

Descripción del ARN de transferencia mitocondrial para Serina (UCN) de *Lutzomyia colombiana* (Diptera, Psychodidae)

Alveiro Pérez-Doria¹, Eduar Elías Bejarano¹ & Iván Darío Vélez²

¹Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Cra. 14 No. 16B-32, A.A. 406, Sincelejo, Colombia. eduarelias@yahoo.com

²Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET, Universidad de Antioquia, Calle 62 No. 52-59, A.A. 1226, Medellín, Colombia

ABSTRACT. Description of the mitochondrial serine transfer RNA (UCN) of *Lutzomyia colombiana* (Diptera, Psychodidae). The sand fly *Lutzomyia colombiana* is considered a suspected vector of *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* in Colombia. *Lu. colombiana* belongs to the *Lutzomyia verrucarum* species group, which included some sibling species. This has motivated the search for molecular markers to distinguish these taxa. In this paper, we described for the first time the putative secondary structure of the mitochondrial serine transfer RNA that recognizes the codon UCN of *Lu. colombiana* (tRNA^{Ser}). DNA was extracted, amplified and sequenced from six individuals collected in human biting activity. The secondary structure of the tRNA^{Ser} was inferred using the program tRNAscan-SE 1.21. The tRNA^{Ser} gene length was 67 pair of bases (pb), and a single haplotype was detected among the six specimens sequenced. In the inferred secondary structure of the tRNA^{Ser} of *Lu. colombiana*, the acceptor arm consisted of 7 bp, the dihydrouridine (DHU) arm of 3 pb, the anticodon arm of 5 pb, and the ribothymidine-pseudouridine-cytosine (T ϕ C) arm of 5 pb. Similarity, the estimated size of the loops was 5 nucleotides in the DHU, 7 in the anticodon, 4 in the variable, and 7 in the T ϕ C. *Lu. colombiana* differs from other *Lutzomyia* and *Phlebotomus* species sequenced to date by the presence of guanine in the nucleotide position 64, which induce a non-canonical base pair conformation type uracil-guanine in the acceptor arm. More studies are necessary to confirm the usefulness of the tRNA^{Ser} as a suitable molecular tool for sand fly species identification.

KEYWORDS. Colombia; genetics; leishmaniasis; molecular taxonomy; sand fly.

RESUMEN. Descripción del ARN de transferencia mitocondrial para Serina (UCN) de *Lutzomyia colombiana* (Diptera, Psychodidae). *Lutzomyia colombiana* es un flebotomíneo considerado como vector sospechoso de *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis* en Colombia. Este insecto pertenece al grupo *verrucarum*, que incluye algunos taxones isomórficos, lo que ha estimulado la búsqueda de marcadores moleculares que permitan, además de diferenciar las especies, estudiar sus relaciones de parentesco. En este artículo se describe por primera vez la estructura putativa del ARN de transferencia mitocondrial para serina que reconoce el codón UCN (ARNt^{Ser}) de *Lu. colombiana*. El ADN genómico fue extraído, amplificado y secuenciado a partir de seis especímenes colectados con cebo humano. La estructura secundaria del ARNt^{Ser} fue inferida con el programa tRNAscan-SE 1.21. El gen ARNt^{Ser} consistió de 67 pares de bases (pb), encontrándose un solo haplotipo en los seis individuos secuenciados. El ARNt^{Ser} de *Lu. colombiana* mostró 7 apareamientos intracatenarios en el brazo aceptor del aminoácido, 3 en el brazo dihidrouridina (DHU), 5 en el brazo del anticodón y 5 en el brazo ribotimidina-pseudouridina-citosina (T ϕ C). El tamaño de las lupas correspondió a 5 nucleótidos en la DHU, 7 en la anticodón, 4 en la variable y 7 en la T ϕ C. *Lu. colombiana* se distingue del resto de especies de *Lutzomyia* y *Phlebotomus* secuenciadas a la fecha por la presencia de una guanina en la posición nucleotídica 64, que produce un apareamiento no canónico tipo uracilo-guanina en el brazo aceptor. Se necesitan más estudios para confirmar la utilidad del ARNt^{Ser} como marcador molecular para la discriminación de especies de flebotomíneos.

PALABRAS-CLAVE. Flebotomíneo; Colombia; genética; leishmaniasis; taxonomía molecular.

