

Determinación del azúcar preferencial en la dieta de *Lutzomyia evansi* (Nuñeztovar) (Diptera: Psychodidae)

Determination of the preferred sugar in the diet of *Lutzomyia evansi* (Nuñeztovar) (Diptera: Psychodidae)

GILBERTO BASTIDAS P.¹, MILAGROS OVIEDO², ALEJANDRA VIVENES J.³, ADALBERTO GONZÁLEZ³

Revista Colombiana de Entomología 30 (2): 193-196 (2004)

Resumen. Los azúcares han sido señalados por jugar un papel clave en la biología y relación parásito *Leishmania* – hospedador. Bajo condiciones experimentales se precisó el azúcar de preferencia en la dieta de *Lutzomyia evansi* vector alterno de *Leishmania chagasi*. A hembras de una colonia de *L. evansi* y hembras silvestres, postdepleción de azúcares naturales, se les ofreció a la vez y durante 72 h: fructosa, sacarosa, melezitosa, glucosa, galactosa y maltosa debidamente marcados con colorantes vegetales; bajo lupa binocular se determinó el azúcar ingerido por el color presente. Los resultados se compararon con los obtenidos con hembras de colonia de *L. longipalpis*. De 618 hembras de *L. evansi* ensayadas, en 340 se detectó fructosa (55%) indistintamente del colorante empleado seguido por melezitosa (18,6%) y sacarosa (15,5%). Resultados similares fueron obtenidos con 199 hembras de colonia. En contraste, *L. longipalpis* prefirió sacarosa (34%), seguida de glucosa (29%) y fructosa (24%). La prueba de antrona evidenció en hembras silvestres la presencia de fructosa en 55,5% de la muestra. Estos hallazgos son relevantes para la biología de la especie y pudieran ser significativos en el establecimiento y patrón de desarrollo del parásito dentro del insecto vector.

Palabras clave: Dieta. Azúcares reductores. Leishmaniosis.

Summary. Sugars have been shown to play an important role in the biology and relationship between the host and parasitic *Leishmania*. Under experimental conditions the preferred sugars in the diet of *Lutzomyia evansi*, alternate vector of *Leishmania chagasi*, were determined. After the depletion of their natural sugars, females from the wild and females from a colony of *L. evansi* were periodically offered, over a period of 72 hours, fructose, saccharose, melezitose, glucose, galactose and maltose, identified by different vegetable colorings; the ingested sugar was determined by its color under a binocular magnifying glass. The results were compared with those from a colony of *L. longipalpis*. Of 618 wild *L. evansi* studied, fructose was detected in 340 females (55%), regardless of the color used, followed by melezitose (18,6%) and saccharose (15,5%). Similar results were obtained from 199 females from the colony. In contrast, *L. longipalpis* preferred saccharose (34%), followed by glucose (29%) and fructose (24%). The anthrone test detected the presence of fructose in 55,5% of the sample of females from the wild. These discoveries are relevant to the biology of the species and could be significant in the establishment and pattern of parasite development inside the insect vector.

Key words: Diet. Sugar reductors. Leishmaniosis

Introducción

El azúcar es el alimento básico de los mosquitos, es el único nutriente consumido por machos y probablemente uno de los más comunes para las hembras, aún cuando ellas necesitan sangre de vertebrado para producir huevos. Se sostiene que los machos toman azúcar varias veces durante su vida y las hembras, poco después de su emergencia (Foster 1995).

En la naturaleza, las fuentes naturales de azúcar son néctar, jugos de plantas, (Sandholm y Price 1962; Shleim y Warburg 1986) frutos maduros y secreciones de áfidos y coccídeos. Scorza *et al.* (1985)

sugieren que el fruto maduro del café puede servir como fuente de azúcar para *Lutzomyia youngi* (Feliciangeli y Murillo, 1987) y Killick - Kendrick (1979) propone que la solución excretada por los áfidos podría ser importante como fuente de energía. Estos carbohidratos son indispensables para los flebotomos adultos de ambos sexos puesto que proporcionan energía para el vuelo y otras actividades y además, para las hembras es el complemento de la ingesta sanguínea (Samie *et al.* 1990). Otros estudios señalan la influencia de la presencia de áfidos en la densidad de los flebotomos, señalándose una acción fagostimulante de tales secreciones sobre los insectos (Cameron *et al.* 1995). Así

mismo, los flebotomos muestran preferencia hacia ciertas especies de plantas al momento de realizar la ingesta azucarada y ante diferentes tipos de azúcares (Chanotis 1974; Schlein y Warburg 1986; Castillo 1989).

