

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

Variabilidad genética en poblaciones de *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae) y su infección con *Leishmania* spp en el estado de Chiapas

REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD CON ÁREA DE CONCENTRACIÓN EN
ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTOR

Presentado por:

Biol. Angélica del Rosario Pech May

Director de Tesis:

Dr. Carlos F. Marina Fernández

Asesores:

Dra. Ingeborg Becker Fauser

Dra. Miriam Berzunza Cruz

Tapachula, Chiapas, Marzo, 2012.

**Variabilidad genética en poblaciones de *Lutzomyia cruciata*
(Diptera: Psychodidae) y su infección con *Leishmania* spp en el
estado de Chiapas**

Artículo sometido de acuerdo a los requerimientos del Instituto Nacional de Salud
Pública para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud con área de
concentración en Enfermedades Transmitidas por Vector

Por:

Biol. Angélica del Rosario Pech May

Marzo, 2012

Contenido

Dedicatoria	III
Agradecimientos	IV
Resumen	VI
Abstract	VII
1.- Introducción	1
2.- Materiales y métodos	3
2.1. Área de estudio	3
2.1.1. Loma Bonita y Guadalupe Miramar	4
2.1.2. San Antonio Buena Vista	4
2.1.3. Nuevo Montecristo	4
2.2. Colecta e identificación morfológica de flebotominos	5
2.3. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	5
2.4. Análisis de datos	6
3.- Resultados	7
3.1. Diversidad y estructura genética	7
3.2. Inferencia filogenética	8
4.- Discusión	9
5.- Agradecimientos	13
6.- Referencias	14
7.- Cuadros	23
8.- Figuras	25

Dedicatoria:

- ♣ A Dios por estar siempre conmigo.
- ♣ A mis padres Francisco Javier Pech Navarro y María Paulina May de Pech, por alentarme a seguir mis sueños, por inculcarme que soy dueña de mi propio destino y solo yo decido hasta donde llegar. Gracias por los súper genes que me heredaron, los AmO.
- ♣ Al amor de mi vida, Leo por estar conmigo siempre, por apoyarme en mis decisiones y alentarme a seguir a pesar de los sacrificios que tenemos que pasar. Te AmO MuXoTe.
- ♣ A mi hermana María y mi cuñado Miguel por estar conmigo siempre, por ser parte de este viaje, Mil Gracias!!!!.

Agradecimientos:

- ♣ A la Dra. Ingeborg Becker Fauser, Dra. Ella Vázquez Domínguez, Dra. Miriam Berzunza Cruz, Dr. Carlos Marina Fernández, Dr. Eduardo Rebollar Téllez y Dr. José Narváez Zapata por confiar en mí, por compartir conmigo sus conocimientos y dedicarme parte su tiempo.
- ♣ A la Dra. Janine Ramsey Willoquet por estar conmigo desde el inicio de este proyecto, por todas sus observaciones y ratos de discusiones para enriquecer el manuscrito.
- ♣ Al Dr. Sergio Ibáñez Bernal por todas sus observaciones y por dedicarme parte de su tiempo para discutir el manuscrito y enriquecerlo.
- ♣ A la Dr. Patricia Larralde por la hospitalidad en su casa durante la estancia en Reynosa, Tamaulipas.
- ♣ A mi tía Rita por estar conmigo en las buenas y en las malas, por alentarme a seguir mis sueños a pesar de todo lo que pase.
- ♣ A mi gran amigo David Moo Llanes por su ayuda en la identificación de los ejemplares, la realización de los mapas y por las sin fin de discusiones que hemos tenido del cual aprendemos uno del otro, como dice: que sería la ciencia si no tienes con quien discutir.
- ♣ A todo el personal del laboratorio: Nelva Chirino, Nohemí Cigarroa, Anibal Velazco, Magner Roblero y José Muñoz del CRISP; Erika Arguijo e Isabel Rodríguez del IPN; Laura Sánchez, Silvia Pasos, Marco Suarez y Tania Gutiérrez de la UNAM, por toda su ayuda, comentarios y sugerencias.

Continuación...

- ♣ A mis amigos: Irving May, Carlos Baak, Francisco Pesqueira, Nohemí Cigarroa, Ana Montes de Oca, Belem Puerto y Angélica Aponte, por todos los ratos felices y de estrés jajaja.
- ♣ A mi tutora la Dra. Guadalupe Vázquez por estar siempre pendiente de mí.
- ♣ A la odontóloga María Inés Arvizu; Enrique Celis Arvizu y el Dr. Francisco López por ser mis amigos y considerarme parte de su familia.
- ♣ A Conacyt por el apoyo económico durante el posgrado.
- ♣ Por el financiamiento del presente estudio a los proyectos: “Estudio del polimorfismo en TLR2 y en mediadores de la inflamación y su asociación con la susceptibilidad a la Leishmaniasis” CONACYT-102155; "Ecología e incriminación de vectores de leishmaniasis cutánea en la región Fronteriza de Chiapas, México", CRISP-CONACYT-FOSSIS-69530 y al proyecto “Red complejidad, Ciencia y Sociedad” CONACYT-124909.

Resumen

Lutzomyia cruciata es vector potencial de *Leishmania mexicana* en el sureste de México. Este flebotomino presenta una amplia distribución en el país y aunado a su escasa capacidad de vuelo podría favorecer la formación de poblaciones aisladas (debido a la existencia de barreras geográficas y climáticas) o poblaciones fragmentadas asociadas al tipo de hábitat, debido a la modificación del paisaje. El objetivo del presente estudio fue analizar la diversidad y estructura genética dentro y entre poblaciones de *Lu. cruciata*, utilizando la región 3' del gen *cyt b*. De acuerdo con los resultados obtenidos se propone una hipótesis de divergencia de esta especie. Se analizaron 62 secuencias provenientes de cuatro poblaciones de *Lu. cruciata* del estado de Chiapas, México, en el cual se detectó la presencia de 26 haplotipos, una alta estructuración genética y un restringido flujo génico entre poblaciones ($F_{st}= 0.416$, $N_m= 0.701$). Los índices de diversidad genética más altos se detectaron en las poblaciones de Loma Bonita y Guadalupe Miramar. El árbol de máxima verosimilitud determinó tres grupos diferenciados con un soporte del 100% y con divergencia global del 7%. Estos resultados se apoyan de igual manera por lo encontrado con la red mínima de haplotipos, donde se evidencia la separación de estos tres grupos. Los valores de divergencia genética entre los tres grupos fue del 17.2 al 22.7%. De acuerdo con los resultados, se propone que las presiones de selección asociadas con las condiciones ecológicas del ambiente (factores abióticos y bióticos), la deriva génica, historia evolutiva y la heterogeneidad geográfica del estado de Chiapas, están relacionadas con los valores de diversidad y estructura genética dentro y entre poblaciones, así como también con los valores de divergencia entre los tres grupos diferenciados. Por lo anterior se sugiere que *Lu. cruciata* en el estado de Chiapas pudiera ser un complejo de especies.

Palabras claves: leishmaniasis, *Lutzomyia cruciata*, citocromo *b*, diversidad genética, estructura genética, divergencia genética, complejo de especies.

Abstract

Lutzomyia cruciata has a wide distribution throughout Mexico and is a potential vector of *Leishmania mexicana* in the southeast. The reduced flight capacity of this sand fly could lead to isolated populations due to climate variations and geographic barriers, or population fragmentation associated to specific local habitats due to landscape modification. The aim of this study was to analyze the diversity and genetic structure of the 3' *cyt b* gene within and among sand fly populations from the state of Chiapas, a topographically heterogeneous region. We analyzed 62 sequences from four *Lu. cruciata* populations and found 26 haplotypes, as well as high genetic differentiation and restricted gene flow among populations ($F_{st}= 0.416$, $Nm= 0.701$). Highest diversity indices were recorded in populations from Loma Bonita and Guadalupe Miramar. Three groups (100% bootstrap and 7% global divergence) were identified using a maximum likelihood tree test, and genetic divergence among the three groups ranged from 17.2 to 22.7%. A median network test also supported separation of the three groups. Selection pressure associated with ecological conditions (biotic and abiotic factors), genetic drift, evolutionary background, and geographic heterogeneity all appear to affect diversity and genetic structure within and between *Lu. cruciata* populations, and the divergence of three specific clades. *Lutzomyia cruciata* in Chiapas is probably a species complex.

Key words: leishmaniasis, *Lutzomyia cruciata*, 3' *cytochrome b*, genetic diversity, genetic structure, genetic divergence, species complex.

