

Artículo Original

Especies Crípticas *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) y sus Implicaciones en la Transmisión de Leishmaniasis en PanamáCryptic Species *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotominae) and its Implications in the Transmission of Leishmaniasis in Panama.

Valderrama Anayansi*, Santos Mileyka*, Castro Angélica*, Andrade Filho José Dilermando**.

*Departamento de Investigaciones en Entomología Médica, Instituto Comemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá, Panamá. **Grupo de Estudos em Leishmanioses, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Minas Gerais, Brasil.

Palabras claves:

Phlebotominae, *Lutzomyia longipalpis*, población genética, variación genética, red de haplotipos.

Key Word:

Phlebotominae, *Lutzomyia longipalpis*, genetic population, genetic variation, haplotype network.

Correspondencia a:
Anayansi Valderrama-Cumbrera.

Correo electrónico:
avalderrama
@gorgas.gob.pa

Los autores han declarado que no existe conflictos de intereses con la publicación del presente trabajo.

Se obtuvo el consentimiento informado de todo paciente participante. Los autores declaran autogestión como fuente de financiamiento.

Resumen

Lutzomyia longipalpis es el principal vector de una importante enfermedad desatendida en América. La diversidad genética de este vector se estimó en la población colectada en dos áreas geográficas separadas por hasta 37 km. Analizamos la secuencia CB3-PDR / N1N-PDR de 22 individuos obteniendo un parámetro de: $h = 0.43$ y $\pi = 0.0017$ (Bona), $h = 0.89$, $\pi = 0.004$ (El Limón) con una diferenciación genética de $kst = 0.03$; $p > 0.05$ entre ellos. Ocho haplotipos fueron detectados, de los cuales fue compartido. Se detectó una diferenciación significativa entre las poblaciones Panamá-Colombia ($kst = 0.98$), Panamá-Costa Rica ($kst = 0.98$) y Panamá-Brasil ($kst = 0.72$) bajo el modelo de aislamiento. Las inferencias genéticas de esta población pueden complementar la información de la capacidad de dispersión y brindar pistas importantes para comprender la ecología de *Lutzomyia longipalpis* en Panamá.

Abstract

Lutzomyia longipalpis is the main vector of an important neglected disease in America. The genetic diversity of this vector was estimated in the population collected in two geographical areas separated by up to 37 km. We analyzed the sequence CB3-PDR / N1N-PDR of 22 individuals obtaining a parameter of: $h = 0.43$ and $\pi = 0.0017$ (Bona), $h = 0.89$, $\pi = 0.004$ (The Lemon) with a genetic differentiation of $kst = 0.03$; $p > 0.05$ between them. Eight haplotypes were detected, of which it was shared. A significant differentiation was detected between the Panama-Colombia ($kst = 0.98$), Panama-Costa Rica ($kst = 0.98$) and Panama-Brazil ($kst = 0.72$) populations under the isolation model. The genetic inferences of this population can complement the dispersion information and provide important clues to understand the ecology of *Lutzomyia longipalpis* in Panama.

INTRODUCCIÓN

Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva 1912) es una especie de flebótomo que ha sido ampliamente estudiada desde el punto de salud pública, incriminándola en la transmisión de *Leishmaniasis*. Dada su importancia médica como portadora principal de *Leishmania infantum* chagasi, que causa leishmaniasis visceral, la cual según la Organización Mundial de la Salud es una enfermedad desatendida, endémica en el subcontinente Indio y África oriental. Entre 50 000 y 90 000 nuevos casos se reportan anualmente y 90% de los casos notificados a la OMS se producen en Brasil, Etiopía, India, Kenya, Somalia, Sudán y Sudán del Sur.

Por lo antes mencionado, y debido a la interesante biodiversidad de los flebótomos es importante la identificación correcta de las especies vectoras, misma que basada sólo en caracteres morfológicos dificulta la diferenciación de especies crípticas o especies que son similares en apariencia, pero reproductivamente aisladas entre sí. Mangabeira mostró que

Figura 1. Distribución geográfica de las dos poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* registradas en Panamá.

