



ARTÍCULO ORIGINAL

DNA BARCODE: UNA HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Lutzomyia* spp. A PARTIR DE LARVAS

María Angélica Contreras-Gutierrez¹, Rafael Vivero Gómez²,
Sandra Uribe Soto³

^{1,2}Estudiantes de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia, GSM-PECET, Universidad de Antioquia. ³ Profesora Asociada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Coordinadora GSM.

Introducción

Las especies del género *Lutzomyia* França 1924 (L.) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) son de gran importancia en el contexto de la salud pública, siendo vectores reconocidos de protozoos del género *Leishmania* (Le.) Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), agente causal de la leishmaniasis, además se destaca su papel en la transmisión de arbovirus (familias Bunyaviridae, Reoviridae y Rhabdoviridae) y bacterias (Killick-Kendrick 1990, Brazil y Brazil 2003, Munstermann 2005, WHO 2010).

Ante el alto registro de casos y comportamiento endémico de la leishmaniasis en Colombia (INS 2012) se hacen necesarios estudios básicos de biología, taxonomía y presencia de estos insectos, los cuales constituyen el principal factor de riesgo para la transmisión (Travi et al. 1996, Davies et al. 2000, Parras et al. 2012). En estos estudios, la identificación a nivel de especie del vector se realiza con base en caracteres morfológicos presentes en el adulto (Young y Duncan 1994).

Generalmente las encuestas entomológicas son incompletas al no incluir información de inmaduros y particularmente larvas, por la dificultad de encontrarlos en la naturaleza, dado su tamaño pequeño, escasa movilidad y el hábitat donde se desarrollan, que incluye principalmente sitios ricos en materia orgánica; así mismo, no se cuenta a la fecha con claves taxonómicas para su identificación (Baitone 2003, Brazil y Brazil 2003, Alencar 2011, Vivero 2011).

En este sentido, validar una técnica de diagnóstico molecular precisa y costo efectiva para distinguir las especies de flebotomíneos, como apoyo a la taxonomía, es de gran utilidad en los casos en los cuales la morfología del adulto presenta limitaciones como en las especies con hembras similares o isomórficas y en el caso de las larvas que aunque hasta hace poco, eran difíciles o casi imposibles de encontrar, han empezado a incluirse en los resultados de los estudios entomológicos, gracias a la implementación de metodologías de obtención y procesamiento de muestras de suelo y uso de algunos aspectos que podrían considerarse como “marcadores ecológicos” (Rangel 1996, Dujardin 1999, Uribe 1999, Azpurua et al. 2010, Alencar, 2011, Cohnstaedt et al. 2011, Vivero 2011).

Este trabajo integra los resultados de la implementación de la metodología de búsqueda de inmaduros con la evaluación de la metodología DNA barcode para inmaduros y adultos provenientes de la zona cafetera de Colombia, permitiendo avanzar en la identificación de especies de *Lutzomyia* para el país.

Metodología

Colecta de especímenes

Los especímenes se colectaron en 9 localidades de los departamentos de Antioquia, Caldas, Risaralda, Quindío y Valle del Cauca (Tabla 1). Las colectas de flebotomíneos se realizaron durante 2010 y 2011 en plantaciones de café, bosques de galería cerca a los cafetales y domicilios próximos a este tipo de cultivos.

La metodología empleada fue la captura de adultos con trampas de luz tipo CDC, trampa Shannon y búsqueda en sitios de reposo. Para la recuperación de larvas y pupas, se muestrearon madrigueras, hojarasca debajo arbustos de café, corteza y sustrato en bases de árboles, sustrato en huecos de árboles y suelo entre raíces de árboles, los cuales aparecen como criaderos naturales. Se implementaron dos metodologías (Baitone 2003, Feliciangeli 2004, Alencar 2011), con algunas modificaciones (Vivero et al. 2011) para el aislamiento de los inmaduros. El primer método consistió en la búsqueda directa de estados inmaduros, a partir de una muestra de cada sustrato extraído y el segundo método empleado fue la incubación del sustrato orgánico.

