

PRESENCIA DE *Wolbachia* y *Leishmania* EN UNA POBLACIÓN DE *Lutzomyia evansi* DE LA COSTA CARIBE DE COLOMBIA^a

PRESENCE OF *Wolbachia* AND *Leishmania* IN A POPULATION OF *Lutzomyia evansi* FROM THE CARIBBEAN COAST OF COLOMBIA.

RAFAEL J. VIVERO-GÓMEZ^{b c}, MANUELA GUTIÉRREZ-GARCÍA^b, CLAUDIA X. HERRERA^d, GLORIA CADAVID-RESTREPO^c, SANDRA URIBE-SOTO^b

Recibido 31-03-2016, aceptado 01-08-2016, versión final 06-09-2016.

Artículo Investigación

RESUMEN: *Lutzomyia evansi* es importante en salud pública por su participación en la transmisión de la leishmaniasis visceral y cutánea en la costa caribe de Colombia. Diversos estudios se han desarrollado sobre las poblaciones naturales de *Lutzomyia evansi*, sin embargo, pocos estudios han explorado en profundidad la detección de microorganismos simbióticos (ej. *Wolbachia*) y de manera simultánea la presencia de *Leishmania* sp.. El endosimbionte *Wolbachia* ha sido propuesto en la actualidad como control biológico de insectos vectores de diversas enfermedades tropicales. En el presente estudio el ADN de tres especies del género *Lutzomyia* colectadas en el municipio de Ovejas (Departamento de Sucre) fue evaluado para detectar la infección natural por la bacteria *Wolbachia* y la presencia de parásitos del género *Leishmania*. El ADN total de 176 individuos adultos y 34 inmaduros (larvas y pupas) de *Lu. evansi*, fue utilizado para evaluar la detección de *Wolbachia* mediante amplificación por PCR del gen WSP (Proteína Mayor de la Superficie de *Wolbachia*) y la infección por *Leishmania* mediante amplificación por PCR de un segmento del gen HPSN70 (Proteína de Choque Térmico). Se encontró un grupo de machos infectado de forma natural por *Wolbachia* y nueve grupos de hembras con infección natural por *Leishmania*, todos pertenecientes a *Lutzomyia evansi*. El análisis filogenético de la secuencia del gen WSP de *Wolbachia* indica la ubicación de la cepa detectada dentro del supergrupo B (haplogrupo wLeva) y su relación con haplotipos previamente reportados de *Lutzomyia evansi* y *Lutzomyia dubitans*. Una región de 418 pb del gen HSP-70N fue secuenciada y mostró similitud con secuencias de *Leishmania* luego de realizar el análisis en BlastN. Se confirma la presencia de

^aVivero-Gómez R. J., Gutiérrez-García M., Herrera C. X., Cadavid-Restrepo G., Uribe-Soto S. (2016). Presencia de *Wolbachia* y *Leishmania* en una población de *Lutzomyia evansi* presente en la costa caribe de Colombia. *Revista de la Facultad de Ciencias*, 5 (2), 38-54.

^bGrupo de investigación en Sistemática Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. magutierrezga@unal.edu.co, rjviverog@unal.edu.co, siuribesoto@gmail.com

^cPECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales), Universidad de Antioquia.

^dGrupo de Microbiodiversidad y Microprospección, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. cxmoreno@unal.edu.co, gecadavi@unal.edu.co

Wolbachia en poblaciones silvestres de machos de *L. evansi* y la infección natural por *Leishmania spp.* en hembras de la misma especie cuya infección por *Wolbachia* resulto negativa.

PALABRAS CLAVE: ADN, *Lutzomyia evansi*, infección natural, *Wolbachia*, *Leishmania*.

ABSTRACT: *Lutzomyia evansi* is important in public health for its role in the transmission of visceral leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. Various studies have been developed on the natural populations of *Lutzomyia evansi*, however few studies have explored in depth the detection of symbiotic microorganisms (eg. *Wolbachia*) and simultaneously the presence of *Leishmania sp.* The endosymbiont *Wolbachia* has been proposed actually as biological control of insect vectors of various tropical diseases. In the present study the DNA of three species of sandflies collected in the municipality of Ovejas (Sucre Department) was evaluated for natural infection by *Wolbachia* and the presence of parasites of the *Leishmania* genus. The total DNA of 176 adult individuals of different species and 34 immature (larvae and pupae) of *Lutzomyia evansi*, was used to evaluate the detection by PCR amplification WSP gene (Major Surface Protein *Wolbachia*) and *Leishmania* infection by PCR amplification of a segments of HPSN70 gene (Heat Shock Protein). A group of males naturally infected by *Wolbachia* and nine groups of females naturally infected with *Leishmania* were found, all associated with *Lutzomyia evansi*. Phylogenetic analysis of the sequence of WSP gene of *Wolbachia* indicates the location of the strain detected within the supergroup B (haplogroup wLeva) and its relation to previously reported haplotypes of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia dubitans*. A region of 418 bp of HSP-70N gene was sequenced and showed similarity with sequences of *Leishmania* after performing the analysis BlastN. The presence of *Wolbachia* in wild populations of *Lutzomyia evansi* and the natural infection with *Leishmania spp.* is confirmed.

KEYWORDS: Colombia, *Lutzomyia evansi*, natural infection, *Wolbachia*, *Leishmania*.

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis conforma un grupo de enfermedades infecciosas que afecta la piel, la mucosa y las vísceras (Zambrano, 2014). Estas afecciones son causadas por protozoarios del género *Leishmania* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) que infecta a humanos y animales mediante la picadura de hembras del género *Lutzomyia* en América (González *et al.*, 2006; Zambrano, 2014). Los ciclos de transmisión de la leishmaniasis perduran por efecto de la contaminación, cambios ambientales como la deforestación, expansión de la frontera agrícola, la construcción de presas y la urbanización, entre otros (Sánchez *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2016).