Trazas de diferentes azúcares, monosacáridos y disacáridos, se han detectado en el tracto digestivo de diferentes especies de flebotomos, tanto del Viejo como del Nuevo Mundo; entre éstos se mencionan: glucosa, sacarosa, maltosa, arabinosa y melibiosa encontrados libres en la naturaleza y se sugiere la presencia de una enzima invertasa glicosidasa en el intestino, capaz de degradar los disacáridos a sus

1 Autor para correspondencia: Profesor e Investigador del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales "Dr. J. W. Torrealba" Apdo. 214, adscrito a la Universidad de Carabobo. Valencia-Venezuela. E-mail: bastidasprotozoo@hotmail.com

2 Profesora e Investigadora del Centro de Investigaciones José Witremundo Torrealba, Laboratorio de Biología de *Lutzomyia* e Insectario Pablo Anduze. Trujillo-Venezuela. E-mail: longipalpis@cantv.net

3 Investigadores del Centro de Investigaciones José Witremundo Torrealba, Laboratorio de Biología de *Lutzomyia* e Insectario Pablo Anduze. Trujillo-Venezuela.

componentes monosacáridos (Young *et al.* 1980; Castillo 1989; Morton *et al.* 1991).

La presencia de fructosa y de otros carbohidratos, que por hidrólisis generan fructosa, fue verificada por Young *et al.* (1980) en *Phlebotomus ariasi* mediante la prueba de antrona en frío descrito por Van Handel (1967). Empleando otra metodología, Añez *et al.* (1994) detectaron por cromatografía de gas, en el intestino y divertículo esofágico de *L. youngi*, sacarosa, fructosa, glucosa y maltosa, sugiriendo que estos cuatro azúcares son comúnmente ingeridos por flebotomos de ambos sexos. Se ignora cuál puede ser el azúcar preferido por *Lutzomyia evansi*, considerado vector de leishmaniosis visceral en algunas áreas de Colombia y Venezuela (Travi *et al.* 1990; Aguilar *et al.* 1998; Feliciangeli *et al.* 1999; Vivenes 2000).

Además de su valor energético, los azúcares influyen de manera significativa en el establecimiento y desarrollo de parásitos leishmánicos dentro del insecto. Ejercen acción quimiotáctica sobre estos parásitos determinando su migración anterior y posterior colonización del intestino anterior, asegurando su transmisión al hospedador vertebrado. En sentido contrario, pueden inhibir la unión de los parásitos a los receptores lectínicos presentes en la superficie del intestino del insecto bloqueándolos o induciendo su liberación (Molyneux *et al.* 1986).

Como parte de un estudio sobre biología de *L. evansi* y su papel como transmisor de *Leishmania chagasi*, se investigó la preferencia de azúcar por esta especie en ejemplares silvestres y de colonia y se precisó la presencia de fructosa y otros azúcares en hembras silvestres.

Materiales y Métodos

Los ejemplares de *L. evansi* utilizados en este estudio fueron: poblaciones de colonia de 48 horas de emergencia, obtenidas de acuerdo con Oviedo *et al.* (1995) y mantenidas en el Centro de Investigaciones "José Witremundo Torrealba" en Trujillo, Venezuela y poblaciones silvestres coleccionadas sobre trampas Shannon en dos localidades del estado Trujillo de la región andino-venezolana; los Pajones (9° 30' 28" LN y 70° 33' 19" LO) y Montaña de Peraza (9° 27' 05" LN y 70° 31' 33" LO) considerada esta última como un foco endémico de leishmaniosis visceral. Así mismo, se emplearon ejemplares de colonia de *L. longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912) comprobado vector de *L. chagasi* en el Neotrópico.