Lutzomyia colombiana (Ristorcelli y Van Ty, 1941) es un flebotomíneo endémico de Colombia, con una distribución geográfica que se extiende desde los bosques húmedos del Nudo de Los Pastos, pasando por las Cordilleras Occidental y Central, hasta zonas esteparias de La Guajira, en un amplio rango altitudinal que va de los 100 a 2700 msnm (Bejarano *et al.* 2003). Este insecto ha sido asociado con la transmisión del parásito tripanosomatídeo *Leishmania mexicana* en un foco de leishmaniosis cutánea del suroccidente del país (Montoya-Lerma *et al.* 1999). Mediante ensayos experimentales en laboratorio se ha comprobado, además, su susceptibilidad a la infección por *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911 (Warburg *et al.* 1991) y *Leishmania mexicana* Biagi, 1953 (Arroyo y Garzón 1996; Montoya-Lerma *et al.* 1999). Igualmente, se

sospecha que este flebotomíneo participó en la transmisión de la bacteria *Bartonella bacilliformis* (Strong *et al.* 1913) durante un brote de bartonelosis humana registrado en el departamento de Nariño, entre finales de la década de los treinta y principios de los cuarenta (Rozeboom 1947).

Desde el punto de vista taxonómico, *Lu. colombiana* pertenece al grupo *verrucarum* Theodor, 1965 (Bejarano *et al.* 2003), taxón considerado como subgénero *Pifanomyia* Ortiz y Scorza, 1963, por algunos autores (Galati *et al.* 2003). Éste incluye varias especies que exhiben una alta semejanza morfológica en uno de los sexos, la cual limita su identificación con las claves taxonómicas tradicionales. Debido a la importancia epidemiológica de estos insectos y a los problemas que afronta la determinación de especie, se han usado tanto

genes nucleares como mitocondriales para diferenciar las especies y explorar sus relaciones de parentesco (Bejarano 2001; Rojas 2001; Testa *et al.* 2002; Beati *et al.* 2004). Los genes mitocondriales secuenciados a la fecha en *Lutzomyia* spp. son citocromo b, citocromo oxidasa I, las subunidades 1 y 4 del complejo NAD deshidrogenada, la subunidad pequeña ribosomal y el ARN mitocondrial de transferencia para serina (Ready *et al.* 1997; Suguri *et al.* 1997; Uribe *et al.* 2001; Ishikawa *et al.* 1999; Bejarano 2001; Rojas *et al.* 2001; Arrivillaga *et al.* 2002; Testa *et al.* 2002; Torgerson *et al.* 2003; Beati *et al.* 2004; Vivero *et al.* 2007). En años recientes el último gen ha empezado a ser valorado como marcador molecular demostrando, de forma preliminar, su utilidad en la caracterización genética y el diagnóstico de especie. Aunque aún se desconoce la estructura primaria y secundaria de la mayoría de los ARN de transferencia que actúan en la mitocondria de los flebotomíneos, se plantea que por su patrón de evolución podrían ser útiles para la distinción de algunas especies dentro del grupo *verrucarum*. En el presente artículo se describe la estructura secundaria putativa del ARN de transferencia mitocondrial para serina que reconoce el codón UCN (ARNt^{Ser}) de *Lu. colombiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material entomológico se recolectó entre las 18:00 y las 22:00 horas con cebo humano protegido en un bosque secundario de la vereda El Vallano, en el municipio de Envigado, departamento de Antioquia. Esta zona exhibe condiciones de bosque húmedo tropical, con una pluviometría anual de aproximadamente 1937 mm, temperatura de 16,8°C y humedad relativa de 85,8%. Los flebotomíneos se transportaron secos hasta el laboratorio de entomología del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales - PECET, donde fueron conservados a -20°C con el propósito de prevenir la degradación del DNA.

Para el diagnóstico de especie se separó la cabeza, un ala y los últimos segmentos del abdomen de cada espécimen. Estas estructuras se montaron sobre láminas portaobjeto con el medio de Hoyer y están depositadas en la "Colección de Vectores y Hospedadores Intermediarios de Enfermedades Tropicales (VHET)" del PECET de la Universidad de Antioquia, en Medellín, Colombia, bajo los códigos P2465, P2466, P2467, P2468, P2469 y P2470. La identificación morfológica se fundamentó en las claves taxonómicas de Young y Duncan (1994) y Galati (2003).