1. Introducción

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias con manifestaciones clínicamente variadas causadas por protozoarios del género *Leishmania* (Ross) y transmitidas por algunas especies de flebotominos. La Organización Mundial de la Salud las reconoce dentro de las diez enfermedades tropicales desatendidas más importantes del mundo. Está presente en 88 países afectando anualmente entre 1.5 a 2 millones de personas (WHO, 2004). En México esta enfermedad es considerada como un problema de salud pública ya que afecta a la población rural de 22 estados, entre los que se encuentra el estado de Chiapas (Sánchez-Tejeda *et al.*, 2001), donde se han reportado las cuatro formas clínicas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea difusa (LCD), leishmaniasis muco-cutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). La Dirección General de Epidemiología del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y la Secretaría de Salud del estado de Chiapas reportaron 1751 casos de leishmaniasis entre 1990 a 2010 (ISECH, 2010; CENAVECE, 2010).

En México se han reportado a la fecha 45 especies de flebotominos (Young y Duncan, 1994; Ibáñez-Bernal, 2000; Ibáñez-Bernal *et al.*, 2004; 2006; 2010; 2011). De estas especies sólo *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *olmeca olmeca* (Vargas & Díaz-Nájera), ha sido incriminada como vector en el país (Biagi *et al.*, 1965). Sin embargo, estudios realizados recientemente en el sureste de México sugieren que *Lu. (Lutzomyia) cruciata* (Coquillett), *Lu. (Psathyromyia) shannoni* (Dyar) y *Lu. (Psychodopygus) panamensis* (Shannon) son vectores potenciales de *L. mexicana* (Biagi) (Rebollar-Téllez *et al.*, 1996a, b, c; Pech-May *et al.*, 2010; Sánchez-García *et al.*, 2010). En particular, *Lu. cruciata* tiene una amplia distribución en México, ya que ha sido reportada en 18 estados del país (figura 1A) (Vargas & Díaz-Nájera, 1953; Ibáñez-Bernal, 1999; Rebollar-Téllez & Manrique-Saide, 2001; Rebollar-Téllez *et al.*, 2006; Ibáñez-Bernal *et al.*, 2006). La distribución de esta especie puede depender del medio ambiente local y factores como precipitación, temperatura, altitud, latitud, barreras físicas, distribución y abundancia de hospederos (Bejarano *et al.*, 2002).

En general, los flebotominos se desplazan mediante vuelos cortos de aproximadamente 6-10 m, lo que les permite cubrir 100 m alrededor de sus criaderos (Alexander, 1987) y rara vez migran más de 1000 m (Alexander, 1987; Killick-Kendrick, 1990). La escasa capacidad de vuelo, aunado a la amplia distribución que presenta esta especie en el país, podría favorecer la formación de poblaciones aisladas (debido a la existencia de barreras geográficas y climáticas) y/o poblaciones fragmentadas asociadas a tipos de hábitat distintos, particularmente a escalas pequeñas (Soares & Turco, 2003). Es común que los flebotominos de poblaciones disjuntas presenten características particulares relacionadas con dicho hábitat, reflejados en diferencias morfológicas (Mangabeira, 1969; Arrivillaga & Feliciangeli, 2001; Pérez-Méndez, 2009), genéticas (Ishikawa *et al.*, 1999; Arrivillaga *et al.*, 2002) o presenten diferentes compuestos volátiles (e.g. compuestos que actúan como feromonas sexuales) (Lane *et al.*, 1985, Hamilton *et al.*, 2005).

El uso de marcadores moleculares permite determinar el grado de variación y diferenciación genética que existe dentro y entre poblaciones, así como inferir la filogenia de especies (Avise 2004). Entre los marcadores comúnmente utilizados en flebotominos está el ADN mitocondrial (ADNmt) (Esseghir *et al.*, 1997), el cual se hereda por vía materna por lo que tiene poca o nula recombinación, presenta altas tasas de mutación (Bejarano, 2001) y alto polimorfismo a nivel intra- e inter-específico (Avise *et al.*, 1987). El ADNmt está formado por 37 genes entre los cuales está el *citocromo b* (*cyt b*). La región 3' de este gen exhibe una alta tasa de divergencia nucleotídica en flebotominos (Esseghir *et al.*, 1997; Hodgkinson *et al.*, 2002; 2003), por lo cual ha sido utilizado con éxito para inferir relaciones filogenéticas en flebotominos de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* (Torgerson *et al.*, 2003; Parvizi *et al.*, 2010). De igual manera esta región se ha utilizado para evaluar la estructura genética en poblaciones de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Hamarshah *et al.*, 2007), *Ph. sergenti* (Parrot) (Moin-Vaziri *et al.*, 2007; Baron *et al.*, 2008), *Ph. ariasi* (Tonnoir) (Franco *et al.*, 2010), *Lu. longipalpis* (Lutz & Neiva) (Hodgkinson *et al.*, 2002; 2003; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008) y *Lu. whitmani* (Antunes & Coutinho) (Ready *et al.*, 1997; 1998; Ishikawa *et al.*, 1999). En dichos estudios se observó que la variación genética está asociada con diferentes factores tales como condiciones climáticas de

los sitios de estudio (Ready *et al.*, 1997; 1998), distancia entre transectos (Hodgkinson *et al.*, 2003; Hamarsheh *et al.*, 2007), diferencia en latitud o altitud de los sitios de estudio (Ready *et al.*, 1998; Hodgkinson *et al.*, 2002; 2003; Hamarsheh *et al.*, 2007), el tipo de hábitat (doméstico, peri-doméstico y selvático) (Ishikawa *et al.*, 1999) y presencia de barreras geográficas (Moin-Vaziri *et al.*, 2007; Baron *et al.*, 2008; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2010).

En México no existe ningún estudio sobre la estructura y divergencia genética de flebotominos. Considerando que *Lu. cruciata* es un vector potencial de *L. mexicana* y es una especie fuertemente antropófilo, la cual está presente en el estado de Chiapas donde las leishmaniasis son endémicas y existen los cuatro cuadros clínicos de la enfermedad (OPS/WHO- Secretaría de Salud, 1994). Es importante realizar estudios en esta especie debido a que las poblaciones podrían diferir en su capacidad y competencia vectorial, por lo cual, es indispensable conocer los patrones de estructura genética, dispersión y divergencia genética regional. Dicha información sobre *Lu. cruciata* en Chiapas es fundamental para un adecuado diseño e implementación de estrategias de control y vigilancia entomológica. Así, el presente estudio representa el primer trabajo enfocado a poblaciones de *Lu. cruciata*. El objetivo fue analizar la diversidad y estructura genética dentro y entre poblaciones utilizando la región 3' del gen *cyt b*. De acuerdo con los resultados obtenidos se propone una hipótesis de divergencia de esta especie.

2. Materiales y métodos

2.1. Área de estudio

El estado de Chiapas tiene una superficie de 7,492,044 hectáreas, se encuentra al sureste de México y colinda en el oeste con Oaxaca y Veracruz, en el norte con Tabasco y en el sureste con Guatemala. Presenta un relieve altamente heterogéneo con altitudes desde el nivel del mar hasta los 4,000 msnm. El territorio del estado se ha clasificado en: (1) Planicie costera del Pacífico, (2) Sierra Madre de Chiapas, (3) Depresión de Chiapas, (4) Altiplanicie de Chiapas o Meseta central, (5) Montañas del oriente, (6) Montañas del norte y (7) Planicie costera del Golfo. El

clima es muy variable dependiendo de la ubicación geográfica, la altitud y grado de deforestación (Mullerried, 1982).

Las colectas de *Lu. cruciata* se realizaron en cuatro localidades: Loma Bonita, Guadalupe Miramar, San Antonio Buena Vista y Nuevo Montecristo. Estas localidades se eligieron tomando en cuenta los registros de casos de leishmaniasis reportados en los últimos años por la Secretaría de Salud de la entidad (Figura 1).

2.1.1. Loma Bonita (LOB) ($16^{\circ} 11' 53''\text{N}$, longitud $91^{\circ} 11' 88.4''\text{W}$) y **Guadalupe Miramar (GUM)** ($16^{\circ} 09' 22.6''\text{N}$; $91^{\circ} 16' 45.2''\text{W}$) pertenecen al municipio de Maravilla Tenejapa, se encuentran a una altitud de 300 msnm y 432 msnm, respectivamente. Se localizan en las montañas del oriente. Presentan un clima cálido húmedo (Am), precipitación anual entre 1500 a 3000 mm y vegetación de bosque tropical perennifolio. El número de habitantes es de 355 y 446, respectivamente (Mullerried, 1982; Rzedowski, 2006; INEGI, 2011).

2.1.2. San Antonio Buena Vista (SAB) ($16^{\circ} 09' 08''\text{N}$; $91^{\circ} 38' 58.9''\text{W}$) pertenece al municipio de Independencia, se encuentra a 1380 msnm en la Altiplanicie o Meseta Central; con un clima templado-húmedo (Cw) y precipitación anual de 600 a 1200 mm. El tipo de vegetación es bosque de coníferas y encinos. El número de habitantes es de 1,487 (Mullerried, 1982; Rzedowski, 2006; INEGI, 2011).