En Colombia se registra la presencia de 164 especies de la subfamilia *Phlebotominae*, siendo uno de los países con mayor diversidad a nivel mundial, con alto número de especies ($n = 13$) incriminadas como vectores (Vivenes *et al.*, 2005; Bejarano, 2006; Cortés & Fernández, 2008; Contreras *et al.*, 2012; Vivero *et al.*, 2013; Bejarano *et al.*, 2015). Dentro de estas especies, *Lutzomyia evansi* es un reconocido vector primario de *Leishmania infantum*, patógeno que genera la leishmaniasis visceral en la Costa Caribe de Colombia y otras regiones de Latinoamérica, y también es conside-

rado importante porque algunas de sus poblaciones naturales han sido encontradas infectadas por parásitos causantes de leishmaniasis cutánea (Cortés & Fernández, 2008), relacionados filogenéticamente y por su patrón de desarrollo intestinal con especies del subgénero *Viannia* (Cazorla *et al.*, 2010; Montoya-Lerma *et al.*, 1996; Pérez-Doria *et al.*, 2011).

Los antecedentes expuestos y la presencia de *Lutzomyia evansi* en áreas urbanas, periurbanas y rurales (Pérez-Doria *et al.*, 2011; Paternina, 2012; Bejarano *et al.*, 2015), hacen necesario el diseño y la aplicación de medidas de intervención, diferentes a las de tratamiento químico con insecticidas (Bejarano *et al.*, 2003; Bejarano, 2006; Cochero *et al.*, 2007; González *et al.*, 2006; Paternina-Gómez *et al.*, 2011). Dentro de las medidas alternativas se encuentra el empleo de bacterias endosimbiontes como control biológico y genético para disminuir la población de vectores (Hoffmann *et al.*, 2015; Finney *et al.*, 2015).

Wolbachia es una bacteria simbiote intracelular obligada perteneciente a las α -proteobacterias (*Rickettsia*), de transmisión vertical y se encuentra en glándulas salivales, intestino y tejido reproductivo de insectos (Werren *et al.*, 1997; Werren *et al.*, 2008). Algunos fenotipos de *Wolbachia* generan alteraciones reproductivas y fisiológicas en sus hospedadores dentro de las cuales se encuentran la feminización, inducción a partenogénesis, muerte a machos, incompatibilidad citoplasmática, fecundidad, actividad locomotora y supervivencia (Florez Molina, *et al.*, 2006; Fabio *et al.*, 2007; Werren *et al.*, 2008). Las cepas de *Wolbachia* que infectan principalmente hospederos artrópodos se encuentran en los supergrupos A y B (Zhou *et al.*, 1998; González & Martínez, 2010; Hoffmann *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2011).

Es necesario indicar que los estudios que incluyen la aplicación de *Wolbachia* para el biocontrol de insectos transmisores de enfermedades infecciosas, debe vincular en primera instancia el estatus de infección y diferenciación de las cepas de *Wolbachia*, como también incluir el análisis del efecto de *Wolbachia* sobre especies no blanco por una potencial transmisión horizontal que afecte la dinámica de las poblaciones naturales de otros artrópodos (Dedeine *et al.*, 2005; Florez Molina, *et al.*, 2006; González & Martínez, 2010; Hoffmann *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2011).

En este estudio se planteó como objetivo inicial detectar la bacteria *Wolbachia* y el parásito *Leishmania* en especies del género *Lutzomyia* colectadas en el ambiente urbano del municipio de Ovejas (departamento de Sucre, Costa Caribe de Colombia).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colecta, procesamiento e identificación taxonómica de flebotomíneos

Los insectos del género *Lutzomyia* fueron colectados en ambientes urbanos del municipio de Ovejas (7513'O;931'N;277msnm), ubicado en el departamento de Sucre. Se realizó una exploración entomológica por dos días en noviembre de 2013, época de alta precipitación. Los muestreos entomológicos estuvieron enmarcados dentro del proyecto “Estrategia Integral para el control de la leishmaniasis en Colombia”, en actividades asociadas a la descripción de los sitios de cría naturales de *Lutzomyia evansi*, motivo por el cual el mayor esfuerzo de colecta estuvo centrado sobre este tópico y no sobre la colecta de estados adultos. Sin embargo, se indica que el mes de noviembre corresponde al periodo de lluvias en donde la abundancia de las especies de *Lutzomyia* incrementa de manera significativa, lo que garantizó contar con una alta proporción de ejemplares para la detección del endosimbionte *Wolbachia*. Esta localidad es catalogada como un ecosistema de bosque seco tropical (Hernández *et al.*, 1992; Holdrige, 1967) ubicada en la costa norte del Caribe de Colombia. Se utilizaron trampas de luz blanca tipo mini CDC ubicadas en el intradomicilio y peridomicilio de las viviendas para colectar los flebotomíneos adultos.

Los insectos adultos colectados se transportaron y almacenaron en seco usando viales de 1,5mL, conservándolos en el laboratorio a $-20C$ y se procesaron de la siguiente forma: 1) La cabeza y los tres últimos segmentos abdominales fueron fragmentados para la identificación de especie con claves taxonómicas (Young & Duncan, 1994), 2) el tórax, alas y el resto de segmentos abdominales se almacenaron a $-20C$ hasta el proceso de extracción de ADN para posterior detección y caracterización de *Wolbachia* y *Leishmania*.

Adicionalmente inmaduros de *Lu. evansi*, fueron recuperados en sitios de cría naturales del ambiente urbano del municipio de Ovejas mediante extracción de sustratos y examen directo bajo estereomicroscopio (Vivero *et al.*, 2015). Estos inmaduros también fueron contemplados para la detección de *Wolbachia*, utilizando el mismo protocolo de extracción de ADN de adultos.

