

IDENTIFICACIÓN ISOENZIMÁTICA DE *Lutzomyia pseudolongipalpis*, NUEVA ESPECIE VECTOR DE LEISHMANIASIS VISCERAL EN VENEZUELA. NOTA TÉCNICA

Isozymic Identification of *Lutzomyia pseudolongipalpis*, New Vector Species of Visceral Leishmaniasis in Venezuela. Technical Note

Jazzmin Arrivillaga

Universidad Simón Bolívar, Departamento de Estudios Ambientales. Laboratorio de Genética de Poblaciones, Sección de Invertebrados, Ecología de Insectos Vectores, Valle de Sartenejas, Baruta, Venezuela.
Telf. 582129063040. E-mail: jarrivillaga@usb.ve

RESUMEN

Lutzomyia pseudolongipalpis, nueva especie vector de leishmaniasis visceral (LV) reportada para Venezuela, debe ser identificada taxonómicamente con base a dos criterios, los caracteres morfológicos deben ser utilizados para una diferenciación preliminar, y en segundo lugar, debe emplearse marcadores isoenzimáticos (adenilato quinasa y hexoquinasa), para especies dentro del complejo de especies *Lutzomyia longipalpis*, con fines de validación taxonómica.

Palabras clave: *L. pseudolongipalpis*, Venezuela, identificación, complejo, isoenzimas.

ABSTRACT

Lutzomyia pseudolongipalpis, new vector species of visceral leishmaniasis (LV) reported for Venezuela, must be identified taxonomically by two criteria: morphological characters should be used for a preliminary differentiation, and secondly, be used isoenzymic markers (adenylate kinase and hexokinase), for species within the complex species *Lutzomyia longipalpis*, for taxonomic validation.

Key words: *L. pseudolongipalpis*, Venezuela, identification, complex, isoenzyme.

INTRODUCCIÓN

Lutzomyia pseudolongipalpis Arrivillaga & Feliciangeli 2001, es una especie nueva de flebotomino neotropical, formal-

mente descrita dentro del complejo *Lutzomyia longipalpis* [2-7]. La especie es identificada utilizando caracteres de uso no tradicional dentro de la taxonomía de los Phlebotominae [5].

La presencia de dientes cibariales verticales conspicuos, la estructura morfológica del valvifer y de los cercos de la genitalia femenina, representan los caracteres morfológicos diagnósticos para la especie [4]. Mientras, que los alelos AK¹¹¹ y HK⁸⁵, para las enzimas diagnóstico adenilato quinasa y hexoquinasa, respectivamente, representan los caracteres genéticos, usados tradicionalmente para la identificación de especies dentro del complejo *Lutzomyia longipalpis*, ya que no existe disponibilidad de descripciones morfológicas para las cuatro especies restantes del complejo [2, 3].

Los estudios eco-epidemiológicos, han permitido establecer dinámicas poblacionales diferentes entre *L. pseudolongipalpis* y *L. longipalpis* (especie C2) [9]; igualmente, incriminar a esta especie de flebotomino, como vector en la transmisión de leishmaniasis visceral, en Venezuela, específicamente, en la localidad de La Rinconada, El Brasilar, estado Lara [10].

Estudios de infección natural evidencian una tasa de 0,01% de hembras infectadas, con una abundancia relativa de adultos, *L. pseudolongiplapis* del 99,9% en el foco [11]. Paralelamente, estudios de capacidad vectorial señalan a esta especie como un vector con alta susceptibilidad a la infección por *Leishmania chagasi*, pero poco eficiente en la transmisión de LV [1].

En relación a la distribución geográfica, esta especie está registrada para Venezuela, con distribución restringida, aparentemente endémica para el estado Lara, municipio Torres (entre 10°34'24" – 09° 69'36' LN y 69°36'19" – 70°52'50" de LO) y específicamente para la localidad de El Paso (Lat 10°.07' LN y 69°.94' LO) y La Rinconada – El Brasilar (Lat

10°.00' LN y . 69°.95' LO). Sin embargo, no se ha actualizado su distribución geográfica en los últimos 8 años [7].