2.1.3. Nuevo Montecristo (MC) ($16^{\circ} 56' 55.6''\text{N}$; $93^{\circ} 30.4' 72.2''\text{W}$) pertenece al municipio de Berriozabal, se localiza entre la depresión de Chiapas y las Montañas del norte a 340 msnm, con un clima cálido subhúmedo (Aw) y precipitación anual entre 600 a 1200 mm; el tipo de vegetación es bosque tropical caducifolio y el número de habitantes es de 258 (Mullerried, 1982; Rzedowski, 2006; INEGI, 2011).

2.2. Colecta e identificación morfológica de flebotominos

Los muestreos se realizaron de marzo a noviembre del 2009 en las localidades de GUM, LOB y SAB; en agosto 2009 y febrero 2010 en MC. Las colectas se realizaron durante seis días por mes usando trampas CDC con luz blanca (Center for Disease Control) (modelo 512; John W. Hock Co., Gainesville, FL, U.S.A.). Se establecieron cuatro transectos por localidad (norte, sur, este, oeste), iniciando a los 50 m del último domicilio y posteriormente a 100 m, 250 m y 500 m. El tiempo de captura fue de 17.00 h a las 06.00 h del día siguiente. Los ejemplares se conservaron en etanol al 70% hasta su procesamiento para la identificación taxonómica y extracción de DNA. En el laboratorio, se disecó cada ejemplar separando el tórax y abdomen para el análisis molecular y la cabeza para la identificación taxonómica. Para el montaje de los flebotominos se siguieron las recomendaciones de Ibáñez-Bernal (2005). La identificación se realizó usando las claves taxonómicas de Young & Duncan (1994) e Ibáñez-Bernal (2000, 2005). Para la identificación de las hembras se observó la armadura cibarial, ascoides, flagelómeros y palpos en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus 176045 U.S.A.) a diferentes aumentos (10X, 40X y 100X).

2.3. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

Para la extracción de ADN se utilizó el tórax y el abdomen de las hembras. Se siguió el protocolo de extracción de plásmidos de Sambrook *et al.* (1989) con algunas modificaciones: en el paso 1, 2 y 3 se utilizó 100 µl de cada buffer (re-suspensión, lisis y neutralización); en el paso 6 se añadió 60 µl de AcNa 3M (pH 5.2) y 2 volúmenes de etanol absoluto grado biología molecular (Sigma-Aldrich No. 07696MJ, St. Louis U.S.A.) y se dejó precipitar toda la noche a -20°C. Posteriormente en el paso 10 el ADN se re-suspendió en 30 µl de agua inyectable® (Pisa, Guadalajara, Jalisco, México) y se almacenó a -20°C hasta su uso. Para la verificación de la correcta extracción del ADN se amplificó una región conservada del gen 18s (450 pb) con los oligonucleótidos: Lu.18s ARNr-1S (5'-TGCCAGTAGTTATATGCTTG-3') y Lu.18s ARNr-1R (5'-TTACGCGCCTGCTGCCTTCC-3'), bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización de 95°C (2 min) seguido de 30 ciclos de 95°C (1min), 55°C (1min) y 72°C (1 min), y una extensión final de 72°C durante 10 min (Kato *et al.*, 2005).

El volumen final de la reacción de PCR fue de 25 µl, se utilizó el Master mix Taq PCR (QIAGEN, México) y la reacción se corrió con 100 ng de cada oligonucleótido. Para la amplificación de la región final 3' del *cyt b* se utilizaron 100 ng de cada oligonucleótido 11226:(5-GAATGATATTTTTTATTTGC-3') y 11587:(5'CTTATGTTTTCAAGACATATGC-3') los cuales amplifican aproximadamente 365 pb en *Lu. longipalpis* (Hodgkinson *et al.*, 2002; 2003) en un volumen final reacción de PCR de 50 µl y con Master mix Taq PCR. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización de 5 min a 98°C seguido de 10 ciclos de 95°C (1 min), 38°C (1 min) y 72°C (1.5 min); 35 ciclos de 95°C (1min), 40°C (1min) y 72°C (1.5min), con una extensión final de 72°C (3min). Todas las PCRs incluían su control negativo como control de calidad. Se comprobó la presencia de los productos de PCR tanto del 18s como del 3' del *cyt b* en geles de agarosa 1.5%, teñidos con bromuro de etidio (1.0µg/ml) y se realizaron registros fotográficos bajo luz ultravioleta (UV).

Los productos de PCR del 3' del *cyt b* se purificaron con el kit QIAquickTM PCR (Qiagen, Valencia, CA) y se secuenciaron mediante la técnica de secuenciación capilar en un sistema Prisma 310 ABI (High-Throughput Genomics Unit, Washington).

2.4. Análisis de datos

Las secuencias se alinearon manualmente con el programa Bioedit v.7.0.9. (Hall, 2004) y posteriormente con el Mega v.4 (Tamura *et al.*, 2007). Para estimar los niveles de diversidad genética se usó el programa DnaSP v.4.5 (Rozas & Librado, 2009): número total de mutaciones (η), número de sitios polimórficos (S), número de sitios únicos (Su), número promedio de diferencias nucleotídicas (K), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π) y polimorfismo nucleotídico (θ). Para evaluar si existe una señal de crecimiento poblacional o selección natural se utilizaron varios métodos: los estadísticos de D y F de Fu y Li's (1993) y la D de Tajima (Tajima, 1989), con base al número de sitios segregantes. También se usó la prueba de distribución de Mismatch con el programa Arlequin v.3.0 (Excoffier *et al.*, 2005), basado en la distancia genética pareada (Roger y Harpending, 1992), con soporte de

10,000 pseudo-réplicas. La prueba de bondad de ajuste de los datos observados se expresó con la desviación de la suma de cuadrados (*Ssd*) y el índice de Harpending (Harpending, 1994). Para determinar la estructura poblacional de *Lu. cruciata* se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) con 10,000 permutaciones con el programa Arlequín v.3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Se consideró el estimador *Fst* y se estimó el número de migrantes por generación (*Nm*) entre las poblaciones a partir de *Fst* (Wright, 1978). La distancia en línea recta entre las cuatro localidades se calculó con el programa ArcView v.3.2. (Esri, 2011).

El análisis de reconstrucción filogenética se realizó mediante el método de máxima verosimilitud (ML) con el programa Phyml v.3.0. (Guindon & Gascuel, 2009) con 500 pseudo-réplicas de soporte, con base en el modelo de evolución óptimo estimado con el programa JModeltest v.0.1 (Posada, 2008). Los valores de divergencia nucleotídica se estimaron en base al número de sustituciones nucleotídicas (*Da*), con la correlación de Jukes y Cantor (JC) (Nei, 1987; Jukes & Cantor, 1969) entre los tres grupos diferenciados (ver resultados) y con respecto al grupo externo con el programa DnaSP. Para evaluar la relación entre los haplotipos se realizó una red mínima de haplotipos con el programa Network v.4.6.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) a partir del algoritmo Median-joining (Bandel *et al.*, 1999), con los parámetros épsilon 0 y transición/transversión 1:2. Como grupo externo se utilizaron secuencias del GenBank de *Lu. longipalpis* de Brasil (HM030727 y EF107666).

3. Resultados

3.1. Diversidad y estructura genética

Un total de 62 secuencias fueron obtenidas de la región 3' del *cyt b* de *Lu. cruciata*, 12 en LOB, 15 en MC, 12 en GUM y 23 en SAB, con una longitud de 274 pb y con 78 sitios polimórficos. Las pruebas de neutralidad global fueron no significativas, lo que indica que los loci no están sujetos a procesos de selección. En términos de diversidad se obtuvieron 26 haplotipos y los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica global fueron altos, $Hd = 0.866 \pm 0.034$;

$\pi = 0.064 \pm 0.013$. LOB y GUM presentaron el mayor índice de diversidad haplotípica ($Hd = 0.909 \pm 0.079$; 0.894 ± 0.063 , respectivamente), índice de polimorfismo nucleotídico ($\theta = 0.103 \pm 0.010$; 0.078 ± 0.009 , respectivamente) y diversidad nucleotídica ($\pi = 0.099 \pm 0.023$; 0.107 ± 0.014 , respectivamente). Las poblaciones de MC y SAB presentaron valores menores de los índices de diversidad (cuadro 1). El número de haplotipos por población varió entre cinco y nueve (cuadro 1). Los resultados del índice de Tajima mostraron resultados negativos y significativos en la población de SAB ($D = -1.666$, $p < 0.03$), lo cual coincide con los resultados de Mismatch ($Ssd = 0.00006$, $p = 0.999$; $R = 0.109$, $p = 0.648$), de igual manera LOB ($Ssd = 0.088$, $p = 0.326$; $R = 0.067$, $p = 0.672$) como MC ($Ssd = 0.005$, $p = 0.661$; $R = 0.058$, $p = 0.603$) mostraron señal de crecimiento poblacional, sin embargo los resultados de Tajima no fueron significativos. La población de GUM sólo presentó resultados significativos para el índice de Fu y Li's ($F = 1.934$, $p < 0.03$), mientras que el valor de Tajima fue positivo ($D = 2.771$, $p < 0.03$), lo que sugiere efecto de la selección natural.

