

Consejo Directivo

Instituto Venezolano de Investigaciones
Científicas

Director

Eloy Sira

Subdirector

Alexander Briceño

**Representantes del Ministerio del Poder Popular para Ciencia,
Tecnología e Innovación**

Guillermo Barreto

Juan Luis Cabrera

**Representante del Ministerio del Poder Popular
para la Educación Universitaria**

Prudencio Chacón

Representantes Laborales

José Garzaro

Víctor Peña

William Espinoza (suplente)

Sirvia Ávila (suplente)

Gerencia General

Lira Parra

Comisión Editorial**Coordinador**

Eloy Sira

Lucía Antillano, Horacio Biord,

Jesús Eloy Conde, María Teresa Curcio,

Rafael Gassón, Pamela Navarro,

Héctor Suárez, Erika Wagner

©Ediciones IVIC

Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

RIF G-20004206-0

Estudio multidisciplinario de la palometa peluda***Hylesia metabus***

José V. Hernández E., Frances Osborn y Jesús E. Conde

Editores

Coordinación Editorial: Pamela Navarro

Diseño y arte final: Pascual Estrada

Fotografía de portada: Enrique González, Unidad de Fotografía Científica
(IVIC)

Mapas páginas 149 y 172: Grisel Velásquez, Unidad de Sistemas de Información
Geográfica (UniSIG-IVIC).

Impresión: Grupo Intenso

Depósito legal: lf66020126002359

ISBN: 978-980-261-139-3

Altos de Pipe - Venezuela

2012

Cita recomendada:

Para la obra completa:

Hernández JV, Osborn F & JE Conde (Eds.) (2012) *Estudio multidisciplinario de la palometa peluda Hylesia metabus*. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. 224 pp.

Para un artículo:

Gajardo R, Vitelli J, Rodríguez-Lemoine V & B Dorta (2012) Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 en el nororiente de Venezuela. En: Hernández JV, Osborn F & JE Conde (Eds.). *Estudio multidisciplinario de la palometa peluda Hylesia metabus*. Ediciones IVIC, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. Pp. 113-128.

Estudio multidisciplinario de la palometa peluda *Hylesia metabus*

José V. Hernández E.

Frances Osborn

Jesús Eloy Conde

Editores

Ediciones IVIC

Ediciones IVIC

Índice

Presentación	6
Prólogo	8
Agradecimientos	11
SECCIÓN I	13
ANTECEDENTES Y BIOLOGÍA	
Rasgos de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) José V. Hernández E., Frances Osborn y Melfran Herrera	15
Rasgos morfológicos, taxonomía y nomenclatura de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) Ángel L. Vilorio, José Enrique Piñango, Carmen Virginia Liendo-Barandiaran y José V. Hernández E.	25
Variabilidad, estructura genética y filogenia de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) Hernán Cequea, Jazzmin Arrivallaga, Cristina Sainz-Borgo y José V. Hernández E.	33
SECCIÓN II	45
SISTEMA URTICANTE	
Morfología de las setas urticantes de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) Jessica Rodríguez, Frances Osborn, Ulf Lundberg y José V. Hernández E.	47
Toxinología de la polilla <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) Ulf Lundberg, Víctor Salazar, Evelyn León, Luis Javier González y Yanet Támara Hernández	57
Efectos de la toxina de las setas urticantes de la polilla <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae), en modelos experimentales. Estudio histopatológico Víctor Salazar, Ulf Lundberg, Ricardo Gámez y Franklin Méndez	69
SECCIÓN III	107
LOS ENEMIGOS NATURALES	
Daños ultraestructurales en larvas de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) causados por un patógeno bacteriano María Tovar y Frances Osborn	109
Aislamiento y caracterización de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner, 1911) en el nororiente de Venezuela Roxana Gajardo, Juana Vitelli, Vidal Rodríguez-Lemoine y Blas Dorta	115
Primer reporte de un hongo entomopatógeno sobre <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) Roxana Gajardo, Domenico Pavone, Frances Osborn y Blas Dorta	131
Primer reporte de un microsporidio parasítico en larvas de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) Frances Osborn	141

Los parasitoides de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775])	147
José V. Hernández E., Frances Osborn, Beatriz Herrera-Malaver, Carmen Virginia Liendo-Barandiaran, Diony Velásquez y Sandra Díaz	
SECCIÓN IV	161
GESTIÓN Y CONTROL	
Estrategias de monitorización y control (2004-2008) de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) en la península de Paria, estado Sucre, Venezuela	163
Melfran Herrera, Gregorio Ramírez y Frances Osborn	
Análisis espacio-temporal y mapa de riesgo de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) en el estado Sucre	171
Adriana Zorrilla, Juan-Carlos Navarro, Juan Martínez y Frances Osborn	
Evaluación de la eficacia del larvicida biológico DiPel® como controlador de larvas de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775])	183
Frances Osborn, José V. Hernández E., Sandra Díaz, Diony Velásquez, Melfran Herrera, Tivardys Guzmán y Finordys Muñoz	
Elucidación parcial de los componentes de la feromona sexual de <i>Hylesia metabus</i> (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae)	191
Beatriz Herrera-Malaver, Carmen Virginia Liendo-Barandiaran, Ignacio Buscema, Diony Velásquez, Neudo Urdaneta y José V. Hernández E.	
APÉNDICES	207
Apéndice I. El sistema taxonómico de Jacob Hübner y la creación del género <i>Hylesia</i>	209
Apéndice II. Algunos datos sobre <i>Mayeul Grisol</i>	209
Apéndice III. Lista de las especies de <i>Hylesia</i> conocidas en Venezuela	210
Apéndice IV. Aislamiento de células peritoneales e interacción con HM-PT60	211
Apéndice V. Estudios histopatológicos	211
Apéndice VI. Estudios inmunohistoquímicos	214
Apéndice VII. Análisis de imágenes	216
AUTORES	219

Presentación

A finales de 2004 y a principios de 2011 los habitantes de la península de Paria del estado Sucre sintieron nuevamente el azote de una plaga: *Hylesia metabus*, comúnmente conocida como «palometa peluda». Durante el ciclo de vida de este insecto en la fase de imago o adulto, millones de mariposas revolotean alrededor de la luz de los postes del alumbrado público y de los bombillos de las casas y arrojan al ambiente cantidades enormes de setas urticantes. La incrustación de estas espículas en la piel de las personas produce un prurito intenso y erupciones cutáneas que pueden persistir por semanas. Esta invasión de palometas obliga a que durante muchos días los pobladores de Paria tengan que pasar las noches a oscuras y durante el día permanecer encerrados en sus casas; y los comercios y escuelas cerradas, ya que el ambiente continúa impregnado de setas urticantes.

Este grave problema de salud fue asumido directamente por el Gobierno Nacional a través del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación, organismo que aprobó un importante financiamiento para el Proyecto Reto *Hylesia metabus*. Así fue que a inicios del año 2005 un grupo de investigadores se unieron para mejorar sustancialmente el conocimiento que se disponía sobre la biología, control y la identificación de las sustancias urticantes de esta plaga y, de esta manera, en sintonía con los organismos de salud y la comunidad, producir información que podría ser luego utilizada para una mejor gestión de esta plaga. El Proyecto Reto se dividió en ocho subproyectos: genética, biodiversidad, microbiología (bacterias y hongos), feromonas, monitorización, bioquímica, inmunología y educación y participación ciudadana, dirigidos por los responsables de importantes laboratorios e institutos de investigación de las Universidades de Oriente (UDO), Central de Venezuela (UCV), Simón Bolívar (USB) y del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), acompañados por organismos oficiales del estado Sucre, como la Gerencia de Saneamiento Ambiental, Fundasalud y Fundacite Sucre. Desde el principio se trabajó en un equipo bien coordinado, con espíritu de servidores públicos y en el que la participación y el mantener informada a la comunidad afectada eran fundamentales. Así fue como los profesores: Frances Osborn, José Vicente Hernández, Melfran Herrera, Hernán Cequea, Ulf Lundberg, José Clavijo, Blas Dorta, Vidal Rodríguez Lemoine, Roxana Gajardo, Mariolga Berrizbeitia, y sus equipos de investigadores asociados comenzamos a reunirnos trimestralmente, para compartir los avances de los subproyectos.

Mientras fui presidente de Fundacite Sucre, organismo adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación, me correspondió coordinar los aspectos administrativos del proyecto, al tiempo que la entomóloga Frances Osborn dirigió durante tres años la parte académica. El trabajo se inició de inmediato, ya que desde finales de 2004 y principios de 2005 las poblaciones de *Hylesia metabus* eran tan altas que se hacía imposible contabilizarlas y el malestar y las protestas de los habitantes de los municipios Benítez, Cajigal, Libertador y Marino del estado Sucre eran permanentes. Los resultados iniciales del subproyecto sobre monitorización reportaron la ubicación y distribución de edades de las mayores concentraciones de larvas de la palometa peluda, lo que ayudó a dar indicios a los funcionarios del Ministerio del Poder Popular para la Salud, para que las costosas fumigaciones

aéreas se hicieran en los lugares y las fechas convenientes y, a su vez, se organizaron cuadrillas de la comunidad y de la Gerencia de Saneamiento Ambiental de Funda-salud del estado Sucre y la Organización no Gubernamental Funmesaludca, que guiadas por los equipos de monitorización, educación y participación ciudadana, se encargaron de instalar trampas de luz y recorrer los caños de los manglares para erradicar directamente las masas de larvas. Este esfuerzo conjunto de investigadores, comunidad y gobierno dio resultados y para noviembre de 2005 comenzó a decaer la presencia de mariposas en las comunidades.