Los ejemplares adultos obtenidos fueron transportados al laboratorio, donde fueron procesados así: se fragmentaron separando la cabeza, el tórax y los segmentos terminales del abdomen. El tórax y las patas se almacenaron a -20°C para la extracción de ADN y el resto del ejemplar fue procesado para la identificación morfológica tradicional con las claves de Young y Duncan (1994) y verificación por el especialista, Dr.

Charles Porter. El respaldo taxonómico de cada ejemplar permanece en láminas conservadas como espécimen de colección de referencia después de asignarle un código de identificación.

Las larvas fueron preservadas secas, y posteriormente, se separó la cápsula cefálica y últimos segmentos abdominales del tórax, este último fue preservado para el procesamiento molecular, y el resto del espécimen fue almacenado como espécimen voucher.

Tabla 1. Sitios de Colecta de flebotomíneos en áreas de influencia cafetera en la Región Andina colombiana durante los años 2010 a 2011.

	Municipio	Mes y año de colecta	Altitud msnm	Coordenadas	
				Norte	Oeste
Antioquia	Jardín	Marzo 2012	2376	05° 35' 3,8"	75° 46' 5,4"
	Jericó	Abril 2011	1423,8	5° 48' 49,17"	75° 47' 58.141"
Caldas	Salamina	Junio 2010	1613,5	5°22'50"	75° 29' 47"
		Octubre 2010	1590,36	5° 22'51"	75° 29' 48"
		Febrero 2011	1820	5° 22'34.6"	75° 29'22.81"
	Chinchiná	Octubre 2010	1300	4° 59'34"	75° 35'55"
	Chinchiná	Septiembre 2011	1467,64	4° 59'28"	75° 35'24"
Risaralda	Pueblo Rico	Enero 2012	817,76	5° 17'08.317"	76° 04'05.019"
	Pueblo Rico	Enero 2012	1004,35	5° 16'42.135"	76° 3'43.168"
Quindío	Quimbaya	Septiembre 2011	970	4° 34' 08"	75° 51' 03"
Valle del Cauca	Alcalá	Abril 2010	1206,45	4° 42'05"	75° 47'27"

Obtención de secuencias código de barras en adultos e inmaduros

El ADN total de cada muestra (tórax de adultos fue extraído) utilizando Qiagen® DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Chatsworth, California). La PCR para amplificar la región 5' del gen mitocondrial COI se realizó siguiendo el protocolo estándar de código de barras (Hebert et al. 2003).

Análisis de secuencias

Los cromatogramas obtenidos se editaron con BioEdit (Hall 1999) para generar la secuencia consenso de cada espécimen. Las secuencias de ADN fueron alineadas con la herramienta Clustal W, incorporado a MEGA v5.0 software (Tamura et al. 2011) Para determinar la identidad del fragmento obtenido (región 5' COI), las secuencias se contrastaron con genomas mitocondriales de otros insectos usando BLAST-N (Altschul et al. 1997).

La divergencia de las secuencias dentro y entre los individuos se calculó usando el modelo de distancia Kimura dos parámetros (K2P) (Kimura 1980). Un dendrograma de distancias K2P Neighbor-Joining (NJ) fue generado para proporcionar una representación gráfica del patrón de agrupamiento entre las distintas secuencias correspondientes a adultos y las obtenidas a partir de larvas (Saitou y Nei 1987). Todas las secuencias obtenidas estarán disponibles en la plataforma de BOLD Systems (<http://www.boldsystems.org>), proyecto "Phlebotominae Barcoding Initiative - PBIN".

Criterio de delimitación de especies adulto-inmaduro

Para asignar las secuencias de larvas a un grupo de secuencias procedentes de adultos con identidad morfológica establecida previamente se establecieron como medida de confianza dos criterios: 1) Los límites de especies basados en las secuencias de adultos, rango divergencia intraespecífica 0 - 6% e interespecífica 9 - 26,7%, (Contreras 2013). Al incluir las secuencias de larvas al análisis, se espera que un rango variabilidad intraespecífica entre 0% y 6% con la secuencia de referencia del adulto. 2) En el dendrograma de NJ, si el soporte de bootstrap del MOTU en cual se incluyen las secuencias de larvas con una secuencia de referencia de adulto fue alto, >95%, se le asignará el ID de especie.