2.2. Extracción de ADN total de adultos e inmaduros

Posterior al reconocimiento taxonómico de especies del género *Lutzomyia*, los machos y las hembras se organizaron y agruparon por especies en tubos Eppendorf de 1,5ml. Los inmaduros fueron analizados de forma individual. El ADN se extrajo según el protocolo de altas concentraciones de sales descrito por Collins *et al.* (1987). La calidad y concentración del ADN se evaluaron mediante electroforesis en gel de Agarosa al 1%. Se cuantificó en un Nanodrop (Thermo Scientific) y adicionalmente se amplificó por PCR un fragmento del gen COI para evaluar la calidad del ADN y ausencia de inhibidores de la PCR (Figura 1a). El fragmento amplificado sirvió luego para

confirmar la identidad taxonómica de grupos de adultos que resultaron de interés por la infección de *Wolbachia* o *Leishmania*, como también para verificar la identidad de inmaduros por la ausencia de claves morfológicas (Vivero *et al.*, 2015).

2.3. PCR y secuenciación parcial del gen WSP de *Wolbachia*

Se utilizaron oligonucleótidos previamente descritos por Braig *et al.* (1998) (wsp81F-5' TGGTC-CAATAAGTGATGAAGAAAC -3'; wsp691R-5'AAAAATTAACGCTA CTCCA-3'), que amplifican un fragmento parcial (590pb - 632pb) del gen codificante de la principal proteína de superficie de *Wolbachia* (WSP). La mezcla de reacción usada para la detección de *Wolbachia* incluyó 2µl de ADN muestra, en un volumen final de 20µl según las condiciones descritas por Zhou *et al.* (1998) y el perfil térmico registrado en el estudio de Werren *et al.* (1995). Se incluyó como control positivo de la PCR el ADN obtenido de 10 larvas (L4) de *Aedes aegypti* infectadas con una cepa de referencia de *Wolbachia* (Grupo A, cepa wMel) bajo condiciones de laboratorio en el insectario (PECET) (Figura 1b-1c), que sirvió adicionalmente para la estandarización de la amplificación por PCR del gen WSP. Los productos parciales de WSP fueron clonados y secuenciados empleando el servicio de la Compañía Macrogen Inc. en Corea.

2.4. Identidad de cepas de *Wolbachia* con base en secuencias reportadas y sus relaciones de filogenia

Los cromatogramas obtenidos a partir de los productos del gen WSP de *Wolbachia* fueron verificados y editados con Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999), para obtener las secuencias consenso relacionadas con cada *Lutzomyia*. Las secuencias editadas se contrastaron inicialmente con genes de WSP de cepas de *Wolbachia* relacionadas principalmente con artrópodos, usando BLAST-N (Altschul *et al.*, 1997), para confirmar la identidad del fragmento obtenido. Se contempló el marco de lectura del alineamiento nucleotídico reportado por Scott O'Neill (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/embl/align/> Número de acceso DS42468) (Ono *et al.*, 2001).

Los algoritmos Clustal W (Higgins *et al.*, 1992) y Muscle (Robert, 2004) incorporados en MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2007), fueron empleados para la obtención final del alineamiento de las secuencias del gen WSP obtenidas en *Lutzomyia* y reportada en GenBank de artrópodos. Los patrones de divergencia genética y las distancias genéticas K2P fueron evaluadas utilizando Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) y el software DNAsp 5.0 (Jaramillo Jaramillo, *et al.*, 1981). Se realizó una verificación y/o validación de eventos de recombinación y presencia de quimeras con el software RDP4 (Martin *et al.*, 2005) para las secuencias obtenidas, con la finalidad de garantizar la veracidad de la variabilidad nucleotídica con respecto a las secuencias previamente reportadas en GenBank.

Para evaluar la identidad y ubicación en posibles haplogrupos con base en relaciones filogenéticas

PRESENCIA DE *Wolbachia* y *Leishmania* EN UNA POBLACIÓN DE *Lutzomyia evansi* PRESENTE EN LA COSTA CARIBE DE COLOMBIA
a partir de las secuencias del gen WSP se realizó un dendograma de Neighbor Joining construido con todas las secuencias reportadas, en el programa MEGA 6 (Figura 2). La única secuencia del fragmento parcial del gen WSP de *Wolbachia* de este estudio está depositada en el GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI) con el número de acceso KM594548.

2.5. Amplificación por PCR del gen HSP-70N de *Leishmania* en grupos de hembras

Previo a la PCR para la detección de *Wolbachia* se realizó PCR para la detección de infección por *Leishmania*, con las condiciones térmicas y los oligonucleótidos descritos por Fraga *et al.* (2010) (HSP70-F25 -5' GGACGCCGGCACGATTKCT -3'; HSP70-R617 5'- CGAAGAAGTCCGATA CGAGGGA -3') que amplifican un fragmento parcial de 593pb del gen HSP-70N (gen que codifica para la Proteína Citoplasmática de Choque Térmico 70) (Figura 1d). Se incluyó como control positivo el ADN de las especies *Leishmania nsis* (Cepa referente UA 2903), provisto por la Unidad de Biología Molecular del PECET. Los productos parciales obtenidos de *Leishmania* fueron secuenciados en ambos sentidos de la doble cadena de ADN, empleando el servicio de la Compañía Macrogen Inc. en Corea.