Para los procedimientos de biología molecular se empleó el tórax y los segmentos proximales de abdomen, a partir de los cuales se extrajo el DNA siguiendo el protocolo descrito por Collins *et al.* (1987), que incluye maceración en 60 µl del tampón de lisis (0.08 NaCl, 0.16 M Sacarosa, 0.06 M EDTA, 0.5% SDS, 0.1 M Tris-HCL a pH de 7.5), precipitación con 200 µl de etanol absoluto y resuspensión en 30 µl de agua estéril. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se efectuó a partir de un volumen de 6 µl de la solución de ADN extraído, a la que se adicionó tampón PCR 1x (Promega Corporation, Madison, WI), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de la mezcla de desoxirribonucleótidos (Promega), 0.3 mM de cada cebador y 1.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Promega), hasta alcanzar un volumen final de 50 ml con H₂O.

Los cebadores sentido 5'-CA(T/C)ATTCAACC(A/T)GAATGATA-3' y antisentido 5'-GGTA(C/T)(A/T)TTGCCTCGA(T/A)TTCG(T/A)TATGA-3' usados para amplificar el gen ARNt^{Ser} de *Lu. colombiana* tienen como secuencia blanco el extremo 3' del gen citocromo b y el extremo 3' del gen subunidad 1 de la NADH deshidrogenada (NAD1), respectivamente (Ready *et al.* 1997). La complementariedad de ambos cebadores con el extremo 3' se debe a que los genes citocromo b y NAD1 deshidrogenasa codifican a partir de cadenas opuestas, por lo tanto se transcriben en direcciones contrarias.

Los productos amplificados se secuenciaron directamente en un equipo de electroforesis capilar ABI 3730xl, el cual emplea cuatro dideoxinucleótidos terminadores de cadena marcados con grupos fluorescentes. Las secuencias obtenidas en ambos sentidos de la doble hélice del ADN se editaron con el programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004), para generar una secuencia consenso por individuo. Posteriormente, las secuencias se alinearon usando la opción Clustal-W (Thompson *et al.* 1994) incorporada en MEGA. A partir del alineamiento se derivó la composición nucleotídica del gen. La estructura secundaria putativa del ARNt^{Ser} de *Lu. colombiana* se obtuvo con el programa tRNAscan-SE 1.21 (Lowe y Eddy 1997) y se graficó manualmente. Por último, la molécula generada se comparó con la estructura secundaria del ARNt^{Ser} de otras especies del género *Lutzomyia* (Pérez-Doria *et al.* 2008; Vivero *et al.* 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el territorio colombiano están registradas 143 especies de *Lutzomyia* (Bejarano 2006, Bejarano *et al.* 2006), sin embargo, hasta el momento sólo se ha publicado la estructura secundaria del ARNt^{Ser} de *Lu. trinidadensis* (Newstead, 1922), *Lu. panamensis* (Shannon, 1926), *Lu. cayennensis cayennensis* (Floch y Abonnenc, 1941), *Lu. dubitans* (Sherlock, 1962), *Lu. gomezi* (Nitzulescu, 1931), *Lu. rangeliana* (Ortíz, 1952), *Lu. evansi* (Núñez-Tovar, 1924), *Lu. pia* (Fairchild y Hertig, 1961), *Lu. tihuilensis* Le Pont, Torrez-Espejo & Dujardin 1997, y *Lu. hartmanni* (Fairchild y Hertig, 1957) (Vivero *et al.* 2007; Pérez-Doria *et al.* 2008). Este trabajo constituye, por lo tanto, la primera descripción de la estructura secundaria del ARNt^{Ser} mitocondrial de *Lu. colombiana*. La secuencia de nucleótidos del gen ARNt^{Ser} se obtuvo a partir de seis especímenes recolectados mientras intentaban picar al humano. Estas secuencias se encuentran registradas en Genbank con los números de acceso EF033636, EF033637, EF033638, EF033639, EF033640 y EF033641.

El gen mitocondrial ARNt^{Ser} de *Lu. colombiana* exhibe una longitud de 67 pares de bases (pb), consistente con lo descrito en otras especies de *Lutzomyia* cuyo tamaño varía entre 66 y 69 pb (Vivero *et al.* 2007). Todos los nucleótidos que conforman este gen son de codificación exclusiva, es decir, el mismo no comparte bases con genes mitocondriales adyacentes. De esta forma el extremo 5' del gen ARNt^{Ser} de *Lu. colombiana* se encuentra separado del gen citocromo b por el espaciador intergénico 1, mientras que el espaciador intergénico 2 se interpone entre su extremo 3' y el gen NAD1. Como era de esperarse para un gen mitocondrial, la composición nucleotídica estuvo dominada por los nucleótidos adenina y