Se hicieron dos tipos de experimentos:

1) Estudio de la preferencia de azúcar por hembras silvestres y de colonia de *L. evansi* y hembras de colonia de *L. longipalpis* mediante ingesta de azúcares coloreados con colorante vegetal Mc Cormick®, ya que esto permitía probar varios azúcares en una prueba competitiva y visualizar en for-

ma práctica el carbohidrato ingerido. En el caso de las hembras silvestres de *L. evansi*, éstas se mantuvieron en ayunas durante 72 h a 25°C y 90% de humedad relativa para que depletaran los carbohidratos ingeridos naturalmente. Posteriormente, se les proporcionó en trozos de polietileno, soluciones saturadas de fructosa (monosacárido), sacarosa (disacárido), melezitosa (trisacárido), maltosa (disacárido), glucosa (monosacárido) y galactosa (SIGMA) previamente marcadas con colorante vegetal (Mc Cormick) y renovadas cada 24 h.

Con la finalidad de evitar un eventual sesgo de escogencia por el color de las soluciones azucaradas, se realizaron 6 réplicas en cada una de las cuales se intercambiaba el color del azúcar; los colorantes empleados fueron: rojo, amarillo, azul, verde, anaranjado y morado. Los ensayos se hicieron de manera competitiva; es decir, se le suministró al mismo grupo de insectos, en forma simultánea seis azúcares marcados con diferente color. Transcurridas 48 h cada insecto fue disecado y bajo lupa binocular se determinó el azúcar ingerido por el color presente. Se ensayaron 618 hembras silvestres de *L. evansi*, de éstas 303 se coleccionaron en los Pajones y 315 en Montaña de Peraza.

Igual procedimiento fue empleado para detectar la preferencia de carbohidratos en hembras de colonia de *L. evansi* y hembras de colonia de *L. longipalpis*.

2) Investigación de la ingesta natural de azúcar por hembras silvestres de *L. evansi* por medio de la prueba de antrona (Van Handel 1967). Inmediatamente después de capturados los insectos, fueron narcotizados con dióxido de carbono para evitar la depleción de los azúcares naturales, y se colocaron en placas de titulación y fueron triturados (cada uno) con una varilla de vidrio para evitar contaminación. Luego se les agregó 0,16 ml de solución de antrona al 0,1% (w/v) en 72% (v/v) de ácido sulfúrico en frío.

La positividad de la prueba fue leída por la aparición de un color azul, empleando una escala subjetiva (0, +, ++ y ++++) de acuerdo con la intensidad del color desarrollado en un tiempo no mayor de 15

minutos. Los insectos negativos fueron aquellos que no revelaron color en el lapso de una hora.

Resultados

Ingestión selectiva de azúcares coloreados

Los resultados obtenidos en la ingestión experimental de carbohidratos se presentan en la tabla 1. Se evidencia que del total de la muestra, 618 flebotomos, el 55% ingirió fructosa seguida de un 18,6% de melezitosa y 15,5% de sacarosa. Los azúcares restantes glucosa, galactosa y maltosa se ingirieron en muy baja proporción, lo que muestra una franca preferencia de *L. evansi* por la fructosa. Cuando se analizan los insectos por área de procedencia para ambas localidades es marcada la preferencia por fructosa, pero en el caso de la ingestión de melezitosa fue mayor en las hembras de Montaña de Peraza con un 26% en comparación con un 10,8% de las hembras provenientes de la localidad de los Pajones.

En cuanto a la preferencia por fructosa, resultados similares se observaron en especímenes de colonia, en donde, de 199 hembras ensayadas el 49,2% ingirió fructosa, independientemente del colorante utilizado. Sin embargo, en las hembras de colonia no se detectó ingestión de melezitosa, sólo ingirieron fructosa, glucosa y sacarosa (Tabla 2). En esta misma tabla se muestran los resultados obtenidos en especímenes de colonia de *L. longipalpis*, en cuyos ejemplares se detectaron los marcadores de sacarosa, melezitosa y maltosa, lo que sugiere que la especie pareciera ser ecléptica en la ingestión de azúcares; sólo se observa una ligera predilección por sacarosa, ya que el 34% de las 191 hembras ensayadas mostraron el marcador de sacarosa.