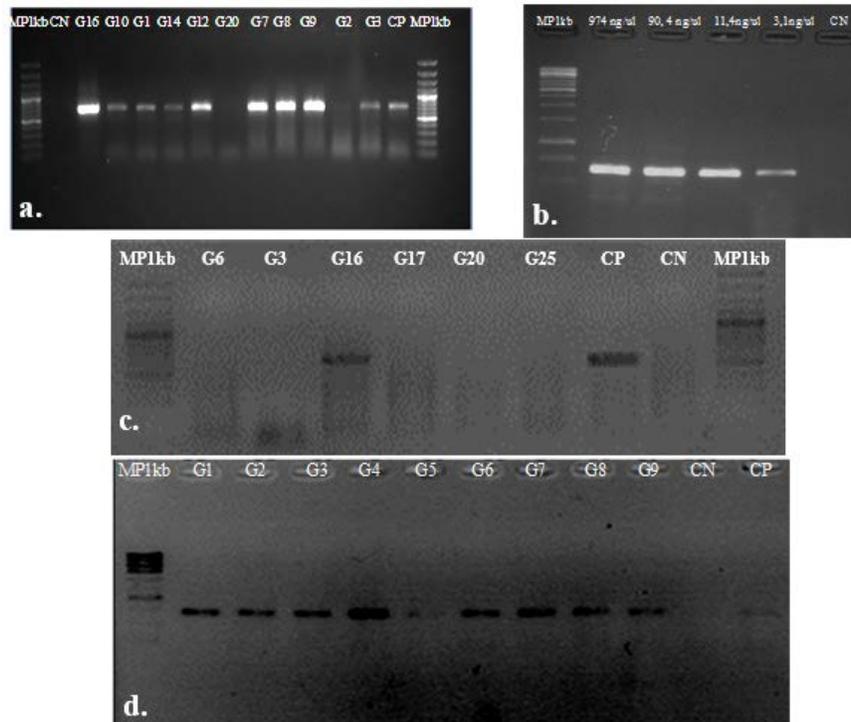


Figura 1: Geles de Electroforesis al 2% (a) PCR del gen COI (b) Estandarización de la amplificación del gen WSP de *Wolbachia* en insectos. (c) Identificación molecular mediante PCR del gen WSP de la infección natural por *Wolbachia* en pools de *Lutzomyia* de Ovejas. (d) Identificación molecular de infección por *Leishmania* en *Lu. evansi*. CN control negativo; CP: Control positivo MPIkb: Marcador de peso molecular.

3. RESULTADOS

3.1. Identificación de ejemplares del género *Lutzomyia*

Un total de 176 adultos colectados y 34 inmaduros recuperados en sitios de cría naturales, fueron obtenidos alrededor de la zona urbana del municipio de Ovejas. El empleo de claves morfológicas y el análisis complementario de las secuencias del gen COI, permitió confirmar la identificación taxonómica de adultos e inmaduros (resultados no mostrados) incluidos en el estudio. Se determinaron las especies *Lu. evansi* (número de individuos adultos = 160; inmaduros = 34), *Lu. panamensis* (número de individuos adultos = 11) y *Lu. gomezi* (número de individuos adultos = 5) (Tabla 1). La asignación taxonómica de especie y del sexo de los flebotomíneos permitió conformar 53 grupos para la detección molecular de *Wolbachia* y *Leishmania* mediante PCR.

3.2. Detección de la infección por *Wolbachia* en *Lu. evansi*.

Tabla 1

Estado	Especie de flebotomíneo	Número de grupos analizado	Número total de ejemplares		Grupos infectados con <i>Wolbachia</i> (número de individuos)	Grupos infectados con <i>Leishmania</i> (número de individuos)
			Hembra	Macho		
Adultos	<i>Lu. evansi</i>	16	143	17	1(10)	9(90)
	<i>Lu. panamensis</i>	2	7	4	-	-
	<i>Lu. gomezi</i>	1	5	-	-	-
Inmaduros	<i>Lu. evansi</i>	34	-	-	-	-
Total	3	53	155	21	1(10)	9(90)

Se detectó la infección natural por *Wolbachia* en un grupo de machos de *Lu. evansi* (número individuos = 10) catalogado como grupo 16 (G16) (Figura 1c; Tabla 1). Se denotó una correcta amplificación del producto esperado de 600pb. El producto amplificado (Tamaño de 600pb) fue óptimo para la secuenciación de gen WSP de *Wolbachia* detectado en *Lu. evansi* (Número de acceso GenBank KM594548) El análisis preliminar con BLAST confirmó la presencia de *Wolbachia* y la identidad del gen WSP con porcentajes de similaridad del 96%. El dendrograma Neighbor Joining, generado con secuencias parciales del gen WSP de *Wolbachia* de otros insectos reportados en Genbank (Figura 2), ilustra la ubicación del haplotipo *WbLevaov16* detectado en machos de *Lu. evansi*, ubicado en el supergrupo B y en el haplogrupo *wLeva* previamente reportado en el municipio de Ovejas en flebotomíneos colectados durante la época seca (Vivero *et al.* en prensa, 2016). Se aprecia mayor relación con los haplotipos de *Wolbachia* *WbLevov75* y *WbLdubov43* reportados para *Lu. evansi* y *Lu. dubitans*. El haplotipo *WbLevaov16* (KM594548) presenta una relación cercana con el grupo Con y otros grupos como Dei, Crag, Unif y Prn, los cuales en su mayoría tienen cepas de *Wolbachia* aisladas de Mosquitos (Figura 2).