Resultados y discusión

Los genes de todos los especímenes adultos y larvas fueron amplificados exitosamente usando los primers LCO y HCO. En total 91 secuencias de adultos pertenecientes a 22 especies morfológicamente identificadas fueron obtenidas como código de barras de ADN (Contre-

ras 2013). El conjunto de secuencias obtenidas constituyeron la librería de referencia usada para asignar larvas a especies conocidas. A su vez, se obtuvieron 7 secuencias de larvas colectadas en este estudio. Todas las secuencias amplificadas (98) constituyen el fragmento 5' del gen mitocondrial COI con una longitud de 700 pb. A lo largo de las secuencias no se observaron inserciones, supresiones o codones de parada.

Las divergencias nucleotídicas se determinaron a los niveles intra e interespecífico aplicando el modelo de Kimura dos parámetros (K2P). En este estudio se utilizó la menor y la mayor distancia intraespecífica e interespecífica en lugar de la media (Meier et al. 2008). La distribución de las distancias genéticas de las secuencias DNA barcode de adultos entre (0 - 6%), e inter (9 - 26,7%) especies reveló que no se superponen, lo cual evidencia la presencia de "barcode gap" como criterio de corte e indicador de variación genética entre las especies (Hebert et al. 2004, Meyer y Paulay 2005). Este "gap" se crea debido que la mutación es más frecuente que la especiación, por lo tanto los linajes diversifican más rápidamente entre las especies, que dentro de las especies (Pons et al. 2006)

La identificación morfológica y la asignación molecular en adultos fueron congruentes, los códigos de barras de ADN realizaron identificaciones inequívocas hasta el nivel de especie para los 91 especímenes (Figura 1).

Un total de 7 larvas de cuarto instar se aislaron a partir de dos tipos de criaderos, termitero (n=2, Códigos TECASA) y hueco de árbol (n=5, Códigos SCHA).

Las larvas se identificaron morfológicamente como pertenecientes al género *Lutzomyia* por poseer dos pares de setas caudales en el último segmento abdominal. Las secuencias de larvas fueron asignadas a especie, basados en la librería de secuencias de adultos colectados en zona cafeteras, usando los criterios descritos en la metodología. El rango de porcentaje de divergencia observada entre las secuencias de larvas fue de 0 a 1% (Tabla 2), distancias que corresponden a una misma especie según el límite de delimitación de especies definido por las secuencias de adultos (Contreras 2013). El número de haplotipos caracterizados para las secuencias de larvas fue de 3 (Tabla 3). En relación a las diferencias en términos de número y tipo de sustituciones entre los diferentes haplotipos a lo largo del alineamiento, los resultados evidencian 7 posiciones variables y los cambios nucleótidos son en su mayoría sustituciones sinónimas tipo transiciones (purina por purina y pirimidina por pirimidina) en las terceras posiciones.

Los rangos de distancias K2P se evaluaron en las secuencias de las larvas donde no fue posible su identificación

a nivel de especie. En este sentido, los valores de distancias genéticas K2P intraespecíficas permitieron asociar las secuencias de larvas no identificadas con *Lu. columbiana* (0 - 0.7%), a diferencia de lo que se observa con el resto de secuencias de adultos, con divergencias entre 14,9 y 23 % (Tabla 4), lo cual sugiere asignar el status taxonómico de ID especie de las secuencias de las larvas a la especie en mención. En el dendrograma de Neighbor-Joining (NJ) se observan MOTUS con valores significativos de bootstrap (>90), que corresponden a una misma especie determinada morfológicamente (Figura 1). Al incluir en el análisis secuencias de larvas, estas se ubican en el MOTU de *Lu. columbiana* con un soporte de bootstrap de 100%, lo cual sustenta la asignación de ID especie.

