



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

VARIABILIDAD GENÉTICA Y PREVALENCIA DE *LEISHMANIA MEXICANA* EN
Bichromomyia olmeca olmeca (Diptera: Psychodidae) EN UN ÁREA ENDÉMICA DE
MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

SILVIA ELENA PASOS PINTO

DIRECTOR DE TESIS
DRA. INGEBORG D. BECKER FAUSER FACULTAD
DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA PATRICIA TATO ZALDIVAR †
FACULTAD DE MEDICINA

CD. MX. noviembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres, Jorge C. Pasos Capetillo y María Elena Pinto Achach, quienes me han apoyado siempre en todos los proyectos que he realizado, me han guiado y aconsejado con respeto y amor.

A mi compañero de vida Carlos Gutiérrez Sosa, gracias por compartir la vida conmigo, mis logros son tuyos también, gracias por tu apoyo, paciencia y amor. Te amo.

A mis hijas Zarité y Maricarmen ustedes son la fuerza que me impulsa a seguir y me dan ánimos para superar todos los obstáculos, son la luz de mi vida las amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Extiendo mis más sinceros agradecimientos a mi tutora, la Dra. Ingeborg Becker Fauser perteneciente a la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Centro de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México por su orientación, apoyo incondicional, estímulo y confianza brindados durante el desarrollo de esta investigación.

Agradezco enormemente el apoyo y ayuda brindada por mis amigos y colegas de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Centro de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la Dra. Miriam Berzunza Cruz, la Dra. Alma Escalante, a la Dra. Laura Sánchez García, al Dr. Sokani Sánchez Montes, a la Dra. Berenice Martínez, al Dr. Arturo Wilkins y del Instituto Nacional de Medicina Tropical, Ministerio de Salud de la Nación, CONICET, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina a la Mtra. en Ciencias Angélica Pech May. Les estoy eternamente agradecida por toda la ayuda que me brindaron.

A mis tutores el Dr. Enrique Ortega Soto del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por sus consejos y aportaciones a este proyecto. A la Dra. Patricia Tato Zaldívar QEPD.

A mi tutor externo el Dr. Eduardo Rebollar Téllez de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, por su apoyo en las colectas de campo, por sus consejos, enseñanzas y por tu amistad mil gracias.

Mis agradecimientos a quienes colaboraron en la obtención de las muestras, al Mto en Ciencias Emigdio May Uc, Biol. Alberto Rosado, al Mto en Ciencias David Moo Llanes.

Mis agradecimientos a todo el personal de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Centro de Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, a los técnicos y compañeros gracias por sus consejos y apoyo que ayudaron a darle forma y estructura a este trabajo y a todos los que de alguna manera colaboraron.

Agradezco al proyecto CONACYT 221405, y a los proyectos PAPIIT IN217515 y PAPIIT IN211418 por el apoyo en la elaboración de esta tesis.

RESUMEN

La Leishmaniasis es endémica en el sureste de México, donde diferentes especies de flebotomíneos están infectados con *Leishmania mexicana* Biagi. La especie *Bichromomyia olmeca olmeca* es uno de los vectores más abundantes y dominantes en esta región (Vargas y Díaz-Najera). Se analizó la variabilidad genética de *Bichromomyia olmeca olmeca* y la prevalencia de infecciones de *Leishmania mexicana* en un foco endémico: el ejido 20 de junio (Mancolona), en Campeche, México, en donde se reportan casos de leishmaniasis a lo largo del año. Se llevó a cabo el análisis de la diversidad genética de un fragmento de 270 pb de la región terminal 3' del gen mitocondrial citocromo b en 102 individuos hembra de *Bichromomyia olmeca olmeca*, revelando 17 haplotipos. La diversidad nucleotídica, así como el índice de polimorfismo nucleotídico fueron bajos. Las pruebas de neutralidad y Mismatch mostraron la población en expansión. La prevalencia de *Leishmania mexicana* fue de 24.5% de 102 hembras analizadas. Este es el primer estudio sobre la diversidad genética en *Bichromomyia olmeca olmeca* en la región de Campeche, México, e igualmente provee información nueva sobre las altas tasas de infección que se observaron a finales de la estación de sequía, en el mes de Julio, lo que no había sido reportado con anterioridad, ya que altas tasas de infección solo se habían observado durante la estación de lluvias en ésta región (Noviembre).

ABSTRACT

Leishmaniasis are endemic in southwestern Mexico, and different sand fly species are infected with *Leishmania mexicana* Biagi. One of the most abundant vectors and dominant species is *Bichromomyia olmeca olmeca* (Vargas and Díaz-Nájera). We analyzed the genetic variability of *Bichromomyia olmeca olmeca* and the prevalence of *Leishmania mexicana* infections with an endemic focus: “the Ejido 20 de Junio” (Manicolona), Campeche, Mexico, where patients with leishmaniasis are reported throughout the year. Genetic diversity analysis of 102 sequences of a 270-bp fragment of the 3' end of mitochondrial cytochrome *b* (*cyt b*) gene of *Bichromomyia olmeca olmeca* revealed 17 haplotypes. The nucleotide diversity and nucleotide polymorphism index were low. The neutrality test and Mismatch test showed population expansion. Prevalence of *Leishmania mexicana* was 24.5% in 102 females analyzed. This is the first study showing the genetic diversity of *Bichromomyia olmeca olmeca* sand flies in the Campeche region of Mexico, and also provides novel information on the high infection rate of *Bichromomyia olmeca olmeca* by *Leishmania mexicana*. Our finding of high sand fly infection rates during the end of the dry and hot weather of July enriches the literature because high infection rates had been reported only during the rainy season (November) in the region.

Contenido

INTRODUCCION.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS PARTICULARES.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Área de Estudio.....	12
Captura de Flebotomíneos.....	14
Procesamiento e Identificación de los Especímenes.....	15
Extracción de DNA.....	15
Amplificación por PCR y Secuenciación.....	17
Análisis de los Datos.....	18
RESULTADOS.....	20
Polimorfismo en secuencias de <i>Bichromomyia olmeca olmeca</i>	20
Pruebas de neutralidad.....	21
Filogenia de <i>Bichromomyia olmeca olmeca</i>	22
Tasas de infección y picadura de <i>Bichromomyia olmeca olmeca</i>	22
DISCUSION.....	25
CONCLUSIONES.....	29
LITERATURA CITADA.....	29

Lista de Figuras

Figura 1. Ubicación geográfica del Ejido 20 de Junio (triángulo rojo) en el estado de Campeche. También se muestran los haplotipos encontrados.	14
Figura 2. Distribución mismach entre diferencias pareadas entre haplotipos de <i>Bichromomyia olmeca olmeca</i> del Ejido 20 de Junio.	23
Figura 3. Árbol Inferencia Bayesiana (BI) para 270 nucleótidos de la terminal 3' del gen citocromo b (cyt b) de <i>Bichromomyia olmeca olmeca</i> del Ejido 20 de Junio inferido usando el modelo GTR.....	24