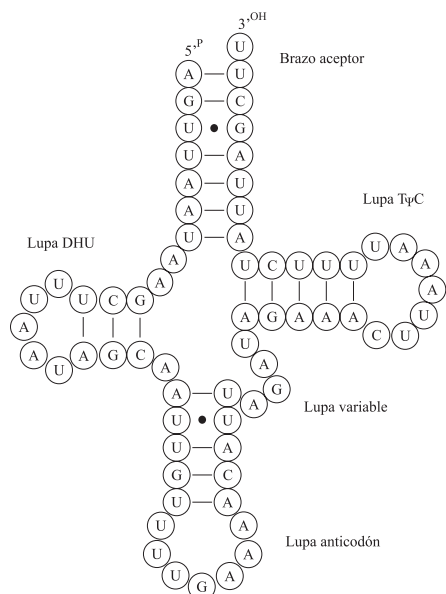


Fig. 1. Estructura putativa del ARN de transferencia mitocondrial para serina que reconoce el codón UCN de *Lutzomyia colombiana*. Los guiones denotan apareamientos canónicos y los puntos apareamientos no canónicos.

timina que constituyeron el 79,1%, con la consiguiente baja representación de guanina y citosina que sólo alcanzaron un 20,9%, lo cual demuestra que el contenido nucleotídico no obedece a factores aleatorios sino que está notoriamente conservado.

En la figura 1 se muestra la estructura secundaria putativa del ARN^{Ser} de *Lu. colombiana*, que está constituido por el brazo aceptor del aminoácido, el brazo y la lapa dihidrouridina (DHU), el brazo y la lapa del anticodón, la lapa variable, y el brazo y la lapa ribotimidina-pseudouridina-citosina (TψC). El tamaño de las lapa correspondió a 5 nucleótidos en la DHU, 7 en la anticodón, 4 en la variable y 7 en la TψC. Similarmente, el brazo aceptor del aminoácido mostró 7 apareamientos intracatenarios, el brazo DHU 3, el brazo del anticodón 5 y el brazo TψC 5. El brazo aceptor del aminoácido y el brazo DHU se encuentran separados por dos adeninas y a su vez el brazo DHU está distanciado del brazo anticodón por una adenina. En el brazo aceptor y del anticodón es notable la presencia de apareamientos no canónicos tipo uracilo-guanina (U-G) y

uracilo-uracilo (U-U), respectivamente, asociaciones de bases que normalmente son determinantes en la formación de la estructura terciaria de los ARNt y en su interacción con otras macromoléculas (Leontis *et al.* 2002).

En los seis individuos secuenciados de *Lu. colombiana* se encontró un solo haplotipo nucleotídico para el gen ARN^{Ser}, lo que refleja la conservación evolutiva de esta molécula a nivel intraespecífico, denotando una baja dinámica mutacional como una probable consecuencia de las complejas restricciones que operan el reconocimiento e interacción de la estructura tridimensional del ARN^{Ser} y su función fisiológica. En la posición nucleotídica 64 del gen se observa la presencia de una guanina que distingue a *Lu. colombiana* del resto de las especies flebotomíneas americanas analizadas hasta ahora (figura 2), las cuales presentan una adenina en ese lugar (Pérez-Doria *et al.* 2008; Vivero *et al.* 2007). El cambio de este nucleótido genera el apareamiento no canónico U-G en el brazo del anticodón (figura 1), que surge dos posiciones antes de los uracilos, los cuales son reemplazados por los nucleótidos citosina, citosina y adenina durante la maduración del ARN^{Ser}, constituyendo el sitio de unión para el aminoácido serina.

Los porcentajes de similitud entre las secuencias de *Lu. colombiana* y las secuencias homólogas de *Lutzomyia* spp. incluidas en Genbank, obtenidos con Nucleotide Blast (Basic Local Alingment Search Tool), estuvieron en el orden de 98% con *Lu. ovallesi* (Ortiz, 1952) (número de acceso AF403491) y 91% con *Lu. nuneztovari* (Ortiz, 1954) (número de acceso AF403487). Más aún, la comparación y búsqueda con BLAST mostró que la preantepenúltima base del extremo 3' del ARN^{Ser} de *L. colombiana* (figura 1), también es distinta a la de todas las especies de *Phlebotomus* Rondani y Berté, 1840, secuenciadas a la fecha, con porcentajes de similitud que oscilan entre el 89% con *Ph. mascomai* Muller, Depaquit y Léger, 2007, (número de acceso EU035612) y el 97% con *Ph. papatasi* (Scopoli, 1786) (número de acceso DQ381835) (Hamarsheh *et al.* 2007; Muller *et al.* 2007).

