

Análisis morfométrico de poblaciones alopátricas de *Lutzomyia olmeca olmeca* y *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vectores principales de la leishmaniasis cutánea en el sureste de México

Concepción Méndez-Pérez¹, Eduardo A. Rebollar-Téllez²

¹Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, México ²Laboratorio de Entomología Médica, Departamento de Zoología de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

RESUMEN

Introducción. La leishmaniasis cutánea localizada es endémica en la Península de Yucatán; hasta ahora, se considera que el agente causal *Leishmania mexicana* es transmitido a humanos por la picadura del insecto vector *Lutzomyia olmeca olmeca* y, posiblemente también, por *Lu. cruciata*. Aunque existen estudios sobre la ecología de ambas especies de flebotominos, se desconoce a la fecha si geográficamente existe una variación genética entre poblaciones.

Objetivo. El objetivo principal de este estudio fue determinar si las poblaciones se pueden segregar en unidades independientes, con base en la evaluación de la variabilidad entre carácter(es) morfológico(s) de las poblaciones a través de un análisis discriminante.

Materiales y Métodos. Especímenes de *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata* fueron colectados en distintas localidades de los estados de Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Con la misma metodología de montaje y preservación, los especímenes fueron medidos con una regla micrométrica. Treinta y un caracteres fueron medidos para cada espécimen; una vez realizado el análisis univariado entre miembros de distintas poblaciones, se seleccionaron sólo los caracteres

significativos y con ellos se hizo un análisis multivariado para la identificación de grupos.

Resultados. Con el análisis univariado se encontró que para *Lu. olmeca olmeca*, de 31 caracteres evaluados, 26 resultaron significativos, mientras que para *Lu. cruciata* se encontraron diferencias significativas en 16 de 31 caracteres estudiados. Mientras que con el análisis multivariado se encontró que, para *Lu. olmeca olmeca*, la población de Becanchén se segregó del resto de las poblaciones. En el caso de *Lu. cruciata*, la discriminación fue para las localidades de Dos Naciones y de La Libertad con respecto al resto de las poblaciones.

Conclusiones. Se confirma que existe variabilidad geográfica a nivel de caracteres morfológicos entre poblaciones (análisis univariado) y a nivel individual considerando varios caracteres simultáneamente (análisis multivariado). Se requieren más estudios para confirmar el nivel de heterogeneidad y aislamiento genético entre poblaciones de ambas especies de flebotominos.

Palabras clave: Diptera, Phlebotominae, leishmaniasis, México, *Lu. olmeca*, *Lu. cruciata*, análisis de morfometría

Autor para correspondencia: Dr. Eduardo A. Rebollar-Téllez. Universidad Autónoma de Nuevo León, Fac. de Ciencias Biológicas, Departamento de Zoología de Invertebrados, Laboratorio de Entomología Médica, Av. Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66451 México. Tel(fax) +52 (81) 8332 1453. e-electrónico: eduardo.rebollartl@uanl.edu.mx

Recibido: el 16 de marzo de 2010. **Aceptado para publicación:** el 7 de febrero de 2011

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb122312.pdf>

ABSTRACT**Morphometric analysis of allopatric populations of *Lutzomyia olmeca olmeca* and *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), main vectors of cutaneous leishmaniasis in southeastern Mexico**

Introduction. Localised cutaneous leishmaniasis (LCL) is endemic in the Peninsula of Yucatan. *Leishmania mexicana* is transmitted to humans by the infectious bite of the insect vector *Lutzomyia olmeca olmeca* and possibly by *Lu. cruciata* as well. Even though there are several previous studies on the ecology of both phlebotomid sandflies, potential genetic variations have not been determined for geographically separated sandfly populations

Objective. The main objective of this study was to evaluate the existence of variability of morphological characters among populations, and then to evaluate whether or not populations could be distinguished from each other using discriminant analyses

Materials and Methods. Specimens of *Lu. olmeca olmeca* and *Lu. cruciata* were collected in distinct locations of the southern states of Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Thirty one morphological characteristics were measured using a micrometric for every specimen, using consistent techniques for preservation and slide mounting for all samples. Following univariant analyses, we then selected only the statistically significant morphological characteristics for a multivariate analysis to identify group characteristics.

Results. For *Lu. olmeca olmeca*, univariate analysis found that 26 out of 31 characteristics were statistically significant, whereas for *Lu. cruciata*, 16 out of 31 characteristics were significant. Subsequent multivariate analyses showed that *Lu. olmeca olmeca* from Bechanchén were statistically different (discriminant) from the rest of the populations. In the case of *Lu. cruciata*, the populations of Dos Naciones and La Libertad were statistically different (discriminant) from the

rest of populations studied.

Conclusions. Geographic variability was found among the morphological characteristics of the studied populations at both individual levels using univariate analysis, and for several characteristics considered simultaneously via multivariate analysis. More studies are required to confirm the levels of heterogeneity and genetic isolation among populations of the two studied sandfly species.

Key words: Diptera, Phlebotominae, leishmaniasis México, *Lu. olmeca*, *Lu. cruciata*, morphometric analysis

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la literatura publicada a nivel mundial (1-3) y nacional (4) sobre vectores de leishmaniasis refiere que, en México, *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *olmeca olmeca* (Vargas & Díaz-Nájera) es la única especie vector del parásito *Leishmania mexicana* (Biagi), el cual es el principal agente causal de la leishmaniasis cutánea (3). La especie *Lu. olmeca olmeca* fue descrita como *Phlebotomus olmecus* en la localidad de Teapa en el estado de Tabasco, México (5). En la actualidad, se considera que *Lu. olmeca olmeca* pertenece a un complejo de subespecies/especies denominado *flaviscutellata* (*sensu* Young & Duncan) (6), entre las que se encuentran, además de *Lu. olmeca olmeca*, *Lu. olmeca bicolor*, *Lu. olmeca reducta*, *Lu. olmeca nociva* y *Lu. flaviscutellata* (6). La distribución conocida de *Lu. olmeca olmeca* en México, hasta el presente, comprende a los estados de la Península de Yucatán, que son Campeche, Yucatán (7,8) y Quintana Roo (9), además de Tabasco, Chiapas, Oaxaca y Veracruz (9). Esta distribución tan restringida a los estados del sureste de México hace entonces suponer que los casos humanos de leishmaniasis cutánea reportados en otros estados, como Nayarit, Sinaloa, Tamaulipas, Coahuila entre otros, no se deben a *Lu. olmeca olmeca*, sino más bien a otras especies de flebotominos. Un estudio

reciente sobre modelaje de nicho ecológico de *Lu. olmeca olmeca* en el país (10) y sobre los casos acumulados reportados de leishmaniasis en México mostró dos hallazgos importantes: i) que la distribución potencial de *Lu. olmeca olmeca* está muy restringida al sureste de México y ii) que no existe una asociación geográfica de la distribución en otras regiones del país donde se han reportado casos de la enfermedad.

La incriminación de *Lu. olmeca olmeca* como vector principal de la leishmaniasis en el país proviene de los estudios pioneros, ahora considerados clásicos y sobresalientes del Dr. Francisco Biagi Filizola y la Biol. Ana María del Buen, quienes en colaboración con otros investigadores demostraron que esta especie en Carrillo Puerto, Quintana Roo, estaba infectada naturalmente en campo con el parásito y que, cuando estos parásitos se inocularon en hámsters susceptibles, se desarrollaron lesiones ulcerosas; además, se comprobó que las hembras *Lu. olmeca olmeca* podían transmitir al parásito por picadura a voluntarios humanos (11). Estos resultados fueron muy similares a los reportados por Disney (12) en Belice; por lo que de inmediato se aceptó que esta especie de flebotomino era indudablemente un vector comprobado.