Los valores más pequeños de distancia genética, con mayor número de migrantes, se observaron entre LOB y GUM ($F_{st} = 0.194$ y $N_m = 2.07$), las cuales son las poblaciones más cercanas geográficamente (5.52 km). Asimismo, las poblaciones de GUM y SAB (41.44 km), mostraron los valores más altos de distancia genética y menor número de migrantes ($F_{st} = 0.633$, $N_m = 0.28$) (cuadro 2). Existe una alta diferenciación genética global entre poblaciones y un restringido flujo de haplotipos migrantes ($F_{st} = 0.416$, $N_m = 0.701$), la distribución de la variación genética fue significativamente mayor dentro poblaciones (58.39%) que entre poblaciones (41.61%).

3.2. Inferencia filogenética

El árbol de máxima verosimilitud fue construido usando el modelo óptimo de evolución según el criterio de Akaike (AICc), el cual fue HKY+G ($-\ln L = 843.17$, $p < 0.001$), con un valor de gamma de 0.406. En el árbol de máxima verosimilitud se observan tres grupos bien diferenciados con un soporte de 100%. El primer grupo incluye haplotipos de todas las poblaciones, mientras que el segundo grupo tiene haplotipos de dos localidades (GUM y LOB) y el tercero únicamente de LOB. El porcentaje de divergencia nucleotídica global fue del 7% (figura 2), mientras que

entre los grupos (*Da*) varió del 17.2 al 22.7% (cuadro 3). En la red mínima de haplotipos se observaron los mismos tres grupos diferenciados. El haplotipo número cuatro, compartido entre las poblaciones de LOB, GUM y SAB, tiene la mayor probabilidad de ser el haplotipo ancestral, del cual se derivan múltiples haplotipos (figura 3).

4. Discusión

La región 3' del gen *cyt b* ha mostrado ser un marcador adecuado y altamente variable para estimar la estructura genética dentro y entre poblaciones e inferir en la filogenia de diversas especies de flebotominos (Torgerson *et al.*, 2003; Hodgkinson *et al.*, 2003; Hamarsheh *et al.*, 2007; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008; Parvizi *et al.*, 2010; Franco *et al.*, 2010). En el presente trabajo esta región del gen *cyt b* muestra que las poblaciones estudiadas de *Lu. cruciata* que presentan valores de diversidad genética altos son LOB y GUM, mientras que MC mostró bajos valores de diversidad nucleotídica e índice de polimorfismo nucleotídico; SAB fue la localidad con valores de diversidad genética más bajos. Los altos niveles de diversidad genética en LOB y GUM sugieren que son poblaciones que han tenido tamaños poblacionales relativamente constantes, debido a que los efectos de la deriva génica se reducen (Avise, 2000). Estos altos niveles de diversidad genética pudieran estar relacionados con el hecho de que estas poblaciones presentan altas presiones de selección local debido a factores abióticos y bióticos (Ready *et al.*, 1997; 1998; Via, 2002), estos altos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones son esenciales en términos de los cambios temporales y espaciales que ocurren en el ambiente (Primack *et al.*, 2001). Los resultados demográficos muestran señal de crecimiento poblacional histórico en LOB y nula en GUM. Por otra parte, Pérez-Méndez (2009) en un estudio de morfometría con poblaciones de *Lu. cruciata* realizado con especímenes colectados en varias localidades del sureste de México, reportó que la heterogeneidad morfológica observada está relacionada con la distancia geográfica entre las poblaciones, así como a la adaptación de los individuos a las características del hábitat local. El presente estudio propone que el hábitat, a nivel local de *Lu. cruciata* tiene un papel importante en su estructuración genética y apoya la propuesta de Hodgins-Davis & Peterson (2009), quienes postulan que el hábitat de cada

población puede modular la expresión de genes asociados con la competencia vectorial de manera local, y esta expresión de genes o plasticidad de expresión puede ser disparada por factores bióticos y abióticos locales. Por otro lado, los valores bajos de diversidad genética observada en las poblaciones de *Lu. cruciata* de MC y SAB pueden estar asociados a: 1) el tamaño de la población, 2) la deriva génica y/o 3) una baja tasa de migración con otras subpoblaciones (Mirabello & Conn, 2006), todo ello potencialmente asociado con la fragmentación del hábitat (e.g., factores antropogénicos, barreras geográficas y/o diferencias climáticas) (Van Dongen *et al.*, 1998; Ready *et al.*, 1998; Franco *et al.*, 2010). Asimismo, Van Dongen *et al.*, (1998) mencionan que la fragmentación de los hábitats naturales puede tener efectos negativos sobre las poblaciones al reducir el potencial de dispersión, lo que consecuentemente aísla las poblaciones, aumenta la divergencia genética y reduce la variabilidad local. En estudios con diferentes taxones (mamíferos, lepidópteros, dípteros), se ha encontrado que la fragmentación del hábitat asociado a la intervención antropogénica y a factores climáticos han reducido el tamaño de las poblaciones y provocado su aislamiento (Van Dongen *et al.*, 1998; Van de Zande *et al.*, 2000; Bouyer *et al.*, 2007). Las localidades de MC y SAB se pueden definir como sitios con un alto grado de perturbación antropogénica. En la localidad de MC es común encontrar escasos parches de vegetación primaria, dado que la mayor parte de esta localidad ha sido desmontada para la agricultura y pastoreo. Asimismo, los habitantes de la localidad de SAB mencionan que hace aproximadamente 40 años hubo en esa área explotación forestal no controlada, lo que provocó la fragmentación del hábitat natural y hace suponer que hubo una gran pérdida de biodiversidad, con potencial de disminución de la diversidad genética al fragmentarse las poblaciones, aumentando así la endogamia por efectos de deriva génica y la disminución de flujo génico (Haila 2002, Willi *et al.*, 2007). Dicha fragmentación tiene un papel fundamental en el origen y la dinámica de los parches, lo cual se refleja en la diversidad genética y en la estructuración de la población (Fitzpatrick & Shaffer, 2007). Similar a lo observado en el presente estudio, Mukhopadhyay *et al.* (2001), en un estudio con isoenzimas en poblaciones de *Lu. shannoni* de distintas poblaciones de Colombia y el estado de Georgia (EUA), encontraron bajos niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y una alta variabilidad entre éstas, con ausencia de migración ($F_{st} = 0.370$, $N_m = 0.4$), lo que asociaron con deriva génica

y fragmentación del hábitat. Adicionalmente, este tipo de poblaciones aisladas son más susceptibles a eventos estocásticos, lo que resulta en fluctuaciones en el tamaño poblacional y en una disminución del potencial adaptativo a cambios ambientales, incrementando el riesgo de extinción (Goodman, 1987). En ambas poblaciones se detectó una fuerte señal de crecimiento poblacional histórico sobre todo en SAB.

En relación a la estructura poblacional de *Lu. cruciata* y la tasa de migración, se encontró una alta diferenciación genética global entre las poblaciones y bajo número de migrantes ($F_{st} = 0.416$, $N_m = 0.701$). Esta diferenciación puede asociarse en mayor medida a la diversidad de microambientes en la región de estudio, el sistema de apareamiento, el efecto relativo que haya tenido el flujo genético y la deriva genética en la historia microevolutiva y demográfica de cada población (Slatkin, 1987; Wenink, 1996). La alta estructuración genética y la baja tasa de migración pudieran también ser el resultado de un proceso de vicarianza asociado a la geografía y clima del estado de Chiapas, que es altamente heterogénea. Los resultados de este estudio coinciden con lo observado en otros trabajos usando diferentes marcadores genéticos donde se ha demostrado el papel de las barreras geográficas y climáticas en el proceso de especiación y estructura genética en *Lu. longipalpis* (Lanzato *et al.*, 1993; Mukhopadhyay *et al.*, 1998; Munstermann *et al.*, 1998; Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2000; Uribe Soto *et al.*, 2001; Mutebi *et al.*, 2002; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008), *Ph. sergenti* (Moin-Variazi *et al.*, 2007); y *Lu. whitmani* (Ready *et al.*, 1997; 1998).

