

## Identificación de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) grupo *verrucarum* por medio de microscopía electrónica de sus huevos

Diana Sierra A., Iván Darío Vélez B y Sandra Uribe S.

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales –PECET- Universidad de Antioquia. A.A 1226 Medellín, Colombia. Fax 574-5716675.

dsierra@catios.udea.edu.co; idvelez@catios.udea.edu.co

Recibido 24-III-1999. Corregido 30-XI-1999. Aceptado 1-XII-1999.

**Abstract:** The value of Colombian phlebotomine eggs for species determination was studied with a scanning electron microscope. The species diversity and medical importance of the *verrucarum* group were the bases to select *Lutzomyia youngi*, *Lutzomyia evansi*, *Lutzomyia columbiana* and *Lutzomyia longiflocosa*. The egg surface was polygonal. *Lutzomyia youngi*, and *Lutzomyia columbiana* had pentagonal or hexagonal patterns; *Lutzomyia evansi* elongated polygons and *Lutzomyia longiflocosa* irregular polygonal sculpturing, frequently rectangular. Egg scanning electron microscopy is reliable to identify species of the *verrucarum* group.

**Key words:** Electronic microscopy, *Lutzomyia*, *verrucarum* group, sculpturing models, polygonal model.

La leishmaniosis, enfermedad que ha sido incluida entre las enfermedades tropicales más importantes y que debe recibir una atención especial (Anónimo1987), es causada por protozoos de la familia Tripanosomatidae, género *Leishmania* (Young y Arias 1992) y transmitida por dípteros de la familia Psychodidae, géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus* para el Nuevo y Viejo Mundo respectivamente.

La *Lutzomyia* es un pequeño insecto de 2 a 3 mm de longitud, con el cuerpo y alas densamente cubierto de pelos y un período de vida en la naturaleza aproximadamente de 40 a 50 días. La mayoría de las hembras están listas para ingerir sangre de 1 a 4 días luego de emerger de la pupa; una vez ingerida la sangre comienza el proceso de ovogénesis (Osorno-Mesa *et al.* 1967).

Se han descrito huevos de aproximadamente 40 especies de *Lutzomyia* del Nuevo Mundo; son oscuros, elípticos y se supone que son depositados uno a uno en pequeños lotes

en lugares húmedos. La superficie del huevo tiene surcos y otras protuberancias que forman patrones típicos de la especie o del complejo de especies; estos surcos probablemente funcionan como un "plastrón", a través del cual ocurre el intercambio de gases (Travi *et al.* 1994); el número de huevos que oviposita una hembra durante un ciclo, varía de 40 a 70 según la especie, tamaño y calidad de ingesta sanguínea.

En estudios de laboratorio se ha observado que los huevos de algunas especies pueden permanecer latentes por períodos adversos de hasta 160 días, aunque en circunstancias normales el desarrollo embrionario toma de 4 a 20 días y pueden tolerar la inmersión por varios días aunque no pueden resistir condiciones de sequedad prolongadas (Travi *et al.* 1994).

En 1975 Ward y Ready trabajaron con microscopía electrónica de huevos de *Lutzomyia gomezi* y según ellos las condiciones del microhábitat donde los huevos son ovipositados tiene