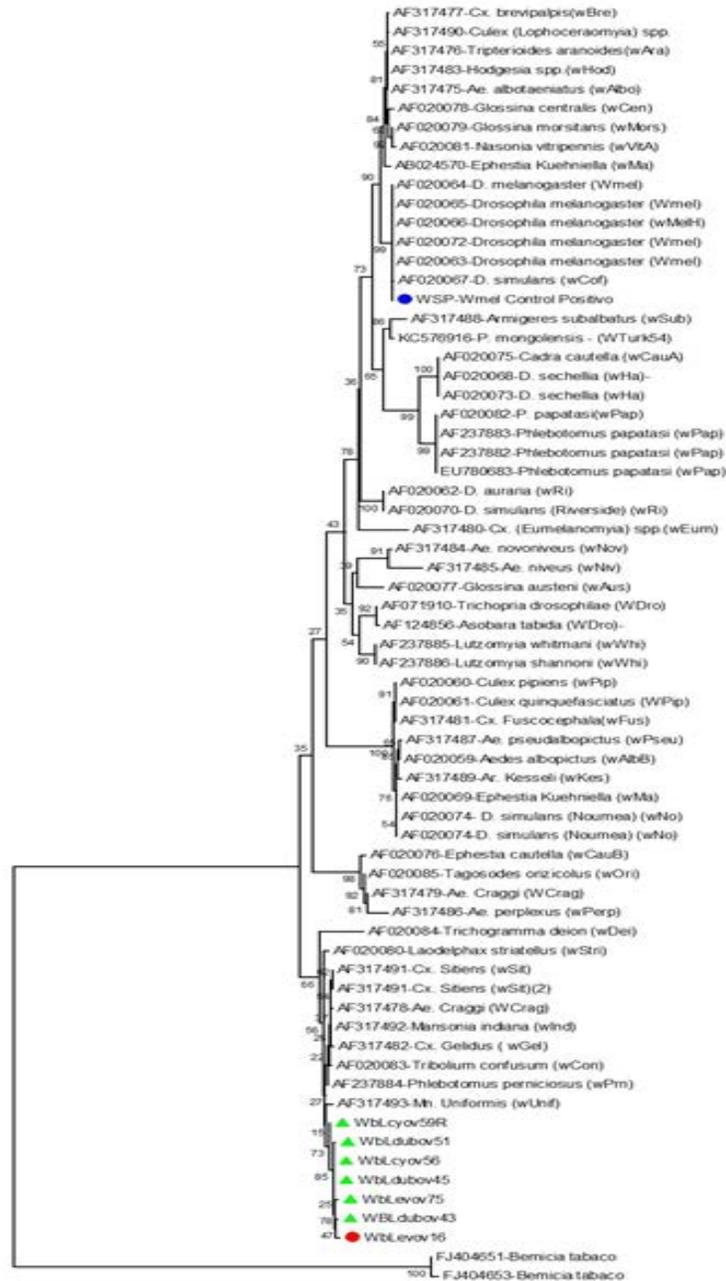


Figura 2: Dendrograma de Neighbor Joining de secuencias parciales del gen WSP, que ilustra en el círculo rojo la ubicación de la cepa de *Wolbachia* encontrada en *Lu. evansi* y en los triángulos verdes cepas de *Wolbachia* previamente reportadas. En círculo azul control positivo de la cepa *wMel*

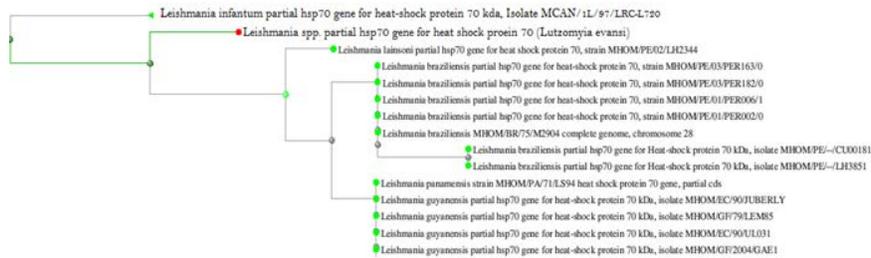


Figura 3: Dendrograma de Neighbor Joining de secuencias parciales del gen HSPN-70 realizado en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con secuencias disponibles en GenBank, que ilustra en el círculo rojo la ubicación del asilamiento de *Leishmania spp.*, encontrada en poblaciones naturales de *Lu. evansi*.

El análisis de la variabilidad nucleotídica de la secuencia de *Wolbachia* detectada revela entre 3 y 6 sitios variables, con respecto a los haplotipos reportados del haplogrupo *wLeva*. Los valores más bajos de distancias genéticas pareadas de Kimura de *WbLevaov16* estuvieron entre 0,007 al compararse con *WbLcyov56*, *WbLdubov43*, *WbLdubov45*; 0,012 con *WbLevov75*, *WbLdubov51* y 0,014 con el haplotipo *WbLcyov59* que corresponde a otra cepa de *Wolbachia* detectada en *Lu. cayennensis*. Las distancias genéticas del haplotipo *WbLevaov16* con respecto a cepas de *Wolbachia* identificadas en especies de la subfamilia *Phlebotominae* y ubicadas en el supergrupo A, fueron de 0,251 (*wPap-Phlebotomus papatasi*), 0,027 (*wPrn Phlebotomus perniciosus*) y 0,171 (*wWhi - Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia shannoni*). Las distancias genéticas con respecto al control positivo de *Wolbachia* (Cepa *wMel*) ubicado en el supergrupo A fueron de 0,214.

3.3. Detección de la infección con *Leishmania* por PCR del gen HSP-70N

De los 53 grupos de flebotomíneos fueron seleccionados 13 grupos conformados por hembras de la especie *Lu. evansi*, *Lu. gomezi* y *Lu. panamensis* para la detección natural de *Leishmania*. Nueve grupos de *Lu. evansi* resultaron positivos con el fragmento esperado de 590pb del gen HSP-70N (Figura 1d). Sin embargo solo una secuencia editada de 418pb del gen HSP-70N del grupo 6 de *Lu. evansi*, fue obtenida de forma legible y mostró mayor similitud con secuencias de *Leishmania* del subgénero *Viannia* luego de realizar el análisis en BlastN. Los mayores porcentajes de similitud (93%) se presentaron con secuencias del gen HSP-70N *Leishmania panamensis* (*XM010702330,1*, *CP009397,1*), sin embargo el análisis de la secuencia obtenida sólo permite definir su relación con el subgénero *Viannia* y su separación de secuencias del gen HSP-70N pertenecientes a *Leishmania infantum* (Figura 3).

4. DISCUSIÓN

La detección de la infección natural de *Wolbachia* por la presencia de su ADN en poblaciones silvestres de insectos vectores presentes en áreas donde se reportan enfermedades infecciosas, es

importante porque este endosimbionte puede ser usado como control biológico para disminuir las tasas de infección al bloquear la actividad patogénica de diversos microorganismos (virus y parásitos) (Ono *et al.*, 2001; Azpurua *et al.*, 2010; Rodriguero & Marcela, 2013; Wallace, 2013). Este estudio reporta y confirma la presencia de *Wolbachia* en un grupo de machos de *Lu. evansi*, especie de gran interés por ser el vector principal de la leishmaniasis visceral en la costa caribe de Colombia y algunos países de Centroamérica (González *et al.*, 2006).