Sin embargo, estudios realizados en los últimos años en sitios de transmisión selvática de leishmaniasis, principalmente en Campeche (8,13-16), sugieren que la transmisión de *Le. mexicana* no se debe exclusivamente a *Lu. olmeca olmeca*, sino quizás a la interacción con otras especies como *Lutzomyia (Lutzomyia) cruciata* (Coquillet), *Lutzomyia (Psathiomyia) shannoni* (Dyar) y *Lutzomyia (Psychodopygus) panamensis* (Shannon). De las anteriores especies, se ha sospechado, desde hace muchos años, sobre el papel que desempeña *Lu. cruciata* como vector de *Le. mexicana*, debido a su marcado comportamiento antropofílico y su amplia distribución geográfica (8,13-18); además de que, al menos experimentalmente, se ha demostrado su capacidad para transmitir *Le. mexicana* a

voluntarios humanos (19).

La especie *Lu. cruciata* fue descrita en Alta Vera Paz, Guatemala (20), y en México es, quizás, la especie de mayor distribución territorial y que ha sido reportada en los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Quintana Roo, Oaxaca, San Luís Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (17,21-26). Asimismo, se ha reportado que el análisis de la distribución de nicho ecológico de *Lu. cruciata* se correlaciona con la distribución de casos de leishmaniasis en el país (10); por lo que su potencial como vector es bastante amplio dada la correspondencia espacial.

Entre los métodos evaluados para la correcta identificación de especies muy similares morfológicamente de flebotominos, el análisis de morfometría ha probado ser una útil herramienta taxonómica para el reconocimiento de especímenes pertenecientes a un taxón en particular (27,28). Además, la morfometría ha sido usada con éxito para estimar variaciones inter-poblacionales en diversas especies (29,30), obteniéndose en algunos casos una buena correlación con marcadores moleculares (31,32).

Hasta ahora, en México se han realizado diversos estudios sobre flebotominos que incluyen determinaciones sobre dinámica poblacional (13,14), índice de paridad y sobrevivencia por ciclo gonotrófico (15), abundancia relativa y composición de especies por método de captura (8), así como la identificación de especies antropofílicas (33). También existen estudios de distribución geográfica y/o taxonómicos (9,21, 23,26,34,35). No obstante, no se han realizado estudios que analicen la variación geográfica que puedan presentar distintas poblaciones, en especial con *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata*; por lo que en la presente investigación se realizó un análisis comparativo morfométrico de especímenes de ambas especies, provenientes de distintas localidades del sureste de México. El presente trabajo reporta un análisis morfométrico preliminar donde se evaluaron 31 caracteres en *Lu.*

olmeca olmeca y *Lu. cruciata*, procedentes de ocho y seis poblaciones, respectivamente. El objetivo primario de este estudio fue evaluar la existencia de variabilidad de caracteres morfológicos entre miembros de poblaciones originadas de diferentes regiones y evaluar si mediante un análisis discriminante las poblaciones se podrían segregar en unidades independientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de estudio. Las localidades seleccionadas para el estudio se ubican en el sureste de México, las cuales fueron: Becanchén (N 19° 52.31', O 89° 12.62'), municipio de Tekax, Yucatán; Dos Naciones (N 17° 58.40', O 89° 20.74') y La Guadalupe (N 18° 20.24', O 89° 28.49'), municipio de Calakmul, Campeche; La Libertad (N 18° 31.60', O 90° 27.89'), municipio de Escárcega, Campeche; La Virgencita de la Candelaria (N 18° 14.53', O 89° 19.65'), municipio de Calakmul, Campeche; Santa Isabel (N 19° 28.20', O 89° 12.52'), municipio de Carrillo Puerto, Quintana Roo; municipios de Cárdenas (N 18° 10.51', O 93° 29.06') y Cunduacán (N 18° 07.23', O 93° 12.54') en Tabasco (**Figura 1**). Las localidades fueron consideradas para el estudio por los antecedentes previos de casos de leishmaniasis cutánea.

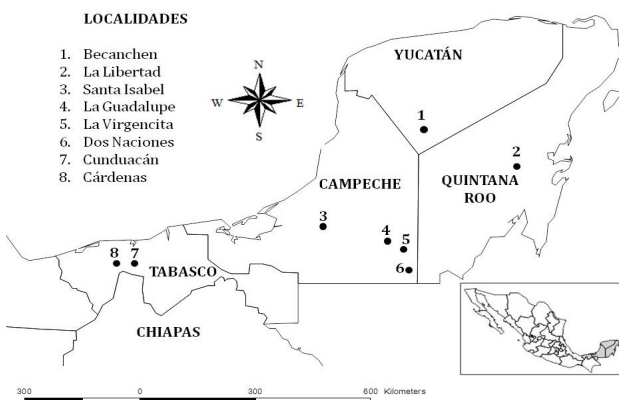


Figura 1. Localización geográfica de los sitios de estudio en el sureste de México. Las localidades donde se colectaron los especímenes de *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata* se enlistan y señalan por puntos. El recuadro en la esquina inferior izquierda representa la posición relativa del sureste (área sombreada) con el resto del país

Colecta de especímenes. Las hembras de *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata* fueron capturadas con la trampa Shannon (36), la cual consiste en una carpa rectangular cuadrada sin base (1.5 m de ancho x 2.5 m de largo, 1.5 m de altura), confeccionada en manta y suspendida a 30 cm del suelo, dentro de ella se colocó un cebo humano, quienes se protegieron con pantalones largos y camisa de mangas largas (37). Los flebotominos, atraídos por el cebo, ingresaron a la trampa por el espacio existente entre ella y el suelo, dirigiéndose al cebo para alimentarse, para posteriormente reposar sobre las paredes internas de la trampa, las cuales fueron revisadas cada 30 minutos, de donde fueron capturadas con la ayuda de un aspirador bucal y colocadas dentro de un frasco colector de plástico. La trampa Shannon se colocó de 18:00 a 22:00 hrs, tiempo en que los flebotominos presentan la mayor actividad (14,18). También se capturaron con la trampa Disney (38), técnica que consistió de una charola de aluminio de 50 x 50 cm, impregnada con aceite de castor (Riedel de Häen, Seelze, Suiza), sobre la cual se colocó una jaula de 15 x 17 x 7 cm, con un roedor, y encima de ésta una charola invertida de aluminio, para proteger la trampa en caso de lluvia. Las trampas se ubicaron a una altura de 20 cm sobre el suelo, funcionando de las 18:00 hrs a las 07:00 hrs del día siguiente.

Identificación de flebotominos. En el laboratorio, los especímenes se lavaron con una solución de jabón Extran® al 2% (Extran MA02, pH neutro, EMD Chemicals Inc. Gibbstown, NJ, EEUU); posteriormente, fueron lavados nuevamente en agua destilada y fueron macerados y aclarados con solución de hidróxido de sodio (J. T. Baker®, Xalostoc, Edo. de México, México) al 10% durante 24 hrs a temperatura ambiente. Al día siguiente, los especímenes se deshidrataron por 10 minutos en cada una de la serie de alcoholes, comenzando con una concentración al 70%, 80% y 100%. Posteriormente, con la ayuda del microscopio estereoscópico y de un par de agujas entomológicas