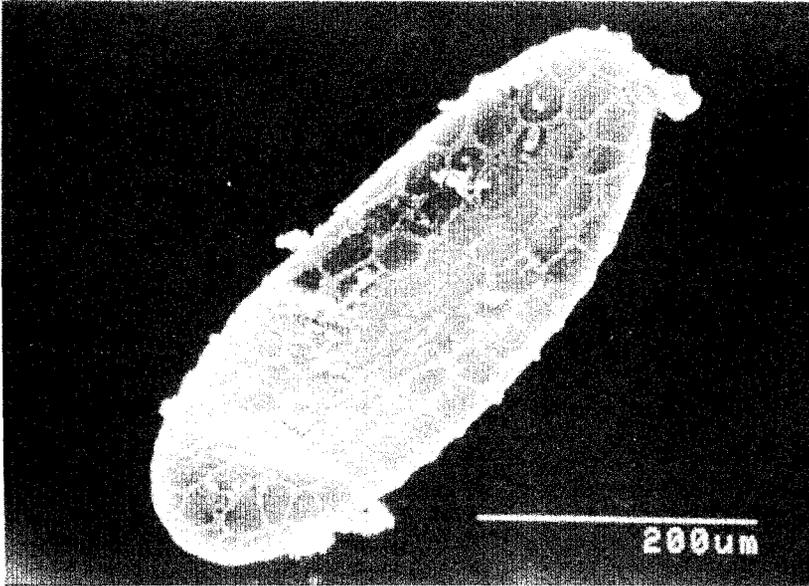


Fig. 1a. Huevo de *Lutzomyia youngi*.

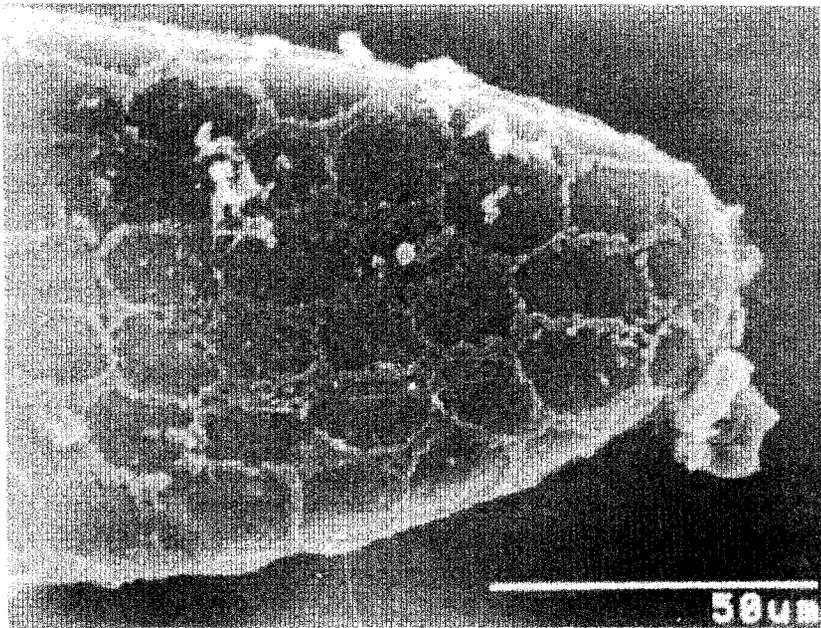


Fig. 1b. Forma poligonal de las células coriónicas.

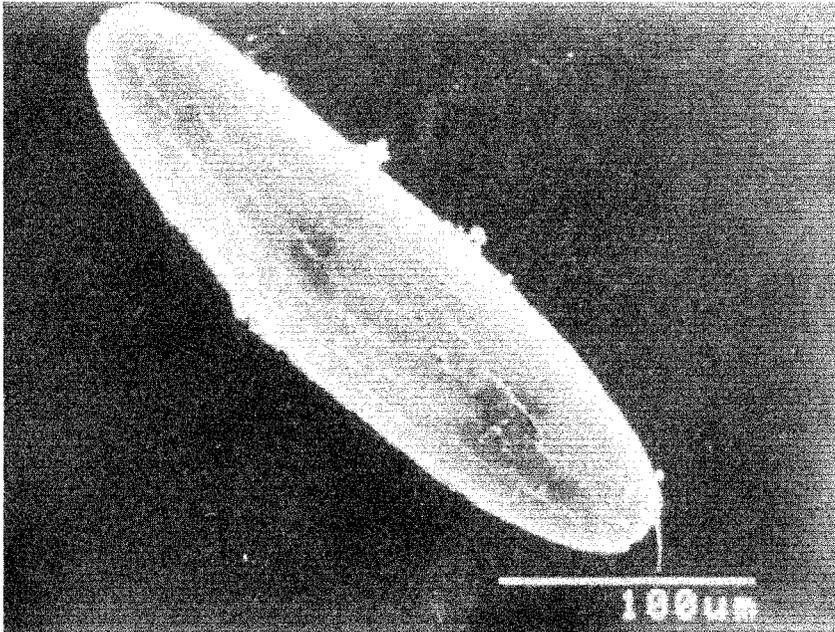


Fig. 2a. Huevo de *Lutzomyia evansi*.