Ingesta natural de azúcar

En cuanto a la detección de azúcares reductores en hembras silvestres mediante la prueba de antrona, se evidenció en general que el 55,5% de las hembras reaccionó positivamente en un tiempo no mayor de 15 minutos (Tabla 3). El contenido de fructosa se observó en diferentes con-

Tabla 1. Ingestión experimental de carbohidratos por hembras de *Lutzomyia evansi* coleccionadas en los Pajones y Montaña de Peraza, Trujillo, Venezuela

Azúcar	Pajones		Peraza		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
Fructosa	167	55,1	173	54,9	340	55
Sacarosa	59	19,4	37	11,7	96	15,5
Glucosa	36	11,8	22	6,9	58	9,3
Melezitosa	33	10,8	82	26,0	115	18,6
Galactosa	8	2,6	-	-	8	1,2
Maltosa	-	-	1	0,3	1	0,16
Total	303	99,7	315	99,8	618	100

Tabla 2. Preferencia de carbohidratos en la dieta de ejemplares de colonia de *Lutzomyia evansi* y *Lutzomyia longipalpis*

Azúcar	<i>Lutzomyia evansi</i>		<i>Lutzomyia longipalpis</i>	
	N°	%	N°	%
Fructosa	98	49,2	46	24
Sacarosa	44	22,1	65	34
Glucosa	57	28,6	56	29
Melezitosa	-	-	11	5,7
Galactosa	-	-	-	-
Maltosa	-	-	13	6,8
Total	199	99,9	191	99,5

Tabla 3. Resultado del test de antrona en hembras de *Lutzomyia evansi* capturadas en las localidades de los Pajones y Montaña de Peraza, Trujillo, Venezuela

Escala	Pajones		Peraza		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
Positivos	99	52,1	160	57,9	259	55,5
Negativos	91	47,8	116	42,0	207	44,4
Total	190		276		466	

Tabla 4. Presencia de azúcares reductores en hembras silvestres de *Lutzomyia evansi*, Trujillo, Venezuela

Escala	Pajones		Peraza		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%
+	57	22,0	66	25,4	123	47,4
++	31	11,9	66	25,4	97	37,4
+++	11	04,2	28	10,8	39	15,0
Total	99		160		259	

centraciones a juzgar por la intensidad de la reacción leída como positiva, desde + hasta +++.

De los 259 ejemplares reactivos, 47,3% dieron reacción débilmente positiva (+); el 37,4% dieron reacciones francamente visibles (++) y el 15% dieron una reacción intensamente positiva (+++); todo antes de 15 minutos como se ejemplifica en la tabla 4. Los insectos que no reaccionaron con la prueba de antrona después de una hora de exposición fueron considerados como negativos, esto significó el 44% del total de la muestra.

Discusión

Los resultados confirman hechos bien conocidos, a saber, que los flebotomos al igual que otros dípteros Nematóceros ingieren naturalmente azúcar como fuente de energía, a juzgar por su presencia en el tubo digestivo en especímenes recién capturados y en insectos bajo condiciones experimentales (Castillo 1989).

La ingestión experimental de carbohidratos por hembras de *L. evansi* y *L. longi-*

palpis se llevó a cabo empleando como marcadores, colorante vegetal Mc Cormick®. Los insectos no fueron afectados en la selección del carbohidrato por el color ya que cuando hubo preferencia por un carbohidrato indistintamente del color del marcador del azúcar empleado, éste fue ingerido. Esto confirma lo planteado por Dethier *et al.* (1956) y Salama (1966) quienes describen que la ingestión de carbohidratos en ciertos insectos es controlado por un sistema de quimiorreceptores localizados en los tarsos, labela, labro y cibario, por lo que el estímulo visual no jugaría parte importante en la selección.

