Biomédica 2002;22:499-509

ARTÍCULO ORIGINAL

Comparación cariotípica de cinco especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) de la serie *townsendi* grupo *verrucarum* en Colombia

Jesús Escovar [1], Cristina Ferro [2], Estrella Cárdenas [1], Felio Bello [1]

[1] Laboratorio de Investigaciones en Entomología, Biología Celular y Genética, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia.

[2] Laboratorio de Entomología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C. Colombia.

Con el propósito de establecer algunas características citogenéticas de cinco especies nativas de *Lutzomyia*, correspondientes a la serie *townsendi* del grupo *verrucarum*: *Lutzomyia longiflocosa*, *Lutzomyia quasitownsendi*, *Lutzomyia spinicrassa*, *Lutzomyia torvida* y *Lutzomyia youngi*, se llevó a cabo un estudio comparativo entre los cariotipos y su morfometría cromosómica. A partir de ganglios cerebrales de larvas de IV estadio, se prepararon los cromosomas mitóticos mediante la técnica de aplastamiento (*squash*) del tejido. Se efectuaron las mediciones cromosómicas, atendiendo los siguientes parámetros: brazo corto, brazo largo, relación de brazos, longitud total, longitud relativa, índice centromérico y longitud relativa promedio. Se clasificaron los cromosomas según su morfometría y posición del centrómero siguiendo patrones estandarizados. Se calculó la distancia taxonómica y con base en estos datos se separaron las especies y se ubicaron en un fenograma. Las cinco especies de flebótomos presentaron 4 pares de cromosomas, número diploide (2N=8), y el número fundamental fue de 16. En ninguno de los cariotipos se observó heteromorfismo sexual cromosómico. El análisis estadístico de los datos de morfometría cromosómica mostró diferencias altamente significativas entre los pares cromosómicos de las cinco especies. Sin embargo, la longitud total del genoma en los flebotómos fue muy similar, a excepción de *L. youngi.* En conclusión, las especies íntimamente relacionadas se lograron diferenciar a nivel citotaxonómico.

Palabras clave: *Lutzomyia*, serie *townsendi*, grupo *verrucarum*, cariotipos, morfometría cromosómica.

Karyotypic comparison of five species of *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) of the series *townsendi* and the *verrucarum* group in Colombia

Cytogenetic characteristics were established for five native species of phlebotomine sand flies *(Lutzomyia*, series *townsendi*, verrucarum group): *Lutzomyia longiflocosa*, *Lutzomyia townsendi*, *Lutzomyia spinicrassa*, *Lutzomyia torvida* and *Lutzomyia youngi*. Karyotypes and chromosomal morphometry were compared. Using the squash technique, brain tissues from late 4th instar larvae provided the necessary mitotic chromosomes. Chromosomal measurements were made on the following chromosomal characteristics: short arm, long arm, arm ratio, total length, relative length, centromeric index and relative length average of chromosomes. Chromosomes were classified according to their morphometry and position of the centromere. The taxonomic distance was calculated, and the relationships among the species displayed in a phenogram. All five species possessed four pairs of chromosomes as diploid number (2N=8). None of the karyotypes indicated presence of heteromorphic chromosomes. Statistical analysis of the morphometric data showed highly significant differences among the chromosomes pairs of the five species. However, the total length of the genome was very similar, with the exception of *L. youngi*. In conclusion, these closely related species were distinguishable at cytological level.

Key words: *Lutzomyia*, series *townsendi*, *verrucarum* group, karyotypes, chromosomal morphometric.

El grupo de flebótomos *verrucarum* (1,2) está constitutido por 28 especies distribuidas en tres series diferentes: *serrana*, *townsendi* y *verrucarum* (3-6). Estos insectos se encuentran en la mayor parte del neotrópico y son especialmente abundantes en áreas montañosas, donde las hembras de varias especies han sido incriminadas como vectores de *Leishmania* y *Bartonella bacilliformis* (7,8). La serie *townsendi*, a su vez, está conformada por 9 especies, las cuales se pueden diferenciar mediante algunas características morfológicas de los machos; las hembras son casi idénticas en forma y estructura (isomórficas) y es difícil separarlas taxonómicamente por características externas (5,9,10). Las especies de esta serie están distribuidas en Colombia, Venezuela y Costa Rica (10-12). En Colombia las especies que han sido registradas como pertenecientes a esta serie, con su correspondiente distribución local, son las siguientes: *Lutzomyia longiflocosa* Osorno, Morales, Osorno & Hoyos, en los departamentos de Huila y Tolima; *Lutzomyia quasitownsendi* Osorno, Osorno & Morales, en los departamentos de Boyacá y Santander; *Lutzomyia sauroida* Osorno, Morales & Osorno y *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno, Osorno & Hoyos en los departamentos de Boyacá y Norte de Santander; *Lutzomyia torvida* Young, Morales & Ferro en el departamento de Cundinamarca y *Lutzomyia youngi* Feliciangeli & Murillo, en los departamentos de Antioquia y Valle del Cauca (5,11). Las hembras de estas especies son altamente antropofílicas y agresivas y se encuentran en forma abundante en los cafetales. *L. spinicrassa* (12) y *L. youngi* (13), se han encontrado infectadas, en forma natural, con *Leishmania braziliensis* en Colombia y Ve-nezuela, respectivamente, en tanto que *L. longiflocosa* es considerada como el más probable vector en el foco de *L. braziliensis* en el departamento del Huila, Colombia (14,15); no hay información de las otras especies que permita establecer su papel vectorial.