Durante los siguientes tres años del proyecto, las permanentes labores de monitoriza-ción, control, junto al trabajo comunitario, principalmente en las escuelas y liceos de la zona, la presencia de *H. metabus* en las poblaciones bajó notablemente y no hubo reportes de alarmas en los centros de salud por casos de dermatitis. A la par, el tra-bajo en los centros de investigación asociados al proyecto se continuó Para encontrar potenciales biocontroladores en su fase larval, también se estudió si la aplicación del producto Dipel®, utilizado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud en las aspersiones aéreas ocasiona impactos negativos en otras especies de insectos. Además, se avanzó en la identificación de la feromona sexual de la polilla para ser utilizada, como agente atrayente, en nuevas trampas y así reemplazar a las actuales que requie-ren de generadores eléctricos. Se estudió la genética de la especie para revisar posibles polimorfismos, se identificaron cepas de *Bacillus thuringiensis* en los suelos y las lar-vas muertas de *H. metabus*, se identificó una cepa autóctona del hongo, *Beauveria bassiana* patógena para las larvas y pupas, y se realizaron ensayos bioquímicos para caracterizar la sustancia urticante y sus efectos clínicos, con el fin de recomendar los medicamentos y tratamientos adecuados para aliviar a las personas afectadas.

Este libro coloca a disposición del público los resultados de esas investigaciones. To-davía falta mucho por estudiar sobre *H. metabus* en especial, los ciclos de vida de los enemigos naturales de este insecto y métodos de cría para usarlos como alternativa de control, sobre todo porque en los primeros meses del año 2011, nuevamente se reportaron invasiones de la palometa peluda en varias localidades del estado Sucre; por ello, es necesario continuar con el reto de mantener controladas definitivamente las poblaciones de esta especie. Tal vez después del año 2008, vista la poca presencia del insecto, hubo un descuido y se dejó de hacer las labores de control y monitori-zación con el resultado que ahora tenemos, otra vez interrumpidas las actividades socioeconómicas de muchos poblados por la presencia de la palometa peluda. Este equipo de investigadores nunca se desintegró y nuevamente están visitando la zona para retomar nuestra tarea de poner la ciencia al servicio de la gente y continuar la magnífica labor de unirnos con la comunidad en la solución de sus problemas. Como ciudadano, mi agradecimiento a los profesores universitarios e investigadores que han participado en el proyecto y contribuido con hacer realidad el presente libro, porque ellos son ejemplo de investigadores, que representan excelentes labora-torios, para compartir sus experiencias con la gente y presentar en sencillas palabras los resultados de sus investigaciones y, a la vez, escuchar con mucho respeto sus observaciones y sugerencias.

El reto continúa.

Prof. JESÚS NORIEGA RODRÍGUEZ
Universidad de Oriente, Cumaná

Prólogo

Las primeras descripciones de lesiones dermatológicas producidas por lepidópteros datan de la Grecia antigua y el Imperio romano. En América la primera descripción se realiza en 1569.

Las lesiones producidas por los lepidópteros se denominan: *erucismo*, cuando son debidas al contacto con las larvas (orugas), y *lepidopterismo*, cuando surgen del contacto directo con la mariposa adulta o con sus setas dispersadas en el ambiente. Ambos contactos generalmente se manifiestan por lesiones cutáneas (prurito, urticaria, pápulas) y en ocasiones vómitos, cefaleas y asma. Sin embargo, es de especial interés un síndrome hemorrágico severo que se presenta después del contacto con las orugas (erucismo) del lepidóptero del género *Lonomia* (*Lonomia achelous* y *Lonomia obliqua*), que fue descrito por primera vez en 1967 (Laboratorio de Coagulación, Centro de Medicina Experimental (IVIC)), en pacientes procedentes del estado Bolívar y luego de los estados Anzoátegui, Monagas, Apure, Amazonas y Delta Amacuro. Posteriormente, se han presentado casos similares en la Guayana Francesa, Colombia, Perú y Brasil; en este último es un problema serio de salud, ya que entre 1989 y 2001 se registraron más de 3000 casos. Aparte de este síndrome, cabe destacar una artritis deformante inducida por el contacto con la larva de la polilla *Premolis semirufa*, denominada vulgarmente *pararama*, entre los jornaleros que trabajan en las plantaciones de caucho del norte de Brasil.

El género *Hylesia* (*Hylesia metabus*, *Hylesia nigricans*, *Hylesia lineata*, etc.), que induce el cuadro clínico cutáneo descrito anteriormente, se distribuye desde Arizona en los Estados Unidos de América hasta Argentina. En Venezuela, en 1923, se identificó la polilla *Hylesia metabus* (denominada vulgarmente palmeta peluda) en el estado Sucre y posteriormente en Monagas, Delta Amacuro, sur del estado Zulia, Miranda y Nueva Esparta. En los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro constituye un problema de salud pública en los meses en que aparece la mariposa, con las manifestaciones clínicas características del lepidopterismo, lo cual obliga a la población a encerrarse en sus casas con el consecuente ausentismo escolar y laboral; este último de gran importancia económica ya que es una zona turística y de explotación petrolera y gasífera.

El problema descrito ha generado gran interés en los organismos dedicados a la ciencia, salud y a la industria, lo cual ha propiciado, en buena medida, los estudios que se presentan en este libro. Aunque es dable mencionar que ya desde 1937 se habían realizado algunas investigaciones de los aspectos biológicos, clínicos y ecológicos del insecto.

Los estudios realizados por un grupo multidisciplinario de investigadores de la Universidad Simón Bolívar (USB), Universidad de Oriente (UDO), Universidad Central de Venezuela (UCV) e Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), en colaboración con la Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias (Fundasalud-Sucre) y el apoyo financiero y administrativo de Fundacite-Sucre, han culminado en la preparación de este libro, titu-

lado *Estudio multidisciplinario de la palometa peluda* (*Hylesia metabus*), el cual está organizado en cuatro secciones y un apéndice de metodología. En éstas se incluye un holgado abanico de temas, que van desde la taxonomía y sistemática hasta la gestión y control del insecto, pasando por varias materias relacionadas con la biología y la biomedicina. Entre otros, se presentan los aspectos clínicos inducidos por las toxinas de las setas del insecto, rasgos morfológicos –macro y microscópicos–, haciendo hincapié en la ultraestructura de las setas. Además, se incluyen la caracterización bioquímica y el mecanismo de acción de las toxinas, usando para ello animales de experimentación. También se mencionan las estrategias de vigilancia y control que se aplican actualmente, las cuales fueron sustancialmente mejoradas mediante su sistematización, georreferenciación y el establecimiento de una sala situacional que genera productos que permiten las mejores decisiones para retroalimentar el programa.

Además, es loable el que se hayan investigado métodos no químicos para el control de la población de insectos; como son el uso de un larvicida biológico, un grupo de enemigos naturales (bacilos, parasitoides, hongos y microsporidios), los cuales merecen estudios más profundos sobre su potencial como alternativas amigables en el control ecológico de esta importante plaga de salud pública. Por otra parte, la colocación de trampas de luz donde se ubica la población de insectos ha logrado una disminución de su abundancia con resguardo del medio ambiente.

Es importante el que se hayan reunido en un solo libro todas estas investigaciones. Para mí, ha sido un placer y un honor el haber prologado este libro, que considero fundamental para el conocimiento de la palometa peluda, ya que podrá servir de modelo para investigaciones futuras en Venezuela, al igual que en los países vecinos (Brasil, Guayana Francesa, Trinidad y Tobago, Colombia y también Argentina), donde se ha identificado a esta especie o algunas de las otras pertenecientes al género y también como modelo para estudios de otros insectos plaga.

Mis congratulaciones a los organismos que han propiciado estas investigaciones y la publicación del libro. Espero que otras entidades sigan su ejemplo y propicien investigaciones similares.

CARMEN LUISA AROCHA-PIÑANGO
Investigadora Emérita, IVIC

Agradecimientos

Los editores e investigadores que participamos en el proyecto Reto *Hylesia* agradecemos el financiamiento otorgado por el Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación (MPPCTI), a través de Fundacite Sucre. Igualmente, vaya nuestro muy especial reconocimiento a Fundasalud Sucre, a las alcaldías de Paria y a todo el personal de estas instituciones, que con su mística de trabajo se constituyeron en un firme soporte para la generación de estos conocimientos. Además, deseamos agradecer a los pobladores de la costa de Paria, de Pedernales, Caripito, El Salto y Pueblo Guri por acogernos y participar de manera entusiasta en el trabajo de campo y en las jornadas de investigación allí realizadas.

Este libro tiene una gran deuda con el Dr. Ulf Lundberg, quien nos puso en contacto con la dirección del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), dirigido a la sazón por el Dr. Ángel Luis Viloria Petit, este a su vez nos encauzó hacia Ediciones IVIC, con la coordinación editorial de Pamela Navarro, quien, con el diseñador gráfico Pascual Estrada, se abocó al proyecto. A todos los nombrados en este párrafo, vaya nuestro auténtico y especial agradecimiento.

El proyecto del libro sufrió retrasos y altibajos por diferentes circunstancias y le correspondió al Dr. Eloy Sira, actual director del IVIC, darle apoyo y continuidad, a través del financiamiento de la impresión de esta publicación, por lo cual los editores e investigadores le manifestamos nuestra más genuina gratitud.

Finalmente, deseamos expresar nuestro sincero reconocimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en la generación de conocimientos y en la producción de este libro y que, de un modo u otro, se sienten identificados con el mismo o lo han prohiado.

LOS EDITORES

SECCIÓN I
Antecedentes y biología

Ediciones IVIC

Rasgos de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])José V. Hernández E.*¹, Frances Osborn² y Melfran Herrera³

¹Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edif. Física y Electrónica I, piso 1, Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

²Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apartado 245, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

³Coordinación de Vigilancia Entomológica, Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias, Fundación para la Salud del estado Sucre (Fundasalud), Carúpano, estado Sucre, Venezuela.