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es endémica en el sureste de México. El primer registro científico del parásito data de 1912 (Seidelin, 1912), que comenzó con la explotación del exudado o látex del árbol *Manilkara zapota* (Chicozapote), utilizado para la fabricación de goma de mascar en la Península de Yucatán (Beltrán y Bustamante, 1942). *Leishmania mexicana* Biagi fue identificada como el agente etiológico de la úlcera del chiclero (Biagi, 1953; Garnham, 1962). Los vectores de leishmania del nuevo mundo, son pequeños dípteros hematófagos de la subfamilia Phlebotominae de Psychodidae (Young y Arias, 1991). En México el flebotomíneo *Bichromomyia olmeca olmeca* (Vargas y Díaz-Najera) es uno de los principales vectores de *Leishmania mexicana* (Biagi et al. 1965; Rebollar-Téllez et al. 1996; Sánchez-García et al. 2010; Pech-May et al. 2010; 2016). Estudios realizados en la Península de Yucatán, demostraron que al menos otras cuatro especies son vectores de Leishmania: *Psychodopygus panamensis* Shannon, *Lutzomyia cruciata* Coquillet, *Psathyromyia shannoni* Dyar y *Lutzomyia ylephiletor* Fairchild y Hertig (Rebollar-Téllez et al. 1996; Sánchez-García et al. 2010; Pech-May et al. 2010; 2016). *Bichromomyia olmeca olmeca* es una de las especies más abundantes en Campeche (Andrade-Narváez et al. 2003; Pech-May et al. 2010; 2016), Quintana Roo (Cruz-Ruiz et al. 1994; Sánchez-García et al. 2010; May-Uc et al. 2011; Mendez-Pérez y Rebollar-Téllez 2012) y Yucatán (González et al. 2010; Mendes-Pérez y Rebollar-Téllez 2012). En México los flebotomíneos también están presentes en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz (Ibañez-Bernal 2002; Rebollar-Téllez et al. 2004; 2005) Varios estudios han

confirmado que en estado silvestre *Bichromomyia olmeca olmeca* hospeda *Leishmania mexicana* (Rebollar-Téllez et al 1996; Sánchez-García et al. 2010; Pech et al. 2010; 2016). En los ambientes selváticos locales, se cree que los flebotomíneos están estructurados en poblaciones locales asincrónicas que se dispersan para colonizar nuevos nichos, por lo tanto, facilitando que el parásito esté en contacto con nuevas poblaciones y así infectarlas (Wilson y Benjamin 1980; Hanski y Gilpin 1997).

El uso de metodología molecular, en especial la secuenciación de DNA, ha influenciado profundamente la taxonomía de los flebotomíneos (Harley 2009), así como ayudado a inferir las relaciones filogenéticas y el análisis de la diversidad genética (Hodgkinson et al 2002; 2003; Torgerson et al. 2003). El DNA mitocondrial se ha usado como marcador para la reconstrucción de filogenias de especies y de eventos historia demográfica, en donde se ha demostrado ser una herramienta poderosa. También se ha demostrado su utilidad en el estudio de taxa cercanamente relacionados y de poblaciones de una especie, esto debido a su muy baja tasa de recombinación, herencia materna, estructura conservada, tamaño poblacional efectivo reducido y tasa de mutación relativamente rápida (Mirol et al. 2008). El citocromo b en flebotomíneos exhibe altas tasas de mutación haciéndolo una herramienta muy útil para estudios a nivel intra-poblacional (Esseghir et al., 1997; Ishikawa et al., 1999; Hodgkinson et al., 2002). La terminal 3' del gen mitocondrial citocromo b posee una elevada tasa de diversidad nucleotídica por lo que ha probado ser suficientemente variable en especies de flebotomíneos por lo que ha sido utilizado exitosamente en varias especies como

Lutzomyia cruciata (Pech-May et al. 2013), *Lutzomyia whitmani* (Ishikawa et al., 1999), *Lutzomyia longipalpis* (Hodgkinson et al., 2002; 2003, Coutinho-Abreu et al. 2008), *Lutzomyia umbratilis* (Scarpassa and Alencar 2012), *Phlebotomus papatasi* (Esseghir et al., 1997; Parvizi et al., 2003; Parvizi y Ready, 2006; Hamarsheh et al., 2007). Estos estudios han demostrado que la variación genética y la divergencia poblacional en flebotomíneos está asociada a múltiples factores tales como el clima (Ready et al., 1997, 1998), distancia (Hodgkinson et al., 2003; Hamarsheh et al., 2007), diferencias en latitud y altitud (Ready et al., 1998; Hodgkinson et al., 2002, 2003; Hamarsheh et al., 2007), modificación del hábitad (Ishikawa et al., 1999) y barreras geográficas (Moin-Vaziri et al., 2007; Barón et al., 2008; Coutinho-Abreu et al., 2008; Franco et al., 2010).

JUSTIFICACION

Los individuos de *Bichromomyia olmeca olmeca* en el Ejido 20 de Junio (Mancolona) coexisten en áreas de alta transmisión de leishmaniasis cutánea, donde se ha encontrado que esta especie naturalmente está infectada con *Leishmania mexicana*. Se desconoce si la diversidad genética local del vector está asociado a la alta transmisión. El análisis de la diversidad genética es importante para el manejo del vector y el entendimiento de la dinámica de la enfermedad.

HIPÓTESIS

La alta transmisión de leishmaniasis por *Bichromomyia olmeca olmeca* en el Ejido 20 de Junio, Campeche, se asocia con la diversidad genética del vector.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la diversidad genética del vector *Bichromomyia olmeca olmeca* y la prevalencia de la infección por *Leishmania mexicana* en un foco endémico, donde pacientes con leishmaniasis fueron reportados durante todo el año.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar polimorfismos en citocromo B de *Bichromomyia olmeca olmeca* colectadas en el Ejido 20 de Junio.
- Estimar la neutralidad en la población de *Bichromomyia olmeca olmeca*.
- Estimar la filogenia de *Bichromomyia olmeca olmeca* en el Ejido 20 de Junio.
- Determinar las tasas de infección y picadura de *Bichromomyia olmeca olmeca* colectadas en el Ejido 20 de Junio, así como la relación entre ambas.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El Ejido 20 de Junio, se encuentra dentro de la Reserva de la Biosfera de Calakmul, la cual se localiza a 350 km de la capital del estado de Campeche. La región es atravesada por una cadena de pequeñas elevaciones, o mesetas bajas

cuya elevación van de entre 100 a 350 m sobre el nivel del mar. El principal tipo de suelo son las rendzinas (Pérez-Salicrup 2004). La precipitación anual va de 1,400 a 900 mm, con alta evaporación y pocas fuentes permanentes de agua superficial. La región se caracteriza por presentar principalmente dos tipos de vegetación, selva mediana subperenifolia, que se distingue porque entre el 25 y el 50 % de sus especies de árboles pierden sus hojas en la época de sequía, su altura varía de entre 5 a 25 metros con diámetros no mayores a 50 cm (Sarukhán 1968; Basáñez et al. 2008). Y la selva baja subperenifolia se caracteriza por árboles bajos no mayores a 15 metros, generalmente con los troncos muy torcidos y delgados (Díaz-Gallegos et al. 2002; Dzib-Castillo et al. 2014). Uno de los rasgos característicos es que su composición incluye especies que toleran condiciones de inundación (Palacio-Aponte et al. 2002; Romero-Montero y Ellis 2016). El área es endémica para leishmaniasis cutánea, con un alto índice de la enfermedad en el estado, con aproximadamente 50 casos reportados anualmente (Hernández-Rivera et al. 2015).

El Ejido 20 de Junio (Mancolona) se localiza a $18^{\circ}06'52''$ S; $89^{\circ}48'30.76''$ W; 190 m sobre el nivel del mar (Fig. 1). El uso principal de estas tierras es el cultivo en pequeñas parcelas, a donde los agricultores se transportan a pie, en bicicleta o a caballo por brechas estrechas dentro de la selva. Por lo que se cree que la transmisión de la leishmaniasis ocurre principalmente a lo largo de estos caminos y en las parcelas (Pech-May et al. 2010).