Por otro lado, entre las localidades estudiadas, las poblaciones más cercanas geográficamente, LOB y GUM, que se ubican a una distancia de 5.52 km, mostraron una moderada diferenciación y subsecuente flujo génico entre ellas. Entre estas poblaciones existe una cañada que pudiera comunicar a ambas debido a la existencia de parches de hábitat continuos (corredores), lo cual ha permitido el intercambio genético. Las poblaciones más alejadas genéticamente, aunque no geográficamente, fueron SAB y GUM, que se ubican a una distancia de 41.44 km, esta alta diferenciación genética y nulo flujo génico entre estas poblaciones debe estar asociada a la

historia evolutiva de cada población relacionada con las características ecológicas (abióticas y bióticas) propias de cada sitio, y con la alta heterogeneidad geográfica del estado de Chiapas. Esto es, existe una separación histórica (e.g., vicarianza) entre estas dos poblaciones dado que las separan el río Santo Domingo, varias montañas y la elevación de la Meseta Central de Chiapas, lo cual favorece el aislamiento de estas poblaciones. Así, sobre la historia evolutiva de *Lu. cruciata* se propone que la alta diferenciación poblacional encontrada puede deberse a la orogénesis de las cadenas montañosas del estado de Chiapas, la cual se inició a mediados del Mioceno (Padilla y Sánchez, 2007), así como a los cambios climáticos que ocurrieron durante el Pleistoceno, los cuales provocaron periodos prolongados de sequía que pudieron favorecer el aislamiento de las poblaciones en refugios húmedos (Young, 1979). Esta fragmentación del hábitat durante el Pleistoceno pudo haber favorecido la evolución diferencial de las poblaciones, que se adaptaron a diferentes refugios o microclimas con diferentes condiciones ecológicas (Heffer, 1969). En *Lu. longipalpis* se ha propuesto que los cambios climáticos del Pleistoceno contribuyeron a la formación de su cladogénesis, ya que durante esta era pudieron llevarse a cabo cambios en la distribución de las comunidades de plantas, creando diferentes refugios que influyeron en la evolución de las poblaciones de este flebotomino (Arrivillaga *et al.*, 2002; Conn & Mirabello., 2007).

Los resultados de máxima verosimilitud mostraron tres grupos diferenciados de *Lu. cruciata* con alto soporte (100%), y una divergencia global entre poblaciones del 7%. La divergencia entre los tres grupos diferenciados fue particularmente alta, del 17.2 a 22.7%. Esta divergencia entre poblaciones varía de acuerdo con su grado de aislamiento, es decir, a mayor tiempo de aislamiento, mayor divergencia (Slatkin, 1987). Niveles altos de divergencia se han reportado en poblaciones de *Lu. longipalpis* usando los genes 3' del *cyt b* y el COI, donde se discute que este flebotomo pudiera ser un complejo de cuatro especies (Arrivillaga *et al.*, 2002; Coutinho-Abreu *et al.*, 2008). Los resultados de máxima verosimilitud se apoyan además por lo encontrado con el análisis de la red mínima de haplotipos, donde se evidencia la separación de estas poblaciones. Una explicación podría ser que las poblaciones de *Lu. cruciata* presentaban una amplia

distribución en la región, lo que implica que pudieron tener contacto antes de que se formaran las cadenas montañosas, lo cual se apoya en el hecho de que las poblaciones de LOB, GUM y SAB conservan el haplotipo ancestral, mientras que MC se encuentra a solo un paso mutacional. Asimismo, se observó un espécimen de LOB en el grupo 2 que incluye haplotipos de GUM, lo que puede asociarse a que comparte la misma característica fenotípica que tres ejemplares de GUM (dientes cibariales largos). Grimstad (1984) propone que las diferencias morfológicas observadas en *Aedes hendersoni* (Cockerell) reflejan diferencias en la expresión de los genes. Por otro lado Belen *et al.*, (2004) observaron que el alto nivel de heterocigotos en las poblaciones de *Ph. papatasi* concuerda con las diferencias morfológicas en la longitud del fémur y tibia, lo cual asociaron a factores climáticos, efectos ecológicos y/o socio-biológicos. Lamentablemente en el presente estudio no se realizó la parte morfométrica en los ejemplares, que hubiera sido de gran ayuda para dar más soporte a nuestros resultados.

En conclusión, se propone que las presiones de selección asociadas con las condiciones ecológicas del ambiente (factores abióticos y bióticos), la deriva génica, historia evolutiva y la heterogeneidad geográfica del estado de Chiapas, están relacionadas con los valores de diversidad y estructura genética dentro y entre poblaciones, así como también con los valores de divergencia entre los tres grupos diferenciados. Se documenta por primera vez una diferencia genética significativa en poblaciones de *Lu. cruciata* y de acuerdo a los resultados de esta investigación, se sugiere que *Lu. cruciata* en el estado de Chiapas pudiera ser un complejo de especies. Sin embargo, es necesario ampliar el tamaño de muestra y llevar a cabo otros estudios sobre genética de poblaciones e inferencia filogenética usando más marcadores genéticos e incluyendo estudios sobre morfometría, fisiología, etología y ecología de ejemplares machos y hembras de *Lu. cruciata*, y así poder dilucidar si es un complejo de especies.

5. Agradecimientos

Se agradece el financiamiento y la beca otorgada a los proyectos: “Estudio del polimorfismo en TLR2 y en mediadores de la inflamación y su asociación con la susceptibilidad a la Leishmaniasis” CONACYT-102155 y al proyecto “Red complejidad, Ciencia y Sociedad” CONACYT-124909. Esta investigación también recibió apoyo a través del proyecto "Ecología e incriminación de vectores de leishmaniasis cutánea en la región Fronteriza de Chiapas, México", CRISP-CONACYT-FOSSIS-69530. Se agradece a la Dra. Janine Ramsey Willoquet (Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Tapachula, México) y al Dr. Sergio Ibáñez Bernal (Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, México) por sus comentarios para enriquecer el manuscrito; al C. Aníbal Velazco, C. Magner Roblero y C. José Muñoz (Centro Regional de Investigación en Salud Pública; Tapachula, México) por su apoyo en campo y laboratorio; al Dr. Javier Escobedo Ortegon (Centro de investigaciones regionales Dr. Hideyo Noguchi, Mérida, México) y a la M. en C. Laura Sánchez (Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México) por la ayuda en la estandarización de la técnica de extracción de ADN. Se agradece a los habitantes de las localidades por su colaboración.

6. Referencias

- Alexander, J. B. 1987. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian coffee plantation. *Journal of Medical Entomology*. **24**: 552-558.
- Arrivillaga J. & Feliciangeli M.D. 2001. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: first new species within the *longipalpis* (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) complex from la Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *Journal of Medical Entomology*. **38**: 783-790.
- Arrivillaga, J. C., Norris D. E., Feliciangeli M. D. & Lanzaro G. C. 2002. Phylogeography of the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infection Genetics and Evolution*. **2**: 83-95.
- Avise J. C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Niegel J.E., Reeb C. A. & Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematic*. **18**: 489-522.

- Avise J.C. 2000 Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press. U.S.A.
- Avise J. C. 2004. Molecular markers, Natural History, and Evolution. Second ed. Sunderland, M.A: Sinauer Associates.
- Azevedo, A.C.R., Monteiro F. A., Cabello P. H., De Souza N. A., Rosa-Freitas M. G., & Rangel E. F. 2000. Studies on populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **95**: 305-322.
- Barón, S., Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Morales-Yuste M., Boussaa, S., & Morillas-Márquez, F., 2008. Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Tropica*. **107**: 159–267.
- Bandel H.J., Forster P. & Röhl A. 1999. Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. **16**: 37-48.
- Bejarano E. E., Rojas W., Uribe S., Velez I. D. & Porter C. 2001. Variabilidad genética en *Lutzomyia* (*Verrucarum*) *evansi* (Nuñez- Tovar, 1924), vector de leishmaniasis visceral Americana. *IATREIA*. **1**: 1-4.
- Bejarano, E., S. Uribe, W. Rojas y I. Vélez. 2002. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **97**: 645-647.
- Belen A., Alten B. & Aytekin A.M. 2004. Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Phlebotomus papatasi* populations. *Medical and Veterinary Entomology*. **18**: 343-350.
- Biagi F. F., De Biagi A. M. & Beltrán-H. F. 1965. *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmisor natural de *Leishmania mexicana*. *Prensa Médica de México*. **30**: 267-272.
- Bouyer J., Ravel S., Dujardin J.P., Meeus T., Vial L., Thévenon S., Guerrini L., Sidibé I. & Solano P. 2007. Population Structuring of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) According to Landscape Fragmentation in the Mouhoun River, Burkina Faso. *Journal of Medical Entomology*. **44**: 788- 795.
- Coutinho-Abreu I. V., Sonoda I.V., Fonseca A.J., Melo M.A., Balbino V. Q. & Ramalho-Ortigão M. 2008. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the Sao Francisco River in the speciation of this sand fly vector. *Parasites & Vectors*. **1**: 1-16.
- Coon J.E. & Mirabello L. 2007. The biogeography and population genetics of neotropical vector species. *Heredity*. **99**: 245–256.

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE):
[Http://www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)).

Esseghir S., Ready P., Killick-Kendrick R. & Ben-Ismaïl R. 1997. Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology*. **6**: 211-215.

ESRI. 2011. ArcView Versión. 3.3. Enviromental Systems Research Inc., USA.
<http://www.esri.com/>

Excoffier L., Laval G., & Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics online*. **1**: 47-50.