Correspondencia:
Felio Bello, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia. Fax: 2868391
fbellog@atenea.lasalle.edu.co

Recibido: 01/07/02; aceptado: 13/11/02

En términos comparativos, los flebótomos han sido más estudiados desde el punto de vista de su bionomía, taxonomía, control, dispersión y competencia vectorial que a nivel citogenético. Carvalho *et al.,* en 1962 (16), fueron los primeros en estudiar el cariotipo de *Lutzomyia longipalpis* a partir de células de cerebro provenientes de larvas en estado prepupal. Los autores determinaron un número cromosómico diploide de 8, el cual fue, a su vez, confirmado por White y Killick-Kendrick (17). Posteriormente, con esta misma especie, que indudablemente ha sido la más estudiada, y con otras del Nuevo y Viejo Mundo, se han efectuado diversas investigaciones citogenéticas, tales como las desarrolladas por Bhat y Modi (18), Troiano (19), Kreutzer *et al.* (20,21), Yin *et al.* (22) y Jimenez *et al.* (23). El número cromosómico diploide de las especies estudiadas oscila entre 6 y 10 y, además, como característica notable se ha observado que los cariotipos están constituidos, principalmente, por pares de cromosomas homomórficos, aunque el dimorfismo sexual en el par 1 ha sido registrado como excepción en una especie (19).

Con el propósito de determinar y comparar las características del cariotipo de cinco especies de *Lutzomyia*, pertenecientes a la serie *townsendi* del grupo *verrucarum* (*L. longiflocosa*, *L. quasitownsendi, L. spinicrassa, L. torvida* y *L. youngi*), se efectuó un estudio morfométrico de los cromosomas en cada una de ellas. El presente estudio informa por primera vez las características cariotípicas de estas especies, excepto para *L. spinicrassa*, cuyo cariotipo fue registrado en 1987 por Kreutzer *et al.* (20).

Materiales y métodos

Muestras biológicas

Se utilizaron larvas de IV estadio correspondientes a cada una de las especies seleccionadas de flebótomos, obtenidas a partir de muestras criadas en el Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud de Colombia, las que a su vez fueron recolectadas de diferentes lugares del país: *L. longiflocosa* del municipio de Baraya, Huila; *L. quasitownsendi* del municipio de Barbosa, Santander; *L. spinicrassa* del municipio de Durania, Norte de Santander; *L. torvida* de la vereda

Platanal, inspección de policía Reventones, municipio de Anolaima, Cundinamarca y *L. youngi* de Mateguadua, municipio de Tuluá, Valle del Cauca (Laboratorio de Entomología, Instituto Nacional de Salud de Colombia, Bogotá, D.C.).

Preparación de cromosomas

Las larvas en estado prepupal correspondientes a cada una de las especies se procesaron individualmente de acuerdo con el procedimiento descrito, con algunas modificaciones, por Kreutzer *et al.* (20). Las larvas se pasaron por una solución de colchicina al 0,1% durante 5 horas, previo al proceso de disección de cada espécimen, el cual se efectuó en solución de citrato de sodio al 1% con la ayuda de una aguja entomológica. Para ello, se separó la cabeza del resto del cuerpo y el contenido de la cápsula cefálica se removió por presión y se llevó a una láminilla con una gota de fijador Carnoy (tres partes de metanol y una parte de ácido acético); luego, se adicionó a la preparación una gota del colorante orceína lacto-acética y se dejó actuar por 30 minutos. Se colocó una lámina sobre el micropreparado y se procedió a efectuar una presión fuerte con el dedo pulgar sobre el conjunto laminilla-lámina (*squash*). Las mejores metafases se fotografiaron con un microscopio Olympus BX-60 con sistema microfotográfico PM-PBK-3. Las mediciones estándar para cada uno de los cromosomas se realizaron directamente sobre las láminas con ocular micrométrico a 1.000X. En promedio, se realizaron 40 láminas por cada especie y se obtuvieron de 20 a 150 metafases para cada una de éstas y la mayoría (80%) se analizaron.

Morfometría cromosómica y análisis de datos

Se seleccionaron 30 metafases de cada una de las especies, las cuales se obtuvieron individualmente a partir de tejidos de cerebro de larvas de IV estadio, en las que se pudo establecer la morfología de los pares cromosómicos de cada cariotipo; se efectuaron, también, las siguientes mediciones directas: brazo corto (p), brazo largo (q) y longitud total (LT); luego se calcularon las indirectas: relación de brazos (p/q y q/p); longitud relativa (LR), que correspondió a la longitud total de cada cromosoma sobre la longitud total del genoma; índice centromérico (IC), el cual se encontró midiendo la relación del brazo corto de cada cromosoma sobre la longitud total del mismo y, finalmente, la longitud relativa promedio de los cromosomas (LRPC), que se registró al relacionar la longitud total de cada cromosoma sobre la longitud del cromosoma más pequeño del genoma (24). Se siguieron los patrones establecidos por Zimmerman y Shivonnen, Levan *et al.* y Ospina de Dulce (25-27) para clasificar los cromosomas (cuadro 1). A los datos directos se les aplicaron los parámetros de estadística descriptiva, los cuales incluyeron: tamaño de la muestra, promedio, desviación estándar, valores mínimos y máximos observados, intervalo de confianza del 95% y el coeficiente de variación. Las diferencias entre la longitud de cada cromosoma para las cinco especies de flebótomos, incluidas en este estudio, se determinaron mediante un análisis de varianza de una vía. A los datos de longitud total del genoma se les realizó una prueba de comparación múltiple de promedios Student-Newman-Keuls, a partir de los cuales se establecieron los grupos promedios homogéneos con un 95% de confianza (28). Se tomaron 36 caracteres (medidas directas e indirectas) de los cromosomas correspondientes a cada una de las cinco especies de *Lutzomyia*, a los cuales se les aplicó el coeficiente de distancia taxonómica promedio (DTM), cuya fórmula es la siguiente:

$$DTM = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n} (X_{ij} - X_{ik})^2}{n} \right]^{1/2}$$

donde Xij es el valor del carácter i en la OTUj; Xik, el valor del carácter i en la OTUk; N el número de caracteres, y OTU, unidad taxonómica operativa.