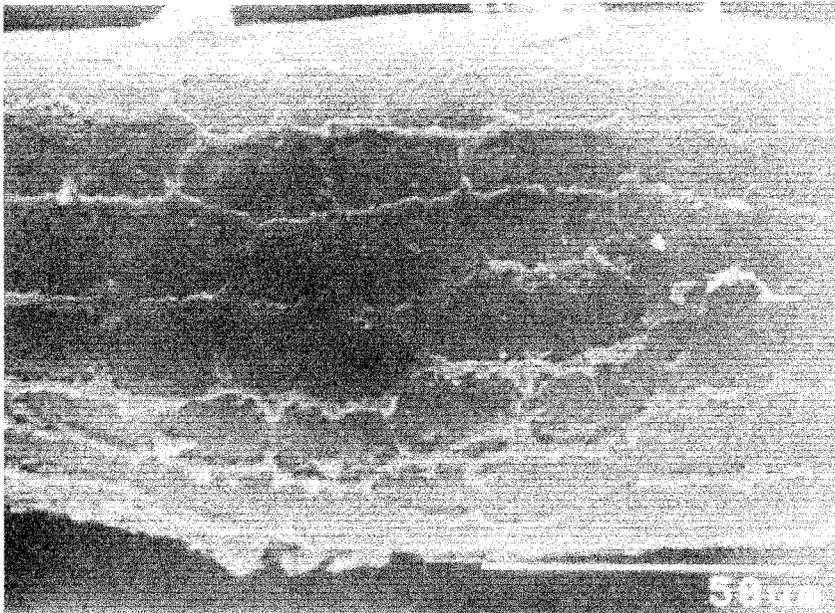


Fig. 2b. Formas poligonales de las células coriónicas.

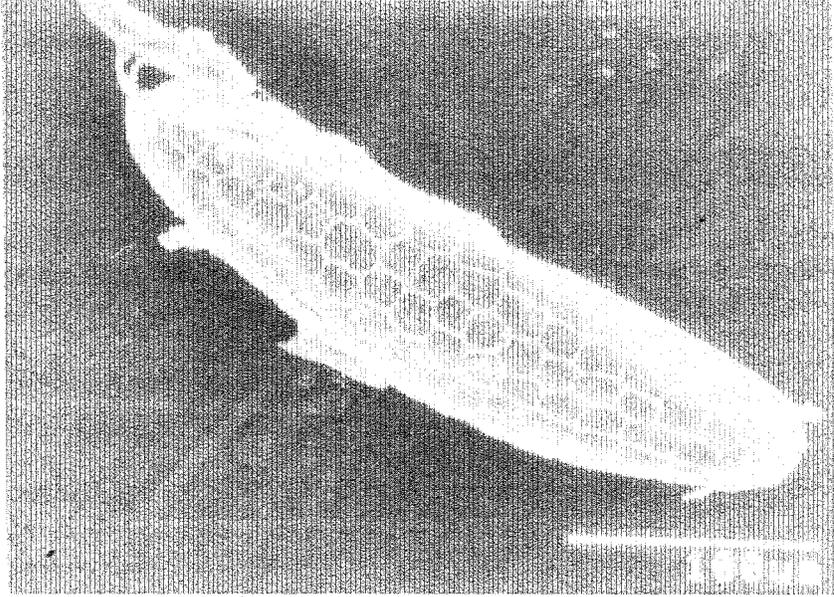


Fig. 3a. Huevo de *Lutzomyia columbiana*.