Lu. Longipalpis originalmente de los estados de Para y Ceará eran diferentes, lo que sugirió la existencia de un complejo de especies crípticas en Brasil [1]. Posteriormente, otros estudios sobre apareamientos, feromonas y canciones de amor mostraron el aislamiento reproductivo de estas poblaciones de *Lu. Longipalpis* sostuvieron esa hipótesis [2, 3, 4, 5].

Por otro lado, con la implementación de técnicas moleculares, el análisis genético con marcadores de los genes mitocondriales ND4 (nicotinamida adenín dinucleótido subunidad 4) y COI (citocromo oxidasa I) también mostraron diferencias entre las poblaciones de *Lu. longipalpis* presentes en Centro y Sur América, estableciéndose la existencia de cuatro complejos de especies crípticas: brasileñas, transandinas, cisandinas y poblaciones de Lara de Venezuela [6, 7]. Por lo que la correcta identificación de cada una de las especies es imprescindible antes de implementar planes de control de prevención de la enfermedad.

La existencia de este complejo de especies crípticas, nominado como *Lu. longipalpis* tiene una gran importancia para la epidemiología de la leishmaniasis visceral estadounidense debido a las diferencias en la composición de aminoácidos del maxadilán en la saliva de las poblaciones de *Lu. longipalpis* de América Central y del Sur, que influye en la visceralización de *Leishmania* y los síntomas clínicos [10]. Por lo que, las diferencias genéticas, morfológicas y de comportamiento del complejo de *Lu. Longipalpis* influye en el potencial de transmisión y formas clínicas de la enfermedad [10].

Inicialmente, la mayoría de los estudios realizados sobre los flebotomos o chitras en Panamá, se centraron en las especies de vectores de leishmaniasis cutánea [11], y pocas colecciones informan la presencia de *Lu. Longipalpis* [12]. Por ello, se desconoce la distribución, ocurrencia e implicaciones de esta especie en la transmisión de la

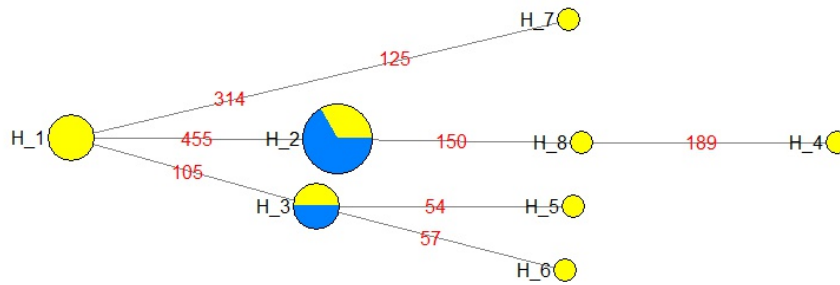
leishmaniasis en Panamá. Teniendo en cuenta la controversia generada por la discontinua distribución del vector en Panamá, nuestros objetivos fueron: evaluar la diversidad genética de dos poblaciones, que son las únicas reportadas hasta el momento. Además, de comparar las secuencias mitocondriales obtenidas con individuos recolectados en Costa Rica, Colombia y Brasil, y disponibles en el acceso público al GenBank NCBI, para determinar las diferencias genéticas entre ellas. Esta información es importante para comprender sobre los aspectos evolutivos y taxonómicos de la especie y sus implicaciones en la transmisión de la leishmaniasis en Panamá.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las colectas se realizaron en las siguientes localidades: Isla de Bona, municipio de Otoque, se recolectaron entre agosto de 2009 y mayo de 2011. Esta isla deshabitada se encuentra entre las coordenadas 8° 34'24"N - 79° 35'24"O, y, según la Clasificación Climática de Köppen, tiene un clima tropical, influenciado por la masa de aire del Océano Pacífico. La vegetación predominante es la selva primaria, sin intervención antropogénica. Las temperaturas medias podrían superar los 27°C, y la humedad del aire podría alcanzar el 90%. Para la recolección de muestras de adultos, se colocaron trampas de luz dentro del bosque, junto a nidos de animales, fisuras de rocas, hoyos en el suelo y árboles huecos.