Con los datos de distancia taxonómica se construyó el fenograma, usando la técnica de ligamiento promedio no ponderado, UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) (29,30). Para el cálculo se utilizó el programa NTSYS 2.0.

Resultados

Número cromosómico

En el estudio cariotípico, las cinco especies de *Lutzomyia* exhibieron cuatro pares de cromosomas

como número diploide (2N=8). El número fundamental fue de 16. En ninguna de estas especies se observó heteromorfismo sexual cromosómico. En general, se observa el número y la morfología del cariotipo de cada una de las especies (figura 1).

Longitudes cromosómicas

El cuadro 2 muestra los promedios de las longitudes cromosómicas del cariotipo de cada una de las especies de flebótomos; mientras que el cuadro 3 aporta la estadística descriptiva para los valores de las mediciones directas de los cromosomas atendiendo a los parámetros de p, q y LT. En forma similar se registra la estadística descriptiva para los datos de la longitud total del genoma en cada uno de los flebótomos incluidos en el estudio (cuadro 4). El análisis de varianza de una vía, aplicado a los datos directos de los cromosomas para las especies de *Lutzomyia*, produjo, en la mayoría de los resultados, diferencias altamente significativas (cuadro 5). La prueba de Student-Newman-Keuls, al 95% de confianza, aplicada a los valores de la longitud total del genoma de cada uno de los cariotipos de las especies, determinó dos grupos homogéneos de promedios: uno constituido por *L. youngi* y el otro por *L. longiflocosa*, *L. quasitownsendi*, *L. spinicrassa* y *L. torvida.* La figura 2 muestra el

Cuadro 1. Clasificación de los pares cromosómicos en el cariotipo de las cinco especies de flebótomos incluidas en el estudio, de acuerdo con los rangos establecidos por tres autores, los cuales se relacionan en la parte inferior del presente cuadro.

Especie		Levan *et al.*	Zimmerman y Shivonnen	de Dulce
L. longiflocosa	Par 1	Submetacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
	Par 2	Metacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
	Par 3	Metacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico
	Par 4	Metacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico
L. quasitownsendi	Par 1	Metacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
	Par 2	Metacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico
	Par 3	Metacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico
	Par 4	Metacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico
L. spinicrassa	Par 1	Submetacéntrico	No clasifica	Subtelocéntrico
	Par 2	Submetacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
	Par 3	Metacéntrico	Metacéntrico	Metacéntrico
	Par 4	Metacéntrico	Metacéntrico	Metacéntrico
L. torvida	Par 1	Submetacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
	Par 2	Submetacéntrico	Submetacéntrico	Submetacéntrico
	Par 3	Metacéntrico	Metacéntrico	Metacéntrico
	Par 4	Metacéntrico	Metacéntrico	Metacéntrico
L. youngi	Par 1	Submetacéntrico	No clasifica	Subtelocéntrico
	Par 2	Metacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico
	Par 3	Metacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico
	Par 4	Metacéntrico	Submetacéntrico	Metacéntrico

Clasificación	Levan *et al.* - q/p	Zimmerman y Shivonnen - q/p	Ospina de Dulce - IC
Metacéntrico	1,0 - 1,7	1	0,5 - 0,4
Submetacéntrico	1,7 - 3,0	1,1 - 2	0,4 - 0,3
Subtelocéntrico	3,0 - 7,0	**	0,3 - 0,2
Acrocéntrico	7,1	2,1	0,2 - 0,05
Telocéntrico	**	**	Menos de 0,05