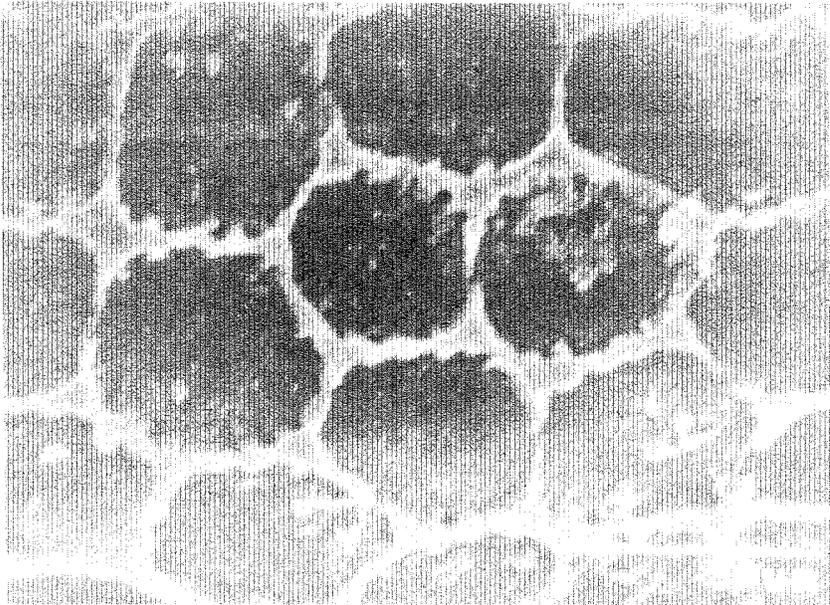


Fig. 3b. Formas poligonales de las células coriónicas.

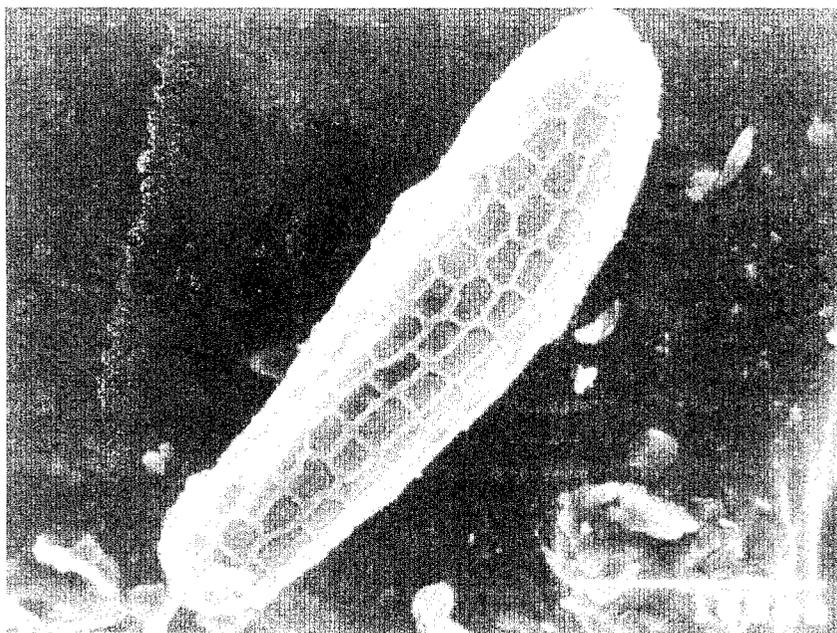


Fig. 4a. Huevo de *Lutzomyia longiflocosa*.

