNA^{Ser} (AGN) y tRNA^{Ser} (UCN), el último de los cuales se caracterizó en este estudio. Aunque en los bancos de datos moleculares reposan algunas secuencias nucleotídicas del gen mitocondrial tRNA^{Ser} para flebotomíneos del Nuevo y Viejo Mundo, no se había evaluado a la fecha, la utilidad de la estructura secundaria del tRNA^{Ser} para el diagnóstico de especies de este grupo taxonómico.

El porcentaje de conservación del 80%, observado entre las secuencias nucleotídicas del gen mitocondrial tRNA^{Ser} de las siete especies de *Lutzomyia* estudiadas, puede ser consecuencia de restricciones operacionales que hacen imperiosa la conservación de la estructura secundaria de este tRNA (10). Más aún, las regiones que aparecen estructuralmente conservadas como el brazo aceptor del aminoácido, el brazo DHU, la lupa del anticodón y el brazo TψC estarían revelando la importancia funcional que tienen dichos motivos para el correcto desempeño del tRNA^{Ser} durante la síntesis proteica en flebotomíneos.

Como era de esperarse, la mayoría de los caracteres nucleotídicos variables se expresaron a lo largo de las lupas DHU, TψC y variable, con la excepción de los cambios observados en las primeras bases del brazo del anticodón de *L. rargeliana* que originaron un apareamiento adicional. Esto permite deducir que tales regiones gozan de mayor libertad para mutar, particularmente las lupas DHU y TψC que sufrieron la mayor parte de las sustituciones. Adicionalmente, llama la atención que las divergencias en longitud entre las especies tengan origen en estas lupas y no en la lupa variable, cuyo tamaño fue constante en todos los taxones, aunque en la mayoría de los animales es la directa responsable de los diferencias de tamaño entre los tRNA mitocondriales.

Las sustituciones nucleotídicas observadas en la secuencia del gen tRNA^{Ser} y los rearrreglos estructurales ocasionados por estas, son útiles para la correcta distinción de cada uno de los flebotomíneos estudiados, sumado a las diferencias

en el tamaño del gen por la pérdida o ganancia de bases. La extensión nucleotídica del gen tRNA^{Ser} en *Lutzomyia*, comprendida en el rango de 66 a 69 bases, es ligeramente inferior al margen de 68 a 70 bases encontrado al comparar el mismo gen en especies flebotomíneas del género *Phlebotomus* del Viejo Mundo registradas en Genbank (28) (números de acceso, U94474, U94473 y U94471), con la excepción de *L. trinidadensis* que posee 69 nucleótidos, por lo cual podría considerarse como la especie más divergente.

Los patrones de cambio genético parecen inclinarse a favor de la teoría de la evolución reduccional en el número de bases nucleotídicas y por consiguiente de los elementos que integran el genoma mitocondrial, conllevando a la disminución de su tamaño. Esto podría explicar el solapamiento de la secuencia del gen tRNA^{Ser} con el gen citocromo b en *L. cayennensis cayennensis*, *L. rangeli* y *L. gomezi*, poniendo en evidencia el carácter económico de la molécula mitocondrial. También se ha sugerido que los tRNAs adyacentes a genes codificadores de proteínas pueden desempeñar un papel de puntuación en el procesamiento de éstas (29).

Dentro de la escala zoológica se ha observado un acortamiento gradual de algunos tRNA mitocondriales como la desaparición del brazo DHU en el tRNA^{Ser} (AGY) (10). Desde el punto de vista del tamaño, *L. trinidadensis* debería considerarse entonces como la especie más ancestral dentro del grupo de flebotomíneos estudiados por presentar el gen tRNA^{Ser} más largo. Esto se sustenta además, según los estudios morfológicos, por la presencia de una espermateca lisa sin anulaciones terminales y de cinco espinas estilares dispuestas en la genitalia masculina, que de acuerdo a Theodor (30), corresponden a la forma primitiva de la que eventualmente se derivaron el resto de especies flebotomíneas americanas.

Teniendo en cuenta que los resultados de esta investigación comprueban la utilidad de la estructura secundaria del tRNA^{Ser}, se sugiere ampliar el análisis incluyendo otros taxones de origen Neotropical. Más aún, por su tasa de conservación evolutiva éste podría ser un marcador molecular apropiado para

evaluar las relaciones filogenéticas entre los subgéneros y grupos de especies de flebotomíneos americanos.