Experiencias previas sobre preferencias de azúcar en flebotomos han sido realizadas proporcionándoles carbohidratos marcados con colorante vegetal a grupos de insectos por separado, tal es el caso de Chaniotis (1974), quien ensayó la preferencia de 11 azúcares por *L. trapidoi* Fairchild y Hertig, 1952; refiriendo que esta especie acepta en orden de preferencia cinco azúcares a saber: sacarosa, fructosa, maltosa, rafinosa y D glucosa.

Los ensayos realizados de forma competitiva pueden representar de mejor manera la existencia de preferencia por un determinado carbohidrato.

A pesar de que estas pruebas fueron sólo realizadas con soluciones saturadas de azúcar, este hecho pareciera no tener un efecto marcado sobre la aceptación de la misma, tal como fuera demostrado por Chaniotis (1974).

Bajo este sistema, los ejemplares de *L. evansi* muestran una franca predilección por la fructosa, mientras que los ejemplares de *L. longipalpis*, aunque ingieren la mayoría de los carbohidratos empleados (fructosa, glucosa, sacarosa, melezitosa y maltosa), muestran ligera predilección por sacarosa, resultados similares encontró Castillo (1989) en *L. youngi*.

Un aspecto importante a resaltar es la diferencia en la aceptación de un mayor número de azúcares por los especímenes silvestres de *L. evansi* que los de colonia, resaltando a la vez que el trisacárido melezitosa fue el segundo más ingerido por ejemplares silvestres, en tanto que los especímenes de colonia no lo ingirieron. Esto pudiera ser explicado por el hecho de que los ejemplares de colonia han sido sometidos al consumo de sacarosa por varias generaciones, mientras que en la naturaleza ellos pudieran tomar néctar floral y extrafloral, que de acuerdo con Foster (1995) a menudo contiene el trisacárido melezitosa.

En el caso de *L. longipalpis*, a pesar de ser una colonia que ha sido mantenida por 70 generaciones, esta posible explicación de preferencia de azúcar de *L. evansi* no es aplicable, ya que puede ingerir cinco de los seis azúcares probados, a saber; fructosa, sacarosa, glucosa, melezitosa y maltosa; esta especie, bajo condiciones de laboratorio, es altamente adaptable a diferentes condiciones.

Es importante resaltar que la lectura de la positividad de la reacción de antrona fue leída a los 15 minutos, ya que después de este tiempo no se encontró reactividad en los ejemplares, contrariamente a lo señalado por Young *et al.* (1994) quienes describen en su metodología lectura hasta 120 minutos.

El hecho de que *L. evansi* mostrara marcada preferencia por fructosa plantea la necesidad de llevar a cabo estudios posteriores de la implicación de la fructosa en la biología de la especie de *Lutzomyia* y en la relación parásito - hospedador en el modelo *L. chagasi* - *L. evansi*, ya que la ingesta de azúcares puede intervenir en el establecimiento y desarrollo de los parásitos de *Leishmania* (Molyneux *et al.* 1986; Muskus 1997).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. José Vicente Scorza por las revisiones y críticas al manuscrito. Al FONACIT por financiar la investigación, a través del proyecto S1- 2002-000501.