** No hay clasificación

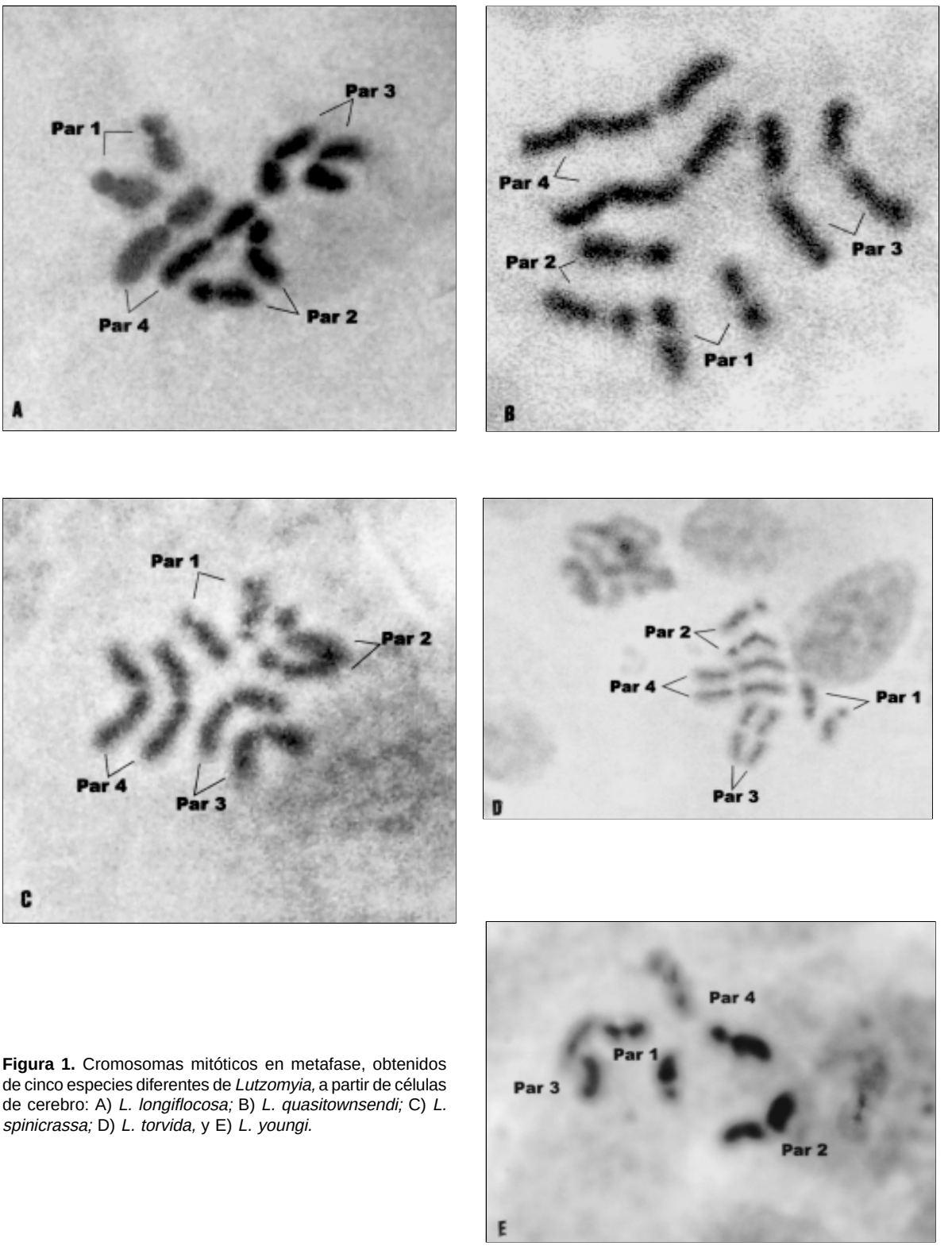

Figura 1. Cromosomas mitóticos en metafase, obtenidos de cinco especies diferentes de *Lutzomyia,* a partir de células de cerebro: A) *L. longiflocosa;* B) *L. quasitownsendi;* C) *L. spinicrassa;* D) *L. torvida,* y E) *L. youngi.*

Cuadro 2. Promedio de las longitudes cromosómicas para cada una de las especies de *Lutzomyia* incluidas en el estudio. p: brazo corto, q: brazo largo, LT: longitud total, LG: longitud total del genoma, LR: longitud relativa, r: relación de brazos, IC: índice centromérico, LRPC: longitud relativa promedio de los cromosomas.

Especies	Cromosomas	p	q	LT	LG	LR	q/p	p/q	IC	LRPC
	Par 1	1.80± 1.2	3.45± 1.4	5.73± 1.5	29.38	0.20	1.97	0.52	0.33	1.00
Lu. longiflocosa	Par 2	2.42± 1.8	3.94± 1.3	6.43± 1.2	29.38	0.22	1.65	0.62	0.38	1.18
	Par 3	3.13± 1.5	4.28± 1.6	7.52± 1.0	29.38	0.26	1.42	0.73	0.41	1.39
	Par 4	4.66± 1.4	4.99± 2.0	9.70± 1.8	29.38	0.33	1.09	0.93	0.48	1.78
	Par 1	1.97± 1.1	3.00± 1.0	5.04± 1.8	30.36	0.17	1.59	0.68	0.39	1.00
Lu. quasitownsendi	Par 2	3.10± 1.5	3.91± 1.2	7.06± 1.5	30.36	0.23	1.26	0.82	0.44	1.42
	Par 3	3.73± 1.6	4.49± 1.4	8.30± 1.4	30.36	0.27	1.20	0.85	0.45	1.68
	Par 4	4.06± 2.0	5.84± 1.8	9.97± 2.4	30.36	0.33	1.43	0.73	0.41	2.01
	Par 1	1.34± 1.2	3.92± 1.5	5.34± 1.0	29.45	0.18	2.90	0.35	0.25	1.00
Lu. spinicrassa	Par 2	2.35± 1.3	4.06± 1.4	6.49± 1.4	29.45	0.22	1.73	0.60	0.37	1.23
	Par 3	3.71± 1.9	3.74± 2.1	7.54± 2.1	29.45	0.25	1.01	0.99	0.49	1.42
	Par 4	4.97± 2.0	5.03± 2.3	10.08± 2.0	29.45	0.34	1.01	0.99	0.49	1.91
	Par 1	1.64± 1.1	3.36± 1.6	5.08± 1.1	28.78	0.18	2.09	0.49	0.32	1.00
Lu. torvida	Par 2	2.12± 1.3	3.88± 1.5	6.08± 1.0	28.78	0.21	1.89	0.56	0.35	1.21
	Par 3	3.69± 1.2	3.76± 2.0	7.53± 1.2	28.78	0.26	1.02	0.98	0.49	1.50
	Par 4	4.96± 1.7	5.06± 1.9	10.09± 2.3	28.78	0.35	1.02	0.98	0.49	2.01
	Par 1	1.01± 1.0	2.94± 1.4	4.15± 2.0	24.42	0.17	2.98	0.34	0.24	1.00
Lu. youngi	Par 2	2.24± 1.1	3.10± 1.6	5.42± 1.8	24.42	0.22	1.42	0.74	0.41	1.35

Cuadro 3. Estadística descriptiva para las mediciones directas correspondientes a las cinco especies de *Lutzomyia* analizadas.