Análisis morfométrico de *Lutzomyia*

finas, los especímenes fueron colocados y disecados sobre una gota de resina sintética de Berlese (Entomopraxis S. C., Barcelona, España) colocada sobre un portaobjetos. El cuerpo fue seccionado de la manera siguiente: la cabeza se separó del resto del cuerpo; el tórax y el abdomen se colocaron en el centro de la preparación de manera lateral, extendiendo lo más posible alas y patas. Mientras que la cabeza se colocó al lado izquierdo del cuerpo dejando el foramen hacia la parte de arriba, las antenas y palpos se extendieron. Una vez seccionado y posicionado el espécimen, se le colocó el cubreobjetos procurando cubrir la gota de la resina de Berlese. Los flebotominos fueron identificados utilizando las claves de Young (39) y Young y Duncan (6). Los especímenes analizados en este estudio fueron almacenados en la colección y dados de alta en la base de datos del Laboratorio de Entomología Médica, Departamento de Zoología de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Medición de caracteres. Las mediciones de los especímenes se tomaron bajo un microscopio compuesto Carl Zeiss® equipado con una pieza ocular graduada (10 X), la división de esta pieza estaba dada en 10 unidades. Debido a posibles cambios de temperatura ambiental, la calibración de la pieza ocular se realizó semanalmente usando una regla graduada ($100 \times 0.01 = 1 \text{ mm}$; Gaticules Ltd, Tonbridge, Kent, Inglaterra). En el **Cuadro 1**, se puede observar la magnificación 40X y 10X, las cuales fueron utilizadas de acuerdo con el tamaño de las estructuras por medir; si eran muy pequeñas, se usó la magnificación 40X y para estructuras más grandes se utilizó la magnificación 10X. Después de tener la matriz de datos con las mediciones de cada magnificación, se realizó la conversión respectiva a mm. Con el propósito de minimizar el error humano por sesgo de medición, todas éstas fueron hechas por una sola persona.

Análisis de datos. Después de realizadas las mediciones de los caracteres morfológicos, se

Cuadro 1
Lista de los 31 caracteres morfológicos usados para el análisis morfométrico de las especies *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata* colectadas en las distintas localidades del sureste de México

Variable	Abreviatura	Magnificación
Altura del ojo	AIO	(40 x)
Ancho del ojo	AnO	(40 x)
Espacio interocular	EI	(40 x)
Altura de la cabeza	AIC	(10 x)
Ancho de la cabeza	AnC	(10 x)
Longitud del clipeo	LCl	(40 x)
Longitud de la faringe	LF	(40 x)
Longitud del labro	LL	(40 x)
Palpo 1	P1	(40 x)
Palpo 2	P2	(40 x)
Palpo 3	P3	(40 x)
Palpo 4	P4	(40 x)
Palpo 5	P5	(40 x)
Flagelómero 1	F11	(10 x)
Fémur 1	F1	(10 x)
Tibia 1	Ti1	(10 x)
Tarso 1	T1	(10 x)
Fémur 2	F2	(10 x)
Tibia 2	Ti2	(10 x)
Tarso 2	T2	(10 x)
Fémur 3	F3	(10 x)
Tibia 3	Ti3	(10 x)
Tarso 3	T3	(10 x)
Longitud del mesonoto	LM	(10 x)
Longitud del cuerpo	LC	(10 x)
Longitud α	La	(10 x)
Longitud β	L β	(10 x)
Longitud γ	L γ	(10 x)
Longitud δ	L δ	(10 x)
Longitud vena radial 5	LR5	(10 x)
Longitud total alar	LA	(10 x)

elaboró una base de datos en Excel® en donde se vaciaron los registros para convertirlas en milímetros con la ayuda del programa estadístico MINITAB 11.0 (Clecom, Inglaterra). Después de

ello, se procedió a realizar para cada variable un análisis estadístico descriptivo, obteniendo media, mediana, cuartiles, desviación estándar, así como la determinación de mediciones extremas, las cuales una vez identificadas se eliminaron de la base de datos correspondiente.

Se realizaron gráficos de dispersión de datos y se procedió a determinar significancia estadística para cada carácter entre poblaciones, usando la prueba univariada de Análisis de Varianza (ANDEVA) y para corregir el error experimental acumulado de cada prueba comparativa, se procedió a calcular la fórmula de Bonferroni (40) cuya fórmula es: $(\alpha' = \alpha/k)$; donde α es el nivel de significancia y k es el número de comparaciones.

A partir de los caracteres que resultaron significativos con la prueba univariada, se procedió a construir una matriz de datos considerando las poblaciones, el objetivo de medición (10X y 40X) y los caracteres morfológicos significativos para cada especie. Una vez construida la base de datos, se procedió al análisis de función discriminante con el programa computacional Statgraphics 5.1 (Manugistics Inc, Rockville, EE.UU.). Para cada especie, los datos se analizaron de forma independiente y considerando para un análisis exploratorio sólo los caracteres medidos en 10X, luego sólo los caracteres medidos en 40X y, por último, con todos los datos. Para seleccionar las funciones discriminantes, se usó como criterio el análisis que haya tenido el mayor porcentaje de casos correctamente clasificados.

El uso del análisis de función discriminante ayudó a predecir a los miembros de una población basada en los valores de otras variables cuantitativas. Las gráficas creadas con las funciones discriminantes se incluyen en los resultados del presente estudio (**Figuras 2A y 2B**). Adicionalmente, con el paquete estadístico SAS®, se reanalizaron sólo las variables que en primera instancia habían sido discriminadas con las gráficas y el análisis del Statgraphics. En el programa SAS, se usó el procedimiento STEPDISC, el cual al inicio no considera ninguna variable y luego va incorporando, una a la vez, el resto de variables,

hasta que, al final, la decisión de introducir o sacar del modelo las diferentes variables es con base en los valores de covarianza y correlación parcial obtenidos; de esta manera, se logran identificar las variables que más poder discriminatorio tienen en el modelo según los resultados de la prueba Lambda de Wilks, considerando un nivel de significancia de $P \leq 0.01$.

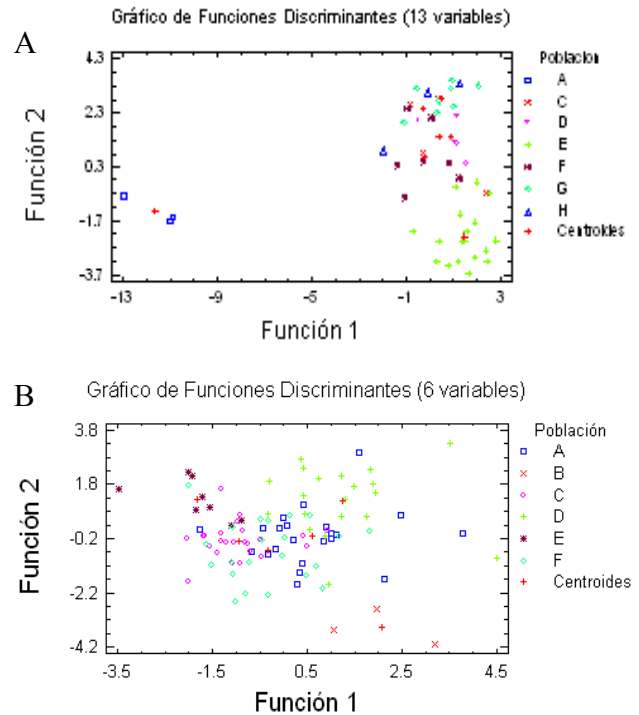


Figura 2. A) Análisis multivariado en poblaciones de *Lu. olmeca olmeca*. B) Análisis multivariado en poblaciones de *Lu. cruciata*

Simbología: A) Becanchén. B) Dos Naciones. C) La Guadalupe. D) La Libertad. E) La Virgencita. F) Santa Isabel. G) Cárdenas. H) Cunduacán. Ce. Centroides

RESULTADOS

Análisis univariado para la separación de caracteres para el análisis multivariado. Los promedios y las desviaciones estándar de las mediciones de los 31 caracteres de ocho poblaciones de *Lu. olmeca olmeca* y de seis poblaciones de *Lu. cruciata*, se muestran en los **Cuadros 2 y 3**, respectivamente.