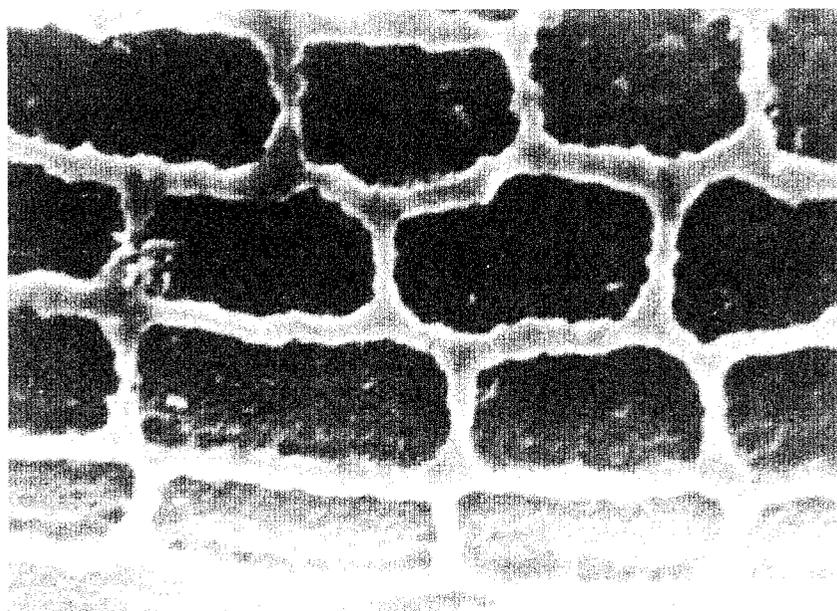


Fig. 4b. Formas rectangulares de las células coriónicas.

que ver con el "esculpido" del huevo. Posteriormente Endris *et al.* (1987) estudiaron cinco especies: *L. cruciata*, *L. diabolica*, *L. authophora*, *L. shannoni*, y *L. vexator* separándolas por grupos dependiendo del esculpido de los huevos.

Feliciangeli *et al.* (1993) determinaron el "esculpido" en huevos de *Lutzomyia* y separaron tres especies isomórficas que corresponden a la serie *townsendi* del grupo *verrucarum*: *L. youngi* y *L. spinicrassa* (especies que fueron confundidas durante mucho tiempo con *L. townsendi*); adicionalmente observaron el "esculpido" coriónico de *L. evansi*, *L. lichyi*, *L. trinidadensis*, *L. venezuelensis*, y *L. olmeca bicolor* encontrando diferencias en la morfología coriónica. Igualmente Fausto *et al.* (1992) separaron por medio de las características del esculpido coriónico cuatro especies de flebotómicos *Phlebotomus perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. papatasi* y *P. dubousqui*, ya que cada especie presentó morfología diferente.

La identificación taxonómica de especies de *Lutzomyia* se realiza tradicionalmente con base en caracteres morfológicos, luego de someter los insectos a un proceso de aclaración y montaje; esta técnica permite diferenciar la mayoría de las especies, sin embargo, algunas como las del grupo *verrucarum*, requieren otras metodologías debido a la similitud de caracteres morfológicos (como es el caso de las espermatecas).

En Colombia no se han informado sobre estudios de microscopía electrónica de huevos de *Lutzomyia* y la falta de progresos en estos estudios puede ser debida al infrecuente hallazgo de huevos en la naturaleza limitando así la investigación. Ante la diversidad de especies e importancia médica del grupo *verrucarum*, se estudió *L. youngi*, *L. colombiana*, *L. evansi* y *L. longiflocosa* para permitir su identificación.

## MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó a partir de ejemplares recolectados en diferentes municipios de Colombia. En Montebello (Antioquia) se capturó *Lutzomyia youngi*, en San Andrés de Sotavento

(Córdoba) *Lutzomyia evansi*, en Herveo (Tolima) *Lutzomyia longiflocosa*. Los huevos de *Lutzomyia colombiana* fueron gentilmente facilitados por la fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas de Cali (procedentes de la colonia que allí se mantiene).

Los insectos se capturaron con trampa Shannon y aspirador manual. Se trasladaron al laboratorio en jaulas de tela (18 cm de largo, 17 cm de alto 16 cm de ancho) suspendida en una armadura de madera con algodones humedecidos. Se alimentaron sobre un hámster previamente anestesiado con 0.3cc de un preparado 1: 9 de Rompun (Xilazina 2%) y Ketalar (Clorhidrato de Ketamina 50/ml); se mantuvieron a 25°C y 80-90 % HR en el insectario del laboratorio.