		Par 1		Par 2		Par 3		Par 4	
Long	Especie	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
p	*L. spinicrassa*	1,34	0,31	2,35	0,56	3,7	1,2	5,0	1,7
	L. longiflocosa	1,80	0,44	2,42	0,44	3,1	0,8	4,7	1,3
	L. quasitownsendi	1,97	0,60	3,10	0,71	3,7	0,9	4,1	0,9
	L. torvida	1,64	0,31	2,12	0,47	3,7	0,6	5,0	0,8
	L. youngi	1,01	0,25	2,24	0,47	2,8	0,4	3,9	0,6
q	*L. spinicrassa*	3,92	1,21	4,06	1,27	3,7	1,2	5,0	1,7
	L. longiflocosa	3,45	0,56	3,94	0,75	4,3	0,6	5,0	1,3
	L. quasitownsendi	3,00	0,83	3,91	1,15	4,5	1,4	5,8	1,9
	L. torvida	3,36	0,50	3,88	0,60	3,8	0,6	5,1	0,8
	L. youngi	2,94	0,52	3,10	0,66	3,7	0,8	4,3	0,6
LT	*L. spinicrassa*	5,34	1,50	6,49	1,76	7,5	2,3	10,1	3,4
	L. longiflocosa	5,73	1,79	6,43	1,06	7,5	1,3	9,7	2,6
	L. quasitownsendi	5,04	1,25	7,06	1,73	8,3	2,2	10,0	2,7
	L. torvida	5,08	0,71	6,08	0,83	7,5	1,2	10,1	1,6
	L. youngi	4,15	1,00	5,42	0,92	6,6	1,1	8,3	1,2

Long: longitudes cromosómicas, p: brazo corto, q: brazo largo, LT: longitud total

idiograma del complemento cromosómico diploide para cada una de las especies.

Clasificación de los cromosomas

Con los datos directos y teniendo en cuenta la posición del centrómero, los cromosomas del cariotipo para cada una de las especies se clasificaron así: *L. longiflocosa*, pares 1, 2 y 3 submetacéntricos y par 4 metacéntrico; *L. spinicrassa*, par 1 subtelocéntrico, par 2 submetacéntrico y 3 -4 metacéntricos; *L. torvida* 1-2 submetacéntricos y 3-4 metacéntricos;

Cuadro 4. Estadística descriptiva para la longitud total del genoma correspondiente a las cinco especies de flebótomos analizadas.

Especie	Tamaño muestra	Promedio	DE	IC 95%		Valores observados		Coef. de variación
				Lim. inf.	Lim. sup.	Mín.	Máx.	
L. spinicrassa	30	29,45	8,29	23,52	35,38	22,24	46,00	28,15
L. longiflocosa	30	29,38	5,13	26,98	31,79	23,12	45,52	17,46
L. quasitownsendi	30	30,36	6,99	27,09	33,64	18,88	45,52	23,03
L. torvida	30	28,78	3,57	27,11	30,45	19,04	34,64	12,41
L. youngi	30	24,42	3,11	22,96	25,88	19,44	31,52	12,75

Cuadro 5. Niveles de significancia para la comparación intracariotípica de las longitudes cromosómicas directas entre especies de *Lutzomyia* incluidas en el estudio, determinados mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Cromosoma	Longitud	Nivel de significancia	
Par 1	p	0,00	**
	q	0,00	**
	LT	0,01	**
Par 2	p	0,00	**
	q	0,01	**
	LT	0,00	**
Par 3	p	0,00	**
	q	0,07	NS
	LT	0,03	*
Par 4	P	0,01	**
	q	0,01	**
	LT	0,09	NS

** p≤0,01: existen diferencias altamente significativas
* 0,01<p≤0,05: existen diferencias significativas
NS: p>0,05: no existen diferencias significativas

L. quasitownsendi todos submetacéntricos y, finalmente, *L. youngi* con par 1 subtelocéntrico y los restantes clasificados como submetacéntricos.

La clasificación de los cromosomas del cariotipo en cada una de las especies, siguiendo los parámetros establecidos por Zimmerman y Shivonnen, Levan *et al.* y Ospina de Dulce (25-27) se registra en el cuadro 1.

La figura 3 muestra el fenograma con la correspondiente ubicación de las especies, de acuerdo con la DTM y el método UPGMA. Las especies *L. longiflocosa* y *L. youngi* formaron un grupo cuya distancia taxonómica fue de 24,4; *L. spinicrassa* está separada del grupo anterior a 33,6 unidades de distancia taxonómica; *L. quasitownsendi* y *L. torvida* forman un grupo alejado de las tres anteriores especies a una distancia taxonómica de 177,9 unidades.

Discusión

El número cromosómico diploide 2N=8, establecido para las cinco especies estudiadas, fue consistente con el resultado previo de *L. spinicrassa* (20) y de otras especies de flebótomos del Nuevo Mundo que han sido analizadas citogenéticamente, a excepción de *Lutzomyia trapidoi*, cuyo número diploide fue de 6 (21). Sin embargo, entre las especies de flebótomos del Viejo Mundo estudiadas cariotípicamente, se ha podido observar que el número diploide es mucho más amplio, situándose en el rango de 2N=6 y 2N=10; además, en una de estas especies, *Phlebotumus perniciosus*, analizada por Troiano en 1982 (19), se estableció en el cariotipo la presencia de un par de cromosomas heteromórficos sexual X y Y. Esta situación corrobora el hecho, previamente señalado por Kreutzer *et al.* (20), que *Phlebotomus* es cromosómicamente un género más polimórfico que *Lutzomyia*. El heteromorfismo cromosómico puede indicar una mayor variabilidad entre los dos sexos, debido a que existe un número mayor de genes implicados en la diferenciación de éstos, lo cual se refleja no sólo en la parte morfológica y fisiológica sino también en el comportamiento sexual (31). En mosquitos, al igual que en flebótomos, el heteromorfismo cromosómico sexual no es una característica común para todas las especies y sólo se ha registrado en la subfamilia *Anophelinae*, cuyas especies exhiben un cromosoma X más grande que el Y, siendo este último mayoritariamente heterocromático (31).