Los resultados del análisis univariado de las mediciones de caracteres morfológicos reveló

Análisis morfométrico de *Lutzomyia*

la existencia de variabilidad dentro de varios caracteres entre poblaciones. Para *Lu. olmeca olmeca*, de 31 caracteres evaluados, 26 resultaron significativos, mientras que para *Lu. cruciata* se encontraron diferencias significativas en 16 de 31

caracteres estudiados. Para *Lu. olmeca olmeca* de estos caracteres significativos, 13 están asociados a la cabeza, cinco a las patas, uno al tórax, seis a las alas, así como la longitud total del cuerpo. Para *Lu. cruciata*, 11 de esos caracteres pertenecen

Cuadro 2
Caracteres morfológicos en hembras de *Lu. olmeca olmeca* provenientes de ocho poblaciones localizadas en el sureste de México

Carácter	Becanchén (n=10)	Dos Naciones (n=28)	La Guadalupe (n=32)	La Libertad (n=30)	La Virgencita (n=30)	Santa Isabel (n=30)	Cárdenas (n=20)	Cunduacán (n=13)
AIO	0.24±0.01	0.24±0.01	0.24±0.01	0.24±0.01	0.24±0.01	0.25±0.01	0.24±0.01	0.23±0.03
AnO	0.14±0.01	0.15±0.01	0.15±0.02	0.15±0.02	0.12±0.03	0.15±0.01	0.13±0.01	0.12±0.02
EI	0.10±0.02	0.13±0.02	0.11±0.02	0.10±0.02	0.12±0.01	0.10±0.02	0.01±0.01	0.11±0.02
AIC	0.43±0.02	0.46±0.02	0.48±0.02	0.47±0.02	0.48±0.01	0.47±0.03	0.46±0.02	0.45±0.03
AnC	0.38±0.03	0.37±0.03	0.39±0.03	0.39±0.03	0.35±0.07	0.40±0.03	0.38±0.02	0.38±0.02
Fl1	0.36±0.03	0.37±0.02	0.38±0.02	0.37±0.02	0.36±0.02	0.37±0.03	0.35±0.02	0.33±0.06
LCI	0.15±0.01	0.17±0.01	0.18±0.01	0.18±0.01	0.18±0.01	0.17±0.01	0.18±0.01	0.25±0.30
LF	0.20±0.01	0.20±0.02	0.21±0.01	0.22±0.01	0.21±0.01	0.22±0.02	0.22±0.01	0.21±0.01
LL	0.29±0.02	0.27±0.02	0.28±0.01	0.28±0.02	0.28±0.01	0.27±0.05	0.28±0.01	0.28±0.01
P1	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
P2	0.14±0.02	0.12±0.02	0.12±0.04	0.12±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01	0.12±0.03	0.11±0.01
P3	0.16±0.01	0.16±0.01	0.18±0.09	0.16±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01	0.16±0.04	0.15±0.01
P4	0.07±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.04	0.06±0.01
P5	0.17±0.03	0.13±0.04	0.13±0.01	0.13±0.01	0.12±0.01	0.13±0.02	0.12±0.03	0.14±0.04
F1	0.97±0.06	0.94±0.03	1.01±0.06	0.98±0.06	0.99±0.04	0.96±0.07	0.97±0.03	0.91±0.11
Ti1	1.48±0.15	1.30±0.03	1.43±0.01	1.39±0.09	1.41±0.06	1.45±0.07	1.36±0.05	2.35±3.22
T1	0.98±0.09	0.88±0.03	0.93±0.06	0.92±0.04	0.93±0.03	0.96±0.04	0.91±0.09	0.80±0.21
F2	0.83±0.09	0.86±0.08	0.85±0.04	0.86±0.05	0.88±0.04	0.84±0.05	0.85±0.03	0.81±0.07
Ti2	1.66±0.17	1.53±0.01	1.58±0.14	1.63±0.09	1.62±0.08	1.64±0.12	1.49±0.38	1.45±0.30
T2	1.14±0.19	1.00±0.01	1.02±0.05	1.04±0.05	1.01±0.09	1.07±0.03	0.10±0.07	0.89±0.22
F3	0.90±0.04	0.93±0.02	0.98±0.05	0.98±0.05	0.99±0.04	0.95±0.08	0.98±0.03	0.93±0.08
Ti3	1.81±0.09	1.79±0.09	1.96±0.11	1.90±0.11	1.93±0.10	1.93±0.13	1.87±0.07	1.71±0.32
T3	1.19±0.02	1.12±0.04	1.16±0.07	1.18±0.06	1.17±0.07	1.12±0.25	1.14±0.06	0.91±0.38
LM	0.58±0.02	0.59±0.03	0.61±0.04	0.61±0.03	0.58±0.04	0.60±0.3	0.59±0.02	0.59±0.03
LCu	3.09±0.25	2.97±0.12	3.14±0.34	3.25±0.20	3.55±0.19	3.07±0.30	3.14±0.62	3.32±0.32
VA	0.41±0.04	0.57±0.05	0.61±0.05	0.58±0.06	0.60±0.05	0.56±0.06	0.56±0.03	0.54±0.02
VB	0.34±0.03	0.40±0.09	0.40±0.04	0.38±0.02	0.38±0.03	0.38±0.06	0.35±0.04	0.34±0.02
VG	0.31±0.03	0.17±0.03	0.20±0.05	0.20±0.03	0.18±0.03	0.21±0.05	0.20±0.03	0.18±0.03
VD	0.04±0.02	0.13±0.17	0.14±0.04	0.11±0.06	0.13±0.03	0.09±0.04	0.09±0.02	0.09±0.04
LR5	1.30±0.06	1.97±2.66	1.48±0.08	1.44±0.07	1.47±0.07	1.39±0.21	1.39±0.04	1.16±0.51
LA	2.25±0.07	2.43±0.52	2.55±0.12	2.54±0.01	2.57±0.01	2.45±0.20	2.35±0.13	2.39±0.08

Tamaño de muestra (n) y valores promedio (±) desviación estándar

Cuadro 3

Caracteres morfológicos medidos en hembras de *Lu. cruciata* provenientes de seis poblaciones localizadas en el sureste de México