El patrón de divergencia nucleotídica junto con el dendrograma NJ permiten deducir que el método de DNA barcode es efectivo para Phlebotominae de la zona cafetera colombiana. Por lo tanto, se utilizó este conjunto de secuencias de DNA barcode para la identificación molecular de la 7 larvas secuenciadas identificándolas como *Lu. columbiana*.

Tabla 2. Porcentajes de divergencia intraespecífica bajo el modelo Kimura 2 parámetros, entre secuencias nucleotídicas parciales del gen Citocromo Oxidasa I, de larvas colectados en zona cafetera

Código de la secuencia		1	2	3	4	5	6
1	MA100_LarvaTECASA01_06						
2	MA101_LarvaTECASA01_07	0,60%					
3	MA102_LarvaSCHA053_10	0,40%	1,00%				
4	MA104_LarvaSCHA053_16	0,00%	0,60%	0,40%			
5	MA105_LarvaSCHA053_19	0,60%	0,00%	1,00%	0,60%		
6	MA106_LarvaSCHA053_21	0,60%	0,00%	1,00%	0,60%	0,00%	
7	MA107_LarvaSCHA053_23	0,00%	0,60%	0,40%	0,00%	0,60%	0,60%

Tabla 3. Número de haplotipos con secuencias COI para adultos en el presente estudio.

Nº Hap.	Nº de secuencias	Haplotipos de larvas de la secuencia COI
Hap_1:	4	[MA100_LarvaTECASA01_ MA104_LarvaSCHA053_1 MA107_LarvaSCHA053_2 MA92]
Hap_2:	3	[MA101_LarvaTECASA01_ MA105_LarvaSCHA053_1 MA106_LarvaSCHA053_2]
Hap_3:	1	[MA102_LarvaSCHA053_1]

Nº Hpl. Número de haplotipos. Los códigos dentro [] corresponden a un mismo haplotipo

Tabla 4. Valores de distancia genética a nivel interespecífico según el modelo K2P, entre secuencias larvas y adultos colectados en zona cafetera.

Especie adultos	Rango de divergencia distancia k2P larva vs adulto	
	% Mínimo	% Máximo
<i>Brumptomyia beaupertuyi</i>	18,9	20,1
<i>Brumptomyia guimaresi</i>	18,4	19,5
<i>Lutzomyia bifoliata</i>	17,4	18,5
<i>Lutzomyia carpenteri</i>	19,8	20,8
<i>Lutzomyia carrerai thula</i>	18,4	19,2
<i>Lutzomyia columbiana</i>	0,0	0,7
<i>Lutzomyia gomezi</i>	16,4	18,9
<i>Lutzomyia hartmanni</i>	17,1	18,5
<i>Lutzomyia lichyi</i>	19,5	20,4
<i>Lutzomyia nuneztovari</i>	15,5	16,4
<i>Lutzomyia panamensis</i>	18,0	19,6
<i>Lutzomyia pia</i>	14,9	16,4
<i>Lutzomyia scorzai</i>	16,0	19,2
<i>Lu. (Helcocyrtomyia) sp. 1</i>	19,4	20,1
<i>Lutzomyia shannoni</i>	18,1	18,8
<i>Lutzomyia sordelli</i>	16,5	17,3
<i>Lutzomyia trapidoi</i>	18,1	19,2
<i>Lutzomyia triramula</i>	16,9	18,0
<i>Lutzomyia walkeri</i>	17,1	18,0
<i>Lutzomyia youngi</i>	15,5	16,2
<i>Lutzomyia yuilli</i>	18,2	19,1
<i>Warileya rotundipennis</i>	21,7	23