Cada hembra se transfirió con aspirador a frascos de oviposición y diariamente se observó al estereo-microscopio; tras ovipositar, las hembras se identificaron con la clave de Young & Duncan (1994).

Para el microscopio electrónico de barrido (MEB) se sumergió los huevos en una solución fijadora de glutaraldehído al 2% durante 2h, seguida de tres lavados en una solución tampón fosfato y luego en tetraóxido de osmio al 1% durante 1h. Posteriormente se hizo tres lavados en solución tampón y agua destilada, se deshidrató en gradiente de etanol desde 30° hasta 100°, se secaron por punto crítico con CO<sub>2</sub> y se cubrió el material con una capa de oro de 20 nm en un cobertor iónico.

## RESULTADOS

La morfología ultraestructural de la superficie de los huevos de las especies estudiadas se muestran en las Figs. 1 y 2. *Lutzomyia youngi* y *Lutzomyia colombiana* presentan un modelo poligonal (pentagonal o hexagonal), *Lutzomyia evansi* exhibe polígonos elongados y *Lutzomyia longiflocosa* presenta formas frecuentemente rectangulares.

Huevos de *Lutzomyia youngi*

**Apariencia total:** forma elipsoidal y color negro; el esculpido coriónico exhibe un modelo

poligonal (pentagonal o hexagonal) con aproximadamente ochenta células visibles en una de las superficies; estos polígonos son de apariencia redondeada bien definidos y delimitados por columnas de color blanco conectadas entre sí con apariencia de hileras no alineadas (Figs. 1a y b)

**Tamaño:** promedio de longitud del huevo 340.07  $\mu\text{m}$  (322.85-366.85) y ancho promedio 106.04  $\mu\text{m}$  (85.5-124.3)  $n=15$ ; promedio de longitud del polígono 23.23  $\mu\text{m}$  (18.15-25.85) y diámetro promedio 16.11  $\mu\text{m}$  (12.10-20.35)  $n=15$ .

#### Huevos de *Lutzomyia evansi*

**Apariencia total:** forma de cigarro y color negro, presentan la superficie cubierta de células coriónicas mostrando un modelo poligonal elongado, aunque también se aprecian formas rectangulares, ambos lados – longitudinales y transversales forman columnas muy irregulares, débilmente unidas, de color blanco y apariencia algodonosa; el huevo exhibe en una de las superficies aproximadamente 84 células visibles (Figs. 1c y d)

**Tamaño:** promedio de longitud del huevo 311.92  $\mu\text{m}$  (288.75-328.35) y ancho promedio 88.38  $\mu\text{m}$  (72.60-108.35)  $n=15$ ; promedio de longitud del polígono 19.18  $\mu\text{m}$  (11.66-34.21) y diámetro promedio 11.54  $\mu\text{m}$  (6.57-15.0)  $n=15$ .

#### Huevos de *Lutzomyia columbiana*

**Apariencia total:** forma elipsoidal y color negro, el modelo del esculpido coriónico se observa poligonal, (pentagonal- hexagonal, aunque también se observan formas rectangulares), con aproximadamente 71 células visibles en una de las superficies; los polígonos son bien definidos delimitados por cadenas de eslabones fuertemente unidos formando columnas delgadas y de color blanco (Figs. 2a y b).

**Tamaño:** promedio de longitud del huevo 335.35  $\mu\text{m}$  (313.5-359.15), ancho promedio 108.64  $\mu\text{m}$  (87.45-150.7)  $n=15$ ; promedio de longitud del polígono 26.86  $\mu\text{m}$  (20.35 -34.1) y diámetro promedio 18.64  $\mu\text{m}$  (14.85-23.1)  $n=15$ .

#### Huevo de *Lutzomyia longiflocosa*

**Apariencia total:** color negro y forma elipsoidal; presentan aproximadamente 64 células visibles en una de las superficies, las cuales están conectadas por gruesas columnas longitudinales y perpendiculares fusionadas entre sí y formando figuras frecuentemente rectangulares, aunque también poligonales de apariencia algodonosa (Figs. 2c y d).