Las muestras de la comunidad rural de El Limón, distrito de Capira, que se encuentra entre las coordenadas 8° 41'14"N - 79° 54'3"W, se recolectaron entre junio y agosto de 2010 y de agosto de 2012 a septiembre de 2014. La clasificación del clima de la región es la sabana tropical, con una temperatura media de 23°C y una humedad del aire del 80%. La cobertura vegetal es heterogénea, entre restos de bosque secundario y pastos. Las trampas

Figura 2. Red de haplotipos del análisis del gen mitocondrial de las dos poblaciones de *Lutzomyia longipalpis* registradas en Panamá. Cada círculo simboliza un haplotipo y el tamaño indica las frecuencias de este genotipo en la población. Los círculos azules y amarillos indican los haplotipos encontrados en las islas Bona y El Limón, respectivamente. Las trazas entre los haplotipos señalan el número de mutaciones.



de luz se colocaron en el área cerca de las casas, junto a los refugios de animales domésticos y la vegetación similar a un árbol. (Ver figura 1)

Las trampas se colocaron a 1.5 m de altura y 50 metros de distancia una de la otra. El período de recolección fue de 12 horas (1800 a 0600 horas) durante tres días consecutivos en cada lugar. Las muestras se sacrificaron utilizando trietilamida, se conservaron en alcohol al 95% y se almacenaron a -20 ° C. Fueron identificados utilizando los criterios taxonómicos de [13].

Extracción de ADN:

El ADN se extrajo de acuerdo al protocolo de [14], con leves modificaciones. Cada individuo colectado se homogeneizó utilizando un tampón de lisis (TRIS-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, SDS al 0,5%, pH 8,0) y 20 mg / ml de la enzima proteasa, y se incubó a 37 ° C durante toda la noche. El ADN se purificó utilizando fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (26: 25: 1), seguido de la precipitación con acetato de sodio 3M, pH 5.2 y etanol frío absoluto y etanol final al 70%. El ADN genómico se re-suspendió en 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM pH 8,0) y se almacenó a -20 ° C hasta que se usó.

Amplificación y secuenciación:

Los cebadores utilizados para la amplificación de los 500 pb del ADNmt fueron CB3-PDR 5'-CA (T / A) ATTCAACC (A / T) GAATGATA-3 'y N1N-PDR 5'-GGTA (C / T) TTGCCTCGA (T / A) TTCG (T / A) TATGA-3 '(15) Para una reacción de PCR de 25 µl, se utilizaron 50 ng de ADN genómico, tampón (1X), MgCl₂ (1,5 mM), 0,2 mM de cada dNTP, cebadores (10 pM) y 1U de ADN polimerasa de Go Taq (Promega). Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las utilizadas y descritas por (15). El producto derivado del proceso de amplificación se separó en gel de agarosa al 1,5%.

Se incluyó un control negativo, sin ADN genómico, en cada reacción de PCR. Los productos resultantes del proceso de amplificación fueron secuenciados directamente por Macro-gen Inc (Corea del Sur), utilizando los mismos cebadores de la amplificación. Las secuencias se compararon con la herramienta BLAST disponible en GenBank NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) para verificar la similitud entre los *Lu. Longipalpis* se-

cuencias almacenadas en la base de datos.

Análisis estadístico:

Las 22 secuencias de *Lu. longipalpis* en Panamá, obtenidos en el presente estudio, fueron comparados con los de *Lu. Longipalpis* de las secuencias recopiladas en la Gruta da Lapinha / Minas Ge-raís / Brasil (que también se secuenció en este estudio), tres secuencias en Colombia, dos en Costa Rica y dos en Brasil, disponibles en el GenBank NCBI; AF403492.1-AF403498.1. Las secuencias de nucleótidos se editaron utilizando el software CodonCode Aligner y se alinearon con la opción Muscle del software MEGA 5.05.