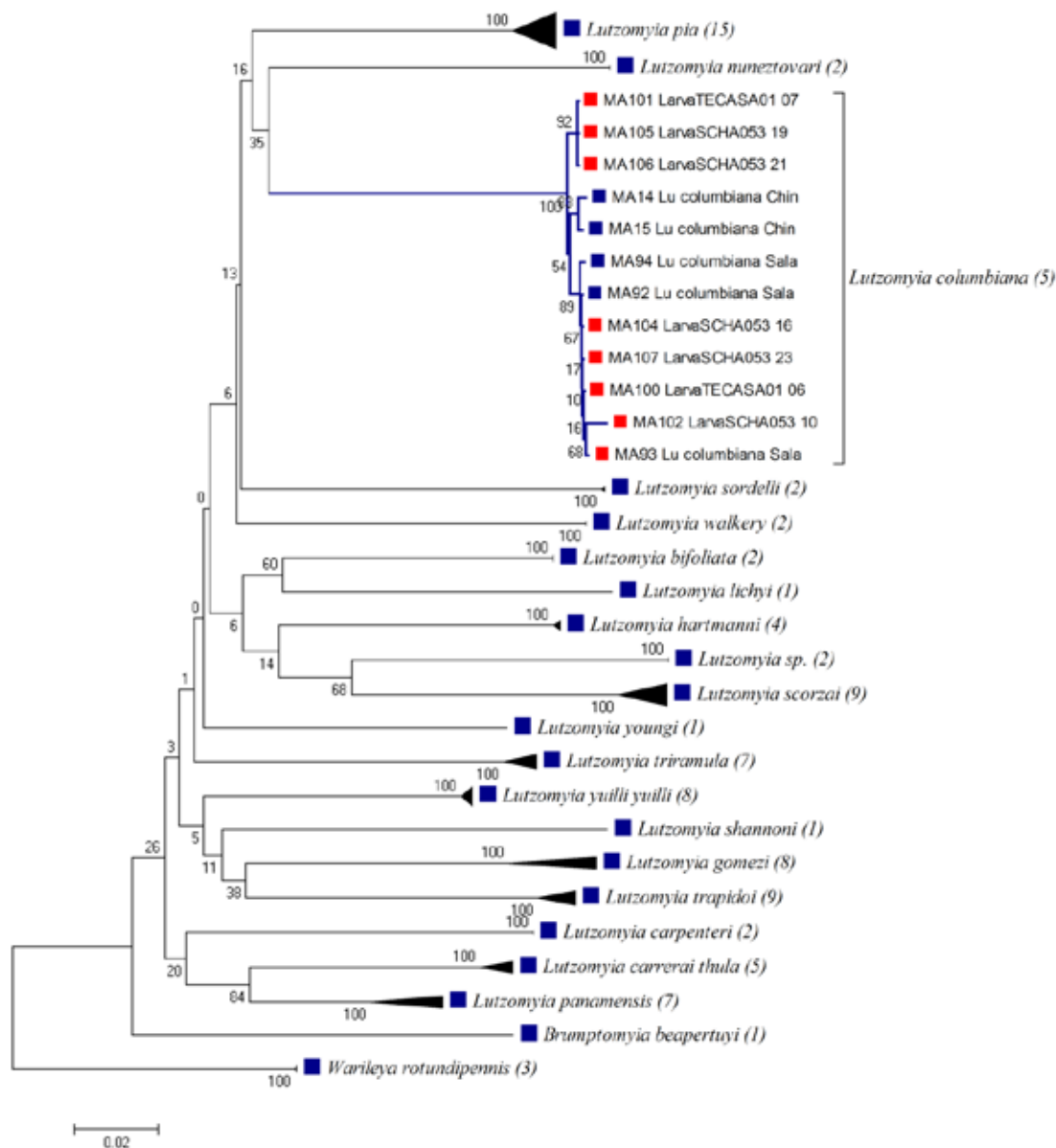


Figura 1. Dendrograma consenso Neighbor-Joining de las secuencias DNA barcode - COI de adultos y larvas porcentajes con valores bootstrap de 1000 réplicas. MA-números se refieren a números de muestra. Soportes de nodos que se muestran en las ramas indicado como porcentaje de bootstrap >95%). ■Secuencias de adulto, ■secuencias de larvas, valores en paréntesis corresponden al número de secuencias de adultos.

