

Desarrollo embrionario de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), bajo condiciones de laboratorio**Embryonic development of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), under laboratory conditions**Judier Karelly Melgarejo-Colmenares¹, Ronald López², Olga L. Cabrera-Quintero^{2*}

1 Universidad Nacional de San Martín, Laboratorio de Ecología de Enfermedades Transmitidas por Vectores (2eTV), Buenos Aires, Argentina

2 Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS), Grupo de Entomología, Colombia

*Autor de correspondencia: olgalucabrera@yahoo.com

Resumen

.....
Palabras clave:
 dípteros;
 flebotominos;
 desarrollo
 embrionario; huevo

Lutzomyia longipalpis es el principal vector de la leishmaniasis visceral en las Américas. Durante seis días se hizo seguimiento al desarrollo de los huevos de *L. longipalpis* bajo condiciones experimentales. Esto permitió describir las características morfológicas internas y externas del huevo y de las larvas recién nacidas, así como estimar su longitud. En huevos con uno y dos días de desarrollo, se observó abundante vitelo sin formación clara de blástula y gástrula. Al tercer día, se registró una disminución de la envoltura vitelina y la diferenciación de algunas estructuras de la larva. En el cuarto día se observó la larva formada, pero sin quitinización. Al quinto día se visualizaron las setas caudales y a través del corión las estructuras diferenciadas de la larva, y al sexto día la mayoría (90 %) de las larvas había eclosionado. En promedio, la longitud de los huevos fue de 372,8 µm y el ancho de 109,0 µm, en tanto que la longitud de las larvas fue de 628,8 µm y la de las setas caudales 686,7 µm.

Abstract

.....
Key words:
 diptera; sandflies;
 embryonic
 development; egg

Lutzomyia longipalpis is the main vector of visceral leishmaniasis in the Americas. The development of *L. longipalpis* eggs was monitored for six days under experimental conditions. This allowed describing the internal and external morphological characteristics of the egg and the newly born larvae, as well as estimating their length. In eggs with one and two days of development, abundant vitello was observed without clear formation of blastula and gastrula. On the third day, a decrease in the vitelline envelope and the differentiation of some larval structures were recorded. On the fourth day the larva formed was observed, but not sclerotized. On the fifth day we visualized the caudal setae and through the chorion the differentiated larval structures, and on the sixth day the majority (90 %) of the larvae had hatched. On average, the length of the eggs was 372.8 µm and the width 109.0 µm, while the length of the larvae was 628.8 µm and the length of the caudal setae was 686.7 µm.

Lutzomyia longipalpis (Lutz y Neiva, 1912), es reconocido como el vector principal de *Leishmania infantum*, agente etiológico de la leishmaniasis visceral (LV) que en ausencia de tratamiento puede ser fatal (World Health Organization, 2017). Presenta una distribución geográfica que va desde de México hasta el norte de Argentina y Uruguay (Young y Duncan, 1994; Salomón et al., 2011). En Colombia, *L. longipalpis* presenta una distribución restringida al valle alto y medio del río Magdalena, en donde esta especie mantiene la transmisión de la LV, principalmente en el área rural. Las alteraciones y modificaciones en el uso de la tierra han generado cambios en los ciclos de transmisión de la leishmaniasis. En las últimas dos décadas, se han notificado brotes de la enfermedad en áreas periurbanas y urbanas (Flórez et al., 2006; Gómez y Zambrano, 2012), lo que sugiere la rápida adaptación de *L. longipalpis* a ambientes modificados por el hombre (Travi et al., 2002; Dias et al., 2011).