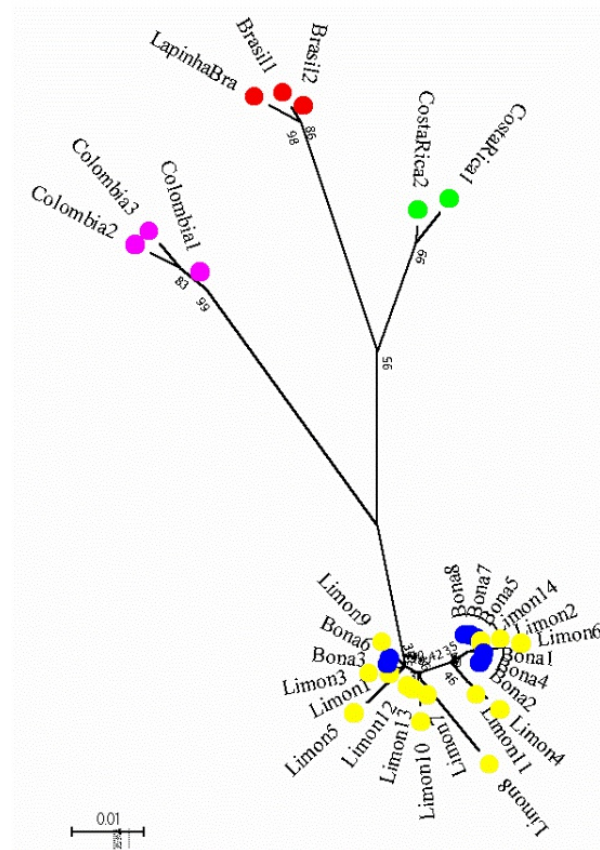
Para estimar el número de haplotipos, la diversidad de nucleótidos (π) y la diversidad de tipo haplo (h) de cada población, se utilizó el algoritmo DnaSP 5 de software. El parámetro Kst* se usó para determinar las diferencias genéticas entre las muestras y se estimó con permutaciones de 10,000 veces ($p = 0.05$). El árbol de clados se construyó a través del método de máxima probabilidad, utilizando el software MEGA. Obtener los valores del bootstrap entre los clados. La selección del modelo también se utilizó para determinar el modelo de sustitución de la nucleótida, según el BIC (Criterio de Información Bayesiano). Se infirió una red de haplotipos mediante el método de red de unión mediana, utilizando el software Network v.4.5.

RESULTADOS

Un total de 22 individuos se colectaron 8 en la isla de Bona (seis hembras / dos machos) y 14 cerca de las casas de la comunidad de El Limón (nueve hembras / cinco machos). Los machos recolectados tenían una mancha blanca en la tergita abdominal IV, según lo observado por (1) y (2) para las poblaciones brasileñas.

La caracterización de las secuencias mitocondriales de los individuos recolectados mostró un fragmento de 500 nucleótidos con la siguiente información: 477 sitios conservados y ocho sitios polimorfos, tres sitios de los cuales eran parsimoniosos y cinco singletons. La diversidad de haplotipos fue de 0.43 ± 0.22 en Bona y de $0.89 \pm$

Figura 3. Árbol de relaciones filogenéticas de máxima verosimilitud del individuo representativo de *Lut. Longipalpis*. Los valores en las ramas corresponden a ML bootstrap, se muestran valores <50%.



0.09 en El Limón, mientras que la diversidad de nucleótidos fue de 0.0040 ± 0.0011 en Bona y de 0.0040 ± 0.0017 en El Limón (Ver figura 2).

Comparando las secuencias mitocondriales obtenidas en este estudio con las de cyt b / NADH1 de GenBank, se obtuvieron 16 haplotipos: ocho en Panamá, dos en Costa Rica, tres en Colombia y tres en Brasil. Se detectaron diferentes haplotipos en cada uno de los países comparados, mostrando la presencia de cuatro linajes diferentes (Ver Fig. 3).

La diferenciación genética entre las poblaciones de la Isla Bona y El Limón fue baja ($kst = 0.03$; $P > 0.05$ ns), por lo tanto, mucho más baja que la detectada entre las poblaciones de Panamá y las otras poblaciones comparadas: Panamá-Colombia ($Kst = 0.98$), Panamá-Costa Rica ($Kst = 0.98$), Panamá-Brasil ($kst = 0.72$).

DISCUSIÓN

Aunque se han realizado colectas de flebotomos durante mucho tiempo en Panamá, *Lu. longipalpis* parece ser una especie con una distribución restringida y poco abundan-

te. En estudios previos, esta especie se ha encontrado solo en el Parque Nacional Altos de Campana y en la Isla Bona, cuyos ambientes son boscosos húmedos [16, 17]. Cercano a esa región del Parque Nacional de Campana existe una zona alterada antropogénicamente donde se colectaron machos y hembras en el peridomicilio de una comunidad en El Limón, rumbo hacia Chicá [12]. Indicando su adaptación a las áreas domésticas y peridomésticas, de las casas cercanas a esta zona.