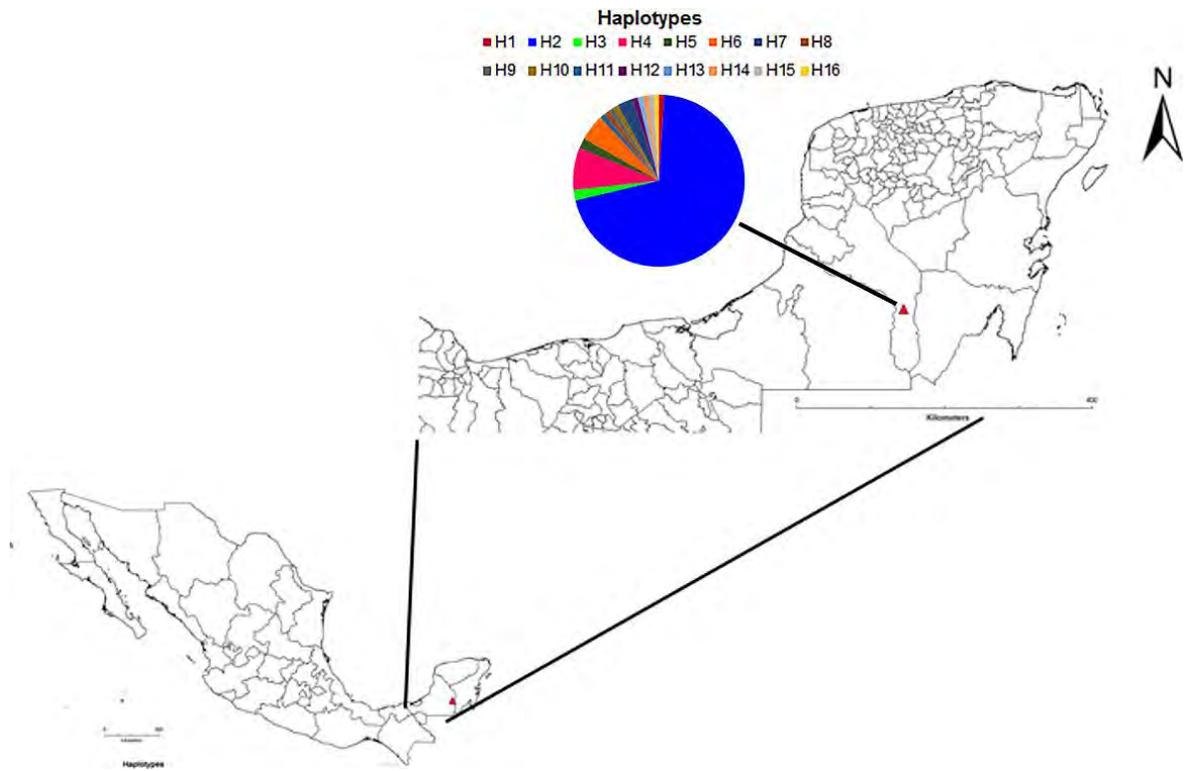


Figura 1. Ubicación geográfica del Ejido 20 de Junio (triángulo rojo) en el estado de Campeche. También se muestran los haplotipos encontrados.

CAPTURA DE FLEBOTOMINEOS

Los flebotomíneos fueron colectados durante cinco noches consecutivas del 16 al 20 de julio de 2009. Se colocaron dos trampas Shannon (1.6 x 2.5 x 1.6) por noche alejadas por al menos 100m una de la otra ubicadas al azar y en el mismo período de tiempo en la selva. Las trampas se sujetaron a los árboles y suspendidas a 30 cm del suelo. Cada trampa fue monitoreada por dos personas que permanecieron en su interior y sirvieron de cebo para capturar a los flebotomíneos. Las personas utilizaron ropa gruesa de manga larga, pantalones y

una especie de malla de mosquitero que les cubría la cabeza, para protegerse de las picaduras (Pérez et al. 1987). Los insectos fueron capturados con la ayuda de aspiradores bucales de vidrio por un período de 4 horas por noche (18:00-22:00 hrs).

PROCESAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Los especímenes capturados fueron almacenados vivos en frascos transparentes de boca ancha y transportados a un laboratorio de campo en donde fueron separados y lavados en una caja de Petri que contenía solución de detergente al 2% (extran MAO2, pH7.2; EMD Chemical, Gibbstown, NJ). Enseguida fueron lavadas con agua en otra caja de Petri, las mosquitas fueron secadas con papel filtro y preservadas en 500 μ l de etanol al 80%. La cabeza de cada espécimen fue separada para la identificación taxonómica y el resto del cuerpo (tórax y abdomen) se almacenaron a -20°C para posteriormente realizar la extracción de DNA. Las cabezas fueron montadas de acuerdo al protocolo descrito por Ibáñez-Bernal (2005b). La identificación de los especímenes se basó en la clasificación taxonómica de Young y Duncan (1994), Ibáñez-Bernal (2000, 2005a b) y Galati (2003).

EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA fue realizada utilizando las soluciones empleadas para extracción de DNA de plásmidos (Sambrook et al. 1989), con algunas modificaciones hechas por Pech-May (2013). La extracción se realizó a partir de flebotomíneos individuales. Cada espécimen fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se dejó secar al aire los residuos de etanol. Se adicionaron 100 µl de la solución I (de lisis: 25 mM Tris HCl, pH 8; 10mM EDTA, pH 8; 50 mM Glucosa) y se procedió a macerar los tejidos utilizando pistilos de polipropileno desechables (Sigma Cat. No. Z359947). Se adicionaron 100 µl de la solución II (de lavado: NaOH 0.2 N, SDS al 1%) y se incubó a 65°C durante 10 min en un baño con agitación a 80 rpm (Boekel/Grant orbital reciprocating shaker/waterbath model ORS-200). Posteriormente se adicionaron 100 µl de la solución III (3M KAc, ácido acético) y se mezcló vigorosamente en vórtex por 20 segundos y se incubó en hielo por 5 min. Se procedió a centrifugar a 20,817 x g a 4°C por 2 min en una microcentrifuga (Eppendorf Centrifuge 5417R). Todos los pasos siguientes de centrifugación se realizaron a la misma velocidad y temperatura. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamil (25:24:1) y se mezcló en vórtex, se centrifugo durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se adicionaron 60 µl de 3M NaAc, pH 5.2 y dos volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión, se dejó precipitando a -20°C por al menos 12 hrs. Se centrifugó por 10 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de DNA se lavó por inversión con etanol frío al 70%, se centrifugó por 5 min y se eliminó el etanol. La pastilla de DNA se dejó secando a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en 30 µl de agua inyectable. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Para

6

verificar las extracciones de DNA se amplificó un fragmento de 450 pb del gen 18S rRNA utilizando los oligonucleótidos Lu.18SrRNA-1S y Lu.18SrRNA-1R (Kato et al 2005) siguiendo las condiciones reportadas por Sánchez-García et al. (2010)

AMPLIFICACIÓN POR PCR Y SECUENCIACIÓN

Un fragmento de 365 pb de la terminal 3' del gen mitocondrial citocromo b (cyt b) fue amplificado utilizando los oligonucleótidos 11226 y 11587 (Hodgkinson et al. 2002; 2003). Las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo en un volumen 50 µl por reacción conteniendo lo siguiente: de 10-50 ng de DNA genómico, 0.15 µM de cada oligonucleótido, y el master mix de Promega, GoTaq green (200 µM de cada dNTP, 1.5 mM MgCl₂) como control negativo se utilizó agua estéril. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) de acuerdo con el siguiente protocolo: una desnaturalización inicial por 5 min a 95°C, seguida por 10 ciclos de 95°C por 1 min, 38°C por 1 min y 72°C por 1.5 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min, 40°C por 1 min y 72°C por 1.5 min y una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y observados con luz ultravioleta. Los productos de amplificación fueron purificados utilizando MinElute PCR purification kit (Qiagen cat. No. 28006) se siguieron las especificaciones del fabricante. Cada muestra fue secuenciada usando el sistema Prisma 310 ABl3730xl, con el oligonucleótido sentido cyt b-11226(High-Throughput Genomic Unit, Department of Genome Sciences, University of Washington).

Para detectar DNA de *Leishmania*, cada muestra fue evaluada usando los oligonucleótidos LMC-1S y LMC-1R, los cuales son específicos para el género *Leishmania*. Para las muestras que resultaron positivas se utilizaron oligonucleótidos IR1 y LM17, específicos para *Leishmania mexicana* (Berzunza-Cruz et al. 2009). Las amplificaciones por PCR fueron llevadas a cabo en un volumen 50 μ l por reacción conteniendo lo siguiente: de 10-50 ng de DNA genómico, 0.15 μ M de cada oligonucleótido, y el master mix de Promega, GoTaq green (200 μ M de cada dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$) como control positivo se utilizó DNA de cepas de *Leishmania mexicana* y como control negativo se utilizó agua estéril. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) de acuerdo con el siguiente protocolo: una desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 65°C por 1 min y 72°C por 1min y una extensión final de 72°C por 7 min. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y observados con luz ultravioleta.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Las secuencias de DNA fueron alineadas y editadas usando el software Mega v.7.0. (Kumar et al. 2015). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank (KY947524, KY947525, KY947526, KY947527, KY947528, KY947529,

KY947530, KY947531, KY947532, KY947533, KY947534, KY947535, KY947536, KY947537, KY947538, KY947539, and KY947540).