En la localidad de El Paso, esta especie se encuentra en condición simpátrida [3, 12] con otra especie del complejo, *Lutzomyia longipalpis sensu lato* tipo especie C2, llamada así porque es una especie genética, bien diferenciada de la especie *Lutzomyia longipalpis sensu stricto* colectada en Brasil, especie A, [6, 14]. Sin embargo se desconoce si esta situación de simpatría pueda darse en otra área geográfica, por lo cual es necesario monitorear a las dos especies en los focos de leishmaniasis visceral en Venezuela.

Las especies señaladas para Venezuela, son especies hermanas, por análisis filogenéticos [5], con una divergencia en tiempo evolutivo de aproximadamente 5 millones de años (Pleistoceno-Plioceno), por lo que las diferencias morfológicas se hacen más sutiles sino se hacen comparaciones morfológicas directas, entre las dos especies presentes en Venezuela.

En tal sentido, la identificación genética permite diferenciar y validar las especies, y por ende, confirmar la presencia de *L. pseudolongipalpis*. En el área de simpatría, geográficamente ubicada en el municipio Torres, estado Lara, Venezuela, es una necesidad obligatoria el identificar a nivel genético las especies venezolanas del complejo, con base a dos marcadores isoenzimáticos. Adicionalmente, es necesario actualizar la distribución de esta especie, y para esto hay que evaluar todos los focos de LV (viejos y nuevos) en donde se ha registrado a *L. longipalpis s. l.*, de la forma convencional.

El objetivo de la presente nota fue proveer un protocolo para la correcta identificación y caracterización eco-epidemiológica de *L. pseudolongipalpis* y/o *Lutzomyia longipalpis* (especie C2) en los focos de LV donde se colecta "*Lutzomyia longipalpis*", según Young y Duncan [13].

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de flebotomos pertenecientes al complejo *Lutzomyia longipalpis* en distintas áreas geográficas en Venezuela: Los adultos (machos y hembras) colectados en un foco de leishmaniasis visceral, deben ser rápidamente almacenados (individualmente o en grupos de 20 individuos por sexo) en hielo seco o nitrógeno líquido, manteniéndose la cadena de frío hasta su traslado al laboratorio, para fines de identificación taxonómica.

Disección de los ejemplares colectados: Los adultos hembras y machos, deben ser disecados para tener una muestra de referencia de cada ejemplar. En el caso de las hembras debe disecarse la cabeza, la cual deberá ser clarificada en KOH 10% durante 24 hrs., para luego ser montada en medio Berlesse, en una lámina para su identificación como "*L. longipalpis*" según la morfología convencional (presencia de 8 dientes horizontales presentes en el arco cibarial) propuesta para *L. longipalpis* [13].

Para los machos, la genitalia debe ser disecada, para su identificación, como "*L. longipalpis*" según la morfología convencional (2 setas en el parámetro) [13].

Análisis de isoenzimas: Posteriormente a las disecciones, el resto del cuerpo de los adultos hembras y machos debe ser almacenado en forma individual a -80° F o en nitrógeno líquido hasta los análisis isoenzimáticos.

En los ensayos de isoenzimas, deben incluirse muestras de referencias de *L. pseudolongipalpis* y *L. longipalpis*, a fin de realizar la caracterización genética del complejo *Lutzomyia longipalpis*, utilizando dos enzimas diagnósticos adenilato quinasa (AK 2.7.4.3) y hexoquinasa (HK 2.7.1.1), empleando la técnica de electroforesis en geles de acrilamida [3, 12].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El monitoreo e interpretación de fenotipos, bandas de los electromorfos, para los dos marcadores isoenzimáticos [4], resulta en la genotipificación de cuatro alelos privados (frecuencia alélica > 0,99) que permiten determinar la ocurrencia de *L. pseudolongipalpis* (alelo AK¹¹¹ / alelo HK⁸⁵) y *L. longipalpis s. l.* (alelo AK¹²⁹ / alelo HK¹¹⁸) (FIG. 1).

El uso de estos dos marcadores isoenzimáticos, es la única técnica genética rápida y de bajo costo con criterio taxonómico, que permite lograr una identificación y diferenciación simultánea de *L. pseudolongipalpis* y *L. longipalpis* (especie C2).

Estos resultados indican que *L. pseudolongipalpis*, es una especie de flebotomino, que no puede ser identificada de forma convencional, utilizando la morfología interna (caracteres tradicionales), y que aún cuando los nuevos caracteres morfológicos son útiles para diferenciarla de *L. longipalpis s. l.* su identificación debe ser necesariamente confirmada a través de estudios genéticos.