*jnandez@usb.ve

El orden Lepidoptera comprende a todos los insectos conocidos como polillas y mariposas. Éstos tienen una importancia ecológica y ambiental vital ya que, por un lado, las plantas constituyen el sustrato para la alimentación de las larvas y, por otro, todas las fases del ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto, son el alimento de depredadores insectívoros e insectos parasitoides. Sin embargo, este grupo ocupa el cuarto lugar entre los insectos en orden de importancia para el hombre, luego de los Coleoptera, Diptera e Hymenoptera (Scoble 1992).

Los lepidópteros son insectos considerados benéficos o plagas, dependiendo de si compiten o no con las actividades humanas. Se ha señalado que la polinización de las flores se encuentra entre una de las más importantes funciones de la alimentación de los imagos de Lepidoptera, lo cual es notable en el caso de algunas especies pertenecientes a las familias Sphingidae, Hesperidae, Papilionidae, Noctuidae y Geometridae. No obstante, ha sido documentado que los especímenes del orden no presentan órganos especializados para la recolección del polen Scoble (1992).

Una característica muy importante de los lepidópteros es el potencial que tienen como bioindicadores de la calidad ambiental; bien sea del grado de degradación de los hábitats o por su fraccionamiento en pequeños componentes (Kurdna 1986). Las mariposas, lepidópteros diurnos, son muy usadas como bioindicadores de hábitats terrestres en las zonas templadas y tropicales (Scoble 1992; Pearson 1994; Paoletti 1999).

Desde el punto de vista de insectos plaga y de su acción, traducida en términos de significado económico para el hombre, el grupo de las polillas puede ocasionar

grandes pérdidas al usar como sustrato alimenticio diferentes partes de las plantas cultivadas o sus productos cosechados y almacenados, y en algunos casos, procesados. Representantes de las familias Tortricidae, Noctuidae, Pyralidae, Sesiidae, Oecophoridae, Brassolidae y muchas otras, incluyen miembros que son serias plagas agrícolas (Bastidas & Zavala 1995). Además, pueden actuar como plagas de importancia en salud pública y en actividades productivas o recreativas realizadas por el hombre. Es conocido que algunas larvas de Megalopygidae, Limacodidae, Saturniidae y algunos Nymphalidae, Anthelidae, Lasiocampidae, Bombycidae, Eupterotidae, Lymantriidae, Arctiidae y Noctuidae presentan setas y espinas que contienen sustancias defensivas (Roth & Eisner 1962). Por su parte, en los adultos, algunas familias también pueden presentar escamas o setas urticantes, como por ejemplo en Notodontidae (Thaumetopoeinae), Lymantriidae, Arctiidae y Saturniidae. Como también pueden producir sustancias urticantes en glándulas tegumentales como por ejemplo en Zygaenidae y Arctiidae (Rothschild *et al.* 1970). De interés para el presente libro, la familia Saturniidae, tiene especies que afectan la salud y las actividades humanas. Algunas especies, por ejemplo del género *Hylesia*, producen severas dermatitis y otras inclusive pueden causar la muerte, como ha sido reportado en el caso de *Lonomia* (Casalá *et al.* 1967; Arocha-Piñango & Layrisse 1969; Jörg 1969; Zaias *et al.* 1969; Grosshans & Pradinaud 1979; Ducombs *et al.* 1983; Dinehart *et al.* 1985; Lamy & Werno 1989; Fernández *et al.* 1992; Glasser *et al.* 1993; Benvenuti *et al.* 1998; Couppié *et al.* 1998; Rodríguez-Acosta *et al.* 1998; De Roodt *et al.* 2000; Salomón *et al.* 2005).

FAMILIA SATURNIIDAE

Alrededor del mundo existen unas 1.300 especies de saturnídeos identificadas, de las cuales la mayoría han sido descritas para la región tropical del nuevo mundo (Scoble 1992). La familia está dividida en nueve subfamilias, entre las cuales se encuentra la subfamilia Hemileucinae que incluye a los géneros *Lonomia* e *Hylesia*. Esta familia se caracteriza por presentar adultos o imagos de tamaño medio a grandes: las polillas de mayor tamaño se encuentran aquí representadas. La expansión alar generalmente se encuentra sobre los 12 cm; normalmente presentan el cuerpo cubierto con millones de diminutas escamas modificadas en forma de setas o espículas de diferentes formas; y casi siempre presentan manchas parecidas a ojos en el centro de las alas, algunas veces de aspecto transparente. Algunas especies tienen colores muy llamativos y con larvas fáciles de criar y mantener, motivo por el cual son un atractivo para aficionados y coleccionistas. Los machos generalmente presentan antenas plumosas y cuadrípectinadas, especializadas en la recepción de feromonas.

Como se ha señalado, esta familia es importante en el ámbito de la salud pública, debido a la acción de sus secreciones defensivas sobre los seres humanos. Algunos investigadores usan los términos *erucismo* y *lepidopterismo* para referirse a los efectos producidos por las larvas y los adultos o imagos, respectivamente. Sin embargo, existe ambigüedad en el uso de estos términos ya que algunos investigadores, como por ejemplo Wirtz (1984), Lamy & Werno (1989), usan indistintamente el término lepidopterismo para referirse a los efectos en el hombre de las secreciones defensivas contenidas en setas y espinas de larvas, como también algunas glándulas tegumentales de los imagos, las cuales producen sustancias químicas urticantes.

Por lo general, las personas que tienen contacto con setas urticantes o con secreciones defensivas sufren la sensación de una picada y aquellas que son muy sensibles manifiestan intensos dolores y fuertes reacciones alérgicas. Han sido bien documentados casos de dermatitis que requieren hospitalización, como se ha reportado para los géneros *Hylesia* y *Hemileuca* e inclusive situaciones extremas que han causado la muerte, como por ejemplo los casos citados para Venezuela y sur de Brasil del contacto con las larvas

de *Lonomia achelous* Cramer, 1777, cuyas espinas contienen sustancias anticoagulantes las cuales causan una hemorragia severa (Casalá *et al.* 1967; Arocha-Piñango & Layrisse 1969; Jörg 1969; Zaias *et al.* 1969; Marsh & Arocha-Piñango 1971; Grosshans & Pradinaud 1979; Wirtz 1984; De Roodt *et al.* 2000; Salomón *et al.* 2005). Algunas personas pueden desarrollar inmunidad al entrar en contacto repetidamente con larvas o adultos que producen efectos nocivos a la salud, pero en otros casos puede ocurrir la hipersensibilidad, tal y como ha sido reportado en Nuevo México para *Hemileuca oliva* Cockerell 1898, y en Europa para *Euproctis chrysoorrhoea* L. 1758, (Wirtz 1984). Otro género de importancia para el hombre por los efectos sobre la salud es *Automeris*, cuyas larvas son consideradas las más ponzoñosas del orden Lepidoptera en el estado de Florida, EUA (Biery 1977; Zak 1986).

Los compuestos tóxicos de los saturnídeos pueden ser inyectados directamente por medio de las setas y espinas al entrar en contacto con la piel. Cuando ello ocurre, producen un intenso prurito y el individuo afectado al rascarse rompe completamente las setas liberando mayor cantidad de toxina. Cuando se presentan altas densidades poblacionales de adultos de estos insectos, en zonas pobladas por el hombre, las polillas de esta familia pueden liberar un incalculable número de setas que pueden tener acceso al sistema respiratorio del humano, causando severos malestares y síntomas de asma, sobre todo en la población infantil (Rodríguez-Morales *et al.* 2005).

Género *Hylesia*

El género *Hylesia* pertenece a la subfamilia Hemileucinae, familia Saturniidae, superfamilia Bombycoidea, suborden Dytrisia, orden Lepidoptera. Este género está restringido a la región Neotropical, distribuido desde México hasta Argentina con un número de especies de alrededor de 110 (Lemaire 2002). En la mayoría de los casos, la biología, ecología e importancia como plagas de salud pública se desconoce. En la Tabla 1 se resume y se muestra la información de algunas de las especies del género y de las especies plaga reportadas hasta la fecha, las sintomatologías descritas y el país afectado. En Venezuela, *H. metabus* es una plaga que

Tabla 1. Algunas especies de *Hylesia* y países afectados por la presencia de especies urticantes junto con los síntomas reportados.

Especies /Fase	País	Síntomas	Fuente
<i>H. nigricans</i> Berg, 1875 (larva y adulto)	Argentina	Granuloma manos, dermatitis	Casalá <i>et al.</i> 1967; Salomón <i>et al.</i> 2005
<i>H. dalina</i> Schaus, 1911			
<i>H. subaurea</i> Schaus, 1900			
<i>H. colimatifex</i> Dyar, 1926			
<i>H. alinda</i> Druce, 1886 (adulto)	México	Intenso prurito, eritema de la piel	Fernández <i>et al.</i> 1992
<i>H. acuta</i> Druce, 1886			
<i>H. coinopus</i> Dyar, 1913			
<i>H. colimatifex</i> Dyar, 1926			
<i>H. continua</i> Walker, 1865			
<i>H. ileana</i> Schaus, 1932			
<i>H. iola</i> Dyar 1913			
<i>H. urticans</i> Floch & Abonnenc, 1944; (adulto y larva)	Guayana Francesa	Dermatitis, placa eritematosa persistente, lesiones, patol resp.	Grosshans & Padrinaud, 1979; Couppié <i>et al.</i> 1998; Ducombs <i>et al.</i> 1983
<i>H. umbrata</i> Schaus, 1911			
<i>H. athlia</i> Dyar, 1913			
<i>H. bouvereti</i> Dognin, 1886			
<i>H. canitia</i> Cramer, 1780			
<i>H. coex</i> Dyar, 1913			
<i>Hylesia</i> sp.	Brasil	Vasculitis sistoclastica cutánea, prurito, necrosis	Benvenuti <i>et al.</i> 1998
<i>H. c. alinda</i>			
<i>H. fulviventris</i> Berg, 1883 (adulto)	Chile	Nódulo inflamatorio subcutáneo	Jörg, 1969
<i>H. frigida</i> Schaus, 1911			
<i>H. umbratula</i> Dyar, 1915			
<i>H. gamelioides</i> Michener, 1952			
<i>H. gyrex</i> Dyar, 1913			
<i>H. hubbelli</i> Lemaire, 1982			
<i>H. index</i> Dyar, 1913			
<i>H. leilex</i> Dyar, 1913			
<i>H. lineata</i> Druce, 1886			
<i>H. melanostigma</i> Herrich-Schäffer, 1855			
<i>H. murex</i> Dyar, 1913			
<i>H. nanus</i> Walker, 1855			
<i>H. metabus</i> Cramer, 1775 (adulto)	Venezuela	Dermatitis, eritema pruriginoso, pápulas, edema	Zaias <i>et al.</i> 1969; Rodríguez-Acosta <i>et al.</i> 1998.

afecta la salud pública y todas las actividades antrópicas (productivas, sociales y recreativas), incluyendo además las actividades de exploración y extracción de gas y petróleo en los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro.