Considerando la importancia epidemiológica esta especie ha sido objeto de diversos estudios, como los realizados por Morrison et al. (1995a) en un estudio llevado a cabo en la vereda El Callejón del municipio de Ricaurte (Cundinamarca, Colombia), describieron la asociación positiva entre la abundancia de hembras de *L. longipalpis* y las variables humedad relativa y precipitación. Los mismos autores determinaron también aspectos de la bionomía de esta especie y establecieron patrones de actividad nocturna, sitios de cría y preferencias de hospedero como fuente de alimento sanguíneo (Morrison et al., 1995a,b; Ferro et al., 1997). La primera descripción de la morfología externa del huevo, del estadio larval IV y de la pupa, para *L. longipalpis*, fue realizada por Guitton y Sherlock (1962). Estos estudios han sido posibles debido a la relativa facilidad con la que se logra mantener en cautiverio a esta especie por muchas generaciones continuas. Por otro lado, estudios relacionados con el ciclo vida bajo condiciones de laboratorio, han estimado el tiempo de duración, con descripción morfológica de cada fase del desarrollo (Killick-Kendrick et al., 1977).

A pesar de lo anterior, es notable el desconocimiento relacionado con la morfología interna del huevo y el desarrollo embrionario. En la literatura, solo se conoce el estudio de la embriogénesis en *Phlebotomus papatasi*

(Abbassy et al., 1995a,b), en el cual se registraron los

cambios en cada etapa del desarrollo embrionario entre las 0 y las 216 h, tiempo requerido para la formación completa de la larva de esta especie. Para especies del género *Lutzomyia*, presentes en las Américas, no se conocen estudios sobre este tema. Una de las razones es atribuida a la dificultad para lograr criar estas especies bajo condiciones controladas de laboratorio, a fin de disponer de suficiente material biológico para estas observaciones. No obstante, *L. longipalpis* es la única especie mantenida en una colonia cerrada en el laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud de Bogotá (Colombia). El presente trabajo describe las características generales de la morfología externa y el desarrollo del huevo de *L. longipalpis*.

Se utilizaron 30 hembras de *L. longipalpis*, filial 71, procedentes de una colonia establecida a partir de especímenes silvestres recolectados en la vereda El Callejón. Estas hembras fueron alimentadas con sangre ofrecida desde un hámster anestesiado. El uso del hámster para alimentar a las hembras de *L. longipalpis*, fue aprobado por el comité de Ética del INS (junio 25 del 2009). Después de 24 horas, cuando la hembra ha digerido parcialmente la sangre ingerida, se individualizaron en vasos de cría con una humedad máxima del 100 %, medida de humedad del sustrato (yeso dental) usada en la cría masiva para esta especie en el Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud (INS), en Bogotá. Los vasos fueron colocados en el interior de un recipiente plástico mantenido en una incubadora con una temperatura que varió entre 28 y 29 °C, una humedad relativa entre 78 y 81 % y un fotoperiodo luz: oscuridad de 6:18.

Para registrar las características del huevo, después de ovipositados (entre el 5o y el 6o día después de alimentadas, datos no publicados de los autores), se seleccionaron 20 huevos de alguna de las 30 hembras individualizadas, para cada día de desarrollo. Cada huevo se trasladó, con la ayuda de un pincel, a una gota de solución tampón fosfato (PBS) colocada sobre una lámina portaobjeto. Se midió la longitud, desde el extremo anterior hasta el extremo posterior y el ancho se midió en la parte media. Estas medidas se obtuvieron usando un microscopio óptico, Nikon Eclipse 50i. Para visualizar el aspecto interno del huevo, éste se disecó usando agujas de disección, bajo un estereomicroscopio Nikon SMZ1000. Las larvas hasta con 24 h de nacidas también se midieron. La medida se tomó desde el

margen frontal de la cápsula de la cabeza hasta donde finaliza el último segmento abdominal o metámero. La longitud de las setas caudales se midió desde el punto de inserción en el último segmento abdominal hasta el extremo distal de cada seta.

Las variables registradas fueron: aspecto externo del huevo, corion brillante o rugoso, coloración, forma y tamaño. Del interior del huevo, se registró el aspecto

del vitelo, presencia de masa corporal y formación de larva. Las variables de tamaño para huevos y larvas recién nacidas, se presentan como promedio con su rango de variación. El uso del hámster para alimentar a las hembras de *L. longipalpis*, fue aprobado por el comité de Ética del Instituto Nacional de Salud (junio 25 del 2009).