La diversidad genética fue estimada utilizando el número de mutaciones (η), número de sitios segregantes (S), número de sitios únicos (S_u), número de haplotipos (N_h), diversidad haplotípica (h) diversidad nucleotídica (π) y el índice de polimorfismo nucleotídico (θ). La D de Tajima (Tajima 1989) así como los índices D y F (Fu y Li 1993) fueron utilizados para estimar la neutralidad, considerando los sitios segregantes mediante el software DnaSP v.5.10 (Rozas y Librado 2009). Los valores negativos significativos son esperados en poblaciones que han experimentado un incremento en el tamaño efectivo de la población (Tajima 1989, Fu 1997, Ramos-Onsins y Rozas 2002). Una prueba de distribución mismatch fue computada mediante ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier and Lischer 2010), el índice R raggedness (Harpending 1994) y la suma de las desviaciones cuadradas (S_{sd}) fueron calculadas para validar la señal de expansión poblacional usando 10,000 réplicas. En poblaciones que han pasado por expansiones demográficas rápidas, la distribución mismatch se espera presente una curva unimodal suave (Rogers and Harpending 1992). Se realizó un análisis filogenético intra-específico con los haplotipos. Para encontrar el modelo de evolución que mejor se ajustara a los datos que se emplearon, se siguió el criterio de Akaike (Akaike 1974) implementado en el software JModeltest v.0.1.1 (Posada 2008). Se utilizó el software MrBayes: Bayesian Inference Phylogeny v.3.2 (Ronquist et al. 2012) y se computaron cuatro cadenas markovianas de Monte Carlo para 10,000,000 generaciones (muestreadas cada 1,000 generaciones) para permitir el tiempo

adecuado de convergencia (0.003). De los árboles muestreados el 25% inicial se eliminó. El árbol se visualizó utilizando Fig Tree v.1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Una secuencia de *Lutzomyia cruciata* fue utilizada como outgroup para el análisis de MrBayes (GeneBank accession number KC791221). Adicionalmente se calcularon las distancias pareadas „p” no corregidas, para establecer las diferencias intra e inter-específicas (Sánchez-Montes et al. 2016).

La tasa de infección fue calculada con la proporción de individuos de *Bichromomyia olmeca olmeca* infectados con *Leishmania mexicana* dividido entre el número total de moscas examinadas usando PCR. La tasa de picadura media de *Bichromomyia olmeca olmeca* para el mes de julio fue estimada como el número de flebotomíneos hembra por persona por noche. Para estimar la media de las picaduras infecciosas potenciales, se utilizó el modelo matemático de Rabinovich y Feliciangeli (2004) modificado por Pech-May et al. (2010), se utilizó [(proporción de *Bichromomyia olmeca olmeca* infectadas) (tasa media de picadura) (30 días del mes)].

RESULTADOS

POLIMORFISMO EN SECUENCIAS DE BICHROMOMYIA OLMECA OLMECA

Se colectaron 102 especímenes de *Bichromomyia olmeca olmeca* durante el período de 5 noches. La terminal 3' del gen citocromo b amplificó para 270 nucleótidos aproximadamente. Las 102 secuencias tuvieron 249 sitios

conservados, 21 sitios variables, cuatro sitios informativos en parsimonia y 17 singletons y fueron ricos en A-T (78.5%). Se identificaron 17 haplotipos, donde el más frecuente fue H2 (n=71) (Fig. 1). La diversidad haplotípica (H_d) fue 0.5092 ± 0.6 , mientras que la diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00321 \pm 0.0005$) y el índice de polimorfismo nucleotídico ($\theta = 0.01497 \pm 0.003$) tuvieron valores bajos.

PRUEBAS DE NEUTRALIDAD

Los resultados de las pruebas de Neutralidad están diseñados para evaluar si el polimorfismo nucleotídico se desvía de lo esperado bajo el supuesto de neutralidad. Todas las pruebas de neutralidad fueron negativas y significativas; D de Tajima (-2.284), la F de Fu y Li (-4.543) y la D de Fu y Li (-4.720) $p < 0.02$. Los valores negativos significativos de estas pruebas estadísticas podrían indicar que la población de *Bichromomyia olmeca olmeca* en el Ejido 20 de Junio pasaron por un proceso de expansión poblacional o selección purificadora. Aunque debido a la naturaleza de nuestros datos, en donde existe una asociación de un haplotipo común con otros en baja frecuencia e incluso haplotipos únicos, es un patrón frecuentemente atribuido a poblaciones que han experimentado recientemente un rango de expansión. Para corroborar esto, se realizó un análisis de distribución mismatch, el cual mostró que la distribución pareada de las diferencias observadas no es significativamente diferente a la frecuencia observada, dando como resultado una curva unimodal, todo lo cual es consistente con el modelo de expansión poblacional ($R = 0.07384$, $p = 0.8324$; $Ssd = 0.00088$, $p = 0.8656$) (Fig. 2).

El tiempo desde la expansión fue estimado usando la ecuación $t = \tau/2\mu$, donde μ es la tasa de mutación por sitio por generación (Slatkin y Hudson, 1991). En este caso utilizamos la tasa de mutación del DNA mitocondrial en *Drosophila melanogaster* (6.2×10^{-8} ; Haag-Liautard et al., 2008) y se consideraron 4 generaciones/año (Ferro et al. 1998; Volf y Volfava 2011). Las estimaciones de τ se tomaron del cálculo del índice raggednes. La expansión comenzó aproximadamente hace 84,598 años atrás durante el Pleistoceno tardío.

FILOGENIA DE BICHROMOMYIA OLMECA OLMECA

La filogenia Bayesiana fue construida usando el modelo GTR (general tiempo reversible), siendo el más apropiado para el análisis de los datos (-INL = 655.1010, Delta AIC = 0, AIC = 1392.2019) proporcionando el máximo soporte (1.0 probabilidad posterior, PP) para el clado principal (Fig. 3). Las distancias p intraespecificas estuvieron en un rango de 0 – 0.04 entre secuencias de *Bichromomyia olmeca olmeca*.

TASAS DE INFECCIÓN Y PICADURA DE BICHROMOMYIA OLMECA OLMECA

De los 102 especímenes colectados y analizados de *Bichromomyia olmeca olmeca*, 25 estuvieron infectados con *Leishmania mexicana*, 24.5% del total. La tasa de picadura media por *Bichromomyia olmeca olmeca* durante Julio fue de 5.1 mosquitas hembra por persona por noche, mientras que el número potencial de

picaduras infecciosas que una persona podría haber recibido fue de 1.44 en el mes de Julio.