En este sentido, se puede afirmar que esta especie, sólo ha sido registrada con base a la estructura genética, en dos localidades La Rinconada-El Brasililar y El Paso.

En todos aquellos trabajos de investigación llevados a cabo en Venezuela, en fecha posterior a la fecha de descripción y nominación taxonómica, y en donde no se hayan realizado estudios genéticos, su identificación taxonómica es cuestionable, y en especial para nuevas localidades, donde de no efectuarse estudios genéticos, sólo se podrá registrar a la especie vector incriminada en la transmisión como *L. longipalpis s. l.* (complejo de especies) ya que no puede considerarse la distribución geográfica actual de las especies de flebotominos citados en el presente trabajo [4, 5, 7] como un criterio taxonómico.

Por lo tanto, no se puede registrar e incriminar a esta especie como vector, asociado al foco del estado Lara, municipio Torres, localidad de San Esteban (Lat 10° 54' N/ Long 69°.55' O) [8] hasta que se haga una caracterización morfológica y genética del vector para esta localidad.

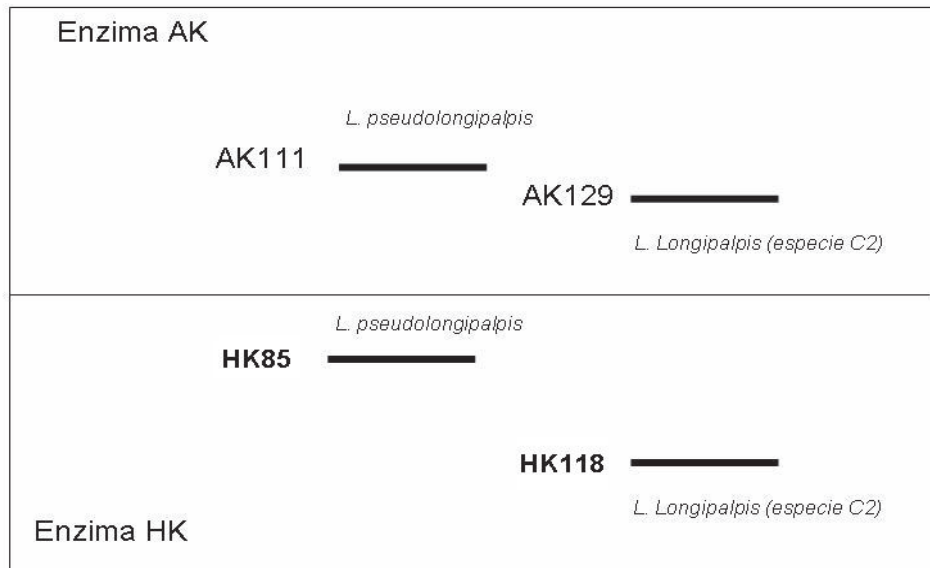


FIGURA 1. DIAGRAMA DEL PATRÓN DE CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LOS ALELOS DIAGNÓSTICOS PARA LAS ESPECIES *L. Pseudolongipalpis* Y *L. Longipalpis*, OBTENIDOS CON LAS ENZIMAS ADENILATO QUINASA (AK) Y LA ENZIMA HEXOQUINASA (HK). /ELECTROPHORETIC PATTERNS OF THE ALLELES DIAGNOSIS FOR SPECIES *L. pseudolongipalpis* AND *L. Longipalpis*, OBTAINED WITH ENZYMES ADENYLATE KINASE (AK) AND HEXOKINASE (HK).

Finalmente, en los estudios epidemiológicos, la identificación válida y certera del vector, es una necesidad, y en especial para focos donde pueden estar presentes estos dos flebotominos vectores de leishmaniasis visceral, ya que presentan competencias vectoriales y fluctuaciones poblacionales diferentes, claves en la dinámica de la transmisión y manejo de la enfermedad.