Contrariamente, al comparar el gen ARN^{Ser} de *L. colombiana* de la población de Envigado, Valle de Aburrá, con el segmento homólogo (número de acceso AF403485) de ejemplares de la misma especie recolectados en La Cumbre, Valle del Cauca, se encontró un porcentaje de similitud del 100%, lo que demuestra la robustez del marcador mitocondrial para asociar individuos de la misma especie, pero que provienen de poblaciones geográficamente distantes. Esto es

	1	1111111112	222222223	333333334	444444445	555555556	666666667
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
<i>L. trinidadensis</i>	AGTTAATAAG	CTTA-ATAG	CAATTGTTTT	GAAAACATTA	GATAGAAATT	TAAAAATTTT	CTATTAACCT
<i>L. panamensis</i>A.A.A...
<i>L. c. cayennensis</i>A.T.C...	---...A...
<i>L. dubitans</i>	---...C...
<i>L. gomezi</i>	---...C...
<i>L. rangeli</i>A.A....	...T.....A.A...	...T.....
<i>L. evansi</i>CCCC
<i>L. pia</i>CCC	---...G...
<i>L. tihuilensis</i>A-....AC	C-.....
<i>L. hartmanni</i>A.....AC	AT-T...A...
<i>L. colombiana</i>CG...

Fig. 2. Alineamiento múltiple de la secuencia de nucleótidos del gen mitocondrial ARN^{Ser} de *Lu. trinidadensis* (número de acceso en Genbank, EF012215), *Lu. panamensis* (EF012217), *Lu. cayennensis cayennensis* (EF012219), *Lu. dubitans* (EF012220), *Lu. gomezi* (EF012222), *Lu. rangeli* (EF012224), *Lu. evansi* (EF012225.), *Lu. pia* (EF033642), *Lu. tihuilensis* (EF033647), *Lu. hartmanni* (EF033635) y *Lu. colombiana* (EF033636). Los nucleótidos se representan con la primera letra del respectivo nombre. Los puntos indican homología y los guiones corresponden a eventos indel (inserción-delección).

importante, considerando que los marcadores moleculares apropiados para el estudio del grupo *verrucarum*, deben tener el suficiente polimorfismo como para establecer patrones únicos que permitan discriminar las especies y, a la vez, ser muy conservados en cada taxón para agrupar individuos co-específicos.

La potencial ventaja del ARN^{tSer} se derivaría no sólo de la variación hallada en la secuencia primaria de nucleótidos, sino también de los cambios en la estructura secundaria putativa. Sin embargo, es de notar que se necesitan más estudios genéticos para poner a prueba el poder de resolución del ARN^{tSer} en la separación de especies morfológicamente similares. Este trabajo constituye un llamado a los sistemáticos a evaluar la utilidad de estos genes mitocondriales en la taxonomía de los insectos flebotomíneos.

Agradecimientos. Esta investigación fue financiada por la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (código no. 1606).