Conclusiones

El patrón de divergencia nucleotídica junto con el dendrograma permiten deducir que el método de DNA barcode es efectivo para Phlebotominae de la zona cafetera colombiana. Por lo tanto, se utilizó este conjunto de secuencias de DNA barcode para la identificación molecular de la 7 larvas secuenciadas. Este es el primer estudio donde se evalúa la iniciativa código de barras de ADN en larvas de flebotomíneos en zona cafetera de Colombia. Consideramos que la región de códigos de barras COI para ser un marcador robusto para diferenciar especies de flebotomíneos. En consecuencia, podemos ampliar los estudios de Phlebotominae, que se han centrado principalmente en la etapa adulta, para incluir estadios larvales, información valiosa para los estudios epidemiológicos.

Referencias

Alencar RB, de Queiroz RG, Barrett TV. 2011. Breeding sites of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) and efficiency of extraction techniques for immature stages in terra-firme forest in Amazonas state, Brazil. *Acta Tropica* 118: 204-208.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Resources* 25: 3389-3402.

Azpurua J, De La Cruz D, Valderrama A, Windsor D. *Lutzomyia*. 2010. Sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. *PLoS*

Neglected Tropical Disease 4(3): e627.

Baitone R. 2003. Criadouros naturais de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em floresta de terra-firme na vila do Pitinga, estado do Amazonas. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. INPA Universidade Federal do Amazonas UFAM. 203 p.

Brazil RP, Brazil BG. 2003. Bionomia: Biología de flebotomíneos neotropicales. En: Rangel EF, Lainson R. (eds). *Flebotomíneos do Brasil*. Río de Janeiro: Editora Fiocruz. Pp. 257-274.

Cohnstaedt LW, Beati L, Caceres A, Ferro C, Munstermann LE. 2011. Phylogenetics of the Phlebotomine Sand Fly Group *Verrucarum* (Diptera: Psychodidae: *Lutzomyia*). *American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84(6): 913-922.

Contreras MA. 2013. *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) en zonas cafeteras de la región andina colombiana: taxonomía e importancia médica. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Medellín, Colombia. 235 p.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de Saúde Pública* 16(4): 925-950.

Dujardin F, Pont E, Bianchi Galati EA. 1999. Cryptic speciation suspected by morphometry within *Lutzomyia runoides*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322(5): 375-382.

- Feliciangeli MD. 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 18(1): 71-80.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: 313-321.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2: 1657-1668.
- Instituto Nacional de Salud - INS. 2012. Programa de Enfermedades de Transmisión Vectorial. Informe sobre leishmaniasis en Colombia. *Sivigila; Años 2019-2010. Semana* 45.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolution* 15: 111-120.
- Killick-Kendrick R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology* 4: 1-24.
- Meyer CP, Paulay G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PloS Biology* 3: 2229-2238.
- Munstermann LE. 2005. Phlebotomine sand flies, the Phlebotomidae. En: *Biology of disease vectors* M. R. Quardt WC (Ed). Elsevier Academic Press. Pp. 141 -151.
- Parras MA, Rosa JR; Szelag EA; Salomón OD. 2012. Identification of the natural breeding sites of sandflies (Diptera: Phlebotomidae: Phlebotominae), potential vectors of leishmaniasis, in the province of Chaco, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107(4): 550-552.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Durand DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD, Vogler T. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595-606.
- Rangel EF, Lainson R, Souza AA, Ready P, Azevedo ACR. 1996. Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato (Diptera: Phlebotomidae: Phlebotominae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 43-50.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Travi BL, Montoya J, Gallego J, Jaramillo C, Llano R, Vélez ID. 1996. Bionomics of

Lutzomyia evansi (Diptera: Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. Journal Medical Entomological 33(3): 278-285.

Uribe S 1999. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94: 729-734.

Vivero RJ. 2011. Caracterización de criaderos naturales y composición de flebotomíneos en áreas con transmisión de leishmaniasis en ecosistemas de bosque húmedo y bosque seco tropical en Colombia. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. Medellín.

WHO Expert Committee. 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. WHO Tech Report Serie 949:1-186.

Young D, Duncan M. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico the West Indies, Central and South America (Diptera:Psychodidae). Memoirs of the American Entomological Institute, Gainesville. 881 p.