Carácter	Becanchén (n=29)	Dos Naciones (n= 20)	La Guadalupe (n= 30)	La Libertad (n= 30)	La Virgencita (n= 28)	Santa Isabel (n=28)
AIO	0.23±0.01	0.23±0.01	0.23±0.10	0.22±0.04	0.22±0.01	0.22±0.01
AnO	0.14±0.01	0.15±0.01	0.14±0.01	0.14±0.03	0.12±0.01	0.13±0.01
EI	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.8±0.010	0.10±0.01	0.90±0.01
AIC	0.40±0.02	0.39±0.02	0.41±0.02	0.41±.020	0.41±0.02	0.40±0.02
AnC	0.38±0.02	0.39±0.01	0.38±0.02	0.39±0.03	0.36±0.03	0.37±0.02
FII	0.38±0.46	0.30±0.02	0.20±0.30	0.30±0.02	0.31±0.02	0.29±0.02
LCI	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01	0.14±0.01
LF	0.19±0.01	0.19±0.01	0.19±0.01	0.19±0.03	0.19±0.01	0.18±0.01
LL	0.28±0.02	0.27±0.01	0.27±0.03	0.29±0.01	0.28±0.02	0.27±0.01
P1	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01	0.06±0.02	0.07±0.01	0.07±0.07
P2	0.16±0.01	0.16±0.01	0.15±0.01	0.16±0.01	0.16±0.01	0.15±0.01
P3	0.18±0.02	0.18±0.01	0.17±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01	0.17±0.01
P4	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.14±0.04	0.14±0.01	0.13±0.01
P5	0.33±0.06	0.29±0.07	0.46±0.57	0.37±0.15	0.38±0.03	0.31±0.04
F1	0.76±0.05	0.76±0.07	0.77±0.04	0.76±0.04	0.78±0.07	0.74±0.05
Ti1	0.84±0.07	0.84±0.07	0.82±0.06	0.86±0.05	0.88±0.16	0.80±0.06
T1	0.48±0.03	0.47±0.04	0.48±0.06	0.49±0.02	0.51±0.16	0.45±0.03
F2	0.75±0.04	0.76±0.06	0.76±0.05	0.77±0.05	0.76±0.04	0.73±0.06
Ti2	0.98±0.08	1.03±0.09	0.99±0.06	1.04±0.02	1.06±0.17	0.96±0.08
T2	0.53±0.03	0.53±0.05	0.54±0.04	0.55±0.04	0.60±0.15	0.53±0.09
F3	0.81±0.05	0.81±0.07	0.83±0.04	0.84±0.08	0.82±0.04	0.78±0.06
Ti3	1.22±0.01	1.25±0.14	1.21±0.17	1.29±0.07	1.31±0.17	1.17±0.11
T3	0.64±0.07	0.63±0.04	0.65±0.04	0.68±0.02	0.68±0.15	0.64±0.09
LM	0.59±0.04	0.59±0.03	0.58±0.03	0.58±0.22	0.58±0.03	0.56±0.03
LCu	2.95±0.32	2.86±0.45	3.18±0.23	3.01±0.09	3.01±0.29	3.00±0.20
VA	0.49±0.04	0.49±0.38	0.47±0.31	0.50±0.02	0.50±0.04	0.47±0.03
VB	0.25±0.04	0.23±0.02	0.23±0.03	0.25±0.02	0.25±0.03	0.25±0.02
VG	0.26±0.03	0.26±0.04	0.25±0.03	0.26±0.30	0.26±0.03	0.24±0.02
VD	0.11±0.04	0.12±0.03	0.11±0.03	0.13±0.02	0.11±0.04	0.17±0.22
LR5	1.27±0.08	1.24±0.06	1.20±0.06	1.21±0.04	1.28±0.08	1.14±0.29
LA	2.07±0.14	2.02±0.11	1.92±0.33	2.10±0.07	2.11±0.11	2.00±0.10

Tamaño de muestra (n) y valores promedio (±) desviación estándar

a la cabeza, tres a las patas, uno al ala, así como también a la longitud total (**Cuadro 4**).

El análisis de funciones discriminantes multivariado confirmó la existencia de variabilidad entre las poblaciones de *Lu. olmeca* y *Lu. cruciata* respectivamente, como se había previsto con el análisis univariado. Este hallazgo pone de manifiesto la existencia de, por lo menos, dos

grupos de población diferentes para cada especie estudiada. Para *Lu. olmeca olmeca*, se observó que la función de discriminación separó claramente a los miembros de la localidad de Becanchén, mientras que el resto de las poblaciones mostraron un traslape en grado variable entre ellas (**Figura 2A**). La función de discriminación para *Lu. olmeca olmeca* fue: $-926.777 + 610.529 * AIC_{10}$

Cuadro 4

Análisis univariado realizado para cada variable morfológica. La valores significancia para la prueba (ANDEVA) de α (0.05) fueron corregidos mediante la fórmula de Bonferroni para un valor crítico de $\alpha'' < 0.002$. Los valores marcados con un asterisco corresponden a variables que resultaron significativas, el resto de los caracteres no significativos fueron eliminados para análisis multivariado

Variable	Abreviatura	<i>Lu. olmeca olmeca</i>		<i>Lu. cruciata</i>	
		F=	P	F=	P
Altura del ojo	AIO	3.66	0.001*	7.44	0.000*
Ancho del ojo	AnO	14.90	0.000*	10.61	0.000*
Espacio interocular	EI	5.76	0.000*	8.63	0.000*
Altura de la cabeza	AIC	8.61	0.000*	4.87	0.000*
Ancho de la cabeza	AnC	6.33	0.000*	7.03	0.000*
Flagerómero I	FII	5.29	0.000*	1.77	0.122
Longitud del clipeo	LCI	8.70	0.000*	2.07	0.072
Longitud de la faringe	LF	6.59	0.000*	1.71	0.137
Longitud del labro	LL	3.35	0.001*	4.35	0.001*
Palpo 1	P1	2.69	0.008	5.95	0.000*
Palpo 2	P2	5.22	0.000*	7.44	0.000*
Palpo 3	P3	4.53	0.000*	4.79	0.000*
Palpo 4	P4	4.51	0.000*	4.45	0.001*
Palpo 5	P5	7.28	0.000*	10.78	0.000*
Fémur 1	F1	2.73	0.013	3.08	0.012
Tibia 1	Ti1	5.88	0.000*	2.62	0.027
Tarso 1	T1	4.82	0.000*	1.87	0.105
Fémur 2	F2	3.06	0.006	2.29	0.049
Tibia 2	Ti2	2.45	0.024	4.29	0.001*
Tarso 2	T2	3.99	0.001*	2.53	0.032
Fémur 3	F3	4.04	0.001*	4.43	0.001*
Tibia 3	Ti3	3.68	0.001*	4.71	0.001*
Tarso 3	T3	2.83	0.010	2.25	0.054
Longitud del mesonoto	LM	4.44	0.000*	3.10	0.011
Longitud total del cuerpo	LCu	13.10	0.000*	4.10	0.002*
α	VA	17.31	0.000*	1.85	0.110
β	VB	3.72	0.000*	2.16	0.065
γ	VG	6.33	0.000*	1.46	0.211
δ	VD	11.45	0.000*	0.36	0.877
Longitud de vena radial 5	LR5	16.00	0.000*	5.08	0.000*
Longitud alar	LA	14.16	0.000*	3.66	0.005

Cuadro 5

Resultados para *Lu. olmeca olmeca* con el procedimiento STEDISC en SAS, para la identificación de las variables con mayor poder discriminatorio en el modelo, según la prueba de Lambda de Wilks

Paso	Variable introducida	Correlación parcial	F	P>F	Lambda de Wilks	P> Lambda	Correlación canónica cuadrada de la media	P> CCCM
1	AIC_10	0.5148	5.66	0.0004	0.4852	0.0004	0.0858	0.0004
2	AnC_10	0.5439	6.16	0.0002	0.2212	<0.0001	0.1476	<0.0001
3	P2_40	0.4307	3.78	0.0064	0.1260	<0.0001	0.1922	<0.0001
4	EI_40	0.4770	4.41	0.0028	0.0659	<0.0001	0.2505	<0.0001
5	Ti1_10	0.4070	3.20	0.0160	0.0391	<0.0001	0.3143	<0.0001
6	Valfa_10	0.6009	6.78	0.0002	0.0156	<0.0001	0.3660	<0.0001

AIC_10= altura de la cabeza, AnC_10= ancho de la cabeza, P2_40= longitud del Palpo 2, EI_40= distancia del espacio interocular, Ti1= longitud de la tibia 1, Valfa= longitud de la vena R2 (distancia α)

+ 993.731*AnC_10 - 392.569*EI_40
 + 55.9329*Lcu_10 + 1049.89*LF_40
 + 383.184*LR5_10 - 267.921*P2_40
 + 541.944*P3_40 + 916.791*T1_10
 - 247.376*T2_10 - 71.3189*Ti1_10 -
 691.624*Valfa_10 + 146.212*Vbeta_10_1.

Para *Lu. cruciata*, se obtuvo que el análisis discriminante separó en su totalidad a los miembros de la población de Dos Naciones y a los miembros de la población de La Libertad, aunque existió un poco de traslape de ésta con el resto de las poblaciones analizadas (**Figura 2B**). La función de discriminación para *Lu. cruciata* fue: 0.998837*AnC_10 - 0.500893*EI_40 - 0.595734*Lcu_10 + 0.447554*P4_40 - 0.450236*P5_40 - 0.00129037*Ti3_10.