REFERENCIAS

- Arrivillaga, J. C.; D. E. Norris; M. D. Feliciangeli & G. C. Lanzaro. 2002. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. **Infection, Genetics and Evolution** 2: 83–95.
- Arroyo, C. G. & J. Garzón. 1996. Investigación de un foco de leishmaniasis cutánea en la zona andina del departamento de Nariño. **Biomédica** 16: 25–31.
- Beati, L.; A. G. Cáceres; J. A. Lee & L. E. Munstermann. 2004. Systematic relationships among *Lutzomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) of Peru and Colombia based on the analysis of 12S and 28S ribosomal DNA sequences. **International Journal of Parasitology** 34: 225–234.
- Bejarano, E. E. 2006. Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. **Folia Entomológica Mexicana** 45: 47–56.
- Bejarano, E. E.; P. Duque & I. D. Vélez. 2006. Redescrpción de la hembra de *Lutzomyia vattierae* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) de la serranía de La Macarena, Colombia. **Biomédica** 26: 556–561.
- Bejarano, E. E.; W. Rojas; S. Uribe & I. D. Vélez. 2003. Sistemática de especies de *Lutzomyia* del grupo *verrucarum* Theodor, 1965 (Diptera: Psychodidae). **Biomédica** 23: 87–102.
- Bejarano, E. E. 2001. Nuevas herramientas para la clasificación taxonómica de los insectos vectores de leishmaniosis: utilidad de los genes mitocondriales. **Biomédica** 21: 182–191.
- Collins, F. H.; M. A. Mendez; M. O. Rasmussen; P. C. Mehaffey; N. J. Besansky & V. Finnerty. 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 37: 37–41.
- Galati, E. A. B. 2003. Morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América, p. 53–175. *En*: E. F. Rangel & R. Lainson (eds). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro, Fiocruz, 368 p.
- Hamarshah, O.; W. Presber; Z. Abdeen; S. Sawalha; A. Al-Lahem & G. Schonian. 2007. Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. **Medical and Veterinary Entomology** 21: 270–277.
- Ishikawa, E. A.; P. D. Ready; A. A. De Souza; J. C. Day; E. F. Rangel; C. R. Davies & J. J. Shaw. 1999. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the rain-forest regions of Amazonia and northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94: 339–345.
- Kumar, S.; K. Tamura & M. Nei. 2004. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** 5: 150–163.
- Leontis, N. B.; J. Stombaugh & E. Westhof. 2002. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. **Nucleic Acids Research** 30: 3497–3531.
- Lowe, T. M. & S. R. Eddy. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. **Nucleic Acids Research** 25: 955–964.
- Montoya-Lerma J.; H. Cadena; I. Segura & B. L. Travi. 1999. Association of *Lutzomyia columbiana* (Diptera: Psychodidae) with a leishmaniasis focus in Colombia due to species of the *Leishmania mexicana* complex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94: 277–283.
- Muller, F.; J. Depaquit & N. Leger. 2007. *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* n. sp. (Diptera-Psychodidae). **Parasitology Research** 101: 1597–1602.
- Pérez-Doria, A.; E. E. Bejarano; D. Sierra & I. D. Vélez. 2008. Molecular evidence confirms the taxonomic separation of *Lutzomyia thulliensis* from *Lutzomyia pia* (Diptera: Psychodidae) and the usefulness of pleural pigmentation patterns in species identification. **Journal of Medical Entomology** 45: 653–659.
- Ready, P. D.; J. C. Day; A. A. De Souza; E. F. Rangel & C. R. Davies. 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. **Bulletin of Entomological Research** 87: 187–195.
- Rojas, W.; E. E. Bejarano; S. Uribe; I. D. Vélez & C. H. Porter. 2002. Phylogenetic relationships among *Lutzomyia* spp. of *verrucarum* group based on molecular characters. **Entomología y Vectores** 9: 14–15.
- Rozeboom, L. E. 1947. The identity of the *Phlebotomus* associated with bartonellosis in Colombia. **Annals of the Entomological Society of America** 40: 705–714.
- Suguri, S.; M. Harada; M. Maruno; A. Hosokawa; R. A. Sud; E. A. L. Gómez & Y. Hashiguchi. 1997. A preliminary study on nucleotide sequence variations of *Lutzomyia* spp. in the cytochrome c oxidase subunit I gene, p. 25–27. *En*: Y. Hashiguchi (ed.). **Studies on New World leishmaniasis and its transmission, with particular reference to Ecuador**. Kochi, Japan, Kyowa Printing Co.
- Testa, J. M.; J. Montoya-Lerma; H. Cadena; M. Oviedo & P. D. Ready. 2002. Molecular identification of vectors of *Leishmania* in Colombia: mitochondrial introgression in the *Lutzomyia townsendi* series. **Acta Tropica** 84: 205–218.
- Thompson, J. D.; D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673–4680.
- Torgerson, D. G.; M. Lampo; Y. Velázquez & P. T. K. Woo. 2003. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 69: 484–493.
- Uribe, S.; T. Lehmann; E. D. Rowton; I. D. Vélez & C. H. Porter. 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 18: 456–461.
- Vivero, R. J.; M. A. Contreras-Gutiérrez & E. E. Bejarano. 2007. Análisis de la estructura primaria y secundaria del ARN de transferencia mitocondrial para Serina en siete especies de *Lutzomyia*. **Biomédica** 27: 429–438.
- Warburg, A.; J. Montoya-Lerma; C. Jaramillo; A. L. Cruz-Ruiz & K. Ostrowska. 1991. Leishmaniasis vector potential of *Lutzomyia* spp. in Colombian coffee plantations. **Medical and Veterinary Entomology** 5: 9–16.
- Young, D. G. & M. A. Duncan. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memoirs of the American Entomological Institute** 54: 1–881.

Recibido 08/10/2007; aceptado 21/08/2008