Hylesia metabus

Hylesia metabus, comúnmente conocida en Venezuela como «palometa peluda», es una polilla pequeña con actividad nocturna y color que varía de grisáceo

a marrón. Se encuentra distribuida principalmente en el nordeste de Venezuela, en los manglares del golfo de Paria, estado Sucre, extendiéndose hasta los estados Monagas y Delta Amacuro. La hembra de este insecto tiene pelos abdominales extremadamente urticantes, los cuales utiliza para cubrir las posturas de huevos con el fin de protegerlos de enemigos naturales depredadores y parásitos. El contacto con estos pelos produce lesiones cutáneas pápulo eritematosas con ligera degeneración vascular, causando un prurito intenso que empeora con el roce. En algunas personas estos síntomas están acompañados por una fuerte reacción alérgica y se han reportado trastornos respiratorios, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, queratitis y conjuntivitis, entre otros. La duración de las lesiones es muy variable, oscilando entre 3 y 15 días (Vásquez 1990; Benaim-Pinto *et al.* 1991).

Las mariposas son atraídas por la luz eléctrica de las comunidades cercanas a los manglares costeros de los estados antes mencionados. De esta manera se produce periódicamente una invasión de mariposas en estas comunidades. Las mariposas hembras, al volar alrededor del alum-

brado público y doméstico liberan cantidades enormes de setas urticantes al ambiente, causando la interrupción de la mayoría de las actividades socioproductivas.

Con respecto a la caracterización de la sustancia o sustancias que causan los síntomas señalados, Dinehart *et al.* (1985) presentaron evidencias que indican que el agente causal de la sintomatología que presentan los individuos afectados por las setas urticantes de *Hylesia* es una histamina, detectada en extractos de cuerpos completos de polillas y de setas. Estos extractos reprodujeron los síntomas cuando fueron evaluados sobre la piel de monos.

Por su parte, Lundberg *et al.* (2002, 2005) aislaron y caracterizaron parcialmente la sustancia urticante obtenida de las setas que cubren la postura de *H. metabus*, la cual contiene proteínas con propiedades selectivamente fibrinolítico vasodegenerativas o quimotáctico proinflamato-

rias. Para tratar a las personas afectadas por *H. metabus* se recomienda la administración sistémica de antihistamínicos, el uso de corticosteroides en forma tópica, compresas frías y el ácido acético al 5 % (vinagre) aplicado en forma tópica (Glasser *et al.* 1993; Lundberg *et al.* 2002).

HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN DE *Hylesia metabus* EN VENEZUELA

En 1923, se realizó el primer reporte de *H. metabus* para Venezuela como *H. grisoli* (ver páginas 25-32) y en 1937 se reportó en el caño San Juan, estado Monagas (Martínez 1986). A partir de esta fecha, se reporta la presencia de la polilla una dos veces al año en la zona de Irapa, coincidiendo con la entrada y salida de la época de lluvias (Martínez 1986; Fornés & Hernández 2001).

A partir de 1947 comienza una serie de reportes de casos de dermatitis en varios buques petroleros en los que los tripulantes presentaron erupciones cutáneas aisladas y generalizadas. Estos casos provenían mayormente del oriente del país (Hill *et al.* 1948; Anónimo 1952; Zaias *et al.* 1969), aunque también se señaló en una oportunidad varios casos en el extremo occidental del país, en el río Catatumbo, estado Zulia (Vicente 1952).

Durante las décadas de los sesenta y setenta, los informes sobre la presencia de *H. metabus* provinieron en su totalidad del sur de la península de Paria, estado Sucre. Dichos reportes se contradicen en parte; sin embargo, la mayoría de los autores concuerdan en que los brotes empezaron a verse más seguidos y con poblaciones cada vez mayores (Cásares 1986; Martínez 1986; Fornés & Hernández 2001). Fue en esta región, y a partir del ciclo de vuelo de febrero-marzo de 1985, que se inició el uso de trampas de luz para capturar las mariposas adultas, lo que permitió estimar las densidades poblacionales. Estas trampas fueron colocadas entre los poblados de Irapa y El Pilar (costa de Paria) en los años 1985-1987 y 1991-1993.

Las poblaciones de esta especie aumentaron entre enero y diciembre 1986, para luego disminuir y permanecer en niveles mínimos entre 1987 y 1995 (Vásquez 1994; Fornés & Hernández 2001) (Figura 1). A partir de enero de 1997 hasta el año 2000, se reportaron poblaciones de *H. metabus* cada vez mayores; tal es el caso que en el ciclo de vuelo correspondiente a enero-febrero de 1998, la población

de *Hylesia* aumentó significativamente y fue necesario suspender el servicio de alumbrado público en el poblado de Yaguaraparo (golfo de Paria) y sus alrededores (Fornés & Hernández 2001). En diciembre del año 2000 y en abril de 2001, se realizaron dos aspersiones de una formulación a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, las cuales mantuvieron bajo control a las polillas hasta marzo de 2003. Desde entonces las densidades de *H. metabus* en el golfo de Paria han fluctuado, con picos en septiembre del año 2004 y en febrero de 2006, noviembre de 2010 y marzo de 2011 (Figura 1) (Osborn *et al.* 2001; Herrera *et al.* 2007). Actualmente, las poblaciones de este insecto se encuentran desbordadas en los tres estados nororientales mencionados, siendo Sucre donde se ha registrado la mayor densidad y dispersión de la que se tenga conocimiento, viéndose afectados 13 de sus 15 municipios (Figura 2) con más de 500.000 personas en riesgo, reportándose cerca de 4.000 casos de lepidopterismo. Durante el periodo 2007-2009 las poblaciones del insecto habían sido monitorizadas y controladas focalmente por la Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias (Gsace), estado Sucre y la Fundación para el Mejoramiento de la Salud del municipio Cajigal (Fundamental) (Figura 1) (ver páginas 163-169).

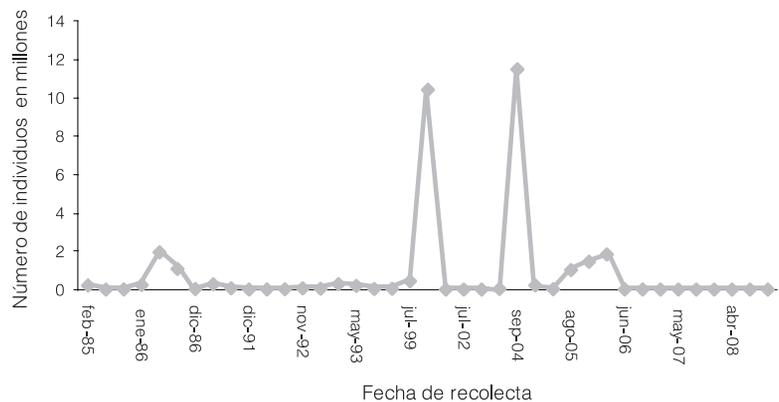


Figura 1. Densidades poblacionales estimadas de adultos de *Hylesia metabus* capturados en trampas de luz en el golfo de Paria desde 1985 hasta 2008. *Los datos para 2004 son aproximados. (Fuentes: Vásquez 1994; Herrera *et al.* 2007).

En otras regiones de Venezuela existen reportes como en el estado Monagas, municipio Sotillo (Vásquez 1990) municipio Maturín (Vásquez 1990; Cortez 2003), especialmente la zona del caño San Juan y los caños cercanos (Vásquez 1990) y el municipio Aguasay en las localidades de El Aceital y El Salto; en el estado Delta Amacuro (municipios Pedernales y Tucupita); en los estados Miranda y Nueva Esparta (isla de Coche) (Vásquez 1990); y, más recientemente un reporte nuevo, en junio de 2008, en el estado Bolívar, Pueblo Guri (alrededor de la zona norte de la represa de Guri), municipio Raúl Leoni. La mayoría de estos reportes son de los trabajos rutinarios de Gsace IX Fundasalud, estado Sucre y el Ministerio del Poder Popular para la Salud (Figura 2).

