

Esculpido exocoriónico del huevo de dos poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae) de Venezuela

Milagros Oviedo^{1*} & M. Dora Feliciangeli²

Estudios de los patrones del exocorión en insectos, utilizando microscopia electrónica de barrido (MEB), refieren que las diferencias entre éstos son marcadores taxonómicos útiles para separar especies relacionadas. En el presente trabajo se examinó el patrón del exocorión del huevo de dos poblaciones venezolanas de *Lutzomyia longipalpis* s.l., principal vector de la leishmaniasis visceral americana, una procedente del Estado Trujillo y la otra del Estado Guárico. El esculpido del exocorión del material estudiado estuvo caracterizado por un patrón de crestas paralelas, pero el huevo de la población de Trujillo presentó irregularidades y crestas conectadas, mientras que en la población del Guárico, las crestas son más regulares y no se observaron conexiones. Siendo *L. longipalpis* un complejo de especies, es necesario realizar estudios comparativos con otras poblaciones del complejo de diferentes países neotropicales, incluyendo *Lutzomyia pseudolongipalpis*, la primera especie descrita en el complejo, para tratar de dilucidar el significado de estas diferencias y su utilidad como herramienta taxonómica para este complejo.

Palabras claves: *Lutzomyia longipalpis*, exocorión, microscopia electrónica de barrido.

Los miembros de la subfamilia Phlebotominae son de importancia médica debido a que algunas especies del género *Lutzomyia* en el Neotrópico y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, son transmisores de virus, bacterias y protozoos al hombre y a otros mamíferos.

La base para la identificación y clasificación de esta subfamilia ha sido la morfología externa comparada de adultos, con muy pocos aportes en cuanto al estudio morfológico de los estadios pre-imagales en la taxonomía del grupo, debido a la dificultad del encuentro de criaderos y de cría en el laboratorio.

El estudio de los patrones del exocorión utilizando el microscopio electrónico de barrido ha

conducido a proponer categorías morfológicas para separar especies (Ward & Ready 1975, *J. Ent. (A)* **50**: 127-134; Endris *et al.*, 1987), *J. Med. Entomol.* **24**: 412-415; Michael & Lane, 1991, *Parassitologia.* **33**: 261-266; Feliciangeli *et al.*, 1993, *J. Med. Entomol.* **30**: 651-656; Pérez & Ogusuku 1997, *Med. Vet. Entomol.* **11**: 127-133), señalándose que las diferencias de los patrones del exocorión entre especies relacionadas son útiles marcadores taxonómicos (Sierra *et al.*, 2000, *Rev. Biol. Trop.* **48**: 615-622; Fausto *et al.*, 2001, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **96**: 197-204). De allí la importancia de conocer los patrones exocoriónicos de huevos de especies cuyas hembras son indistinguibles morfológicamente, como es el caso de *Lutzomyia longipalpis* s.l., principal transmisor de la leishmaniasis visceral americana, la cual es reconocida como un complejo de especies, formado por lo menos por 4 poblaciones (Arrivillaga *et al.*, 2003, **40**: 615-27; Watts *et al.*, 2005. *Am J Trop Med Hyg.* **73**: 734-43). En Venezuela se reconocen dos poblaciones, las cuales fueron diferenciadas utilizando estudios morfométricos del aparato bucal de formas inmaduras y tecnología bioquímica y molecular aplicada en ejemplares adultos, como electroforesis de isoenzimas y ADN

¹ Laboratorio Biología de *Lutzomyia*, Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba" Universidad de Los Andes, Trujillo. Apdo. 214, Venezuela

² Centro de Referencia Nacional de Flebótomos y otros Vectores (CNRFV-BIOMED), Universidad de Carabobo, Maracay, Estado Aragua, Venezuela

*Autor de Correspondencia: longipalpis@cantv.net

mitocondrial (Arrivillaga & Feliciangeli, 2000, *Bol. Entomol. Venez.* **15**: 229-234; Arrivillaga *et al.*, 2000, *Amer. Mosq. Control Assoc.* **16**: 171-174; Arrivillaga *et al.*, 2000, *J. Med. Entomol.* **37**: 325-330; Arrivillaga *et al.*, 2003, **40**: 615-27), los cuales permitieron separar *L. pseudolongipalpis*, primera especie descrita del complejo longipalpis (Arrivillaga & Feliciangeli, 2001. *J. Med. Entomol.* **38**: 783-790).

Sin embargo, en lo que respecta a la fase huevo, al presente no se han realizados estudios del esculpido del exocorión del huevo de diferentes poblaciones de *L. longipalpis s.l.*, a pesar que en otras especies isomórficas de flebotominos, utilizando microscopía electrónica de barrido se demostró su utilidad como marcador taxonómico. Tal es el caso del grupo Verrucarum serie townsendi dentro del cual se pudieron claramente separar tres especies cuyas hembras son morfológicamente indistinguibles: *Lutzomyia youngi*, *L. townsendi* y *L. spinicrassa* (Feliciangeli *et al.*, 1993, *J. Med. Entomol.* **30**: 651-656.).