El hallazgo de *Wolbachia* sugiere revisar en futuras investigaciones la variabilidad genética de *Lu. evansi*, por la capacidad de este endosimbionte para recombinarse con los genomas mitocondriales y nucleares de los hospederos (Baldo *et al.*, 2006; Ellegaard *et al.*, 2013). Algunos estudios han sugerido que *Wolbachia* puede promover la especiación rápida causando incompatibilidad reproductiva entre las poblaciones (Kittayaponga *et al.*, 2000; Sinkins *et al.*, 2005; Azpurua *et al.*, 2010). Esta apreciación coincide con la sugerencia de Azpurua *et al.* (2010), sobre la necesidad de explorar los patrones de transmisión de *Leishmania* en diferentes haplotipos de *Lutzomyia trapidoi*, los cuales resultaron ser positivos para *Wolbachia*, presentaron alta variabilidad intra-específica del marcador mitocondrial COI y mostraron tasas diferenciales de infección por *Leishmania*. Lo expuesto anteriormente resultaría de gran interés epidemiológico asociado a nuestro estudio, porque variantes genéticas (haplotipos) de *Lu. evansi* pueden reflejar diferencias en la competencia vectorial y la dinámica de transmisión de la leishmaniasis en diferentes áreas de influencia del parásito y de reservorios de la enfermedad.

Las cepas de *Wolbachia* varían en forma considerable según sus hospederos (González & Martínez, 2010; Rodriguero & Marcela, 2013) y en cuanto a su dinámica de fijación o efectos generados en el insecto como la incompatibilidad citoplasmática. Por tal motivo existe la posibilidad en el panorama del control biológico, de que la cepas de *Wolbachia* transfectadas en un nuevo hospedero (insecto vector de interés) puede verse alterada por las cepas ya existentes de la población silvestre de insectos (Rodriguero & Marcela, 2013), (Hoffmann *et al.*, 2015). En este contexto la detección molecular de la cepa de *Wolbachia* en *Lu. evansi*, es importante porque permite conocer su genotipo, relación con otros insectos hospederos y estimar posibles efectos que puede tener la cepa *Wolbachia*, como el de transmisión horizontal al estar presente en otras especies de *Lutzomyia* de la región.

El análisis de secuencias del gen WSP de nuestro estudio indica que la cepa de *Wolbachia* encontrada en machos de *Lu. evansi* se sitúa en el supergrupo B, uno de los primeros en ser estudiados y se corresponden con las cepas responsables de la incompatibilidad citoplasmática, partenogénesis en huevos y feminización en los artrópodos (Werren *et al.*, 1997). Dentro de este sistema de clasificación de supergrupos, se ha propuesto subdividirlos en otros más pequeños (“grupos”, linajes o cepas) basándose en la secuencia del gen WSP. La cepa detectada en machos de *Lu. evansi* tiene relación con cepas de los grupos Con, Unif, Dei, Prn y Gel que en su mayoría han sido detectadas

en dípteros, indicando que estas cepas tienen gran capacidad de adaptación por sus hospederos y de infectividad por diferentes órganos (Zhou *et al.*, 1998; Ruang–Areerate *et al.*, 2003). Los hospederos de las cepas Con, Unif, Dei, Prn relacionados corresponden con los dípteros *Phlebotomus perniciosus*, *Mansonia uniformis*, *Mansonia indiana*, *Culex sitiens*, *Trichogramma deion*, *Culex gelidus* y al escarabajo *Tribolium confusum* principalmente (Ono *et al.*, 2001; Azpurua *et al.*, 2010).

Resulta necesario indicar que la cepa de *Wolbachia* encontrada en *Lu. evansi*, tiene lejana relación con las cepas encontradas en *Lu. shannoni* y *Lu. whitmani* (Ono *et al.*, 2001). Esto indica que diferentes especies de flebotomíneos han sido infectadas con diferentes cepas de *Wolbachia* en distintas ocasiones (Ono *et al.*, 2001).

El desarrollo de estudios sobre la detección de la infección por *Leishmania* y *Wolbachia* en hembras de poblaciones del género *Lutzomyia* aporta información preliminar para el diseño potencial de estrategias de control biológico de estos insectos vectores. Dentro del grupo de especies encontradas en este estudio, *Lu. gomezi* presenta antecedentes epidemiológicos por ser un vector reconocido de leishmaniasis cutánea en la Costa Caribe y otras regiones del país tanto en zonas rurales como en zonas urbanas (Cochero *et al.*, 2007; Azpurua *et al.*, 2010; Paternina–Gómez *et al.*, 2011; Paternina, 2012).

Esta especie también ha sido encontrada infectada naturalmente con diferentes especies de *Leishmania* en distintos países de Suramérica (González *et al.*, 2006; Paternina–Gómez *et al.*, 2011; Azpurua *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestro estudio, no se detectó la infección natural con *Leishmania* ni con *Wolbachia* en esta especie. El grupo de individuos de *Lu. panamensis* también resultó negativo a la infección natural por *Wolbachia* y *Leishmania*, la presencia de sus ejemplares en el área de estudio es un hallazgo de interés ecoepidemiológico, porque esta especie es un vector reconocido de *Leishmania* (*Viannia*) panamensis en Panamá (Christensen *et al.*, 1972) y fue encontrada infectada naturalmente con *Leishmania* (*Viannia*) braziliensis en Venezuela (Rodríguez *et al.*, 1999).

Es necesario precisar que la ausencia de *Wolbachia* y *Leishmania* en estas dos especies (*Lutzomyia panamensis* y *Lutzomyia gomezi*) puede estar influenciada por el esquema de muestreo, la reducida escala geográfica al considerarse como una exploración puntual y la baja abundancia encontrada, que reduce la posibilidad de acceder a su ADN.

A diferencia, varios grupos de hembras de *Lutzomyia evansi* fueron encontrados positivos a la infección por *Leishmania* (*Viannia*) spp en el estudio. Estos resultados son congruentes con el reporte preliminar realizado por Bejarano *et al.* (2012). Sin embargo es necesario precisar que el ADN de los mismos grupos resultó negativo para *Wolbachia*. En contraste Azpurua *et al.* (2010), reportó co-infección por *Wolbachia* y *Leishmania* en otras especies del género *Lutzomyia*. *Lu. evansi* es el

PRESENCIA DE *Wolbachia* y *Leishmania* EN UNA POBLACIÓN DE *Lutzomyia evansi* PRESENTE EN LA COSTA CARIBE DE COLOMBIA vector principal de la leishmaniasis visceral en la costa caribe de Colombia (Sucre, Bolívar, Córdoba) y vector secundario en ausencia de *Lutzomyia longipalpis* en algunas regiones de Colombia y determinados países de Centroamérica (González *et al.*, 2006).