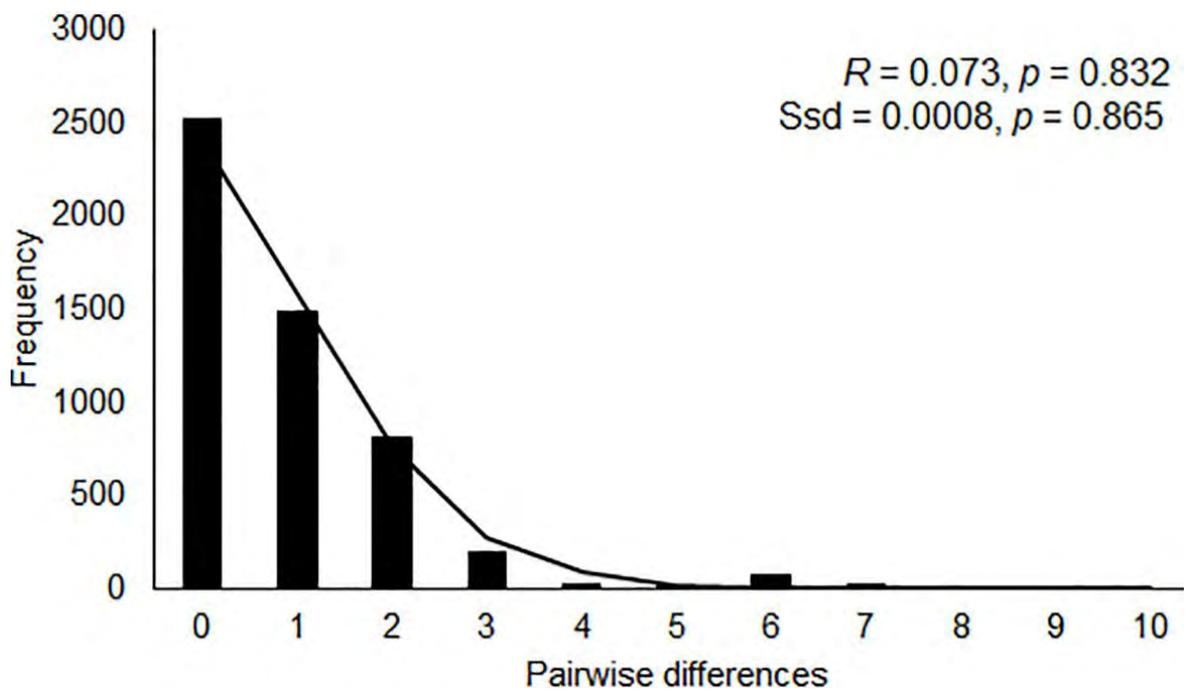


Figura 2. Distribución mismach entre diferencias pareadas entre haplotipos de *Bichromomyia olmeca olmeca* del Ejido 20 de Junio. Las barras muestran la distribución observada y la línea la distribución simulada bajo el modelo de expansión repentino. El valor de p proviene de la suma de desviaciones cuadradas (Ssd), y el índice de desigualdad de Harpending R es la prueba de bondad de ajuste para el modelo de expansión repentino.

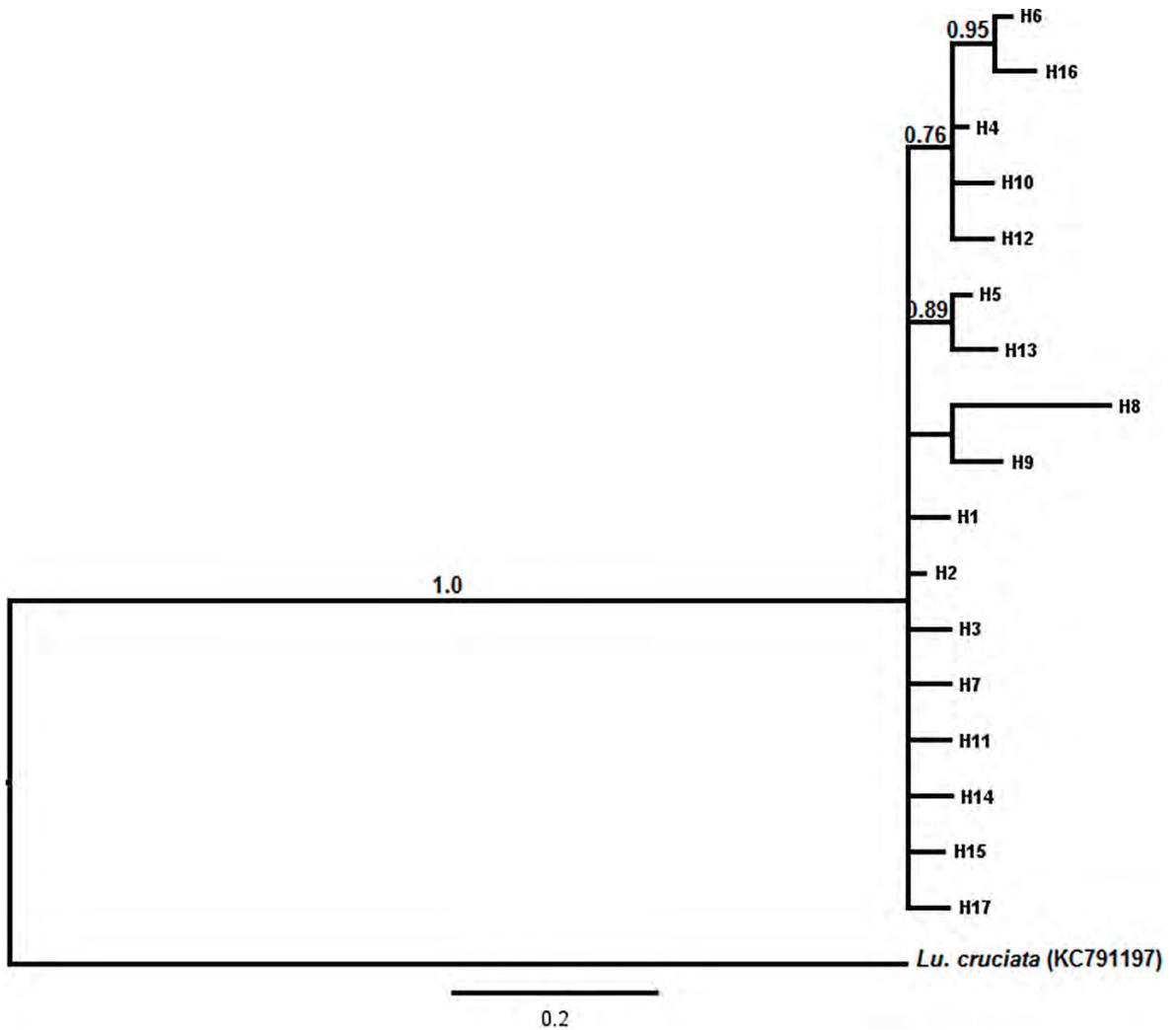


Figura 3. Árbol Inferencia Bayesiana (BI) para 270 nucleótidos de la terminal 3" del gen citocromo b (cyt b) de *Bichromomyia olmeca olmeca* del Ejido 20 de Junio inferido usando el modelo GTR. Los números sobre las ramas representan probabilidades posteriores obtenidas en el BI. *Lutzomyia cruciata* fue utilizada como outgroup. La escala representa el número esperado de sustituciones nucleotídicas por sitio.

DISCUSION

La variabilidad genética del vector *Bichromomyia olmeca olmeca* y la prevalencia de las infecciones por *Leishmania mexicana* fueron analizadas en un foco endémico donde pacientes con leishmaniasis fueron reportados a lo largo del año (Hernández-Rivera et al. 2005). En este estudio obtuvimos que las secuencias de *Bichromomyia olmeca olmeca* fueron ricas en A-T (78.5 %), como se esperaba, ya que esta es una observación común en la región citocromo b (Simmons y Weller, 2001, Parvizi y Ready, 2006, Depaquit et al. 2008, Belen et al. 2011). La diversidad haplotípica fue moderada, pero la diversidad nucleotídica y el índice de polimorfismo nucleotídico fueron bajos comparados con otro estudio donde se utilizó el mismo marcador genético, pero con *Lutzomyia cruciata* en México (Pech-May et al. 2013). La baja diversidad nucleotídica estimada para *Bichromomyia olmeca olmeca* fue consistente con una población panmítica (Mirabello y Conn 2006). La baja diversidad genética podría ser causada por bajas tasas de dispersión efectivas y/o deriva genética y endogamia debido a la fragmentación o cambio del paisaje. Los patrones de dispersión para pequeños hematófagos como los flebotomíneos dependen de varios factores entre los cuales se incluyen, la distancia de vuelo promedio, velocidad del viento y distancia hacia los recursos. Las capacidades de dispersión varían de acuerdo a la especie de flebotomíneo, para la especie del nuevo mundo *Lutzomyia longiplapís* (Lutz y Neiva), la distancia de vuelo promedio varía entre 0.5 km y un mínimo de 50 m (Morrison et al. 1993, Casanova et al. 2005). Otro factor, es la heterogeneidad del paisaje que influencia la dispersión de las hembras que están en busca de fuentes de sangre

apropiadas, sitios de descanso, de apareamiento y lugares adecuados en donde depositar sus huevos. Los flebotomíneos hembras buscan refugio para evitar la exposición directa al sol y la desecación (Montes de Oca-Aguilar et al. 2013).