En el presente trabajo se describe y se compara el esculpido del exocorión del huevo de dos poblaciones de *Lutzomyia longipalpis*, procedentes del estado Guárico, región de los llanos centrales, y del estado Trujillo, región de los Andes.

Los huevos de *L. longipalpis*, población Guárico fueron obtenidos a partir de hembras silvestres colectadas en la localidad El Layero (09° 41'N, 67°16'O), Municipio Ortiz, Estado Guárico, alimentadas en laboratorio con hamsters (*Cricetus auratus*) y confinadas en frascos de cría. Después de 24-48 hs de la ovipostura, los huevos fueron retirados y conservados a 4°C en una solución de Carnoy (Gabe, 1968. *Techniques Histologiques*. Ed. Masson, Paris) en el Centro de Referencia Nacional de Flebotomos (CNRFV, BIOMED) Universidad de Carabobo en Maracay, Estado Aragua hasta su procesamiento. Los huevos de *L. longipalpis*, población Trujillo, fueron obtenidos de una colonia cerrada mantenida en el laboratorio Biología de *Lutzomyia* del Insectario "Pablo Anduze", del Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba" del Núcleo Universitario "Rafael Rangel" de la Universidad de Los Andes, Trujillo. Esta colonia fue establecida a partir de hembras colectadas en la localidad del Batatillo (09° 25' N, 70° 30' O), Municipio Candelaria, Estado Trujillo. Para el estudio del esculpido, se tomaron los huevos de la

ovipostura de un lote de hembras (aproximadamente 30) en pequeños viales, transcurridas 48 horas de la misma. Estos huevos fueron fijados en una solución de Karnovsky (Karnovsky. 1965, *J. Cell. Biol.* **27**: 137A- 137B) durante 2 horas.

El procesamiento del material para la observación con el microscopio electrónico de barrido se efectuó según el protocolo de Sierra *et al.* (2000, *Rev. Biol. Trop.* **48**: 615 - 622). Los huevos en estudio fueron lavados tres veces con solución tampón fosfato y luego colocados en una solución de tetraóxido de osmio al 1% durante 1 hora. Transcurrido este lapso, se realizaron tres lavados con solución tamponada y agua destilada y se procedió a la deshidratación utilizando un gradiente de etanol desde 30 % hasta 95 %, bajo un período de tiempo de 5 minutos en cada alcohol. En seguida fueron secados por punto crítico con CO₂ en un aparato HITACHI HCP-2 y se cubrieron con una capa de oro en un cobertor iónico EIKO IB2.

Una vez cubiertos con oro, los huevos que no estaban colapsados fueron montados en un porta-muestra, en grupo de 6 huevos para su observación bajo Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) marca HITACHI S-500 20. La toma de imágenes se realizó a diferentes aumentos desde 300X a 900X y las imágenes fueron procesadas en COREL DRAW 10.

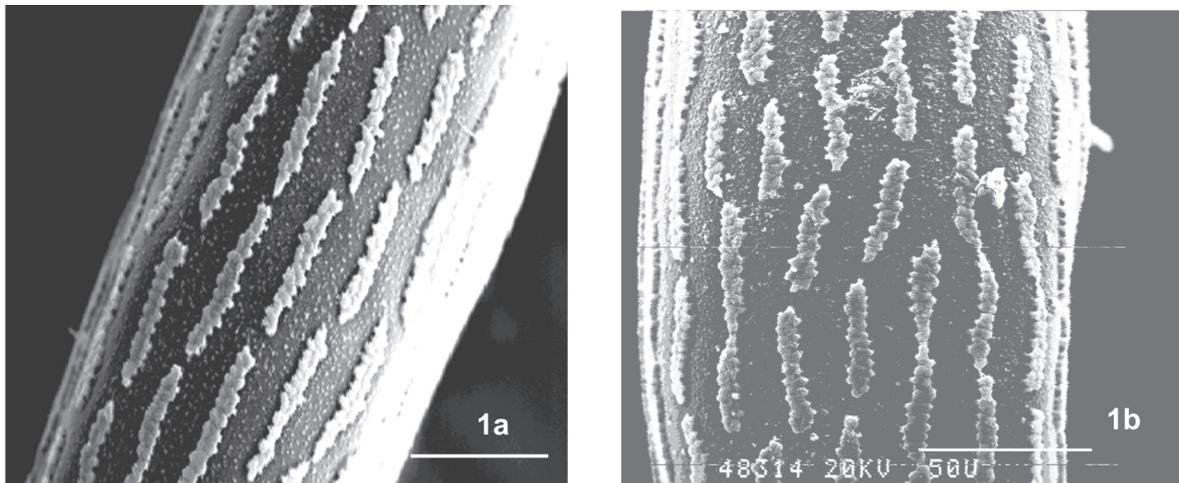
En las Fig. 1a y 1b se presentan las imágenes obtenidas del esculpido de los huevos de *L. longipalpis s.l.* de las dos poblaciones estudiadas.