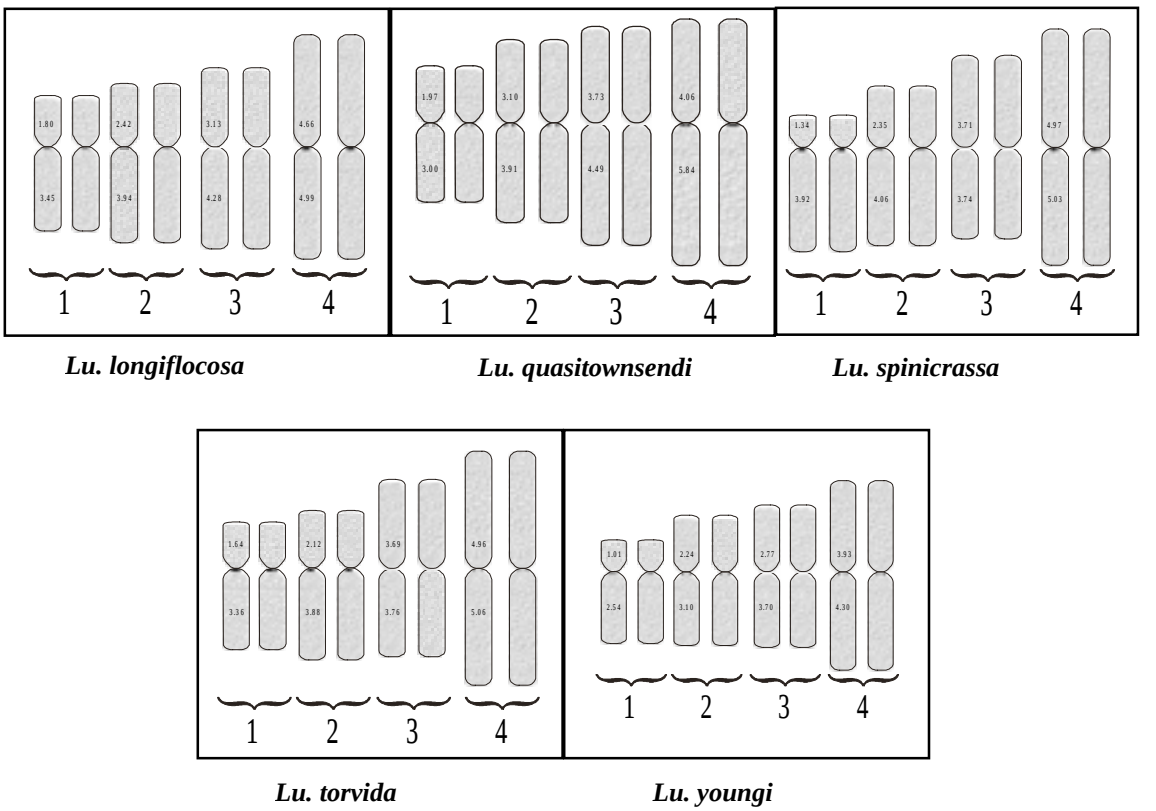

Figura 2. Idiogramas de las cinco especies del género *Lutzomyia*.

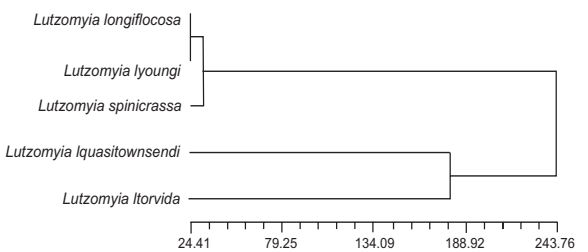

Figura 3. Fenograma de las relaciones entre cinco especies de *Lutzomyia*, basado en la distancia taxonómica promedio y el método UPGM.

Los valores promedio de la longitud total del genoma en cuatro de las cinco especies estudiadas fueron cercanos entre sí, situándose en el rango de 28,78 mμ para *L. torvida* a 30,36 mμ para *L. quasitownsendi*; no obstante, entre *L. longiflocosa* y *L. spinicrassa* estos valores fueron casi coincidentes, siendo de 29,38 mμ y 29,45 mμ , respectivamente; sin embargo, *L. youngi* difiere en este parámetro de medición cromosómica respecto a las anteriores especies, debido a que presenta un tamaño significativamente menor, el cual correspondió a 24,42 mμ. Al aplicar la prueba de Student-Newman-Keuls a estos datos, se pudieron establecer dos grupos homogéneos de promedios, uno representado por *L. youngi* y el otro por las demás especies incluidas en el estudio. Estos resultados permitieron establecer una tendencia homogenizante de los cariotipos de las especies, en cuanto a longitud total del genoma, a excepción de *L. youngi* que constituyó un grupo aparte. Otra situación interesante en el análisis citotaxonómico la constituyó el fenograma de las distancias taxonómicas (figura 3), que mostró un grupo más alejado con respecto a las demás especies, integrado por *L. quasitownsendi* y *L. torvida* y, contrariamente a lo sucedido con los resultados de la longitud total del genoma, *L. youngi* quedó asociada con *L. longiflocosa* y también relativamente cerca de *L. spinicrassa*, lo cual indica el poder discriminatorio de esta

herramienta en la interrelación de las especies de una misma taxa, mostrándonos unos organismos más similares que otros. Estos resultados fueron obtenidos por la asociación de todas las mediciones, directas e indirectas, de los cariotipos seleccionados y, lógicamente, en concordancia con la DTM y el método UPGMA. Intracariotípicamente, el análisis estadístico asociado con las medidas directas de brazo corto, brazo largo y longitud total (cuadro 5) mostraron diferencias altamente significativas para cada uno de los pares cromosómicos de las especies y sólo en los datos del brazo corto del par 3 y longitud total del par 4 no se registraron tales diferencias, siendo consistentes estos resultados con la tendencia a mostrar la separación de las especies.

En términos generales, la aplicación de los análisis estadísticos a los datos morfométricos reflejaron, por un lado, la globalización y poca diferenciación de las especies en los tamaños del genoma y, por el otro, la separación de las mismas al utilizar los datos directos de las mediciones cromosómicas y el fenograma de distancia taxonómica.