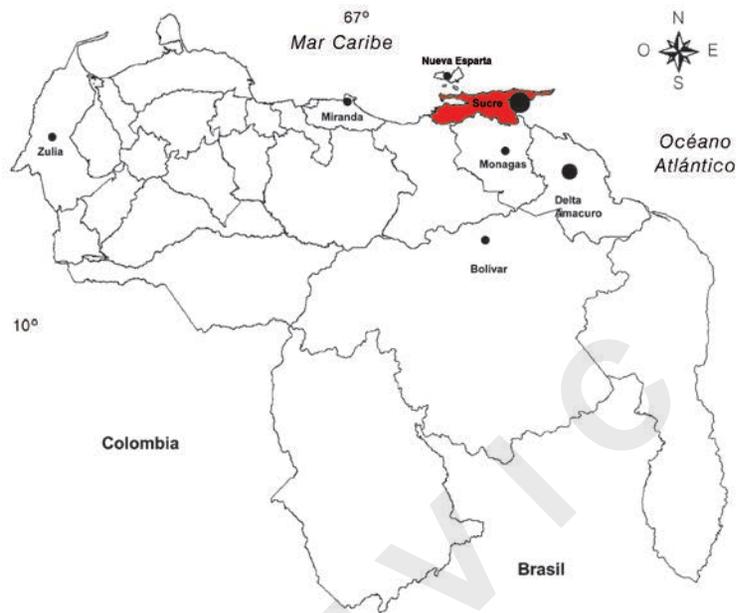


Figura 2. Distribución actual de *Hylesia metabus* en Venezuela. Los puntos indican dónde se ha reportado la presencia de esta polilla. El tamaño del punto indica las zonas de mayor importancia como plaga de salud pública.

Hábitat y plantas hospederas de *Hylesia metabus*

Como se puede apreciar de la distribución geográfica de *H. metabus*, el hábitat de esta especie en Venezuela se encuentra, en general, delimitado por las zonas de manglar que abarcan desde el golfo de Paria, en el norte del país, hasta el sur del estado Delta Amacuro y la frontera con Guyana. Esto se debe principalmente a que las plantas hospederas principales de *H. metabus* son el mangle rojo, *Rhizophora mangle* L., el mangle negro, *Avicennia germinans* (L.) L. y el mangle blanco, *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn. f., siendo *R. mangle* la hospedera preferida por esta especie (Vásquez 1994). Sin embargo, observaciones de campo indican que *H. metabus* también puede alimentarse de hojas de las siguientes especies de plantas: *Psidium guajava* L. (Guayaba); *Hura crepitans* L. (Jabillo); *Anacardium*

occidentale L. (Merrey); *Syzigium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry, (Pumalaca); *Syzigium cumini* Skeels (Uva pesajua); *Erythrina poeppigiana* (Walp.) O. F. Cook, (Bucare) (Vásquez 1990; Vásquez 1994), *Vismia* sp. (Patillo Colorado); *Virola sebifera* Aubl, (Cuajo); *Inga edulis* Mart. (Guama) y *Simaba cedron* Planch. (Jobo liso) entre otros.

Además, se han realizado algunos trabajos que estudian el desarrollo de *H. metabus* sobre diferentes plantas hospederas a partir del tercer estadio (Osborn *et al.* 2001), en el que se encontró que al menos una proporción de las larvas pudieron sobrevivir sobre *L. racemosa* (16 %), *H. crepitans* (5 %) (Osborn *et al.* 2001), *P. guajaba* (1 % y 3 %) (Cortez *et al.* 2001; Osborn *et al.* 2001, respectivamente), y *S. cumini* 81 % (Cortez *et al.* 2001).

BIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO

Ciclo de vida

Hylesia metabus, como todos los lepidópteros, es un insecto holometábolo, por lo que presenta cuatro fases durante su ciclo de vida (huevo, larva, pupa e imago o adulto); es decir sufre una metamorfosis completa (Figura 3), la cual tiene una duración de 97-105 días (Vásquez 1990; Benaim-Pinto *et al.* 1991; Vásquez 1994). Aunque no todos los individuos de una población nacen el mismo día, el ciclo se encuentra, en términos generales, sincronizado:

toda la población se encuentra en una sola etapa de desarrollo en un momento dado. Sin embargo, en diferentes localidades geográficas, este ciclo puede verse adelantado o retrasado (Vásquez 1990; Benaim-Pinto *et al.* 1991; Osborn *et al.* 2001). El fenómeno de encontrar todas las fases cuando las poblaciones y su dispersión disminuyen considerablemente, pareciera repetirse también cuando aumentan considerablemente, como ocurre en la actualidad.

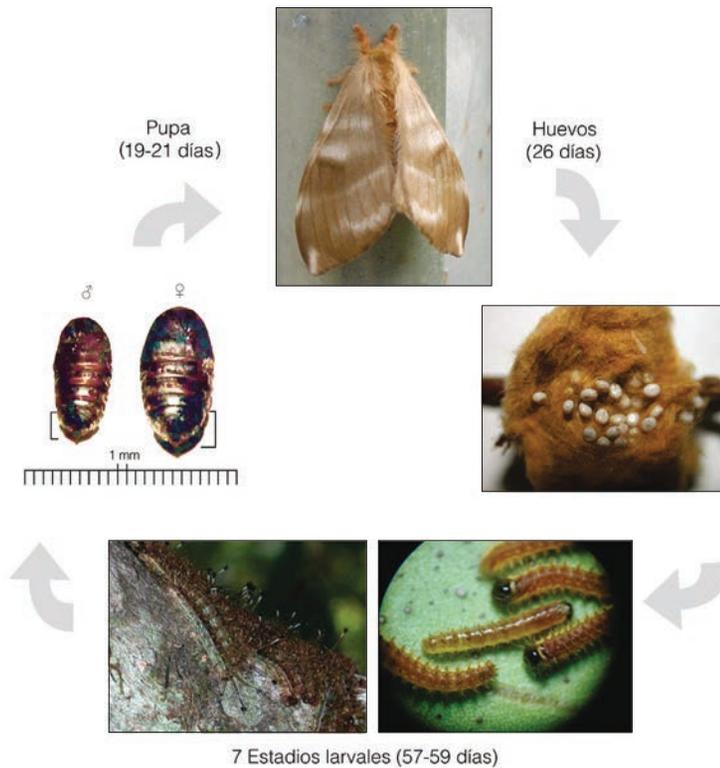


Figura 3. Ciclo de vida de *Hylesia metabus*.

Los huevos de *H. metabus* son pequeños, blancos y redondos. Cada hembra ovipone una sola masa ovígera, que consta de 300-400 huevos (Benaïm-Pinto *et al.* 1991; Vásquez 1994). Los huevos son recubiertos con las setas abdominales para formar una estructura ovalada, color amarillo-marrón, de 1 cm de ancho y de 1 cm de largo (Lundberg *et al.* 2005). Esta etapa dura aproximadamente 26 días, al cabo de la cual eclosionan las larvas, las cuales pasan por siete instares larvales, cada uno de los cuales dura de 7 a 8 días (ver Tabla 2). Las larvas son de color marrón oscuro a negro. En cada segmento del cuerpo se presentan grupos de setas urticantes

Tabla 2. Tamaño de la cápsula cefálica y duración en cada estadio c de *H. metabus* (Fuente: Vásquez, 1994).

Estadio larval	Tamaño de la cápsula cefálica (mm) $\bar{X} \pm DE$	Duración (Días) $\bar{X} \pm DE$
I	0,20 ($\pm 0,58$)	8,5 ($\pm 1,68$)
II	0,77 ($\pm 0,03$)	7,8 ($\pm 0,02$)
c	1,08 ($\pm 0,04$)	7,7 ($\pm 0,06$)
IV	1,51 ($\pm 0,05$)	7,7 ($\pm 0,12$)
V	2,04 ($\pm 0,07$)	8,2 ($\pm 2,07$)
VI	2,67 ($\pm 0,08$)	8,7 ($\pm 0,05$)
VII	3,77 ($\pm 0,09$)	9,3 ($\pm 0,07$)

DE = Desviación estándar.

arreglados en arcos dorso laterales. La cabeza es de color ámbar y las setas del protórax emergen como una corona en su parte posterior (Figura 3) (Vásquez 1994; Berlioz 2002). El sexo de las larvas no puede ser distinguido por la morfología externa, pero internamente las larvas machos presentan un par de testículos en el quinto segmento abdominal.

La etapa de pupa tiene una duración de 19-21 días. Son de color marrón muy oscuro y muestran un dimorfismo sexual marcado (Figura 4). Las hembras son significativamente mayores que los machos y pesan significativamente más ($\bar{X}_{\text{♂}} = 0,356$ g; $DE \pm 0,09$ comparado con $\bar{X}_{\text{♀}} = 0,238$ g; $DE \pm 0,03$) (Osborn *et al.* 2001). Morfológicamente, las hembras tienen un par de hendiduras longitudinales, curvadas, en la parte ventral anterior, mientras que los machos presentan dos protuberancias redondas (Figura 4) (Rodríguez 2001).

Los adultos tienen un cuerpo robusto cuyo color varía entre marrón, marrón amarillento y grisáceo. El cuerpo está densamente cubierto de setas, encontrándose la mayor cantidad de éstas en el abdomen. En relación a la longevidad de los adultos, Vásquez (1994) indica que el rango de variación para ambos sexos es de 3 a 6 días con una media para los machos de $\bar{X} = 4,7 \pm 0,8$ días y $\bar{X} = 4,6 \pm 0,5$ días para las hembras. Por otro lado, Vassal (1989) indica que la duración de los adultos de *H. metabus* no es mayor de 3 ó 4 días en individuos criados en el laboratorio. Estos resultados difieren de Fornés & Hernández (2000), quienes reportaron una longevidad promedio para los machos de $7,05 \pm 1,58$ días ($n = 99$), y la de las hembras de $6,24 \pm 1,21$ días ($n = 25$), presentando un intervalo para los machos de 3 a 11 días y de 4 a 10 días para las hembras. De los resultados presentados se puede apreciar que la longevidad determinada para los adultos de *H. metabus* es variable y puede depender, entre otros factores, de las condiciones de cría de las mariposas, el estado en el cual fueron recolectadas en el campo, la temperatura, la humedad y posiblemente de factores genéticos.