Conflicto de Interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés alguno sobre el estudio publicado.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Grupo de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre.

Referencias

1. **Montoya-Lerma J, Ferro C.** Flebótomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. En: Amat G, Andrade MG, Fernández F, editores. Insectos de Colombia. Volúmen II. Colección Jorge Álvarez Lleras, No. 13. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Santafé de Bogotá: Centro Editorial Javeriano; 1999. p.211-45.
2. **Sherlock IA.** Importância dos flebotomíneos. En: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio do Janeiro, Brasil: Editora Fiocruz; 2003. p.15-21.
3. **Brazil RP, Brazil BG.** Biología de flebotomíneos neotropicales. En: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio do Janeiro, Brasil: Editora Fiocruz; 2003. p.257-74.
4. **Young DG, Duncan MA.** Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Amer Ent Inst 1994;54:1-881.
5. **Galati EAB.** Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. En: Rangel EF, Lainson R, editores. Flebotomíneos do Brasil. Rio do Janeiro, Brasil: Editora Fiocruz; 2003. p.53-175
6. **Bejarano EE.** Sobre la evolución de los flebotomíneos americanos (Diptera: Psychodidae): un llamado a los sistemáticos moleculares. Rev Colomb Entomol 2002;28:211-12.
7. **Bejarano EE.** Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniosis: utilidad de los genes mitocondriales. Biomédica 2001;21:182-91.
8. **Avise JC.** Molecular markers, natural history and evolution. 1st ed. New York: Chapman & Hall, Inc; 1994. p.1-511.
9. **Young DG, Perkins PV.** Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). Mosq News 1984;44:263-304.
10. **Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P.** Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a

compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 1994;87:651-701.

11. **Ready PD, Day JC, De Souza AA, Rangel EF, Davies CR.** Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bull Entom Res* 1997;87:187-95.
12. **Bejarano EE.** Variabilidad genética y especiación en *Lutzomyia (verrucarum) evansi* (Nuñez-Tovar, 1924), vector de leishmaniosis visceral americana (tesis). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia; 2001.
13. **Uribe S, Lehmann T, Rowton ED, Vélez ID, Porter C.** Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Mol Phylogenet Evol* 2001;18:456-61.
14. **Rojas W.** Relaciones filogenéticas en *Lutzomyia* spp. del grupo *verrucarum* (tesis). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia; 2001.
15. **Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD, Lanzaro GC.** **Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences.** *Infect Genet Evol* 2002;2:83-95
16. **Testa JM, Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD.** Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: Mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townseni* series. *Acta Trop* 2002;84:205-18.
17. **Beati L, Caceres AG, Lee JA, Munstermann LE.** Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 2004; 34:225-34.
18. **Rich A, Schimmel PR.** Structural organization of complexes of transfer RNAs with aminoacyl transfer RNA synthetases. *Nucleic Acids Res* 1977; 4:1649-65.

19. **Masta S.** Mitochondrial sequence evolution in spiders: intraspecific variation in tRNAs lacking the TCC arm. *Mol Biol Evol* 2000;17:1091–100.
20. **Chandra BC, Jennifer L, Kapatral V.** Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genome synteny Sathees. *Afr J Biotechnol* 2006;5:1308-18.
21. **Lodish H, Baltimore D, Berk A, Lawrence S, Matsudaira P, Darnell J.** *Molecular cell biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books, Inc; 1995. p.1-1344.
22. **Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V.** A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med Hyg* 1987;37:37-41.
23. **Kumar S, Tamura K, Nei M.** MEGA 3.1: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
24. **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-80.
25. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-10.
26. **Klingler TM, Brutlag DL.** Detection of Correlations in tRNA Sequences with Structural Implications. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*. 1993;1:225-33.
27. **Beard CB, Hamm DM, Collins FH.** The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*. DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol Biol* 1993;2:103-24.
28. **Esseghir S, Ready PD, Killick-Kendrick R, Ben-Ismaïl R.** Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Mol Biol* 1997;6:211-25.

29. **Ojala D, Montoya J, Attardi G.** tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 1981;290:470-4.
30. **Theodor O.** On the classification of American Phlebotominae. *J Med Entomol* 1965;2:171-97.