**Tamaño:** promedio de longitud del huevo 335.81  $\mu\text{m}$  (322.3-347.0) y ancho promedio 113.31  $\mu\text{m}$  (101.2-123.7); promedio de longitud del polígono 21.80  $\mu\text{m}$  (18.15-22.27) y 15.01  $\mu\text{m}$  de diámetro (11.55-18.70)  $n=15$ .

## DISCUSIÓN

La microscopía electrónica de huevos es una herramienta útil en taxonomía de flebotómíneos ya que provee información detallada acerca de los patrones superficiales, los cuales permiten deparar especies que presentan dificultad en la taxonomía por métodos tradicionales como la utilización de caracteres morfológicos. Presumiblemente la forma del esculpido coriónico esta relacionada con las diferencias en los microhabitats (humedad, temperatura, etc.) donde las hembras ovipositan (Ward y Ready, 1975). Sin embargo, los huevos de *L. youngi* y *L. evansi* de Venezuela (Feliciangeli *et al.* 1993) al ser comparados con *L. youngi* y *L. evansi* de Colombia muestran un patrón similar. De allí la necesidad de obtener mas información sobre la morfología de huevos como criterio taxonómico en la identificación de especies de flebotómíneos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de Albeiro Acevedo, departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Antioquía por su ayuda técnica en el procesamiento de las muestras y toma de microfotografías y a Marta Wolff por su ayuda en la identificación de flebotómíneos.

## RESUMEN

En Colombia la microscopía electrónica de huevos de phlebotomíneos para determinación de especies es nueva. Debido a la diversidad de especies e importancia médica del grupo *verrucarum* se estudiaron cuatro de estas especies: *Lutzomyia youngi*, *Lutzomyia. evansi*, *Lutzomyia colombiana* y *Lutzomyia longiflocosa*. El modelo de superficie del huevo es poligonal. *Lutzomyia youngi* y *Lutzomyia colombiana* exhibieron un modelo pentagonal o hexagonal, *Lutzomyia evansi* polígonos elongados y *Lutzomyia longiflocosa* un modelo poligonal frecuentemente rectangular. La microscopía electrónica de huevos es confiable para identificar especies del grupo *verrucarum*.

## REFERENCIAS

- Anónimo. 1987. Tropical Disease Research, A Global Partnership. Organización Mundial de la Salud (OMS), Geneva, Switzerland. 191 p.
- Endris, R., D. Young & P. Perkins. 1987. Ultrastructural comparison of egg surface morphology of five *Lutzomyia species* (Diptera: Psychodidae). J. Med. Entomol. 24: 412- 415
- Fausto, A., M. Maroli & M. Mazzini. 1992. Ootaxonomy and eggshell ultrastructure of Phlebotomus sandflies. Med. and Vet. Entomol. 6: 201-208.
- Feliciangeli, D., O. Castejon & J. Limongi. 1993. Egg surface ultrastructure of eight new world *Phlebotomine sandfly species* (Diptera: Psychodidae). Entomological Society of America 30: 651-656.
- Osorno-Mesa, E., A. Morales-Alarcón & F. Osorno. 1967. *Phlebotominae* de Colombia (Diptera: Psychodidae). Distribución geográfica de especies de *Flebotomus* registradas con algunas anotaciones biológicas y descripción de una nueva. Caldasia. 10: 27-28.
- Travi, B. & J. Montoya. 1994. Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas fundación CIDEIM. Manual de Entomología Médica para Investigadores de América Latina. Cali, Colombia 280 p.
- Ward, R., & P. Ready. 1975. Chorionic Sculpturing in some sandfly eggs (Diptera, Psychodidae). Journal Entomology 50: 127-134.
- Young, D. & R. Arias. 1992. Flebotomos: vectores de Leishmaniosis en las Américas. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Washington. cuaderno técnico No.3. 33: 1-26.
- Young, D. & M. Duncan. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia sandflies* in Mexico, the West Indies, Central and South América. (Diptera: Psychodidae). Gainesville, Florida 881 p.