Pérez-Mendes y Rebollar-Téllez (2012) analizaron la variabilidad morfométrica de varias poblaciones de *Bichromomyia olmeca olmeca* en la Península de Yucatán y concluyeron que tal variabilidad fue debido a la distancia geográfica entre localidades. Debido a que nuestro estudio fue focalizado en un área específica, los cambios en el paisaje en el Ejido 20 de Junio a través del tiempo jugaron un papel importante en la baja variabilidad genética observada para *Bichromomyia olmeca olmeca*.

Cambios en el paisaje debido a deforestación y uso antropogénico de las tierras (ej. agricultura) fueron la causa de la pérdida de diversidad genética (reflejada en la alta frecuencia de un solo haplotipo, H2, y la baja frecuencia de haplotipos únicos). *Lutzomyia cruciata* de Nuevo Montecristo y San Antonio Buenavista (Chiapas, México) tuvieron baja diversidad genética debido a la deforestación no controlada y a la utilización de tierras para el pastoreo (Pech-May et al. 2013). De acuerdo a registros históricos, impactos de corto y largo plazo producen la heterogeneidad del paisaje. En el ecosistema del Ejido 20 de Junio han ocurrido impactos a largo plazo después de que el municipio de Calakmul comenzara a ser explotado por sus recursos naturales, con deforestación intensiva para la obtención de madera y la intensificación del cultivo de *Capsicum annum* L., a finales del siglo XX (Keys 2005). De 1954 a 1981 la explotación del chicle y la llegada y establecimiento de diferentes grupos indígenas provocaron un

continuo cambio del paisaje, debido a que cada grupo étnico introdujo diferentes estrategias para la explotación de las tierras. Los cambios a corto plazo, incluyen actividades recientes tales como programas para la recuperación de las áreas deforestadas y la preservación de áreas selváticas después de la rotación por cultivo. El cultivo de alimentos como pimienta (*Piper nigrum* L.), maíz (*Zea mays* L.), piñas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) y la introducción de abejas en apiarios (*Apis mellifera* L.) condujeron a las fluctuaciones en el nicho ecológico y las fuentes de sangre para *Bichromomyia olmeca olmeca*, afectando las interacciones entre las poblaciones (Vester et al. 2007).

Los valores negativos y estadísticamente significativos de la D de Tajima y la F y D de Fu y Li sugieren un exceso de alelos raros, expansión poblacional o selección purificadora (Nei and Kumar 2000, Paupy 2008). En este estudio obtuvimos valores negativos significativos, tanto para la D de Tajima, como para las F y D de Fu y Li. Para poder determinar la fuerza que está actuando sobre los datos se realizó una prueba mismatch, la cual mostró una curva unimodal característica de poblaciones en expansión, la cual ocurrió hace aproximadamente 84,000 años durante el plesistoceno tardío. Esto nos estaría indicando que la población de *Bichromomyia olmeca olmeca* del ejido 20 de Junio pasó por una expansión poblacional a finales de la última glaciación, lo que concuerda con diversos estudios realizados para otras especies de dípteros (Foley y Torres 2006, Mirabello y Conn 2006, Matthews et al. 2007, Mirol et al. 2008, Loaiza et al. 2010). Las recientes expansiones en una variedad de vectores de enfermedades, entre los cuales están los triatominos (Monteiro et al. 2003) y mosquitas (Pramual et al.

2005) y moscos (Matthews et al. 2007) parecen estar ligados a las expansiones en poblaciones humanas, cambios climáticos durante el Pleistoceno o interacciones entre las dos, dependiendo de circunstancias locales, tamaños poblacionales, ecología y rangos del huésped.

En Calakmul, Campeche, varios poblados especialmente en la parte norte de Calakmul donde se encuentra el poblado “Ejido 20 de Junio”, mostraron prevalencia de leishmaniasis cutánea (Hernández-Rivera et al 2015). En el área habitan cuatro especies de roedores que son reservorios para *Leishmania mexicana*: la rata arrocera de orejas negras (*Oryzomys melaanotis*, Thomas), la rata algodонера (*Sigmodon hispidus*, Say and Ord), la rata arborícola orejuda (*Ototylomys phyllotis*, Merriam) y el ratón venado de Yucatán (*Peromyscus yucatanicus*, J.A. Allen and Chapman) (Canto-Lara et al. 1999). Estudios sobre vectores de *Leishmania* en el Ejido 20 de Junio arrojaron varias especies de flebotomíneos positivas a *Leishmania mexicana* (Pech-May et al. 2010), indicando que el ciclo de vida de *Leishmania* en el área selvática de Calakmul depende de la interacción de varias especies de flebotomíneos vectores así como de diferentes especies de huéspedes. El área de distribución de *Bichromomyia olmeca olmeca* en Campeche comprende el 43.3% del estado, principalmente áreas rurales. El número de personas expuestas a *Bichromomyia olmeca olmeca* en áreas rurales fue 107,343 de un total de 328,009 personas, lo que contrasta con la falta de exposición de personas en las áreas urbanas (Pech-May et al. 2016). Esta especie de flebotomíneo es uno de los vectores más importantes en el área, basado en su abundancia y sus hábitos antropofílicos (Rebollar-Téllez et al 1996, Pech-May et

al. 2010). La abundancia de *Bichromomyia olmeca olmeca* en el mes de Julio fue mayor que lo reportado por Pech-May et al (2010) en un período de cuatro meses. Aun así, las tasas de picadura e inoculación (el número de picaduras infecciosas a las cuales una persona en el área podría estar expuesta durante un mes) fueron similares a lo reportado por Pech-May et al. (2010, 2016).

CONCLUSIONES

1) No hay asociación entre la variabilidad genética de *Bichromomyia olmeca olmeca* y la alta transmisión de leishmaniasis en el Ejido 20 de Junio, Campeche.

2) Nuestros datos proveen información nueva, ya que se reveló una alta tasa de infección de *Bichromomyia olmeca olmeca* por *Leishmania mexicana* durante el final de la época de sequía en el mes de Julio, antes del comienzo de la temporada de lluvia en esta región. Este resultado enriquece la literatura, ya que anteriormente únicamente se habían reportado altas tasas de infección en flebotomíneos durante la temporada de lluvias en la región, lo que corresponde al mes de Noviembre (Pech-May et al 2010).

LITERATURA CITADA

Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans. Automat. Contr. 19: 716-723.

Andrade-Narváez, F. J., S. B. Canto-Lara, N. R. Van Wynsberghe, E. A. Rebollar-Téllez, A. Vargas-González, and N. E. Albertos-Alpuche. 2003. Seasonal transmission of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the State of

- Campeche, Yucatan Peninsula, Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98: 995-998.
- Barón, S., Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Morales-Yuste, M., Boussaa, S., MorillasMárquez, F., 2008. Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. Acta Trop. 107, 159–267.
- Basáñez, A.J.; Alanís, J.L. y Badillo E. (2008) Composición florística y estructura de la selva mediana subperenifolia del ejido “El Remolino” Papantla, Veracruz. Avances en Investigación Agropecuaria. 12(2): 3-21.
- Belen A., S. Kucukyildirim y B. Alten (2011) Genetic structures of sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in a leishmaniasis endemic región of Turkey. J. Vector Ecol. 36: S32-S48.
- Beltrán, E., y N. E. Bustamante. 1942. Datos epidemiológicos acerca de la “ulcera de los chicleros” (Leishmaniasis americana) en México. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. 3: 1-28.
- Berzunza-Cruz, M., G. Bricaire, N. Salaiza-Suazo, R. Pérez-Montfort, and I. Becker. 2009. PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. Parasitol. Res. 104: 691-699.
- Biagi, F. 1953. Síntesis de 70 historias clínicas de leishmaniasis tegumentaria en México (úlceras de los chicleros). Medicina 33: 385-396.
- Biagi, F. F., A. M. de Biagi, y F. H. Beltrán. 1965. *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmisor natural de *Leishmania mexicana*. Prensa Médica México 30: 267-272.
- Canto-Lara, S. B., N. R. Van Wynsberghe, A. Vargas-González, F. F. Ojeda-Farfán, and F. J. Andrade-Narváez. 1999. Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania spp.* from humans and wild rodents in the state of Campeche, Mexico. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94: 305-309.
- Casanova, C., A. I. Costa, and D. Natal. 2005. Dispersal pattern of the sand fly *Lutzomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic rural area in Southern Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100: 719-724.