El patrón del exocorión de la población de Guárico sigue el modelo de crestas paralelas dispuestas en forma regular (Fig. 1a) mientras que los huevos de la población de Trujillo, aunque sigue el modelo de crestas paralelas, éstas están dispuestas en forma irregular, son de menor tamaño y se observan débiles interconexiones entre algunas de ellas (Fig. 1b).

El patrón del exocorión mostrado por la población de *L. longipalpis* del estado Guárico fue igual al patrón descrito para una población de esta especie del Brasil, definido como un modelo de crestas paralelas, no conectadas, longitudinales discontinuas y sin conexiones laterales (Ward & Ready 1975, *J. Ent.* **50**: 127-134; Secundino & Pimenta 1999, *Acta Microscópica.* **8**: 33-38).

En el caso del exocorión de *L. longipalpis* población de Trujillo, se encontraron algunas

Fig. 1. 1a) Morfología del exocorión de huevos de *Lutzomyia longipalpis*, población El Layero, estado Guárico, Venezuela; 1b) Morfología del exocorión de huevos de *Lutzomyia longipalpis*, población Batatillo, Trujillo, Venezuela.



diferencias en el esculpido, tales como, disposición irregular en algunas crestas y puntos de conexión longitudinales entre las mismas, pudiéndose observar la interconexión entre dos o tres crestas.

Para dar una explicación a estos hallazgos podemos considerar dos aspectos importantes:

1. los huevos de la población de *L. longipalpis* de Trujillo fueron obtenidos de una colonia cerrada y mantenida ininterrumpidamente durante diez años en el laboratorio, mientras que la muestra del Guárico era de hembras silvestres, recién colectadas y confinadas en potes de cría. 2. *L. longipalpis* s.l. de Venezuela es parte de un complejo de especies.

En lo que respecta a los huevos procedentes de colonia, durante el periodo de colonización, se han obtenido 97 generaciones cuya oviposición de las hembras es realizada sobre una superficie lisa de yeso, diferente a lo que podría estar pasando en la naturaleza. Sería de gran importancia comparar este esculpido con el esculpido de huevos de hembras provenientes del medio silvestre para cada especie estudiada. Si estos son diferentes, se ratificaría entonces lo descrito: que la forma de los esculpidos coriónicos estaría relacionada con las características del microhábitat donde las hembras ovipositan (Ward & Ready 1975, *J. Ent. (A)* **50**: 127-134), Si por el contrario hay similitud, podríamos pensar sea debida a diferencias interspecíficas en *L. longipalpis*, determinadas por la expresión genética de las características de las células foliculares del ovario de cada especie.

Sobre la base de estos resultados, se hace necesario el estudio del esculpido del exocorión de huevos *L. pseudolongipalpis* silvestres y procedentes de una colonia cerrada la cual es mantenida en el CNRFV desde al año 1991, así como de material de otras poblaciones de *L. longipalpis* s.l. de Venezuela y del Neotrópico, con la finalidad de aclarar el significado de las diferencias morfológicas del esculpido exocoriónico y la utilidad de esta herramienta en términos taxonómicos dentro del complejo.

Chorionic sculpturing in eggshells from two populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Venezuela

SUMMARY

Scanning electron microscope (SEM) studies of eggshell morphology have shown that differences between related species of insects are reliable taxonomic markers. In the present study, the eggshell fine structure of two Venezuelan populations of *Lutzomyia longipalpis* s.l., vector of American visceral leishmaniasis, was examined by SEM. Newly laid eggs of *L. longipalpis* s.l. were obtained from a colony from Trujillo state and from field females collected in Guárico state. The chorionic egg sculpturing of both populations was characterized as a pattern of parallel ridging, but in the population from Trujillo the pattern was irregular and the ridges appeared connected, while those from Guarico were more regular and no

Esculpido exocoriónico en Lutzomyia longipalpis s.l.

connections were observed. As *L. longipalpis s.l.* is recognised as a species complex, further studies are needed to compare the chorionic sculpturing of eggs from different populations of *L. longipalpis* in Venezuela and other Neotropic countries, including *L. pseudolongipalpis*, the first described species in the complex, in order to clarify the significance of such differences and the usefulness of the eggshell chorionic sculpturing as a taxonomic tool in the complex.

Key Words: *Lutzomyia longipalpis*, chorionic sculpturing, Scanning electron microscope.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de La Universidad de Los Andes, para la realización del presente trabajo, en el marco del proyecto: NURR-C-340-03-03-B.

Recibido el 02/02/2007
Aceptado el 13/03/2007