Fu Y.X. & Li W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. **133**: 693-709.

Fitzpatrick, B.M. & H.B. Shaffer. 2007. Introduction history and habitat variation explain the landscape genetics of hybrid tiger salamanders. *Ecological Applications*. **17**: 598-608.

Franco F.A.L., Morillas-Márquez F., Barón S.D., Morales-Yuste M., Gálvez R., Díaz V., Pesson B., Alves-Pires C., Depaquit J., Molina R., Odette Afonso M., Gállego M., Guernaoui S., Bounamous A. & Martín-Sánchez J. 2010. Genetic structure of *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Mediterranean: Epidemiological implications. *International Journal for Parasitology*. **40**: 1335–1346.

Goodman D. 1987. The Demography of Chance Extinctions. In: viable populations of conservation. Ed. Soulé E. Cambridge University press, Cambridge.

Grimstad P.R. 1984. Mesonotal scale pattern polymorphism and a temperature-induced phenocopy in *Aedes hendersoni* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. **21**: 237-241.

Guindon S. & Gascuel O. 2009. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. **52**: 696-704.

Haffer J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*. **165**: 131- 137.

Hall T. 2004. Bioedit sequence alignment editor. V.7.0.9.

Haila Y. 2002. a conceptual genealogy of fragmentation research from island biogeography to landscape ecology. *Ecological Applications*. **12**: 321–334.

- Hamarsheh O., Presber W., Abdeen Z., Salwalhans., Lahem A. & Schonion G. 2007. Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. *Medical and Veterinary Entomology*. **21**: 270- 277.
- Hamilton J.G.C., Maingon R.D.C., Alexander B., Ward R.D., & Brazil R.P. 2005. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*. **19**: 480–488.
- Harpending H. 1994. Signature of ancient population growth in low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*. **66**: 591-600.
- Hodgins-Davis, A., & Townsend J.P. 2009. Evolving gene expression: from G to E to GxE. *Trends in Ecology and Evolution*. **24**: 649-658.
- Hodgkinson V.H., Birungi J., Haghpahan M., Joshi S. & Munstermann L.E. 2002. Rapid identification of mitochondrial cytochrome b haplotypes by single strand conformation polymorphism in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) populations. *Journal of Medical Entomology*. **39**: 689-694.
- Hodgkinson V.H., Birungi J., Quintana M., Dietze R. & Munstermann L.E. 2003. Mitochondrial cytochrome b variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **69**: 386-392.
- Ibañez Bernal S. 2000. Los Phlebotominae (Díptera : Psychodidae) de México. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 291pp.
- Ibañez Bernal S., Rodríguez- Domínguez G., Gómez- Hernández C. H., & Ricardez-Esquinca J. R. 2004. First record of *Lutzomyia evansi* (Nuñez-Tovar 1924) in Mexico (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **99**: 127-129.
- Ibañez Bernal S. 2005. Phlebotominae (Díptera: Psychodidae) em México. V.- Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia* Franca. *Folia Entomológica Mexicana*. **42**: 109-152.
- Ibañez Bernal S., Hernández- Xoliot R. A., & Mendoza F. 2006. Collections of *Bruchomyiinae* and *Phlebotominae* (Diptera: Psychodidae) from the north- central portion of the state of Veracruz, Mexico, with the description of a new species. *Zootaxa*. **1270**: 19-33.
- Ibañez Bernal S., May-Uc Emigdio & Rebollar-Téllez E.A. 2010. Two new species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from Quintana Roo, Mexico. *Zootaxa*. **2448**: 26-3.

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

INEGI- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2011. <http://www.inegi.org.mx>.

Instituto de Salud del Estado de Chiapas (ISECh), 2010. Casos de Leishmaniasis por jurisdicción sanitaria Chiapas. Departamento de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vector.

Ishikawa E.A.Y., Ready P.D., De souza A.A., Day J.C., Rangel E.F., Davies C.R. & Shaw J.J. 1999. A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) from the rainforest regions of Amazonia and northeast Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **94**: 339-345.

Jukes, T. H. & Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules, pp.21-132. In H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.

Kato H., Uezato H., Katakura K., Calvopiña M., Marco J.D., Barroso P.A., Gómez E.A., Mimori T., Korenaga M., Iwata H., Nonaka S. & Hashiguchi Y. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sandflies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **72**: 87–93.

Killick-Kendrick R. 1990. *Phlebotomus* vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*. **4**:1-24.

Lane R.P.; Phillips A., Molineux D.H., Procter G. & Ward R.D. 1985. Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone?. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **79**: 225- 229.

Lanzaro, G. C., Ostrovska K., Herrero M. V., Lawyer P. G., & Warburg, A. 1993. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: Genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **48**: 839–847.

Mangabeira O. 1969. Sobre la sistemática e biología dos flebótomos do Ceará. *Revista Brasileira de Malariologia e Doencas Tropicais*. **21**: 3-26.

Mirabello L. & Conn J.E. 2006. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity*. **96**: 311–321.

Moin-Vaziri V., Depaquit J., Yaghoobi-Ershadi M.R., Oshaghi M.A., Derakhshandeh-Peykar P., Ferté H., Kaltenbach M., Bargues M.D., Léger N. & Nadim A. 2007. Intraspecific variation within *Phlebotomus sergenti* Parrot (1917) (Diptera: Psychodidae) based on mtDNA sequences in Islamic Republic of Iran. *Acta Tropica* **102**: 29–37.

Mukhopadhyay, J., Ghosh, K., Rangel, E. F. & Munstermann, L. E. 1998. Genetic variability in biochemical characters of Brazilian field populations of the *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **59**: 893–901.

Mukhopadhyay, J., Ghosh K., Ferro C., & Munstermann L.E. 2001. Distribution of phlebotomine sand by genotypes (*Lutzomyia shannoni* Diptera: Psychodidae) across a highly heterogeneous landscape. *Journal of Medical Entomology*. **38**: 260-267.

Mulleried F.K.G. 1982. Geología de Chiapas. Colección libros de Chiapas. Segunda edición. Editorial la comisión. 180pp.

Mutebi J.P., Tripet F., Alexander J.B., & Lanzaro G.C. 2002. Genetic differentiation among populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Central and South America. *Annals of the Entomological Society of America*. **95**: 740–752.

Munstermann L.E., Morrison A.C., Ferro C., Pardo R., & Torres M. 1998. Genetic Structure of Local Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Central Colombia. *Journal of Medical Entomology*. **35**: 82-89.

Network V. 4.6.0.0. 2010. <http://www.fluxus-engineering.com>.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.

OPS/WHO- Secretaria de Salud. 1994. Informe técnico de la I Conferencia Interamericana para el control de la Leishmaniasis. México.

Padilla y Sánchez R.J. 2007. Evolución geológica del sureste mexicano desde el Mesozoico al presente en el contexto regional del Golfo de México. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana. **1**: 19-42pp.

Parvizi P., Taherkhani H. & Ready P.D. 2010. *Phlebotomus caucasicus* and *Phlebotomus mongolensis* (Diptera: Psychodidae): indistinguishable by the mitochondrial *cytochrome b* gene in Iran. *Bulletin of Entomological Research*. **100**: 415–420.

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

Pérez Méndez C. 2009. Morfometría de *Lutzomyia olmeca olmeca* (Vargas y Díaz- Nájera) y *Lutzomyia cruciata* (Coquillett) (Díptera: Psychodidae) en el sureste de México. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2. (ITA)-SEP-SEIT. Yucatán, México.

Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. **25**: 1253–1256.

Primack R., Rozzi R., Feinsinger P., Dirzo R. & Massardo F. 2001. Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas. FCE. México. 797pp.

Ready P.D., Day J., De souza A.A., Rangel E.F. & Davies C.R. 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peridomestic and silvatic transmission of Leishmania species in Brazil. *Bulletin of Entomological Research*. **87**: 187-19.

Ready P.D., De Souza A.A., Rebelo J.C., Day J., Silveira F.T., Campbell-Lendrum D., Davies C.R. & Costa J.M.L. 1998. Phylogenetic species and domesticity of *Lutzomyia whitmani* at the south-east boundary of Amazonian Brazil. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **92**: 159–160.

Rebollar- Téllez E. A., Reyes- Villanueva F., Fernández- Salas I., & Andrade- Narváez F. J. (1996a). Abundance and parity rate of *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of localized cutaneous leishmaniasis in southern Mexico. *Journal of Medical Entomology*. **33**: 638-685.

Rebollar-Téllez E. A., Ramírez- Fraire A., & Andrade-Narváez F. J. (1996b). A two years study vectors of cutaneous Leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission cycle in the state of Campeche, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **91**: 555-560.

Rebollar-Téllez E. A., Reyes-Villanueva F., Fernández-Salas I., & Andrade-Narváez F. J. (1996c). Population dynamics and biting rhythm of the anthropophilic sand fly *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae) in southeast Mexico. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. **38**: 29-33.