Los valores de las longitudes cromosómicas se pueden asociar con la cantidad de ADN nuclear en cada una de las especies de insectos analizados. Rao y Rai (32) encontraron una correlación significativa entre la longitud cromosómica y el contenido de ADN nuclear de 36 especies de mosquitos; observaron que la longitud total de los cromosomas varía de 8,4 mμ en *Anopheles quadrimaculatus* a 38,3 mμ en *Aedes zoosophus,* correspondiendo, a su vez, a los valores mínimo y máximo de 0,24 pg y 1,90 pg, respectivamente, en núcleos haploides de las células de testículos de pupas, los cuales fueron determinados por citometría Feulgen.

Para *L. spinicrassa*, cuyo cariotipo había sido estudiado previamente por Kreutzer *et al.* (20), hubo coincidencias en la clasificación de sus cromosomas, debido a que en el anterior trabajo y en éste se establecieron las mismas denominaciones, de acuerdo con los valores directos de las mediciones de los brazos y las posiciones de los centrómeros, es decir, el par 1 fue subtelocéntrico, el 2, submetacéntrico y los pares 3 y 4, metacéntricos. Sin embargo, en los valores de la longitud total del genoma hubo diferencias significativas, siendo mayor este parámetro en el presente trabajo, que correspondió a 29,45 mμ, en tanto que en el informe previo había estado en un valor de 23 mμ. Estas diferencias pudieron deberse a tres factores: 1) los parámetros de medición y los diferentes estados de condensación de los cromosomas en las metafases analizadas; 2) la utilización de cepas de la especie, aunque colombianas, de origen diferente, y 3) el tiempo de longevidad de las colonias que puede haber dado lugar a una mayor tasa de endogamia y, consecuentemente, a rearreglos cromosómicos (33) que pudieron haber incidido en una mayor longitud del genoma.

El análisis interespecífico en la clasificación directa de los cromosomas demuestra que las especies presentaron distintos cariotipos; por lo menos, difieren entre sí en la clasificación de un par de cromosomas. No obstante, según los parámetros de clasificación establecidos por los tres autores seleccionados (25-27), observamos (cuadro 1) lo siguiente: para Levan *et al.*, el cariotipo de *L. longiflocosa* fue similar al de *L. youngi* y el cariotipo de *L. spinicrassa* fue similar al de *L. torvida.* Por su parte, en Zimmerman y Shivonnen, el cariotipo de *L. longiflocosa* fue similar al de *L. quasitownsendi* y para de Dulce, el cariotipo de *L. longiflocosa* fue similar al de *L. torvida.* No se puede esperar que haya una coincidencia total entre los autores antes mencionados, debido a que los rangos y parámetros establecidos por cada uno de ellos para clasificar los cromosomas son distintos; sin embargo, resulta significativo el hecho de que en cada autor se haya podido equiparar, en términos de igualdad, por lo menos, la clasificación del cariotipo de una especie con respecto a otra, indicándonos los nexos que se establecen citogenéticamente en esta serie de especies.

En un trabajo previo, Kreutzer *et al.* (4), con datos obtenidos de isoenzimas, establecieron las relaciones genéticas de diez especies de *Lutzmoyia* del grupo *verrucarum* y encontraron que *L. longiflocosa*, *L. quasitownsendi* y *L. sauroida,* a diferencia de las otras especies analizadas, eran poblaciones locales de una misma especie. Para

el caso de las dos primeras especies, que también fueron incluidas en el presente trabajo, hubo aproximación entre ellas en los valores de la longitud total del genoma, que coincidieron en la misma agrupación, al igual que *L. torvida* y *L. spinicrassa*; también fueron similares en la clasificación de sus cariotipos, de acuerdo con los parámetros establecidos por Zimmermann y Shivonnen (25); sin embargo, no ocurrió lo mismo al asociar todos los caracteres, correspondiendo *L. longiflocosa y L. quasitownsendi* a grupos distintos en el fenograma y tampoco fue coincidente esta agrupación con el análisis genético previo antes mencionado. Los resultados evidencian la particularidad de cada herramienta metodológica para el enfoque y análisis en la definición taxonómica de las especies que, como en el presente caso, están estrechamente relacionadas, siendo necesario complementar estos estudios con otros en los que se utilicen simultáneamente varios marcadores con un poder mayor de discriminación para determinar los análisis taxonómicos y filogenéticos.

En resumen, podemos afirmar que en términos de clasificación y morfometría cromosómica, las especies estudiadas, correspondientes a la serie *townsendi* del grupo *verrucarum,* pudieron ser diferenciadas, aunque fuertemente relacionadas citotaxonómicamente y unas más cerca que otras.

Agradecimientos

A Marco Fidel Suárez del Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud por el apoyo y colaboración brindados en el suministro del material biológico. A Colciencias (Código: 1243-04-179-95), la Universidad de La Salle y el Instituto Nacional de Salud por la financiación del presente trabajo.

Referencias

1. **Theodor O.** On the classification of American Phlebotomine. J Med Entomol 1965;2:171-97.

2. **Martins AV, Williams P, Falcao AL.** American sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Rio de Janeiro, Brazil: Academia Brasileira Ciencias; 1978.

3. **Feliciangeli D, Conrado A, Ward R**. Phlebotomine sand flies in Venezuela: review of the *verrucarum* species group (in part) of *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) with description of a new species from Lara. J Med Entomol 1992;29:729-44.

4. **Kreutzer RD, Palau MT, Morales A, Ferro C, Feliciangeli D, Young DG.** Genetic relationships among phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in the *verrucarum* species group. J Med Entomol 1990;27:1-8.

5. **Young DG, Duncan.** Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst. No. 54. Gainesville: Associated Publishers; 1994.

6. **Young DG, Arias J.** Phlebotomine sand flies in the Americas. Paper No. 33. Washington: Pan American Health Organization; 1991.

7. **Grimaldi G Jr, Tesh RB.** Leishmaniasis in the New World: Current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev 1993;3:230-50.