5. CONCLUSIONES

Se confirma la infección natural por el endosimbionte *Wolbachia* en machos de *Lu. evansi* y la detección del parásito *Leishmania* en un grupo de hembras que carecía de la infección de *Wolbachia*. Se sugiere realizar más estudios en otras localidades de la región Caribe y de Colombia para aportar a la filogenia y distribución de *Wolbachia* en estos insectos vectores y relacionarlos a los niveles de infección simultáneos de *Wolbachia* y *Leishmania*.

Referencias

- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- Azpuruá, J., De La Cruz, D., Valderama, A. & Windsor, D. (2010). *Lutzomyia* Sand Fly Diversity and Rates of Infection by *Wolbachia* and an Exotic *Leishmania* Species on Barro Colorado Island, Panama. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(3), e627.
- Baldo, J., Hotopp, D., Jolley, K., Bordenstein, S., Biber, S., Choudhury, S., Hayashi, C., *et al.* (2006). Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (11), 7098–7110.
- Blanco-Tuirán, P., Maingon, R., Hommel, M. & Alcalá, J. (1993). A focus of visceral and cutaneous leishmaniasis on the northern coast of Colombia. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 70, 481–8.
- Bejarano, E., Sierra, D. & Vélez, I. (2003). Novedades en la distribución geográfica del grupo *verrucarum* (Diptera: Psychodidae) en Colombia. *Biomédica*, 23(3), 341–350.
- Bejarano, E. (2006). Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomológica Mexicana*, 45(1) 47–56.
- Braig, R., Zhou, W., Dobson, L. & O'Neill, S. (1998). Cloning and characterization of a gene encoding the major Surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology*, 180(9), 2373–2378.

- Bejarano, E., Uribe, S., Pérez, A., Egurrola, J., Dib, J. & Porter, C. (2015). Nuevos hallazgos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) en la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Acta biol. Colomb.* doi.org/10.15446/abc.v20n1.45176.
- Bejarano, E., Pérez-Doria, A., Paternina, E., Paternina-Gómez, M. & Martínez, L. (2012). Natural infection of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae) with *Leishmania (Viannia)* spp. in northern Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 87, 173.
- Camacho, M., Caraballo, L., Barrios, H., Correa, I. & Figueroa, N. (1977). Kala-azar: un foco en el departamento de Sucre. *Tribuna Médica*, 56, 33–4.
- Cazorla, D., Oviedo, M. & Vivenes, M. (2010). Redescrición de la quetotaxia del cuarto estadio larval de *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Revista Colombiana de Entomología*, 36(1), 76–81.
- Christensen, H., Herrero, A. & Telford, S. (1972). Enzootic cutaneous leishmaniasis in eastern Panama. II. Entomological investigations. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 66, 55–66.
- Contreras, A., Vivero, R., Bejarano, E., Carrillo, L. & Vélez, I. (2012). Nuevos registros de flebotominos (Diptera: Psychodidae) en el área de influencia del río Amoyá en Chaparral, Tolima. *Biomédica*, 32(2), 263–268.
- Cochero, S., Anaya, Y., Días, Y., Paternina, M., Luna, A., Paternina, L. & Bejarano, E. (2007). Infección natural de *Lutzomyia cayennensis cayennensis* con parásitos tripanosomástideos (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en los Montes de María, Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3) 59–66.
- Collins, F., Mendez, M., Rasmussen, M., Mehaffey, P., Besansky, N. & Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37(1), 37–41.
- Cortés, L., Fernández, J. (2008). Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomédica*, 28, 433–40
- Dedeine, F., Ahrens, M., Calcaterra, L. & Shoemaker, D. (2005). Social parasitism in fire ants (*Solenopsis* spp): a potential mechanism for interspecific transfer of *Wolbachia*. *Molecular Entomology*, 14, 1543–1548.
- Ellegaard, M., Klasson, L., Naslund, K., Bourtzis, K. & Andersson, S. (2013). Comparative genomics of *Wolbachia* and the bacterial species concept. *PLoS Genet.* 9(4), e1003381. doi:10.1371/journal.pgen.1003381.

- Floate, K., Kyei-Poku, G. & Coghlin, P. (2006). Overview and relevance of *Wolbachia* bacteria in biocontrol research. *Biocontrol Science Technology*, 16(8), 767–788.
- Favia, G., Ricci, I., Damiani, C., Raddadi, N., Crotti, E., Marzorati, M., *et al.* (2007). Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104, 9047–9051.
- Finney, C., Kamhawi, S. & Wasmuth, J. (2015). Does the Arthropod Microbiota Impact the Establishment of Vector-Borne Diseases in Mammalian Hosts?. Plos DOI: 10.1371/journal.ppat.1004646.
- Fraga, J., Montalvo, A., De Doncker, S., Dujardin, J. & Auwera, G. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238–45.
- González, C., Cabrera, O., Munstermann, L. & Ferro, C. (2006). Distribución de los vectores de *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) en Colombia. *Biomédica*, 26(supl.1), 64–72.
- González, E. & Martínez, F. (2010). Consecuencias evolutivas causadas por bacterias del género *Wolbachia* en artrópodos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 46, 189–202.
- Gomes, M., de Medeiros, M., Silva, J., Tavares, J., Alves, M. & Freire, M. (2016). Sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vectors of *Leishmania* protozoa, at an Atlantic Forest Conservation Unit in the municipality of Nísia Floresta, Rio Grande do Norte state, Brazil. *Parasites & Vectors*, 9, 83.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hernández, J., Hurtado, A., Ortiz, R. & Walschburger, T. (1992). Unidades biogeográficas de Colombia. Págs. 105-152 en: Halffter, G. (ed.). La Diversidad Biológica de Iberoamérica I. CYTED-B Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, México.
- Higgins, D., Bleasby, A. & Fuchs, R. (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput Appl Biosci*. 8, 189–191.
- Hoffmann, A., *et al.* (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476, 454–457.
- Hoffmann, A., Ross, P.n & Rasic, G. (2015). *Wolbachia* strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. *Evolutionary Applications* doi:10.1111/eva.12286. 8, 751-768.