Los machos *Lu. longipalpis* recolectados en las comunidades muestreadas en este estudio presentaban una sola mancha blanca en la tergita abdominal IV, lo que indica que podría ser la forma morfológica establecida en Panamá. Hasta ahora, se ha documentado que los individuos que presentan una mancha blanca tienen una amplia distribución, desde México hasta el sur de Brasil [2], y que los individuos que presentan dos manchas abdominales tienen una distribución restringida al noreste de Brasil, teniendo más importancia en la transmisión de la enfermedad [2]. A pesar de la distancia geográfica, nuestros datos muestran que la diferenciación genética entre las dos poblaciones de *Lu. longipalpis* es poca debido al flujo de genes.

Al parecer la variación genética de las poblaciones de *Lu. longipalpis* no están influenciadas por barreras geográficas. Las condiciones climáticas parecen no contribuir a la diferenciación de estas poblaciones. El sistema de salinidad influenciado por el mar y las temperaturas superiores a 27°C son condiciones a las que las poblaciones de la Isla Bona tuvieron que adaptarse, en un área reducida de desplazamiento de 110 hectáreas. Por otro lado, la población de El Limón se desarrolló en condiciones climáticas típicas de la sabana tropical y la vegetación del bosque lluvioso, incluso con una fuerte influencia antropogénica en la región.

Los resultados observados en la red de haplotipos y los valores de kst obtenidos cuando se compararon las poblaciones de Panamá con la secuencia de Costa Rica, Colombia y Brasil muestran diferencias entre ellas, lo que corrobora los patrones obtenidos por otros autores [6, 7], cuando analizaron las secuencias de los genes NAD4 y COI, respectivamente. Estos datos sugieren que las barreras geográficas, como las montañas y los ríos, junto con la capacidad limitada para dispersar a *Lu. longipalpis*, produce su aislamiento geográfico [7]. También se muestra el aislamiento reproductivo de las poblaciones cuando se comparan con las distribuidas en Costa Rica, Colombia y Brasil; también detectados en los estudios sobre el apareamiento iso-enzimático y el análisis realizado por [8, 9].

El cladograma filogenético mostró que las poblaciones de Panamá están más cercanas a las de Colombia. Esto sugiere que Colombia podría haber sido el origen de la población panameña. La diferenciación mostrada en la red de haplotipos podría ser el resultado de procesos de vicarianza, si fuera el caso y la creación de las barreras geográficas andino-amazónicas en el Plioceno tardío y el

Pleistoceno [7]. Independiente a la existencia o no de un complejo de especies crípticas, *Lu. Longipalpis* tiene una gran importancia en la epidemiología de la leishmaniasis visceral Americana. A raíz de esta controversia, se han realizado estudios comparativos de la saliva de esas poblaciones de *Lu. Longipalpis* del Centro y Sur de América, que han mostrado diferencias en la composición de aminoácidos de la proteína maxadilar, y que esta influye en la visceralización de la *Leishmania* en los humanos [18]. Las observaciones realizadas en estos estudios indicaban que la leishmaniasis transmitida por los individuos de *Lu. longipalpis* presentes en Brasil y Colombia se manifestaban en lesiones viscerales, en cuanto que la transmisión por los individuos presentes en Costa Rica, se manifestaban en lesiones cutáneas no ulcerativas [18]. Es posible que esas diferencias tanto morfológicas como genéticas entre las especies del complejo *Lu. longipalpis* influyan en la capacidad vectorial y control de la enfermedad.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados son relevantes para el entendimiento de la transmisión de la leishmaniasis y sus distintas formas clínicas. La importancia de determinar si estas poblaciones panameñas podrían estar dentro de un complejo de especie, trae consigo un impacto económico negativo de magnitud en el sector salud, debido a la inversión de medicamentos que en ocasiones resultan ser más nocivos para algunos pacientes, un incremento en la tasa de morbilidad en las poblaciones endémicas y un control químico inadecuado. Se proporcionan las evidencias científicas sobre la estructura genética de las poblaciones de *Lu. Longi-palpis*, útil para la elaboración de estrategias de control ajustadas a la realidad de nuestro país..