8. **Schultz MG.** A history of bartonellosis (Carrion's disease). Am J Trop Med Hyg 1968;17:503-15.

9. **Tesh RB, Guzmán H.** Sand flies and the agents they transmit. In: Beaty BJ, Marquardt WC, editors. The biology of disease vectors. Boulder, CO: University Press of Colorado; 1996. p.117-27.

10. **Feliciangeli MD, Murillo J.** *Lutzomyia youngi* (Diptera: Psychodidae), a new phlebotominae sand fly previously misidentified as *L. townsendi* in endemic foci of cutaneous leishmaniasis in Venezuela and Costa Rica. J Med Entomol 1987;24:141-6.

11. **Wolff M.** Flebotomíneos en el departamento de Antioquia: informe de la presencia de nuevas especies para la región. Entomólogo 1996;22:2-6.

12. **Young DG, Morales A, Kreutzer RD, Alexander JB, Corredor A, Tesh RB.** Isolations of *Leishmania braziliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatide) from cryopreserved Colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1987;24:587-9.

13. **Saravia NG, Holguín AF, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A.** Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. Am J Trop Med Hyg 1985;34:714-20.

14. **Santamaría E, Castillo M, Cárdenas R, Bello F, Ayala M, Ferro C.** Transmisión experimental de *Leishmania braziliensis* a hamster por picadura de *Lutzomyia longiflocosa* (Diptera: Psychodidae) provenientes de un foco endémico en la zona cafetera colombiana. Médicas UIS 1998;12:279-84.

15. **Pardo R, Ferro C, Lozano G, Lozano CA, Cabrera OL, Davies C.** Flebotómos (Diptera: Psychodidae) vectores de leishmaniasis cutánea y sus determinantes ecológicos en la zona cafetera del Huila. Memorias, XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, 1999. p.147-62.

16. **Carvalho HC, Falcao A, Schreiber G.** Cariotipo dos *Phlebotomus*. Cienc Cult (Sao Paulo) 1962;14:38.

17. **White GB, Killick-Kendrick R.** Polytene chromosome of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and the cytogenetics

of Psychodidae in relation to other Diptera. J Entomol 1975;50:187-96.

18. **Bhat UKM, Modi B.** Karyotype of the sand fly *Phlebotomus papatasi*. Curr Sci 1976;45:265-6.

19. **Troiano G.** The karyotype of *Phlebotomus perniciosus* with some observations on cytogenetics of *Phlebotominae* in relation to the other Psychodidae. Parassitologia (Rome) 1982;24:231-6.

20. **Kreutzer RD, Modi GB, Tesh RB, Young DG.** Brain cell karyotypes of six species of New and Old World sand flies (Diptera: Psychodidae). J Med Entomol 1987;24: 609-12.

21. **Kreutzer RD, Morales A, Cura E, Ferro C, Young DG.** Brain cell karyotypes of six New World sand flies (Diptera: psychodidae). J Am Mosq Cont Assoc 1988;4: 453-5.

22. **Yin H, Mutebi JP, Marriott S, Lanzaro GC.** Metaphase karyotypes and G-banding in sand flies of the *Lutzomyia longipalpis* complex. Med Vet Entomol 1999;13:72-7.

23. **Jiménez ME, Bello FJ, Ferro C, Cárdenas E.** Brain cell karyotype of the phlebotomine sand fly *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). Mem do Inst Oswaldo Cruz 2001;96:379-80.

24. **Hernández C, Reyes E, Rodríguez J, Olano V, Morales A, Bello F.** Comparación citogenética de *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) en cepas representativas de dos poblaciones colombianas. Biomédica 2000;20:218-27.

25. **Zimmerman EG, Shivonnen G.** Chromosomal banding pattern and idiogram of the cotton rat *Sigmodon arizonae* (Rodentia: Muridae). Chromosoma 1973;41:85-91.

26. **Levan A, Fredga K, Sanaberg A.** Nomenclature for centromeric positions on chromosomes. Heredita 1964; 52:201.

27. **Ospina De Dulce B.** Parámetros utilizados en la clasificación de los cromosomas. En: García BE**.** Estudio citotaxonómico de los peces *Nematobrycon palmeri* y *Nematobrycon lacotei* (tesis). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 1980.

28. **Dowinie NM, Health RW.** Métodos estadísticos. Barcelona, España: Editorial Harla; 1973. p.365-70.

29. **Sokal R, Sneath PHA.** Principles of numerical taxonomy. San Francisco: Ed. Freemann WH; 1963. p.359.

30. **Crisci JV, López MF.** Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Washington, D.C.: Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico; 1983. p.132.

31. **Clements AN.** The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction. London: Chapman & Hall; 1992.

32. **Rao PN, Rai KS.** Genome evolution in the mosquitoes and other closely related members of superfamily *Culicoidea.* Hereditas 1990;113:139-44.

33. **Munstermann L.** Care and maintenance of *Aedes* mosquito colonies. In: Crampton JM, Beard CB, Louis C, editors. The molecular biology of insect disease vectors. A methods manual. London: Chapman & Hall; 1997. p.13-20.

34. **Adamson RE, Chance ML, Ward RD, Feliciangeli D, Maingon RDC.** Molecular approaches applied to the analysis of sympatric sand fly populations in endemic areas of Western Venezuela. Parassitologia 1991;33:48-51.

35. **Pérez S.** Diferenciación morfométrica de las hembras de la serie *townsendi* del grupo *verrucarum* presentes en Colombia en los focos de leishmaniasis cutánea (tesis). Bogotá: Universidad de La Salle; 1996.

36**. Añez N, Valenta D, Cazorla D, Quicke D, Feliciangeli MD.** Multivariate analysis to discriminate species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae): *Lutzomyia townsendi*, *L.* s*pinicrassa* and *L. youngi.* J Med Entomol 1997;34:312-6.