Rebollar-Téllez E.A. & Manrique P. 2001. New distributional record of *Lutzomyia cruciata* in the State of Yucatan, Mexico. *Entomological News*. **117**: 21-23.

Rebollar-Téllez E. A., Orilla H., Dzúl F., Che A., Manrique P. & Zapata A. 2006. An update on the phlebotomid sand fly (Diptera: Phlebotomidae) fauna of Yucatan, Mexico. *Entomological News*. **117**: 21-23.

Roger A.R. & Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. **9**: 559-569.

Rozas J. & Librado P. 2009. DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. **25**: 1451-1452.

- Rzedowski J. 2006. Vegetación de México. Primera Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO, México, 504 pp.
- Sambrook, D. J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory, cold spring harbor, N.Y. 1647 pp.
- Sánchez-García, L., Berzunza-Cruz M., Becker-Fauser I. & Rebollar-Téllez E. A. 2010. Sand flies naturally infected by *Leishmania* (Le.) *mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **104**: 406-411.
- Sánchez-Tejeda G., Rodríguez N., Parra C., Hernández-Montes O., & Monrroy-Ostria A. (2001). Cutaneous leishmaniasis caused by members of *Leishmania braziliensis* complex in Nayarit, state of Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **96**: 15-19.
- Soares, R. P., & Turco S. J. 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *Anais Da Acadimia Brasileira de Ciencias*. **75**: 301-330.
- Slatkin M. 1987. Gene Flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. **15**: 787-792.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. **123**: 585-595.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. **24**: 1596-1599.
- Torgerson D.G., Lampo M., Velázquez Y. & Woo P.T. 2003. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (diptera: psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **69**: 484- 493.
- Uribe Soto S. I., Lehmann T., Rowton E.D., Vélez I.D., & Porter C.H 2001. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as Derived from the Mitochondrial ND4 Gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **18**: 84-93.
- Van de Zande L., Van Apeldoorn R.C., Bilijdenstein A.F. De Jong D., Van Delden W. & Bijlsma R. 2000. Microsatellite analysis of population structure and genetic differentiation within and between populations of the root vole, *Microtus oeconomus* in the Neerdelands. *Molecular Ecology*. **9**: 1651-1656.
- Vargas, L. & Díaz-Nájera A. 1953. Listado de flebótomos mexicanos y su distribución geográfica (Diptera: Psychodidae). *Revista del Instituto de Salubridad en Enfermedades Tropicales*. **8**: 309-314.

- Via S. 2002. The ecological genetics of speciation. *The American Naturalist*. **159**: S1-S7.
- Von Dongen S., Backeljau T., Matthysen E. & Dhondt A.A. 1998. Genetic population structure of the winter moth (*Operophtera brumata* L.) (Lepidoptera, Geometridae) in a fragmented landscape. *Heredity*. **80**: 92-100.
- Willi Y., Buskirk V.J., Schmid B. & Fischer M. 2007. Genetic isolation of fragmented populations is exacerbated by drift and selection. *Journal of evolutionary biology*. **20**: 534-542.
- Wenink K., Kater A.J., Roser H. & Tilanus M.G.J. 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of holartic inbreeding (*Calledrisalpina*). *Evolution*. **50**: 318-330.
- WHO- World Health Organization. 2004. Report of the Scientific Working Group Meeting on Leishmaniasis. 2-4 February. Geneva, Switzerland.
- Young D. G. & Duncan M. A. 1994. Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Associated Publishers American Entomological*. Institute EE.UU., 881pp.
- Wright S., 1978. Evolution and genetics of population, variability within and among populations. Vol. 4. The University of Chicago Press. Chicago U.S.A.

7. Cuadros

Cuadro 1. Estimadores de diversidad genética del 3' del *cyt b* en *Lu. cruciata*. N: número de secuencias; η número de mutaciones; S: número de sitios polimórficos; Su: Número de sitios únicos; K: número promedio de diferencias nucleotídicas; H: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; π : índice de diversidad nucleotídica; θ : índice de polimorfismo nucleotídico de: desviación estándar; Pruebas de neutralidad: D y F de Fu y Li; D de Tajima.

Población	N	η	S	Su	K	H	Hd $\pm$ de	$\pi \pm$ de	$\theta \pm$ de	Fu y Li		Tajima
										D	F	D
LOB	12	79	70	198	26.6	9	0.909 $\pm$ 0.079	0.099 $\pm$ 0.023	0.103 $\pm$ 0.010	-0.243	-0.001	0.675
MC	15	10	10	260	1.9	9	0.848 $\pm$ 0.088	0.006 $\pm$ 0.001	0.011 $\pm$ 0.003	-2.025	-2.15	-1.472
GUM	12	59	55	216	29.2	7	0.894 $\pm$ 0.063	0.107 $\pm$ 0.014	0.078 $\pm$ 0.009	1.312	1.934*	2.771*
SAB	23	5	5	260	0.58	5	0.451 $\pm$ 0.121	0.002 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.002	-2.135	-2.317	-1.666*
Total	62	93	78	186	17.03	26	0.866 $\pm$ 0.034	0.064 $\pm$ 0.013	0.070 $\pm$ 0.007	0.623	0.499	0.087

* $p < 0.03$.

Población: LOB: Loma Bonita; MC: Nuevo Montecristo; GUM: Guadalupe Miramar; SAB: San Antonio Buena Vista

Cuadro 2. Distancia genética pareada de los valores de F_{st} y N_m en paréntesis (debajo de la diagonal) y distancia geográfica (arriba de la diagonal) entre las poblaciones de *Lu. cruciata* en el estado de Chiapas.

	LOB	MC	GUM	SAB
LOB		235.31	5.52	38.2
MC	0.257 (1.44)		240.09	201.99
GUM	0.194 (2.07)	0.554 (0.40)		41.44
SAB	0.329 (1.01)	0.451 (0.60)	0.633 (0.28)	

* $p < 0.03$.

* La distancia geográfica se encuentra en km, las cuales fueron estimadas en línea recta. Las abreviaciones se pueden observar en la tabla 1.

Cuadro 3. Divergencia nucleotídica (D_a) medida como el número de sustituciones nucleotídicas netas por sitio entre los diferentes grupos (ver resultados), utilizando la corrección de Jukes y Cantor.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo 1	—		
Grupo 2	0.227±0.040	—	
Grupo 3	0.208±0.057	0.172±0.054	—
Grupo 4	0.226±0.080	0.240±0.091	0.191±0.105