Para las poblaciones de *Lu. olmeca olmeca*, se observó que, con el procedimiento de STEPDISC en SAS, se logró la identificación de las variables (caracteres morfológicos) que tuvieron mayor peso en la función de discriminación. El **Cuadro 5** ilustra que las variables con mayor poder de discriminación fueron: la altura de la cabeza (AIC_10), el ancho de la cabeza (AnC_10), la longitud del palpo 2 (P2_40), la distancia del espacio interocular (EI_40), la longitud de la tibia 1 (Ti1_10) y la longitud de la vena R2 (conocida como distancia α (Valfa_10). Mientras que para el caso de las poblaciones de *Lu. cruciata*, las variables con mayor poder de discriminación

fueron: la longitud del palpo 4 (P4_40), el ancho de la cabeza (AnC_10), la longitud del palpo 5 (P5_40), la longitud de la tibia 3 (Ti3_10), la longitud total del cuerpo (LCu_10) y la distancia del espacio interocular (EI_40) (**Cuadro 6**).

DISCUSIÓN

Los análisis morfométricos han sido reportados como herramientas útiles para la separación y la identificación de muchas especies de insectos en un complejo, o bien, para analizar la variación geográfica en tamaño. En insectos de importancia médica, se han reportado análisis morfométricos en *Triatoma dimidiata* (Latreille) para interpretar la variación geográfica en diferentes poblaciones (29,41); también se han utilizado para distinguir entre poblaciones silvestres y domésticas de *Triatoma infestans* (Klug) (42). En combinación con el análisis del perfil de hidrocarburos cuticulares, la medición de caracteres morfométricos en *Tabanus nigrovittatus* Macquart y *Tabanus conterminus* Walker permitió reconocer entre ambas especies, aunque las mediciones morfométricas por sí solas no clasificaron en todos los casos a las dos especies. En otras especies de Diptera, como en mosquitos, los análisis comparativos morfológicos entre especies estrechamente relacionadas han permitido discriminar hasta en 97% de confiabilidad a los miembros del complejo *Anopheles gambiae* (43).

Cuadro 6

Resultados para *Lu. cruciata* con el procedimiento STEDISC en SAS, para la identificación de las variables con mayor poder discriminador en el modelo, según la prueba de Lambda de Wilks

Paso	Variable introducida	Correlación parcial	F	P>F	Lambda de Wilks	P> Lambda	Correlación canónica cuadrada de la media	P> CCCM
1	P4_40	0.3543	3.73	0.0084	0.6456	0.0084	0.0709	0.0084
2	AnC_10	0.4347	5.08	0.0015	0.3650	0.0001	0.1558	0.0001
3	P5_40	0.4770	5.84	0.0006	0.1909	<0.0001	0.2234	<0.0001
4	Ti3_10	0.4523	5.12	0.0015	0.1045	<0.0001	0.2872	<0.0001
5	LCu_10	0.3055	2.64	0.0430	0.0726	<0.0001	0.2872	<0.0001
6	EI_40	0.2855	2.32	0.0690	0.0519	<0.0001	0.3595	<0.0001

P4_40= longitud del palpo 4, AnC_10= ancho de la cabeza, P5_40= longitud del palpo 5, Ti3_10= longitud de la tibia 3, LCu_10= longitud total del cuerpo, EI_40= distancia del espacio interocular

En especies del subgénero *Nyssorhynchus*, el análisis multivariado de caracteres morfológicos permitió identificar y separar con 90% de confiabilidad a las especies *Anopheles nuneztovari* Gabaldon, *Anopheles rangeli* Gabaldon, Cova-García & López, *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova-García & López, *Anopheles oswaldoi* (Peryassú) y *Anopheles triannulatus* (Neiva & Pinto) (44). También, usando un análisis multivariado, se ha podido distinguir entre dos especies crípticas de mosquitos del género *Haemagogus* (45). Todo lo anterior demuestra la gran utilidad y el poder discriminante de los análisis multivariados para elucidar problemas taxonómicos.

En vectores de leishmaniasis, los análisis morfométricos se han empleado para discriminar entre especies estrechamente relacionadas; por ejemplo, Añez *et al.* (28), usando 31 caracteres morfológicos, pudieron distinguir diferencias entre las especies *Lutzomyia townsendi* (Ortiz), *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno & Hoyos y *Lutzomyia youngi* Feliciangeli & Murillo. Similarmente, Gebre-Michael y Medhin (46), usando 27 caracteres morfológicos, se obtuvieron por un análisis discriminante que se podía separar las especies *Phlebotomus duboscqi* Newstead-Lemaire y *Phlebotomus bergeroti* Parrot, en Etiopía.

Algunos autores han estudiado la variabilidad de caracteres cuantitativos y cualitativos en *Lutzomyia umbratilis* Ward & Frahia, de Brazil y Venezuela, encontrando que, del grupo de 60 caracteres cuantitativos morfológicos, hubo diferencias significativas entre las cinco poblaciones estudiadas en ambos países (47). Otros estudios han evaluado la utilidad de caracteres alares en conjunto con análisis de isoenzimas de diferentes poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), encontrando que se podrían diferenciar las distintas poblaciones de Centro y Sudamérica (48).

Por otra parte, se ha documentado que la variación morfométrica en flebotominos no sólo es ocasionada por distancia geográfica, sino que la altitud y estacionalidad son también fuentes de variación. Por ejemplo, en *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) se analizaron 46 caracteres morfológicos de poblaciones localizadas a distintas altitudes, encontrando que las localizadas entre los 488 m y 1,117 msnm fueron distintas en un análisis de funciones discriminantes (49). Un hallazgo similar fue reportado para *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva), colectadas a altitudes entre los 30 y los 750 msnm (50). En los resultados reportados en este trabajo con *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata*, el efecto de la altitud sobre la variabilidad morfológica es mínima, ya que la mayoría de las localidades se encuentran entre el rango de 10 a

280 msnm.

El efecto de la estacionalidad sobre las dimensiones morfométricas de flebotominos, se ha evaluado en *Lutzomyia intermedia*, aunque no se encontraron diferencias entre especímenes colectados en junio y en diciembre (50). En contraste, Goyena y cols. (51) reportaron que el tiempo de desarrollo generacional en distintas estaciones del año en *Sergentomyia minuta* (Rondani) ocasiona variaciones de tamaño en los adultos. Los especímenes estudiados en el presente trabajo de *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata* han sido colectados dentro de un mismo periodo estacional, por lo que las diferencias encontradas en ambas especies se pueden atribuir, principalmente, a la variación geográfica.

Aparte de ayudar a la elucidación de problemas taxonómicos y/o ecológicos, los análisis morfológicos representan una herramienta poderosa y de bajo costo para determinar segregación entre poblaciones de una misma especie. Rangel y cols. (31) demostraron que, usando morfometría, se pudo distinguir entre las poblaciones de *Lutzomyia whitmani* (Antunes & Coutinho) del Amazonas y del noreste de Brasil. Más tarde, otros autores han podido demostrar que las diferencias morfométricas eran consistentes con los análisis de ADN mitocondrial (52). Aunado a estas diferencias, se ha reportado que las diferencias encontradas en *Lu. whitmani* también correlacionan con distintos grados de antropofilia (53). Por su parte, Arrivillaga y cols. (54) demostraron, para *Lu. longipalpis* de diferentes poblaciones en Venezuela, que existía una correlación entre la variabilidad morfométrica (en larvas) con la diversidad genética encontrada entre las poblaciones estudiadas.