- Coutinho-Abreu, I. V., I. V. Sonoda, A. J. Fonseca, M. A. Melo, V. Q. Balbino, and M. Ramalho Ortigão. 2008. *Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the Sao Francisco River in the speciation of this sand fly vector. *Parasit, Vectors* 1: 1-16.
- Cruz-Ruíz, A. L., J. García-Rejón, P. Manrique-Saide, and J. Pérez-Motul. 1994. Taxonomical identification of anthropophilic species of *Lutzomyia* in Quintana Roo, Peninsula of Yucatan, Mexico. *Rev. Biomed.* 5: 127-131.
- Depaquit, J., E. Lienard, A. Verzeaux-Griffon, H. Ferte, Bounamous, J.C. Gantier, H.A. Hanafi, R.L. Jacobson, M. Maroli, V. Moin-Vaziri, F. Muller, Y. Ozbel, M. Svobodova, P. Volf, and N. Leger. 2008. Molecular homogeneity in diverse geographical populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) inferred from ND4 mtDNA and ITS2 rDNA Epidemiological consequences. *Infect. Genet. Evol.* 8:159-170.
- Díaz-Gallegos, J.R.; A.O. Castillo y G.G. García (2002) Distribución espacial y estructura arbórea de la selva baja subperenifolia en un ejido de la reserva de la biosfera de Calakmul, Campeche, México. *Universidad y Ciencia.* 18(35): 11-28.
- Dzib-Castillo, B.; C. Chanatásig-Vaca y N.A. González-Valdivia (2014) Estructura y composición en dos comunidades arbóreas de la selva baja caducifolia y mediana subcaducifolia en Campeche, México. *Revista mexicana de biodiversidad.* 85:167-178.
- Esseghir S., P.D. Ready, R. Killick-Kendrick, R. Ben-Ismael (1997) Mitochondrial haplotypes and phylogeography of *Phlebotomus* vectors of *Leishmania major*. *Insect Molecular Biology.* 6(3): 211-225.
- Excoffier, L., and H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.
- Ferro C., E. Cárdenas, D. Corredor, A. Morales y L.E. Munstermann (1998) Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(2): 195-199.

- Foley D.H. y E.P. Torres (2006) Population structure of an island malarian vector. *Med. Vet. Entomol.* 20: 393-401.
- 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. *Int. J. Parasitol.* 40, 1335–1346.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Fu, Y. X., and W. H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Galati, E. A. B. 2003. Classificação de Phlebotominae. Flebotomíneos do Brasil, pp. 23-51. *In* E. F. Rangel and R. Lainson [eds.], FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.
- Garnham, P. C. C. 1962. Cutaneous leishmaniasis in the New World, with special reference to *Leishmania mexicana*. *Sci. Rep. Inst. Sup. Sanit.* 2: 76-82.
- González, C., O. Wang, S. E. Strutz, C. González-Salazar, V. Sánchez-Cordero, and S. Sarkar. 2010. Climate change and risk of Leishmaniasis in North America: predictions from ecological niche models of vector and reservoirs species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4: e585.
- Haag-Liautard C., N. Coffey, D. Houle, M. Lynch, B. Charlesworth y P.D. Keightley (2008) Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *Plos Biol* 6(8): e204.
- Hamarsheh O., W. Presber, Z. Abdeen, S. Sawalha, A. Al-Lahem, G. Schönian (2007) Genetic structure of Mediterranean populations of the sandfly *Phlebotomus papatasi* by mitochondrial cytochrome b haplotype analysis. *Med. Vet. Entomol.* 21: 270-277.
- Hanski, I., and E. Gilpin. 1997. *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution*. Academic Press, USA.

- Harley, E. H. 2009. Evolutionary and molecular taxonomy. *In* G. Contrafatto and A. Minelli [eds.], *Biological Science Fundamentals and Systematics*. United Nations Educational Scientific and Cultural Organization, UK. 2: 322.
- Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- Hernández-Rivera, M. P., O. Hernández-Montes, A. Chiñas-Pérez, J. M. Batiza-Avelar, G. Sánchez-Tejeda, C. Wong-Ramírez, and A. Monroy-Ostria. 2015. Study of cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche (Yucatan Peninsula) Mexico, over a period of two years. *Salud Publica Mex.* 57: 58-65.
- Hodgkinson, V. H., J. Birungi, M. Haghpanah, S. Joshi, and L. E. Munstermann. 2002. Rapid identification of mitochondrial cytochrome b haplotypes by single strand conformation polymorphism in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) populations. *J. Med. Entomol.* 39: 689-694.
- Hodgkinson, V. H., J. Birungi, M. Quintana, R. Dietze, and L. E. Munstermann. 2003. Mitochondrial cytochrome b variation in populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* across eastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69: 386-392.
- Ibáñez-Bernal, S. 2000. Los Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. Ph.D. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal.
- Ibáñez-Bernal, S. 2002. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. . Las especies de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) Barretto, del grupo Aragoi, de *L.* (*Trichopygomyia*) Barretto, del grupo Dreisbachi y de *L.* (*Nyssomyia*) Barretto. *Folia Entomol. Mex.* 41: 149-183.
- Ibáñez-Bernal, S. 2005a. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. V. Clave ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia* Franca. *Folia Entomol. Mex.* 44: 49-66.
- Ibáñez-Bernal, S. 2005b. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia* Franca. *Folia Entomol. Mex.* 44: 195-212.