7. Figuras

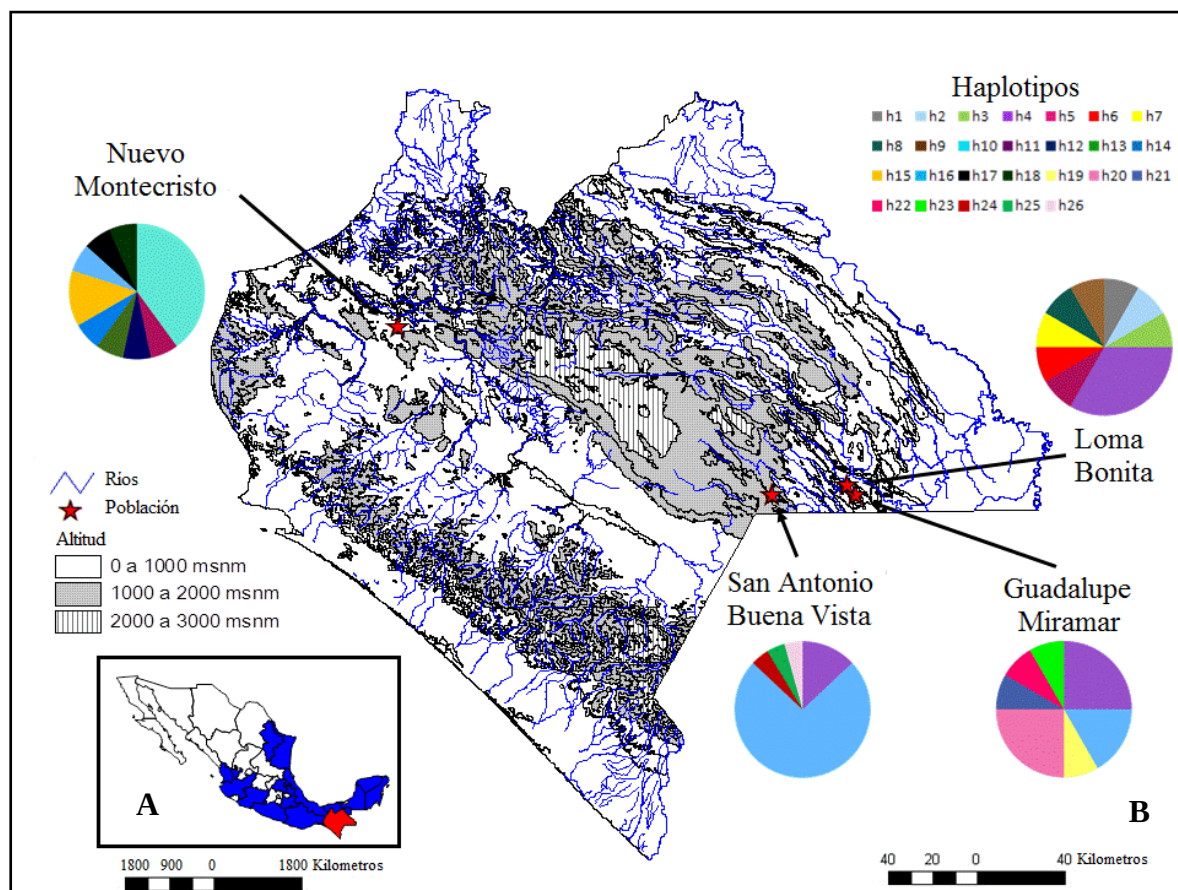


Figura 1. (A) En azul y rojo distribución de *Lu. cruciata* en México (Vargas & Díaz-Nájera, 1953; Ibáñez-Bernal, 1999; Rebollar-Téllez & Manrique-Saide, 2001; Rebollar-Téllez *et al.*, 2006; Ibáñez-Bernal *et al.*, 2006), en rojo localización del estado de Chiapas. (B) estado de Chiapas con la distribución de haplotipos observados en las cuatro poblaciones.

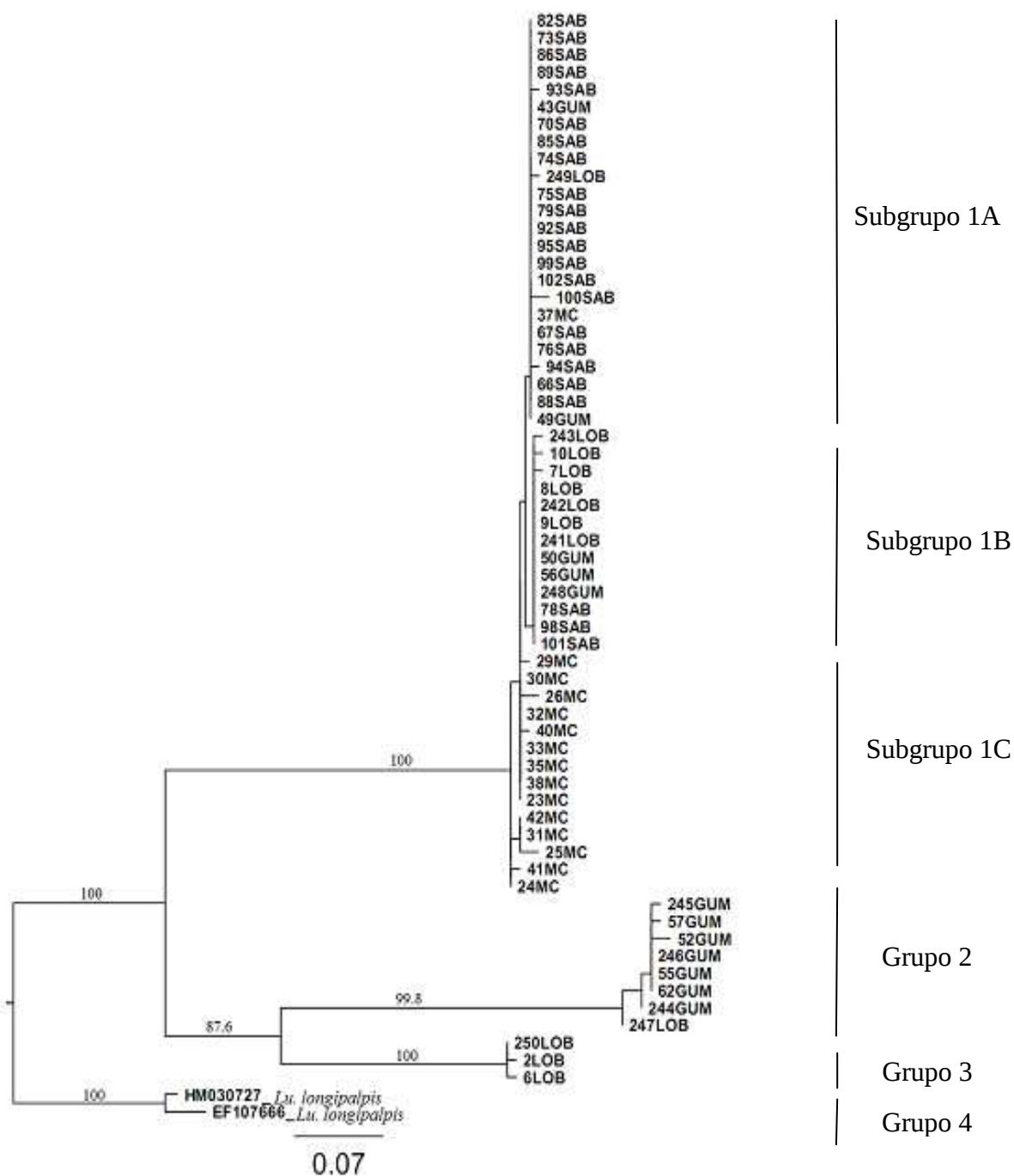


Figura 2. Árbol filogenético de máxima verosimilitud (MV; -lnL= 979.4185) inferido con base a 274 nucleótidos del 3' del *cyt b* de *Lu. cruciata* y dos individuos de *Lu. longipalpis* como grupo externo. Porcentaje de bootstrap en los nodos a partir de 500 replicas. La barra de la escala representa el número esperado de sustituciones de nucleótidos por sitio.

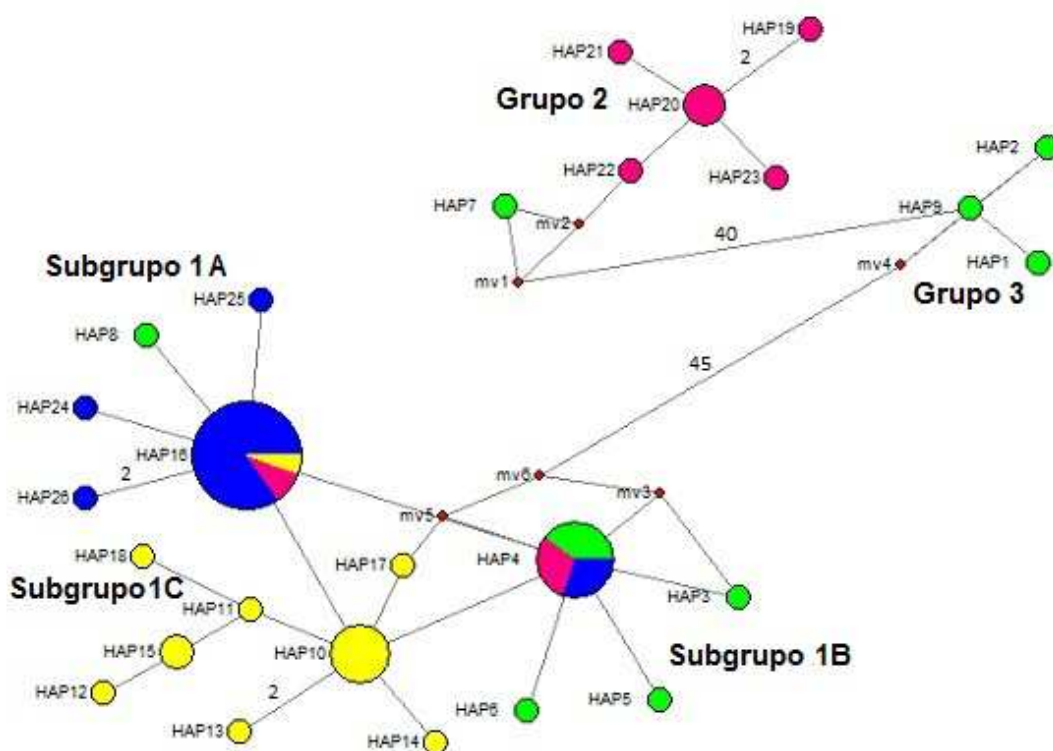


Figura 3. Red mínima de haplotipos de *Lu. cruciata* basados en 275 nucleótidos del 3' del *cyt b* de *Lu. cruciata*. Haplotipos: verde Loma Bonita; amarillo Nuevo Montecristo; rosa Guadalupe Miramar y azul San Antonio Buena Vista. Los círculos rojos representan haplotipos faltantes, los pasos mutacionales entre los haplotipos están representados por una línea (un paso mutacional), mientras que el número a lo largo de la línea indica el número de pasos mutacionales. El área del círculo de cada haplotipo es proporcional a la frecuencia de ese haplotipo en la muestra.