Este estudio representa la primera contribución sobre la morfometría de dos importantes especies de flebotominos (*Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata*), las cuales han sido implicadas en diversos estudios como participantes en la transmisión de *Le. mexicana* en la Península de Yucatán (8, 13-15). Para el caso de *Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata*, el análisis morfométrico

de este estudio sugiere la existencia de, al menos, dos grupos que fueron discriminados en el análisis estadístico. Es interesante señalar que, para ambas especies estudiadas (*Lu. olmeca olmeca* y *Lu. cruciata*), las poblaciones segregadas no mostraron similitud con otras poblaciones que geográficamente estaban más cercanas entre sí. Esto podría sugerir que los flujos genéticos en las poblaciones podría ser afectado por barreras geográficas o ecológicas aún desconocidas. Es por ello que se considera que se requieren más estudios que corroboren estos hallazgos sobre la segregación de poblaciones usando caracteres morfológicos, además de evaluar la genética poblacional en estas dos especies de flebotominos en México. Estos estudios de variabilidad genética permitirán evaluar si existe una asociación entre la heterogeneidad genética y los atributos de la especie para la transmisión eficiente de *Le. mexicana* (*i.e.* competencia y capacidad vectorial).

Por último, se reconoce que una de las limitaciones, que se presentaron al realizar las mediciones de caracteres morfológicos, fue la pérdida de apéndices ocasionada por el daño en la trampas en campo, o bien, originada durante el proceso curatorial. También, se presentaron dificultades de visibilidad para la correcta medición de ciertos caracteres, ocasionado por la posición del montaje. Esos problemas también han sido reportados en otros estudios (47). Para limitar estas dificultades, algunos autores han sugerido que todos los apéndices corporales sean cuidadosamente seccionados y, en el caso de las alas, realizar un proceso de tinción para una mejor visualización de las venas alares (49). En futuros estudios con vectores de leishmaniasis en el sureste de México, se considerarán estas últimas recomendaciones con la finalidad de reducir los errores de medición y reducir la pérdida de datos morfométricos. Además, se requiere que estos análisis morfométricos también evalúen la variación alométrica de los caracteres y que aquellos caracteres o funciones discriminantes sean correlacionados con datos de variabilidad genética y estudios de comportamiento de *Lu.*

olmeca olmeca y *Lu. cruciata*. El objetivo fundamental y prioritario de estos estudios es determinar y asociar las variaciones intra e inter-poblacionales de los insectos vectores; toda vez que estos aspectos hayan sido evaluados, se podrán analizar las variables eco-epidemiológicas que más impacto tienen en la transmisión de la leishmaniasis en el sureste de México.

AGRADECIMIENTOS

La presente contribución es parte del proyecto de investigación "Vector capacity of allopatric populations of *Lutzomyia olmeca olmeca* and the distribution in the Peninsula of Yucatán, Mexico", la cual fue financiada por el Programa de Entrenamiento de Enfermedades Tropicales/Organización Mundial de la Salud/Banco Mundial, ID A00732, otorgado a EART. Se agradece al M. en C. Raúl Zapata Mata, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por facilitar los especímenes del estado de Tabasco. También, se reconoce la participación en campo de los M. en C. Felipe A. Dzul-Manzanilla, Azael Che-Mendoza, Ezequiel Tun-Ku. El mapa fue elaborado y facilitado por el Biol. David A. Moo-Llanes, a quien se le agradece su contribución.

REFERENCIAS

1. **Young DG, Lawyer PG.** New World Vectors of the Leishmaniasis. In: K. F. Harris (ed.) Current Topics in Vector Research, Vol. 4. Springer-Verlag, New York Inc. 1987; p. 29-30
2. **Young DG, Arias R.** Flebotomos: Vectores de Leishmaniasis en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. Cuaderno Técnico No. 33, 1992; p 1-28.
3. **Killick-Kendrick R.** The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin Dermatol 1999; 17: 279-89.
4. **Velasco-Castrejón O.** Las Leishmaniasis en México. Rev Lat-amer Microbiol 1987; 29: 119-26.
5. **Vargas L, Díaz-Nájera A.** *Phlebotomus farilli* n. sp., *Ph. humboldti* n. sp. y *Ph. olmecus* n. sp. de México (Diptera: Psychodidae). Rev Inst Salub Enf Trop Mex 1959; 19:141-49.
6. **Young DG, Duncan MA.** Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). American Entomological Institute Associated Publishers, Gainesville, FL. 1994; 881 pp
7. **Rebollar-Téllez EA, Manrique-Saide P, Tun-Ku E, Che-Mendoza A, Dzul-Manzanilla FA.** Further records of phlebotomid sandflies (Diptera: Phlebotomidae) from Campeche, Mexico. Entomol News 2004; 5: 283-91.
8. **Rebollar-Téllez EA, Tun-Ku E, Manrique-Saide P, Andrade-Narvaéz FJ.** Relative abundances of sandfly species (Diptera: Phlebotominae) in two villages in the same area of Campeche, in Southern Mexico. Ann Trop Med Parasitol 2005; 99:193-201.
9. **Ibáñez-Bernal S.** Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. III. Las especies de *Lutzomyia* (*Psathyromyia*) Barretto, del grupo Aragoi, de *L. (Trichopygomyia)* Barretto, del grupo Dreisbachi y de *L. (Nyssomyia)* Barretto. Folia Entomol Mex 2002; 41:149-83.
10. **González C, Rebollar-Téllez EA, Ibáñez-Bernal S, Becker-Fausser I, Martínez-Meyer E, Peterson AT, Sánchez-Cordero V** Current knowledge of *Leishmania* vectors in México: How geographic distributions of species relate to transmission areas. Am J Trop Med Hyg. 2011; 85:839-846
11. **Biagi F, Biagi AM de, Beltrán V.** *Phlebotomus flaviscutellatus*, transmisor natural de *Leishmania mexicana*. Prensa Méd Mex 1965; 30:267-72.
12. **Disney RHL.** Observations on zoonosis: Leishmaniasis in British Honduras. J Appl Ecol 1968; 5:1-59
13. **Rebollar-Téllez EA, Ramírez-Fraire A, Andrade-Narvaéz, FJ.** A two-year study on vectors of cutaneous leishmaniasis. Evidence for sylvatic transmission cycle in the State of Campeche, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996a; 91:555-60.
14. **Rebollar-Téllez EA, Reyes-Villanueva F, Fernández-Salas I, Andrade-Narvaéz, FJ.** Population dynamics and biting rhythm of the antropophilic sandfly *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae) in Southeast, México. Rev Inst Med Trop São Paulo 1996b; 38:29-33.
15. **Rebollar-Téllez EA, Reyes-Villanueva F, Fernández-Salas I, Andrade-Narvaéz, FJ.** Abundance and parity rate of *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of localized cutaneous leishmaniasis in southern Mexico. J Med Entomol 1996c; 33:683-85.
16. **Pech-May A, Escobedo-Ortegón FJ, Berzunza-Cruz M, Rebollar-Téllez EA.** Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. Med Vet Entomol 2010; 24:150-161.
17. **Biagi, FF, & D. Buen de Biagi, AM.** Datos ecológicos de algunos flebotomos mexicanos (Diptera: Psychodidae). An Inst Biol Méx 1953; 24:445-4450.
18. **Biagi F, AM de Biagi V, Beltrán F.** Actividad horaria de *Phlebotomus* antropofílicos en la península de Yucatán. Rev Invest Salud Públ (Méx) 1966; 26:73-7.
19. **Williams P.** Experimental transmission of *Leishmania mexicana* by *Lutzomyia cruciata*. Ann Trop Med Parasitol 1966; 60:365-72.
20. **Coquillett DW.** Discovery of blood-sucking Psychodidae in America. Entomol. News 1907; 18:101-2.
21. **Vargas L, Díaz-Nájera A.** Lista de flebotomos mexicanos y su distribución geográfica (Diptera: Psychodidae).