CONCLUSIONES

La nueva especie vector de leishmaniasis visceral señalada para Venezuela, *L. pseudolongipalpis*, a pesar de estar descrita morfológicamente, sólo puede ser identificada de forma certera utilizando caracteres genéticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGRELA, I.; SÁNCHEZ, E.; GÓMEZ, B.; FELICIAN- GELI, M.D. Feeding behavior of *Lutzomyia pseudolongi- palpis* (Diptera: Psychodidae), a putative vector of vis- ceral leishmaniasis in Venezuela. **J. Med. Entomol.** 39 (3):440-445. 2002.
- [2] ARRIVILLAGA, J.C.; FELICIAN- GELI, M.D. Diferencia- ción morfológica larval entre poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) en Venezuela (Diptera: Psychodidae). **Bol. Entomol. Venez.** 15 (2): 229-234. 2000.
- [3] ARRIVILLAGA, J.C.; RANGEL, Y.; OVIEDO, M.; FELICI- ANGELI, M.D. Genetic divergence among Venezuelan populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodi- dae: Phlebotominae). **J. Med. Entomol.** 37 (1):325-330. 2000.
- [4] ARRIVILLAGA, J.C.; FELICIAN- GELI, M.D. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new species within the longi- palpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. **J. Med. Entomol.** 38 (6):783-790. 2001.
- [5] ARRIVILLAGA, J.; NORRIS, D.; FELICIAN- GELI, M.D.; LANZARO, G. Phylogeography of the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. **Infect. Gen. Evol.** 2 (2): 83-95. 2002.
- [6] ARRIVILLAGA, J.C.; MUTEPI, J.P.; PIÑANGO, H.; NORRIS, D.; ALEXANDER, B.; FELICIAN- GELI, M.D.; LANZARO, G.C. The taxonomic status of genetically di- vergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. **J. Med. Entomol.** 40 (5): 615- 27. 2003.
- [7] ARRIVILLAGA, J. Filo geografía de la especie C2 del complejo longipalpis, una nueva especie endémica para Venezuela dentro del complejo longipalpis vector de leish- maniosis neo tropical. En: Estrada Venegas E.G., Equi- hua Martínez A., Padilla Ramírez J.R., Mendoza Estrada A. (Eds.). **Entomología Mexicana**. Vol. 7. Sociedad Mex- icana de Entomología A.C. México. 785-789 pp. 2007.
- [8] BONFANTE-GARRIDO, R.; UR- DANETA, R.; UR- DANETA, I.; RODRÍGUEZ, R.; PERDOMO, R. Fle- botominos en dos focos endémicos de leishmaniasis vis-

- ceral Americana en el Municipio Torres estado Lara, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XVII (2): 173-177. 2007.
- [9] FELICIANGELI, M.D.; ARRIVILLAGA, J.C.; BRAVO, A.; ARIAS F. Activity of *Lutzomyia pseudolongipalpis* and *Lutzomyia longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae) in Venezuela. **Parasite.** 11 (3):273-8. 2004.
- [10] FELICIANGELI, M.D.; DELGADO, O.; SUÁREZ, B.; CHIRILLO, M.A. The burden of the *Leishmania chagasi/infantum* infection in a closed rural focus of visceral leishmaniasis in Lara state, west-central Venezuela. **Trop. Med. Int. Health** 10 (5): 444–449. 2005.
- [11] FELICIANGELI; M.D., DELGADO, O.; SUÁREZ, B.; BRAVO, A. Leishmania and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in west central Venezuela. **Trop. Med. Int. Health** 11 (12):1785-1791. 2006.
- [12] LAMPO, M.; TORGERSON, D.; MÁRQUEZ, L.M.; RINALDI, M.; GARCÍA, C.Z.; ARAB, A. Occurrence of sibling species of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Venezuela: first evidence from reproductively isolated sympatric populations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 61 (6):1004-9. 1999.
- [13] YOUNG, D.G.; DUNCAN, M.A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). **Memories of the American Entomological Institute**, Associated Publishers, Gainesville, Florida, USA. Number 54. 881 pp. 1994.
- [14] WATT, P.C.; HAMILTON, J.G.C.; WARD, R.D.; NOYES, H.A.; SOUZA, N.A., KEMP, S.J.; FELICIANGELI, M.D.; BRAZIL, R.; MAINGON, R.D.C. Male sex pheromones and the phylogeographic structure of the *Lutzomyia longipalpis* species complex (Diptera: Psychodidae) from Brazil and Venezuela. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 73 (4): 734-743. 2005.