La proporción macho:hembra de pupas y adultos de esta polilla es muy variable, Fornés & Hernández (2001) reportaron que la proporción macho:hembra de pupas recolectadas en el campo fue de 2,29:1 y la proporción de adultos que emergieron fue de 2,59:1 en individuos

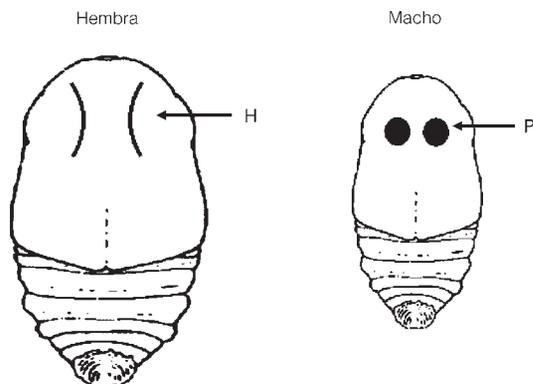


Figura 4. Vista ventral de las pupas de *Hylesia metabus*. Nótese el mayor tamaño y la presencia de hendiduras (H) en la hembra, comparado con el tamaño menor y la presencia de protuberancias redondas (P) en el macho. Fuente: Rodríguez (2001).

capturados como pupas y que eclosionaron en el laboratorio, durante dos ciclos de vuelo. En ambos lapsos el parasitismo y la mortalidad natural de pupas tuvieron un mayor efecto sobre los machos que sobre las hembras. Por su parte, Osborn *et al.* (2001) encontraron que la proporción macho:hembra de las pupas y de los adultos difirió dependiendo de la planta hospedera y variaron entre 1,4:1 (*L. recemosa*) y 9:1 (*R. mangle*) en las pupas y 1:1 (*P. guajava*) y 4,3:1 (*R. mangle*) para los adultos. En ambos estudios la proporción de machos siempre fue mayor. Estos resultados difieren de los de Vásquez (1994), quien reportó proporciones de adultos machos:hembras entre 0,04:1 y 1,06:1, en individuos capturados con trampas de luz en 18 generaciones de mariposas, durante los años 1988-1987 y 1991-1993. Hernández *et al.* (2009) y observaciones personales (J. V. Hernández) sobre la proporción sexual de pupas en el campo indican que existen más machos adultos que hembras. Es posible que la diferencia entre los resultados tenga que ver con el hecho de que Vásquez (1994) obtuvo sus datos a partir de individuos capturados con trampas de luz, mientras en los estudios de Fornés & Hernández (2000) y Osborn *et al.* (2001), los resultados se obtuvieron a partir de adultos que emergieron en el laboratorio. Las observaciones personales en el campo sugieren que las hembras de *H. metabus* son más atraídas a la luz que los machos, aunque no se han realizado experimentos al respecto. De todos los datos presentados, se puede inferir que *H. metabus* muestra una proporción sexual variable, que puede depender de diversas causas tales como: temperatura, humedad, pluviosidad, hábitat, depredadores, parasitoides y disponibilidad y tipo de sustrato alimenticio, entre otros (Fornés & Hernández 2000).

Comportamiento de los adultos

La biología y comportamiento de los adultos de *H. metabus* han sido poco estudiados. Vassal (1989) realizó un estudio completo sobre la biología y la ecología de *H. metabus* donde incluyó observaciones sobre las horas de actividad de vuelo de los adultos, el comportamiento de cópula y de oviposición y la longevidad de los adultos. Por su parte, Fornés & Hernández (2000) caracterizaron algunos aspectos de la biología de los adultos de *H. metabus* en Venezuela, incluyendo la observación de las horas de emergencia de machos y hembras de esta especie, periodicidad de la actividad de vuelo en machos y hembras, comportamiento de oviposición, horas en las que se realiza el comportamiento de llamado de las hembras y comportamiento de cópula. Finalmente, Vásquez (1990; 1994) estudió las horas de actividad de los adultos en condiciones de campo.

Fornés & Hernández (2000) encontraron que *H. metabus* emerge en horas de la mañana, entre las 7:00 y las 12:00. La mayor emergencia de machos se observó entre las 8:25 y las 9:36 y en las hembras entre las 8:43 y las 9:56. De estos datos se aprecia que los machos emergieron más temprano que las hembras. Además, se observó que la máxima emergencia de los adultos coincidió con un ascenso de la temperatura y un descenso en la humedad relativa.

Con respecto a las horas de vuelo, Vásquez (1994) señala el período de 19:00-22:00 como el de mayor actividad. Por su parte, Vassal (1989) indica que hay un período de vuelo después de la caída de la noche, hacia las 19:15, el cual es muy breve. Este lapso termina hacia las 20:00 en períodos de baja densidad poblacional y hacia las 21:00-21:30 horas en fase de altas densidades. Sin embargo, Fornés & Hernández (2000) encontraron que los machos vuelan en dos períodos, uno entre las 18:00 y las 19:00 horas y otro entre las 20:30 y 24:00. En este último, el número de machos en actividad es mucho menor que el número de machos activos durante el primer período de vuelo. Las hembras tienen su período de vuelo sincronizado con el primero de los machos. Es interesante señalar que las observaciones de Vásquez (1994) están basadas en registros hechos en zonas de mangle con la ayuda de trampas de luz, mientras que en el trabajo de Fornés & Hernández (2000) las observaciones se hicieron en un área muy próxima al manglar y tratando de simular lo mejor posible las condiciones naturales de luminosidad del manglar durante la noche.

Además, Fornés & Hernández (2000) reportan que en el período entre las 20:30-2:00, las hembras realizan el comportamiento de llamado (I y II), coincidiendo las primeras horas de este intervalo con el segundo período de vuelo de los machos. La posición observada durante el comportamiento de llamado I de las hembras vírgenes de *H. metabus* consistió en la elevación (curvado dorsal) del abdomen, así como en la protrusión de una estructura tubular ubicada en los últimos segmentos abdominales. A simple vista se pudo distinguir que esta estructura consta de dos partes diferenciadas: la parte proximal de aspecto blancuzco y la distal, que presenta setas que la cubren. En la posición de comportamiento de llamado II, sólo se observa la zona distal proyectada (Fornés & Hernández 2000). El comportamiento de llamado permite el encuentro y la cópula en lepidópteros de actividad nocturna y crepuscular; en este sentido, en la Tabla 3 se muestran diversos datos obtenidos de *H. metabus* en relación con el comportamiento de cópula, oviposición y longevidad de los adultos después del apareamiento (Fornés & Hernández 2000).

Aunque varios investigadores (Vásquez *et al.* 1984; Vassal 1989; Vásquez 1990; Vásquez 1994) han realizado estudios de la biología de *H. metabus*, incluso en épocas de alta incidencia del insecto (millones de polillas volando), el único trabajo donde se observa y describe el comportamiento de cópula en esta especie es el de Fornés & Hernández (2000). Estos autores observaron que la hembra de *H. metabus* comienza a atraer al macho a las 20:30 horas, cuando se inicia el comportamiento característico de llamado (llamado II). El inicio de la cópula se realiza en horas de la noche, en el período comprendido entre las 21:37 y las 00:52 horas (Fornés & Hernández 2001). En contraste, en otra especie del mismo género, *Hylesia nanus*, la mayoría de las cópulas ocurren durante la noche, preferentemente en las primeras horas de la misma, concentrándose el período de inicio de la cópula entre las 18 y las 20 horas (Santos *et al.* 1988).

Fornés & Hernández (2000) realizaron un experimento para estudiar el comportamiento de cópula de esta especie, para lo cual colocaron 44 machos y 32 hembras distribuidos en cámaras de observación (n = 11) a diferentes densidades. Sólo se apreciaron seis parejas copulando, en 6 de las 11 cámaras instaladas. El comportamiento de cópula observado fue el siguiente: el macho ubicado a cierta distancia de la hembra (50 cm aproximadamente), comenzó a caminar y aletear rápidamente hasta llegar al sitio donde estaba la hembra. Al ubicarse frente a ella, el macho rápi-

Tabla 3. Diferentes aspectos de la biología reproductiva de *H. metabus*, observados durante el período 2 (enero-febrero de 1998).

Pareja	Edad al inicio de la cópula (horas)		Duración de la cópula (horas)	Duración de la oviposición (horas)	Longevidad de adultos después de la cópula (horas)	
	♂♂	♀♀			♂♂	♀♀
1	61,38	61,68	10,14	2:00	26	75
2	61,28	61,58	9,45	2:00	50	69
3	14,78	15,08	8,56	-	33	126
4	12,90	13,20	10,08	2:30	49	-
5	14,02	14,32	10,13	-	-	-
6	16,15	16,45	8,32	-	-	-
\bar{x}	30,09	30,39	9,38	2:10	39,5	90
DE	22,12	22,12	0,43	0:17	10	31,3

DE = Desviación estándar. Fuente: Fornés & Hernández (2000).

damente insertó el uncus (estructura quitinosa en forma de garfio localizada en el órgano genital masculino) en una pequeña área de los últimos segmentos abdominales de la hembra. Posteriormente, se sujetó por medio del uncus a la hembra y luego procedió a colocar su cuerpo en posición contraria al de ella. En esta posición, la hembra en ocasiones carga con su peso y con el del macho, ya que este último durante algunos momentos de la cópula se suspende con su aparato genital, de la hembra, sin apoyarse sobre superficie alguna con las patas. En esta posición de cópula, el macho y la hembra permanecen un promedio de 9 horas con 38 minutos (n = 6) (Tabla 3) (Fornés & Hernández 2000).

El estudio del comportamiento de vuelo de *H. metabus* realizado por Fornés & Hernández (2000) permitió determinar que los machos presentan dos picos en su actividad de vuelo, estando involucrados un mayor número de individuos en el primero. Éste puede estar relacionado con la dispersión de los individuos, mientras que el segundo se relaciona con la actividad sexual del insecto, ya que coincide con las horas en que las hembras realizan el comportamiento de llamado II. Esto se refuerza por el hecho de que las seis parejas que copularon iniciaron la cópula entre las 21:37 y las 00:52 horas, intervalo éste que se ajusta dentro del segundo período de actividad de vuelo de los machos. Matthews & Matthews (1978) reportan que en otros satúrnidos como *Samia cynthia* Drury 1773, los machos poseen dos períodos de actividad nocturna de vuelo y, al igual que en *H. metabus*, hay un mayor porcentaje de individuos involucrados en el primer período de vuelo de la noche.