Méndez-Pérez *et al.*

- Rev Inst Salub Enfer Trop Méx 1953; 13:309-14.
22. Fairchild GB, Hertig M. Geographic distribution of the *Phlebotomus* sandflies of Central America (Diptera: Psychodidae). *Ann Entomol Soc Am* 1959; 52:121-4.
 23. Ibáñez-Bernal S. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. I. *Brumptomyia* França y Parrot; *Lutzomyia* França, las especies de *L. (Lutzomyia)* Franca y del grupo Verrucarum. *Folia Entomol Mex* 1999; 107:61-116.
 24. Rebollar-Téllez EA, Manrique-Saide P. New distributional record of *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Phlebotomidae) in the state of Yucatán, México. *Entomol. News* 2001; 112:337-9.
 25. Rebollar-Téllez EA, Orilla-Moguel H, Dzul-Manzanilla FA, Che-Mendoza A, Manrique-Saide P, Zapata-Peniche A. An update on the phlebotomid sand fly (Diptera: Phlebotomidae) fauna of Yucatan, Mexico. *Entomol News*. 2006; 117:21-4.
 26. Ibáñez-Bernal S, Hernández-Xoliot RA, Mendoza F. Collections of Bruchomyiinae and Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) from north-central portion of the State of Veracruz, México, with the description of a new species. *Zootaxa* 2006; 1270:19-33.
 27. Lane RP, Ready PD. Multivariate discrimination between *Lutzomyia wellcomei*. A vector of mucocutaneous leishmaniasis, and *Lu. complexus* (Diptera: Phlebotominae). *Ann Trop Med Parasitol* 1985; 79:469-72.
 28. Añez N, Valente DT, Cazorla D, Quicke DJ, Feliciangeli M. D. Multivariate analysis to discriminate species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae): *Lutzomyia townsendi*, *L. spinicrassa*, and *L. youngi*. *J Med Entomol* 1997; 34:312-6.
 29. Bustamante DC, Monroy C, Menes M, Rodas A, Salazar-Schettino PM, Rojas G, Pinto N, Guhl F, Dujardin JP. Metric variation among populations of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *J Med Entomol* 2004; 41:296-301.
 30. Catala SS, Maida DM, Caro-Riaño H, Jaramillo N, Moreno J. Changes associated with laboratory rearing in antennal sensilla patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:25-30.
 31. Rangel EF, Lainson R, Souza AA, Ready P, Azevedo ACR. Variation between geographical populations of *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) sensu lato. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1996; 91:43-50.
 32. Martínez-Ibarra JA., Bárcenas-Ortega NM, Romero-Napoles J, Noguera-Torres B, Rodríguez-López MH. Diferencia métricas entre poblaciones de *Mecycus longipennis* (Usinger) (Hemiptera: Reduviidae) en el occidente de México. *Folia Entomol Mex* 2006; 45:83-90.
 33. Cruz-Ruiz AL, Garcia-Rejón J, Manrique-Saide P, Perez-Mutul J. Taxonomical Identification of anthropophilic species of *Lutzomyia* in Quintana Roo, Peninsula de Yucatan, Mexico. *Rev Bioméd* 1994; 5:127-131.
 34. Ibáñez-Bernal S. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. II. Las especies de Ibáñez-Bernal S. *Lutzomyia (Coromyia)* Barretto, del grupo Delpozoi de *Lutzomyia (Dampfomyia)* Addis. *Folia Entomol Mex* 2001; 40:17-4641.
 35. Ibáñez-Bernal S. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. IV. Las especies de *Lutzomyia (Psychodopygus)* Mangabeira, *L. (Micropygomyia)* Barretto, *Lutzomyia* grupo Oswaldoi, *L. (Helcocyrtomyia)* Barretto y especies sin agrupar. *Folia Entomol Mex* 2003; 42:109-52.
 36. Shannon R. Methods for collecting and feeding mosquitoes in jungle yellow fever studies. *Am J Trop Med Hyg* 1939; 19:131-40.
 37. Pérez E, Villaseca P, Campos M, Guerra H. Técnicas para colectar "titiras" (*Lutzomyia* spp., Diptera: Psychodidae) en ambientes altoandinos peruanos. *Rev Peru Entomol* 1987; 30:77-80.
 38. Disney RHL. A trap for phlebotomine sandflies attracted to rats. *Bull Entomol Res* 1966; 56: 445-451.
 39. Young DG. A Revision of the Blood Sucking Psychodidae Flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Gainesville, FL. University of Florida. 1979.
 40. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Third edition. New York. 1995
 41. Lehmann P, Ordoñez R, Ojeda-Baranda R, Mendez de Lira J, Hidalgo-Sosa L, Monroy C, Ramsey JM. Morphometric analysis of *Triatoma dimidiata* populations (Reduviidae: Triatominae) from Mexico and Northern Guatemala. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100:477-82.
 42. Dujardin JP, Bermudez H, Casini C, Schofield CJ, Tibayrenc M. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol* 1997; 34: 544-51.
 43. Coetzee M. Comparative morphology and multivariate analysis for the discrimination of members of the *Anopheles gambiae* group in southern Africa. *Mosq Syst* 1989 ;21:100-16.
 44. Calle AD, Quiñones LM, Erazo HF, Jaramillo N. Morphometric discrimination of females of five species of the genus *Nyssorhynchus* from southern and Northwest Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:1191-5.
 45. Alentar J, Rodríguez-Fernández J, Dégallier N, Marcondes CB, Costa JM & Guimarães AR. Multivariate discrimination between two cryptic *Haemagogus* species associated with the transmission of yellow fever virus in the Americas. *J Am Mosq Control*

Análisis morfométrico de *Lutzomyia*

- Assoc 2009; 25:18-24.
46. **Gebre-Michael T, Medhin G.** Morphometric separation of females of *Phlebotomus (Phlebotomus) duboscqi* and *P. (P.) bergeroi* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1997; 34: 383-6.
 47. **Azevedo CR, Lainson R, Souza A.A, Nelson F, Feliciangeli D, Meneses C, Rangel E.** Comparative studies of populations of *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae) in Brazil y Venezuela. *J Med Entomol* 2002; 4:587-600.
 48. **Dujardin JP, Torrez EM, LePont F, Hervas D, Sossa D.** Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Med Vet Entomol* 1997; 11: 394-400.
 49. **Belen A, Alten B, Aytakin M.** Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Phlebotomus papatasi* populations. *Med Vet Entomol* 2004; 18:343-50.
 50. **Marcondes CB, Leuch-Lozovei A, Falqueto A, Brazil AP, Galati EAB, Aguiar GM, Souza NA.** Influence of altitude, latitude and season of collection (Bergmann's Rule) on the dimension of *Lutzomyia intermedia* (Luz & Neiva, 1919) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94:693-700.
 51. **Goyena M, Conesa-Gallego E, Romera H, Martínez-Ortega E.** Estudio biométrico de las poblaciones de *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) del sureste de la península Ibérica. *Parassitología.* 1991; 33:273-82.
 52. **Ready P, Day JC, Souza AA, Rangel EF, Davies CR.** Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and selvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bull Entomol Res* 1997; 87:187-95.
 53. **Campbell-Lendrum DH, Pinto MC, Brandão-Filho SP, de Souza AA, Ready PD, Davies CR.** Experimental comparison of anthropophily between geographical dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) *Med Vet Entomol* 1999; 13:299-309.
 54. **Arrivillaga JC, Rangel YN, Oviedo M., Feliciangeli MD.** Correlated morphologic and genetic diversity among *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) collections in Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 2000; 16:171-4.