- Holdridge, L. (1967). *Life Zone Ecology*. San José (Costa Rica): Tropical Science Center.
- Kittayaponga, P., Milnea, J., Tigvattananontb, S. & Baimaia, V. (2000). Distribution of the Reproduction-modifying Bacteria, *Wolbachia*, in Natural Populations of Tephritid Fruit Flies in Thailand Pattamaporn Kittayapong. *Journal of the Science Society of Thailand*, 26, 93–103
- Le Pape, P. (1992). Écoépidémiologie de la leishmaniose a *Leishmania infantum* = *L. chagasi* dans la plaine des caraïbes (Colombie): corrélation vecteur et réservoir canin. [Montpellier, Francia]: Université de Montpellier I.
- Librado, P. & Rosas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–145.
- Luyo–Acero, G., Uezato, H., Oshiro, M., Takei, K., Kariya, K., Katakura, K., *et al.* (2004). Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology*, 128, 483–491.
- Martin, D., Williamson, C. & Posada, D. (2005). RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics*, 21(2) 260–262.
- Martínez, L., Rebollo, J., Luna, A., Cochero, S. & Bejarano, E. (2010). Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. *Parasitology*, 106, 647–652.
- Montoya-Lerma, J. & Lane, R. (1996). Factors affecting host preference of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Bulletin of Entomological Research*, 86 (1), 43–50.
- Ono, M., Braig, H., Munstermann, L., Ferro, C. & Ot' Neill, S. (2001). *Wolbachia* Infections of Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 38(2), 237–241.
- Paternina–Gómez, M., Pérez–Doria, A., Paternina, L., Velbel, D., Martínez, L. & Bejarano, E. (2011). Infección natural de *Lutzomyia micropyga* con tripanosomatídeos en el Caribe Colombiano. *Biomédica*, 31(sup.3), 209–421.
- Paternina, L. (2012). Determinación molecular de las fuentes alimenticias de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) asociadas a casos de Leishmaniasis Cutánea en el departamento de Sucre, Caribe Colombiano [tesis de maestría]. [Medellín (Colombia)]: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. p. 70.
- Pérez–Doria, A., Paternina, L., Paternina, M., Martínez, L., Verbel–Vergara, D. & Bejarano E. (2011). Infección natural de *Lutzomyia evansi* con especies del complejo *Leishmania braziliensis* causantes de leishmaniasis cutánea en la Costa Caribe Colombiana. *Biomédica*, 31(3), 23–205.

- Robert, E. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–97.
- Rodriguero, Marcela, S. (2013). *Wolbachia*, una pandemia con posibilidades. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 72, 3–4.
- Ruang–Areerate, T., Kittyapong, P., Baimai, V. & O’Neill, S. (2003). Molecular Phylogeny of *Wolbachia* Endosymbionts in Southeast Asian Mosquitoes (Diptera: Culicidae) based on WSP gene sequences. *Journal of Medical Entomology*, 40(1), 1–5.
- Rodríguez, N., Aguilar, C., Barrios, M. & Barker, D. (1999). Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93, 47–49.
- Sinkins, S. P., Walker, T., Lynd, A. R., Steven, A. R., Makepeace, B. L., Godfray, H. C. J., & Parkhill, J. (2005). *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature*, 436(7048), 257–260.
- Sanchez, I., Liria, J. & Feliciangeli, M. (2015). Ecological niche modeling of seventeen sandflies species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) from Venezuela. *International Journal of Zoology*. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/108306>.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA 4.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
- Vívenes, M., Oviedo, M. & Márquez, J. (2005). Desarrollo de *Lesihmania mexicana* y *Lesihmania amazonensis* en *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae, Phlebotomine). *Revista Colombiana de Entomología*, 31(1), 71–74.
- Vivero, R., Ortega, E., Aparicio, Y., Torres, C., Muskus, C. & Bejarano, E. (2013). Flebotominos adultos e inmaduros (Diptera: Psychodidae): registros para el Caribe colombiano. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 3(2), 1–10.
- Vivero R., Torres–Gutiérrez C., Bejarano E., Cadena H., Estrada L., Florez F., *et al.* (2015) Study on natural breeding sites of sand flies (Diptera: Phlebotominae) in areas of *Leishmania* transmission in Colombia. *Parasit Vectors*, 8 (116). doi: 10.1186/s13071–015–0711–y.
- Vivero, R., Cadavid–Restrepo, G., Uribe, S., Moreno, C. & Vélez, I. (2016). Bacterial communities associated with the digestive tract of wild populations of *Lutzomyia evansi*: a vector of *Leishmania* in Colombia. *Parasite*. DOI: 10.1051/parasite/2016051. 23, 32.

- Wallace, H. (2013). Mosquitos genéticamente modificados: preocupaciones actuales. Enang (Malasia): Third World Network. P. 98
- Walker, T., Johnson, P., Moreira, L., Iturbe, I., Frentiu, F., McMeniman, C., *et al.* (2011). The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476, 450–453.
- Werren, J., Zhang, W. & Guo, L. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 261, 55–63.
- Werren, J. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual Review of Entomology*, 42, 587–609.
- Werren, J., Baldo, L. & Clark, M. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 741–751.
- Young, G. & Duncan, M. (1994) Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem. Am. Entomol.* 54, 1–881.
- Zambrano, P. (2014). Leishmaniasis. CIUDAD: Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública PRO-R02.016-Versión 01.
- Zhou, W., Rousset, F. & O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using WSP gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 265, 509–515.