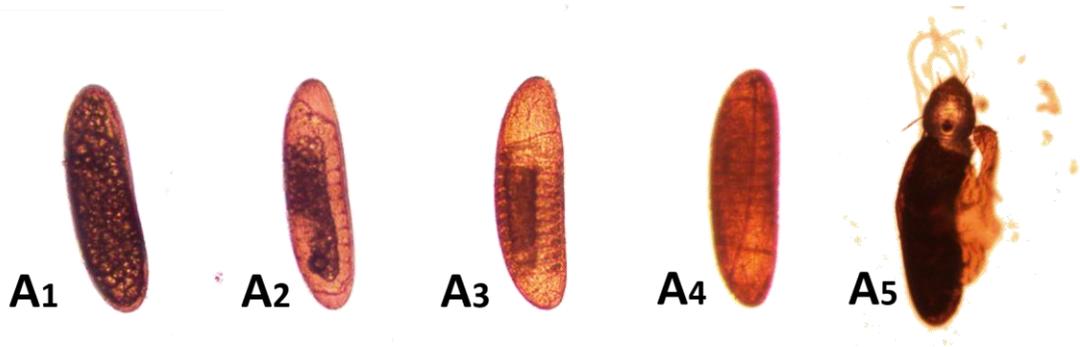


Figura 1. Desarrollo del huevo de *Lutzomyia longipalpis* A1: huevo con 24 h de desarrollo; A2: 72 h; A3: 96 h, con diferenciación de metámeros; A4: 120 h, visualización de setas caudales; A5 144 h formación completa de la larva.

Se midieron 150 huevos y la longitud promedio fue de 372,8 μm (mín.: 368,6; máx.: 384,4) y el ancho 109,0 μm (108,3 - 114,1). Durante el tiempo de desarrollo (6 - 7 días) los huevos no presentaron variación en forma y tamaño, pero si se registró variación en la pigmentación coriónica. Huevos con 24 y 48 h de ovipositados presentaron una coloración café oscuro brillante (figura 1,A1) y en el interior el vitelo presentaron un aspecto viscoso y transparente. Al alcanzar las 72 h de desarrollo (figura 1 A2), el huevo cambió su tonalidad a café claro (translúcido) y el vitelo se transformó en tejido especializado, observándose estructuras de la larva (metámeros). Entre las 96 (figura 1 A3) y las 120 h, se pudo apreciar la formación completa del cuerpo de la larva. Pasadas las 144 h de desarrollo, las setas caudales se hicieron visibles, así como la quitinización de la cabeza y la formación de la espina de eclosión ubicada en la parte dorsal de la cabeza (Barreto, 1941) (figura 1 A4, A5). Después de las 144 h y hasta las 168 h de tiempo de desarrollo bajo condiciones ambientales óptimas, el huevo eclosionó. La condición de eclosionado fue confirmada por un corte en forma de J en uno de los extremos del huevo, hecho por la larva usando la espina de eclosión.

Con relación al tamaño de las larvas, los 30 individuos medidos registraron una longitud promedio de 628,8 μm (min.: 578,7; máx.: 678,8) y para las setas caudales de 686,7 μm (min.: 669,1; máx.: 704,2). Este estudio permitió describir de forma general los cambios morfológicos del desarrollo del huevo de *L. longipalpis*. Durante los dos primeros días (48 h) ocurrió la formación de la blástula y la gástrula; sin embargo, la gran cantidad de vitelo y la técnica de disección del huevo pudieron ocasionar la destrucción de estas estructuras, lo que limitó su visualización. El vitelo, sustancia almacenada en el óvulo y que es la fuente de alimento para nutrir el embrión, se observó en los tres primeros días de desarrollo. Esto también se ha descrito para *P. papatasi* (Abbassy *et al.*, 1995a, b). Según estos autores, la formación del blastodermo y la gástrula se presenta entre las 60 y 84 h y la organogénesis entre el 5º y el 9º día (108 y 204 horas). El tiempo de diferenciación de órganos es mayor para esta especie que para *L. longipalpis* para la cual se reportó una duración de 7 días (rango de 4 a 9) (Killick-Kendrick *et al.*, 1977), bajo condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas.