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Maykon Cristiano Passos, por ayudarnos con los datos de laboratorio y análisis; Jorge Edergarm Santos, Gustavo Martins y Juliana Lopes Fietto por comentarios en borradores anteriores de este manuscrito; además agradecemos a los revisores anónimos y al editor por sus comentarios.

Financiamiento: esta investigación fue apoyada por la Secretaria Nacional de Ciencias y Tecnología Innovadora (SENACYT), Subvención Col09-008, Fundación de Amparo y Pesquisa del Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) y Sistema Nacional de Investigadores (SNI) apoya las actividades de investigación de Anayansi Valderrama.

REFERENCIAS

- [1] Mangabeira O. Sobre a sistemática e biologia dos flebotomos do Ceará. Bras Mal Doenças Trop. 1969; 21: 3-26.
- [2] Ward R, Ribeiro A, Ready PD, Murtagh A. Reproductive isolation between different forms of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) the vector of *Leishmania donovani* Chagas Cunha & Chagas and its significance to kala-azar distribution in South America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1983; 78, 269-280.
- [3] Hamilton JC, Ward RD, Dougherty MJ, Maignon M, Ponce C, Ponce E, Noyes H, Zeledon R. Comparison of the sex pheromone components of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from areas of visceral and atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras and Costa Rica. Ann Trop Med Parasitol. 1996; 90: 535-541.
- [4] Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda MA, Melo PP, Andrade, J.A. Castro, and et al. Genetic structure of natural populations of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. Acta Trop. 2006; 98: 15-24.
- [5] Bauzer LGSR, Souza NA, Ward RD, Kyriacou CP, Peixoto AA. The period gene and genetic differentiation between three Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis*. Insect Mol Bio. 2002; 11(4):315-23.
- [6] Soto SI, Lehmann T, Rowton ED, Vélez BID, Porter, CH. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. Mol Phylogenet Evol. 2001; 18: 84-93.
- [7] Arrivillaga JC, Norris DE, Feliciangeli MD, Lanzaro GC. Phylogeography of the neotropical sandfly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. Infect Genet Evol. 2002; 2: 83-95.
- [8] Lanzaro G, Ostrovska K, Herrero M, Lawyer P, Warburg A. *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. Am J Trop Med Hyg. 1993; 48: 839-847.
- [9] Mutebi JP, Tripet F, Alexander JB, Lanzaro GC. Genetic differentiation among populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in Central and South America. Ann Entomology Soc Am. 2002; 95: 740-752.
- [10] Zeledón R, Hidalgo H, Viquez A, Urbina A. Atypical cutaneous leishmaniasis in a semiarid region of north-west Costa Rica. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989; 83: 786-786.
- [11] Christensen H, Fairchild GB, Herrer A, Johnson C, Young, D, De Vásquez, A. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. J Med Entomol. 1983; 20: 463-484.
- [12] ValderramaA, Tavares MG, Andrade Filho JD. Report of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in a cutaneous-leishmaniasis-endemic area of Panama. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106: 1049-1051.

-
- [13] Young DG, Duncan, MA. Guide to Identification and Geographic Distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). American Entomological Institute, Associated Publishers, 1994. Gainesville, FL. 881.
- [14] Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PF, Secundino NF, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of Leishmania spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2002; 44: 255-259.
- [15] Ready PD, Day J, De Souza AA, Rangel EF, Davies CR. Mitochondrial DNA characterization of populations of Lutzomyia whitmani (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and sylvatic transmission of Leishmania species. Bull Entomol Res. 1997; 87: 187-195.
- [16] Theodor O. On the classification of American Phlebotominae. J Med Entomol. 1965; 2: 171-97.
- [17] Valderrama A, Herrera M, Salazar A. Relación entre la composición de especies del género Lutzomyia Franca (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) y los diferentes tipos de bosques en Panamá. Acta Zool Mex. 2008; 24: 13-14.
- [18] Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F. Saliva of Lutzomyia longipalpis sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1994; 345:223-230.