Con relación al momento de la oviposición, la hembra de *H. metabus*, realiza la misma durante la noche siguien-

te a la cópula (Vassal 1989; Fornés & Hernández 2000). Vásquez (1994) indica que durante el período comprendido entre las 19:00 y las 22:00 horas, la hembra generalmente deposita sus huevos en las ramas de las plantas hospederas, aunque en muchos casos puede depositarlos en plantas no hospederas y en otros sitios como paredes y postes de alumbrado público, entre otros. En los experimentos en los que se usaron cámaras de observación del comportamiento de este insecto, se encuentra que *H. metabus* realiza una sola postura, de forma redondeada. Esta postura es cubierta con las espículas abdominales (cuatro tipos de espículas), entre las cuales se encuentran las responsables de causar dermatitis en humanos (Rodríguez *et al.* 2004). En el momento de realizar la postura y cubrirla con las setas o espículas, la hembra de *H. metabus* curva ventralmente el abdomen, dirigiéndolo hacia la superficie sobre la cual está apoyada y en la cual depositará sus huevos. Por su parte, Santos *et al.* (1988) indican que *H. nanus* realiza 1,33 posturas en un intervalo de tiempo de 1,52 días. Sin embargo, Santos *et al.* (1996) señalan para la misma especie que las posturas pueden ser realizadas durante el día o la noche con un período de preoviposición de 1,7 días, lo que indica que este período es variable para estas especies de *Hylesia*.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo (1952) Mariposas a Babor. *El Farol* Año XIV:18-29.
- Archa-Piñango C & M Layrisse (1969) Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. *The Lancet* 239:810-812.
- Bastidas R & Y Zavala (1995) *Principios de entomología agrícola*. Ediciones Sol de Barro. UNEFM. Venezuela. 398 pp.
- Benaim-Pinto C, Pernía B & R Rojas (1991) Dermatitis caused by moths of *Hylesia* genus (Lepidoptera: Saturniidae) in North-eastern states of Venezuela. I. Bioecology of *H. metabus* Cramer. Clinical features of lepidopterism determined by this species. *American Journal of Contact Dermatitis* 2:213-221.
- Benvenuti L, Cardoso J & R Moraes (1998) Cutaneous leucocytoclastic vasculitis from contact with *Hylesia* moths (Lepidoptera: Saturniidae). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92:428-429.
- Berlioz L (2002) *Aislamiento e identificación de microorganismos asociados a larvas de Hylesia metabus Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) y evaluación de su potencial entomopatogénico*. Tesis. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 62 pp.
- Biery T (1977) *Venomous Arthropod Handbook*. U.S. Government Printing Office. Washington, EE. UU. AFP-161-43. 40 pp.
- Casalá A, Bianchi C, Sánchez-Navarro J, Bianchi O & R Balsa (1967) Granuloma de las manos por nidos de lepidópteros (*Hylesia nigricans*). *Archivos Argentinos de Dermatología* 17:307-314.
- Cásares R (1986) Informe sobre una visita realizada a Irapa (Sucre) entre el 24 y 27 de mayo de 1982 a solicitud del Ministerio del Ambiente, debido a la presencia en el área de la «palometa peluda» (*Hylesia* sp.). Ministerio del Ambiente. Caracas, Venezuela. 8 pp.
- Cortez L (2003) Comparación de la sobrevivencia en larvas de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) al suministrarles una dieta de tres especies de hospederas alternos. I Jornadas de *Hylesia metabus*. Yaguaraparo, estado Sucre. 36 pp.
- Cortez L, Malaver E, Bouquet O & T González (2001) Comparación de la sobrevivencia en larvas de *Hylesia metabus* Cramer al suministrarles una dieta de tres especies de hospederas alternos. XVII Congreso Venezolano de Entomología. Maturín, Venezuela. 1 pp.
- Couppié P, Marty C, Saint-Marie D & R Pradinaud (1998) Poisonous caterpillars in French Guyana. 5 cases. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 125:489-491.
- De Roodt A, Salomón O & T Orduna (2000) Accidentes por lepidópteros con especial referencia a *Lonomia* sp. *Medicina* (Buenos Aires) 60:964-972.
- Dinehart S, Archer M, JE Jr Wolf, McGavran M, Reitz C & E Smith (1985) Caripito itch: dermatitis from contact with *Hylesia* moths. *Journal of American Academy of Dermatology* 13:743-747.
- Ducombs S, Lany M, Michel M, Pradinaud R, Jamet P, Vincendeau P, Maleville J & L Texier (1983) La papillonite de Guyane Françoise. Étude clinique et épidémiologique. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 110:809-816.
- Fernández G, Morales E, Beutelspacher C, Villanueva A, Ruiz C & C Steller (1992) Epidemic dermatitis due to contact with a moth in Cozumel, México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46:560-563.
- Fornés L & J Hernández (2000) Algunos aspectos de la biología de *H. metabus* (Cramer, 1775) (Lepidoptera: Saturniidae). *Boletín de Entomología Venezolana* 15(2):127-145.
- Fornés L & J Hernández (2001) Reseña histórica e incidencia en la salud pública de *Hylesia metabus* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) en Venezuela. *Entomotropica* 16:137-141.
- Glasser C, Cardozo J, Carréri G, Domingos M, Pinto H & C Ciavolo (1993) Surtos epidémicos de dermatite causada por mariposas do gênero *Hylesia* (Lepidoptera: Hemileucidae) no Estado do São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública* 27: 212-220.
- Grosshans E & R Pradinaud (1979) Dermatologie in Französisch-Guayana. *Der Hautarzt Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie und Verwandte Gebiete* 30:443-445.
- Hernández J, Osborn F, Herrera B, Liendo-Barandiarán C, Perozo J & D Velásquez (2009) Parasitoides larva-pupa de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región nororiental de Venezuela: un caso de control biológico natural. *Neotropical Entomology* 38:243-250.
- Herrera M, Osborn F, Díaz L, Velásquez D, Díaz S, Ramírez G & L González (2007) El monitoreo de las poblaciones de *Hylesia metabus* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) en el estado Sucre: base fundamental de su control. XX Congreso Venezolano de Entomología. San Cristóbal, Venezuela. 1 p.

- Hill W, Rubenstein A & J Kovacs (1948) Dermatitis resulting from contact with moths (Genus *Hylesia*). *Journal of the American Medical Association* 138:737-740.
- Jörg M (1969) Nódulo inflamatorio subcutáneo por espículas de *Hylesia fulviventris* (Lepidoptera). *Boletín Chileno de Parasitología* 24:146-150.
- Kurdna O (1986) Aspects of the conservation butterflies in Europe. En: Kurdna O (Ed) *Butterflies of Europe*. Wiesbaden: Aula-Verlag. Alemania. pp. 8-323.
- Lamy M & J Werno (1989) Le papillon du Bombyx «Cul brun» *Euproctis chrysochroa* L. (Lépidoptères) responsable de papillonite en France: interprétation biologique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Serie III, Sci de la Vie* 309:605-610.
- Lemaire C (2002) *The Saturniidae of America: Les Saturniidae Américains. Hemileucinae (= Attacinae)*. Evers Keltern, Alemania. 1388 pp.
- Lundberg U, Osborn F, Carvajal Z, Gil A, Guerrero B & C Arocha-Piñango (2002) Isolation and partial characterization of a protease with kallikrein-like activity from the egg nests of *Hylesia metabus* (Cramer, 1775) (Lepidoptera: Saturniidae), preliminary communication. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias LUZ* 12:102-110.
- Lundberg U, Albornoz A, Sánchez F & F Osborn (2005) Morfología de las posturas de huevos de *Hylesia metabus* (Cramer, 1775) (Lepidoptera: Saturniidae) en comparación con la morfología de los vellos abdominales de los adultos. *Entomotropica* 20:127-204.
- Marsh N & C Arocha-Piñango (1971) Observations on a saturniid moth caterpillar causing severe bleeding in man. *Journal of Proceedings of the Entomological Society of London* 36:9-10.
- Martínez J (1986) Informe sobre invasión de mariposas alergizantes. Hospital Centro de Salud «Irapa». Estado Sucre, Venezuela. 5 pp.
- Matthews R & J Matthews (1978) *Insect Behavior*. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, EUA. 507 pp.
- Osborn F, Motabán L & J Gutiérrez (2001) Crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) alimentadas con cuatro diferentes plantas hospederas. *Saber* 31:14-22.
- Paoletti M (1999) Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture Ecosystems and Environment* 74:1-18.
- Pearson D (1994) Selecting indicator taxa for the quantitative assessment of biodiversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences*. 345:75-79.
- Rodríguez-Acosta A, Rubiano H, Reyes M & C Fernández (1998) Dermatitis caused by *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Hemileucidae) in the coastal region of the State of Delta Amacuro, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 50:215-217.
- Rodríguez-Morales A, Arria M, Rojas-Mirabal J, Borges E, Benitez J, Herrera M, Villalobos C, Maldonado A, Rubio N & C Franco-Paredes (2005) Lepidopterism due to exposure to the moth *Hylesia metabus* in northeastern Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73:991-993.
- Rodríguez J (2001) Morfología externa e interna de setas abdominales de hembras adultas de *Hylesia metabus* (Lepidoptera: saturniidae). Trabajo de grado. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 36 pp.
- Rodríguez J, Hernández J, Fornés L, Lundberg U, Arocha-Piñango C & F Osborn (2004) External morphology of abdominal seate from male and female *Hylesia metabus* adults (Lepidoptera: Saturniidae) and their function. *Florida Entomologist* 87:32-36.
- Roth L & T Eisner (1962) Chemical defenses of arthropods. *Annual Review of Entomology* 7:107-136.
- Rothschild J, Reichstein T, J von Euw, Plin R & R Herman (1970) Toxic Lepidoptera. *Toxicon* 8:293-299.
- Salomón A, Simón D & J Rimoldi (2005) Lepidopterismo por *Hylesia nigricans* (mariposa negra): Investigación y acción preventiva en Buenos Aires. *Medicina* (Buenos Aires) 65:241-246.
- Santos G, Dos Anjos N & J Zanuncio (1988) Biology of *Hylesia nanus* (Walker, 1885) (Lepidoptera: Attacidae), a defoliator of cutieira (*Joannesia princeps*: Euphorbiaceae). *Revista Ceres* 35:479-485.
- Santos G, Zanuncio T, Dias S & J Zanuncio (1996) Biology of *Hylesia nanus* (Walker) (Lepidoptera: Attacidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 25:479-482.
- Scoble M (1992) *The Lepidoptera. Form, Function and Diversity*. Oxford University Press. New York, USA. 404 pp.
- Vásquez L (1990) Estudio bioecológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer en el oriente de Venezuela. *Saber* 3:14-20.
- Vásquez L (1994) Estudio bioecológico y estrategias de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región oriental. Períodos 1985 - 1987 y 1991 - 1993. Informe del Consejo de Investigación. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 93 pp.
- Vásquez L, Olivares M & A Villegas (1984) Ciclo biológico y estacionalidad de la palometa *Hylesia* sp. (Lepidoptera, Saturniidae) en la región oriental venezolana. IX Congreso Venezolano de Entomología. San Cristóbal, Edo. Táchira, Venezuela. pp.
- Vassal J (1989) *Biologie, écologie et de la pathologie d'Hylesia metabus* (Cramer, 1775) (Lepidoptères: Saturniidae), agent de la papillonite en Guyane Française: mise en place d'une structure de lutte integre. Tesis. Université des Sciences et Techniques du Languedoc. Académie de Montpellier. 249 pp.
- Vicente S (1952) Dermatitis producidas por mariposas. Algunas observaciones sobre un brote estudiado en Venezuela. *Acta Científica Venezolana* 3:88-90.
- Wirtz R (1984) Allergic and toxic reaction to non-stinging arthropods. *Annual Review of Entomology* 29:47-69.
- Zaias N, Ioannides G & D Taplin (1969) Dermatitis from contact with moths (Genus *Hylesia*). *Journal of the American Medical Association* 207:525-527.
- Zak R (1986) *A Field Guide to Florida Critters: Common Household & Garden Pests*. Taylor Publishing. Dallas, USA. 294 pp.