Respecto a la coloración de los huevos (negro a marrón), Barreto (1941) menciona que después de ser

ovipositados, la coloración se hace más clara y turgente al momento de la eclosión. Adicionalmente, el tamaño del huevo de *L. longipalpis*, aparentemente se encuentra entre los de mayor longitud comparado con otras especies de flebotominos en el Nuevo Mundo. Por ejemplo, los huevos de *L. youngi* miden 340,1 μm (322,8 - 366,9) con un ancho de 106,0 μm (85,5 - 124,3); para *L. longiflocosa*, la longitud promedio es 335,8 μm (322,3 - 347,0) y el ancho 113,3 μm (101,2 - 123,7); en *L. columbiana*, la longitud promedio es 335,4 μm (313,5 - 359,2) y el ancho 108,6 μm (87,5 - 150,7); en *L. evansi*, la longitud promedio es 311,9 μm (288,8 - 328,4) y el ancho 88,4 μm (72,6 - 108,4) (Sierra *et al.*, 2000). Para las setas caudales, el tamaño puede presentar variaciones en las larvas de primer instar entre especies de flebotominos y por lo tanto constituirse en un carácter morfológico que contribuya a la definición de la especie. En este estudio se determinó que la longitud de las setas caudales fue semejante al tamaño del cuerpo de la larva, diferente a lo descrito en larvas recién nacidas de *P. wellcomei* (1080,0 - 1140,0 μm) y *L. shannoni* (800 - 1350 μm), donde las setas son casi el doble del tamaño del cuerpo de las larvas (550 - 558 μm y 400 - 675 μm , respectivamente) (Ward, 1971; Ferro *et al.*, 1998).

Las descripciones disponibles en la literatura de los estadios inmaduros en flebotominos se han centrado principalmente en larvas y específicamente para larvas de IV estadio. Estudios sobre el desarrollo del huevo en vectores de leishmaniasis, son muy limitados. Ferro *et al.* (1987), realizaron la descripción de algunos de las formas inmaduras de *L. walkeri* (Newstead, 1914). Describieron la quetotaxia y el tamaño de larva de estadio IV y pupa. Para *L. shannoni*, se describieron detalles de la morfología de todos los estadios inmaduros (Ferro *et al.*, 1998).

El tiempo de desarrollo del estadio de huevo de *L. longipalpis* es menor comparado con otras especies de *Lutzomyia* como *L. spinicrassa*, *L. quasitownsendi* y *L. youngi* lo que coincide con lo registrado por Killick-Kendrick *et al.* (1977). Los resultados obtenidos en el presente trabajo colocan a disposición de la comunidad científica, información básica que permitirá realizar comparaciones morfológicas de estadios inmaduros (huevo y larva I) de *L. longipalpis*, considerando que este vector hace parte de un complejo de especies en las Américas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los señores Marco Fidel Suárez (INS) y Gilberto Torres (ULS), por su apoyo y asistencia en el mantenimiento de la colonia de *L. longipalpis* usada para el experimento.