Literatura citada

- AGUILAR, C. M.; FERNÁNDEZ, E.; FERNÁNDEZ, R.; CANNOVA, D.; FERRER, E.; CABRERA, Z.; SOUZA, W.; COUTINHO, S. 1998. Urban visceral Leishmaniasis in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93 (1): 15-16.
- AÑEZ, N.; LUGO, A.; LOAIZA, A.; NIEVES, E., OROZCO, J. 1994. Sugar in the alimentary canal of *Lutzomyia youngi* (Diptera: Phlebotominae). *Medical and Veterinary Entomology* 8: 38-42.
- CAMERON, N. M.; MILLIGAN, P. J. M.; CUENTAS, A. L., DAVIES, C. R. 1995. An association between phlebotomine sandflies and aphids in the Peruvian Andes. *Medical and Veterinary Entomology* 9 (2) :127-132.
- CASTILLO, L. 1989. Mecanismo de adhesión de *Leishmania braziliensis* en *Lutzomyia youngi*. Trabajo de Ascenso. Mimeografiado. Núcleo Universitario "Rafael Rangel", Universidad de los Andes. 25 p.
- CHANLOTIS, B. N. 1974. Sugar - feeding behavior of *Lutzomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Journal of Medical Entomology* 11: 73-79.
- DETHIER, V. G.; WOLBARSH, M. L. 1956. The electron microscopy of chemosensory hairs. *Experientia* 12 (9): 335-337.
- FELICIANGLI, M. D.; RODRÍGUEZ, N.; de GUGLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, A. 1999. The re-emergence of American visceral leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II. Vectors and parasites. *Parasite* 6: 113-120.
- FOSTER, W. A. 1995. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 443-474.
- KILLICK - KENDRICK, R. 1979. The biology of Leishmania in phlebotomine sandflies. *Biology of the Kinetoplastida*, p. 395-460. Vol II (ed, by W. H. R. Lumsden and D. A. Evans), Academic Press, London.
- MOLINEUX, D.H.; RYAN, L.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. 1986. The Leishmania - sandfly interface. *Leishmania Taxonomie et Phylogénese Applications eco-epidemiologiques* (Coll. Int. CNRS INSERM, 1984). IMEE. Montpellier. p. 311-321.
- MORTON, I.; BRAZIL, R.; WARD, R.; VASCONCELOS, A. 1991. The presence of fructosa in wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86 (1):125-125.
- MUSKUS, C. E. 1997. Papel del LPG y carbohidratos en la virulencia de *Leishmania* del subgénero *Viannia*. Tesis de Maestría en Microbiología y Parasitología. Universidad del Valle, Departamento de Microbiología, corporación CIDEIM, Santiago de Cali-Colombia. 72 p.
- OVIEDO, M.; MORENO, G.; GRATEROL, D. 1995. Bionomía de los vectores de leishmaniasis visceral en el Estado Trujillo, Venezuela. III - Colonización de *Lutzomyia evansi*. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* 35 (Supl. 1): 269-276.
- SAMIE, M.; WALLBANKS, K. R.; MOORE, J. S.; MOLYNEUX, D. H. 1990. Glycosidase activity in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 96B: 577-579.
- SALAMA, H. S. 1966. The function of mosquito taste receptors. *J. Insect Physiol.* 12: 1051-1060.
- SANDHOLM, H. A.; PRICE, R. D. 1962. Field observations on the nectar- feeding habits of some Minnesota mosquitoes. *Mosq. News* 22: 346-349.
- SCHLEIN, Y.; WARBURG, A. 1986. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *Journal of Medical Entomology* 23 (1): 11-15.
- SCORZA, J. V.; CASTILLO, L.; REZZANO, S.; MARQUEZ, M.; MARQUEZ, J. C. 1985. El papel del cafeto en la endemicidad de la Leishmaniasis cutánea en Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* 25: 82-88.
- TRAVI, B.; VELEZ, I.; BRUTUS, I.; SEGURA, I.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. 1990. *Lutzomyia evansi* an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombia focus of Leishmaniasis. *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 84: 676-677.
- VAN HANDEL, E. 1967. Determination of fructosa and fructose- yielding, carbohydrates with cold anthrone. *Analytical Biochemistry* 19: 193-194.
- VIVENES, A. 2000. *Lutzomyia evansi* hospedero biológico del complejo *Leishmania mexicana*. Tesis de Maestría en Protozoología. Mimeografiado. Núcleo Universitario Rafael Rangel Universidad de los Andes. 93 p.
- YOUNG, C. J.; TURNER, D. P.; KILLICK-KENDRICK, R.; RIOUX, J. A.; LEANY, A. J. 1980. Fructose in wild - caught *Phlebotomus ariasi* and the possible relevance of sugars taken by sandflies to the transmission of Leishmaniasis. *Trans. of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg.* 74 (3): 363-366.

Recibido: Sep. 25 / 2003

Aceptado: Feb. 21 / 2004