- Ishikawa E.A., P.D. Ready, A.A de Souza, J.C. Day, E.F. Rangel, C.R. Davies and J.J. Shaw (1999) A mitochondrial DNA phylogeny indicates close relationships between populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae, Phlebotominae) from the rain-forest regions of Amazonia and northeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(3): 339-45.
- Kato, H., H. Uezato, K. Katakura, M. Calvopina, D. J. Marco, P. A. Barroso, E. A. Gómez, T. Mimori, M. Korenaga, H. Iwata, S. Nonaka, and Y. Hashiguchi. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 72: 87-93.
- Keys, E. 2005. Market intermediaries link farms to markets: Southeastern Mexican examples. Geogr. Rev. 95: 24-46.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.
- Loaiza J.R., M.E. Scott, E. Bermingham, J. Rovira y J.E. Conn (2010) Evidence of Pleistocene population divergence and expansion of *Anopheles albimanus* in Southern Central America. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82(1): 156-164.
- Matthews S.D., L.J. Meehan, D.Y. Onyabe, J. Vineis, I. Nock, I. Ndams y J.E. Conn (2007) Evidence of late pleistocene population expansion of the malarial mosquitoes, *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* in Nigeria. Med. Vet. Entomol. 21: 358-369.
- May-Uc, E., H. A. Hernández-Arana, y E. Rebollar-Téllez. 2011. Distribución de Flebotominos (Diptera Psychodidae) en Quintana Roo, Mexico. Acta Zool. Mex. 27: 273-289.
- Mirabello, L., and J. E. Conn. 2006. Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. Heredity 96: 311-321.
- Mirol P.M., J. Routtu, A. Hoikkala and R.K. Butlin (2008) Signals of demographic expansion in *Drosophila virilis*. BMC Evol. Biol. 8:59
- 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 Trop.* 102, 29–37.
- Monteiro F.A., T.V. Barrett, S. Fitzpatrick, C. Cordon-Rosales, D. Feliciangeli y C.B. Beard (2003) Molecular phylogeography of the Amazonian chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol.* 12:997-1006.
- Montes de Oca-Aguilar, A. C., D. A. Moo-Llanes, and E. Rebollar-Téllez. 2013. Adult sand fly species form diurnal resting sites on the Peninsula of Yucatan, Mexico. *Southwest. Entomol.* 38: 241-250.
- Morrison, A. C., C. Ferro, A. Morales, R. B. Tesh, and M. L. Wilson. 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *J. Med. Entomol.* 30: 427-435.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evaluation and Phylogenetics*. Oxford University Press, NY. 333 pp.
- Palacio-Aponte, A.G., T.R. Noriega y C.P. Zamora (2002) Caracterización físico-geográfica del paisaje conocido como “bajos inundables”. El caso del rea natural protegida Balamkín, Campeche. *Investigaciones geográficas*. Numero 049:57-73.
- Parvizi P., M. Benlarbi and P.D. Ready (2003) Mitochondrial and Wolbachia markers for the sandfly *Phlebotomus papatasi*: little population differentiation between peridomestic sites and gerbil burrows in Isfahan province, Iran. *Med Vet. Entomol.* 17(4):351-62.
- Parvizi P. and P. Ready (2006) Molecular investigation of the population differentiation of *Phlebotomus papatasi*, important vector of *Leishmania major*, in different habitats and regions of Iran. *Iranian Biomed. Jour.* 10(2): 69-77.
- Paupy, C., C. Brengues, B. Kamgang, J-P. Herve, D. Fontenille, and F. Simard. 2008. Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera:ulicidae) in North Cameroon. *J. Med. Entomol.* 45:391-400.

- Pech-May, A., F. J. Escobedo-Ortegón, M. Berzunza-Cruz, and E. A. Rebollar-Téllez. 2010. Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Med. Vet. Entomol.* 24: 150-161.
- Pech-May, A., C. F. Marina, E. Vázquez-Domínguez, M. Berzunza-Cruz, E. A. Rebollar-Téllez, J. A. Narváez-Zapata, D. Moo-Llanes, S. Ibáñez-Bernal, J. M. Ramsey, and I. Becker. 2013. Genetic structure and divergence in populations of *Lutzomyia cruciata*, a phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) vector of *Leishmania mexicana* in southeastern Mexico. *Infect. Genet. Evol.* 16: 254-262.
- Pech-May, A., G. Peraza-Herrera, D. A. Moo-Llanes, J. Escobedo-Ortegón, M. Berzunza-Cruz, I. Becker-Fausser, A. Montes de Oca-Aguilar, and E. A. Rebollar-Téllez. 2016. Assessing the importance of four sandfly species (Diptera: Psychodidae) as vectors of *Leishmania mexicana* in Campeche, Mexico. *Med. Vet. Entomol.* 30: 310-320.
- Pérez, J. E., P. Villaseca, A. Llanos-Cuentas, M. Campos, y H. Guerra. 1987. Técnicas para colectar "titiras" (*Lutzomyia* spp., Diptera: Psychodidae) en ambientes alto andinos peruanos. *Rev. Peru Entomol.* 30: 77-80.
- Pérez-Méndez, C., y E. Rebollar-Téllez. 2012. Análisis morfológico de poblaciones alopáticas de *Lutzomyia olmeca olmeca* y *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vectores principales de la leishmaniasis cutánea en el sureste de México. *Rev. Biomed.* 23: 7-21.
- Pérez-Salicrup, D. 2004. Forest types and their implications, pp. 63-80. In L. Turner, J. Hoeghegan, and R. Foster eds., *Integrated Land-change Science and Tropical Deforestation in the Southern United States*. Oxford University Press, New York.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253-1256.
- Pramual P., C. Kuvangkadilok, V. Baimai y C. Walton (2005) Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Mol. Ecol.* 14: 3989-4001.

- Rabinovich, J. E., and M. D. Feliciangeli. 2004. Parameters of *Leishmania braziliensis* transmission by indoor *Lutzomyia ovallesi* in Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70: 373-382.
- Ramos-Onsins, S. E., and J. Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092-2100.
- 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 sylvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bull. Entomol. Res.* 87, 187–195.
- 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. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92, 159–160.
- Rebollar-Téllez, E. A., A. Ramírez-Fraire, and F. J. Andrade-Narváez. 1996. Two years study on vectors of cutaneous Leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission cycle in the state of Campeche, Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91: 555-560.
- Rebollar-Téllez, E. A., E. Tun-Ku, P. C. Manrique-Saide, A. Che-Mendoza, and F. A. Dzul-Manzanilla. 2004. Further records of phlebotomid sandflies (Diptera: Phlebotomidae) from Campeche Mexico. *Entomol. News.* 115: 283-291.
- Rebollar-Téllez, E., E. Tun-Ku, P. C. Manrique-Saide, and F. J. Andrade-Narváez. 2005. Relative abundances of sandfly species (Diptera: Phlebotominae) in two villages in the same area of Campeche, in southern Mexico. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99: 193-201.
- Rogers, A. R., and H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 559-569.
- Romero-Montero, J.A. y E.A. Ellis (2016) Selva baja subperenifolia en el sureste de México. *RINDERESU.*1(2): 48-56.

- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61: 539-542.
- Rozas, J., and P. Librado. 2009. DnaSP v.5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Sánchez-García, L., M. Berzunza-Cruz, I. Becker-Fauser, and E. A. Rebollar-Téllez. 2010. Sand flies naturally infected by *Leishmania (L.) mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104: 406-411.
- Sánchez-Montes, S., C. Guzmán-Cornejo, F. Ramírez-Corona, and L. León Paniagua. 2016. Sucking lice (Insecta: Phthiraptera: Anoplura) associated with rodents distributed in the neotropical region of Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* 87: 427-435.
- Sarukhán J. (1968) Los tipos de vegetación arbórea de la zona cálido-húmeda de México. En: Pennington, T. D. y Sarukhán J (Eds). Manual para la identificación de los árboles tropicales de México. Inst. Nal. De Inv. Forestales-FAO. México, D.F. p.3-46.
- Scarpassa, M. V., and R. B. Alencar. 2012. *Lutzomyia umbratilis*, the main vector of *Leishmania guyanensis*, represents a novel species complex? *PLoS ONE* 7: e37341.
- Seidelin, H. 1912. Leishmaniasis and Babesiasis in Yucatan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 6: 295-299.
- Simmons, R.B. y S.J. Weller. 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Mol. Phylogenet. Evol.* 20:196-210.
- Slatkin M. y R. R. Hudson (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

- Torgerson, D. G., M. Lampo, Y. Velázquez, and P. T. Woo. 2003. Genetic relationships among some species groups within the genus *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69: 484-493.
- Vargas, L., y A. Díaz-Najera. 1959. *Phlebotomus farilli* n. sp., *Ph. humboldti* n. sp. y *Ph. olmecus* n. sp. de México (Diptera: Psychodidae). *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.* 19: 141-149.
- Vester, H. F. M., D. Lawrence, J. R. Eastman, B. L. Turner II, S. Calmé, R. Dickson, C. Pozo, and F. Sangermano. 2007. Land change in the southern Yucatan and Calakmul biosphere reserve: effects on habitat and biodiversity. *Ecological Applications* 17: 989-1003.
- Volf P. y V. Volfova (2011) Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Jour. Vector Ecol.* 36(1): S1-S9.
- Wilson, D. S., and D. Benjamin. 1980. *The Natural Selection of Populations and Communities*. Benjamin/Cummings, California.
- Young, D. G., and J. R. Arias. 1991. *Phlebotomine Sandflies in the Americas*. PAHO Technical Paper 33: 1-26.
- Young, D. G., and M. A. Duncan. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 54: 881.