Referencias

- Abbassy, M., Helmy, N., Osman, M., Cope, S. y Presley, S. 1995a. Embryogenesis of the Sand Fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae): Cell cleavage, blastoderm formation, and gastrulation. *Annals of the Entomological Society of America* 88(6): 809-14.
- Abbassy, M., Helmy, N., Osman, M., Cope, S. y Presley, S. 1995b. Embryogenesis of the Sand Fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae): Organogenesis of the nervous system, tracheal system, muscular system, heart, and gonad rudiments. *Annals of the Entomological Society of America* 88(6): 821-6.
- Barreto, M. 1941. Morfología dos ovos, larvas e pupas de alguns flebotomos de São Paulo. *Annual Faculda de de Medicina da Universidade São Paulo* 117(2): 356-427.
- Dias, E.S., Regina-Silva, S., França-Silva, J.C., Paz, G.F., Michalsky, E.M., Araújo, S.C., Lopes- Valado, J., Lara-Silva, F.B., Santos de Oliveira, F., Silva-Pacheco, R. y Latorre-Dias, C. 2011. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology* 176(2-3): 101-11.
- Ferro, C., Morales, A. y Cura, E. 1987. Morfología de los estadios inmaduros de *Lutzomyia walkeri* (Newstead, 1914) (Diptera: Psychodidae). *Biomédica* 7:26-34.
- Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., y Morrison, A.C. 1997. Larval microhabitats of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medical Entomology* 34(6): 719-28.
- Ferro, C., Cárdenas, E., Corredor, D., Morales, A. y Munstermann, L.E. 1998. Life Cycle and Fecundity Analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 93:doi.org/10.1590/S0074-02761998000200011.

- Flórez, M., Martínez, J.P., Gutiérrez, R., Luna, K.P., Serrano, V.H., Ferro, C., Angulo V.H. y Sandoval, C.M. 2006. *Lutzomyia longiplapis* (Diptera: Psychodidae) en un foco suburbano de leishmaniosis visceral en el Cañón del Chicamocha, en Santander, Colombia. *Biomédica* 26 (1): 109-20.
- Gómez-Romero, S.E. y Zambrano, P. 2012. Informe del evento leishmaniosis hasta XII periodo epidemiológico del año 2012. Instituto Nacional de Salud, Bogotá.
- Gitton, N. y Sherlock, I.A. 1962. Descricao das fases imaturas do *Phlebotomus longipalpis* (Lutz & Neira. 1912) (Diptera: Psychodidae). *Revista Brasileira de Biologia* 29(3): 383.
- Killick-Kendrick, A., Leaney, A. y Ready, P.D. 1977. The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 13(4-5): 429-40.
- Morrison, A.C., Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., Devlin, B., Wilson, M.L. y Tesh, R.B. 1995a. Seasonal abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniosis in Colombia. *Journal of Medical Entomology* 32(4): 538-48.
- Morrison, A.C., Ferro, C., Pardo, R., Torres, M., Wilson, M.L. y Tesh, R.B. 1995b. Nocturnal activity patterns of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniosis in Colombia. *Journal of Medical Entomology* 32(5): 605-17.
- Salomón, O.D., Basmajdian, Y., Fernández, M.S. y Santini, M.S. 2011. *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniosis transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106: 381-2.
- Sierra, D., Vélez, I.D. y Uribe, S. 2000. Identificación de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) grupo verrucarum por medio de microscopia electrónica de sus huevos. *Revista de Biología Tropical* 48: 2-3.
- Travi, B.L., Adler, G.H., Lozano, M., Cadena, H. y Montoya-Lerma, J. 2002. Impact of habitat degradation on phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of tropical dry forests in Northern Colombia. *Journal of Medical Entomology* 39(3): 451-456.
- Ward, R. 1971. Some observations on the biology and morphology of the immature stages of *Psychodopygus wellcomei* Fraiha, Shaw and Laison, 1971. (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 70(1): 15-28.
- World Health Organization (WHO) 2019. Leishmaniosis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniosis>. Consultado: 1 de marzo 2019.
- Young, D.G. y Duncan, M.A. 1994. *Guide to the identification and sand flies in Mexico, the west Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*. Associated Publishers American Entomological Institute, Gainesville.

Citar como: Melgarejo-Colmenares, J.K., López, R. y Cabrera-Quintero, O.L. 2019. Desarrollo embrionario de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), bajo condiciones de laboratorio. *Intropica* 14(2): En prensa. DOI: <http://dx.doi.org/10.21676/23897864.3150>