Rasgos morfológicos, taxonomía y nomenclatura de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])

Ángel L. Viloría*¹, José Enrique Piñango^{1,2}, Carmen Virginia Liendo-Barandiaran³ y José V. Hernández E.³

¹Laboratorio de Biología de Organismos, Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Apartado Postal 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

²Insectario, Zoológico El Pinar, Av. Guzmán Blanco. Cota 905. El Paraíso, Caracas, Venezuela.

³Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edif. Física y Electrónica I, piso 1, Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

*aviloria@ivic.gov.ve

Resumen

Hylesia metabus (Cramer, [1775]), una especie de polilla urticante neotropical (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae), fue descrita originalmente de Surinam. Descripciones posteriores del mismo taxón, con base en muestras individuales procedentes también de Surinam, Guayana Francesa y Venezuela han producido al menos otros cinco nombres, todos considerados ahora sinónimos subjetivos posteriores de *H. metabus*. Tras una redescrición de algunos caracteres morfológicos externos, taxonómicamente relevantes, de esta especie y de sus estructuras genitales, se observa que la aparente complejidad en su historia nomenclatural se debe principalmente a la pobre interpretación previa de su plasticidad fenotípica y de su amplia distribución geográfica. En cualquier caso, su taxonomía se considera actualmente bien resuelta.

Abstract

Morphology, systematics and nomenclature of *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])

Hylesia metabus (Cramer, [1775]), an urticant Neotropical moth species (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae), was originally described from Suriname. Subsequent descriptions of the same taxon, based on individual samples coming also from Suriname, French Guiana and Venezuela have yielded at least five other names, all of them now considered junior objective synonyms of *H. metabus*. After redescribing some taxonomically relevant external morphological characters of this species and its genitalic structures, we observed that the apparent complexity of its nomenclatural history is mainly due to previous poor interpretations of its phenotypic plasticity and its wide geographic range. In any case, its taxonomy is currently considered resolved.

Palabras clave Key words

Hemileucinae, *Hylesia*, Lepidoptera, palometa peluda, Saturniidae.
Caripito-itching moth, Hemileucinae, *Hylesia*, Lepidoptera, Saturniidae.

PRESENTACIÓN

Hylesia metabus fue originalmente descrita de Surinam e ilustrada por Pieter Cramer en la primera parte de su voluminosa obra *De Uitlandsche Kapellen*, la cual apareció y comenzó a circular en 1775, aun cuando el pie de página de la misma, encuadernada, indica una fecha posterior (Dos Passos, 1958; Chainey, 2003). Cramer siguió entonces el sistema de Linneo, que clasificaba a los lepidópteros de acuerdo al tipo de antena en mariposas, esfinges y falenas. Al último grupo, *Phalaena* o mariposas nocturnas, le asignó ocho secciones: Attaci, Bombyces, Noctuae, Geometrae, Tortrices, Pyrales, Tinea y Alucitae; que entonces equivalían a familias taxonómicas. Llamó vulgarmente a las Bombyces, *Zyden Spinders* (en holandés) o *Phalènes fileuses* (en francés), y las definió por sus antenas pectinadas y por las alas «en techo» (*ils ont les antennes en peigne, les ailes en toit, les inferieures debordent, les supérieures à leur base*), refiriéndose seguramente a la posición del animal vivo y en reposo, en la cual las alas quedan plegadas a la manera de un tejado de dos aguas, quedando las superiores alineadas con el cuerpo y las inferiores sobresaliendo distalmente del abdomen, más allá de las primeras. Al describir *metabus* entre las Bombyces, cogimos que el primer nombre disponible para esta especie fue *Phalaena Bombyx Metabus* [sic] Cramer.

La descripción original, bastante sinóptica (ver abajo), fue complementada con un grabado coloreado en aguada que representa una hembra adulta en cuyas alas, de matiz rojizo, se aprecia poco o ningún detalle de diseño (Cramer [1775], pp. 117, pl. 74, Fig. D). No obstante, el autor señala algunos caracteres morfológicos definitivos, como la espiritrompa imperceptible, el cuerpo muy velludo y la presencia de antenas filiformes en hembras y plumosas en machos; alas translúcidas con rojizo uniforme en ambas superficies, el cual es conferido por las pocas escamas que las cubren. Se añadía que la muestra estudiada provenía de Surinam y que se encontraba en la colección del «Señor Ministro E. F. Alberti».

Exceptuando la procedencia geográfica, con los datos disponibles en aquella descripción, y careciendo de un ejemplar tipo al cual referirse –Lemaire (2002) asegura que está perdido–, sería difícil separar una sola especie de varios de los 110+ taxones que se conocen hoy en día dentro del género *Hylesia* Hübner. El mismo Cramer, en un fascículo posterior de la obra ya mencionada (*De Uitlandsche Kapellen* vol. 4, [1780]: pág. 28, lám.

304, Fig. C), describió otra vez esta especie de *Phalaena* proveniente de Surinam con un nuevo epíteto (*obsoleta*) y bajo el género *Attacus* (!), produciendo así, él mismo, el primer sinónimo de *Hylesia metabus*, aunque en este caso la ilustración pareciera mejor lograda que en la descripción original de 1775.

A finales del siglo XVIII y principios del siglo XIX, Jacob Hübner (1761-1826), entomólogo de Augsburgo, emprendió la clasificación y catalogación de la fauna lepidopterológica conocida mundialmente en su tiempo, y entre 1785 y 1825 dejó al menos 16 libros fundamentales para la sistemática de mariposas y polillas del mundo, en los que abundan descripciones e ilustraciones originales, nominación de cientos de nuevas especies y géneros, establecimiento de familias y numerosos otros taxones. La aparición de esta vasta obra ocurrió de manera seriada por fascículos que se imprimieron a cuenta privada del autor, muchos de los cuales carecían de la fecha de impresión. Mientras tanto, otros autores hicieron lo propio, describiendo también nuevos taxones, algunos de los cuales representaban las mismas especies propuestas por Hübner. Con el paso del tiempo esta situación generó durante décadas un caos difícil de resolver en lo que respecta al principio de prioridad que establece el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Solamente un estudio pormenorizado de múltiples fuentes de información, incluyendo los manuscritos del propio Hübner, los catálogos de venta de sus publicaciones, y el acopio de resultados de no pocos esfuerzos, realizados por entomólogos de varios países, permitió la confección y aparición del esclarecedor trabajo de Francis Hemming (1937) en el que se establece con mucha precisión las fechas y secuencias de publicación de la obra de Hübner. Siguiendo a Hemming, descubrimos que en la parte correspondiente al año 1820 del libro *Verzeichniss bekannter Schmettlinge* [sic], Hübner crea y describe brevemente el género *Hylesia*, adjudicándole cuatro especies anteriormente descritas por Cramer, que este último había ubicado en otros géneros: *Hylesia Phadina* [sic], *H. Orasia* [sic], *H. Canitia* [sic] y *H. Obsoleta* [sic]. Sin embargo, injustificadamente, quizás por haber detectado una homonimia, Hübner introduce el nombre *H. Boarmia* [sic], que es de su autoría, en sustitución de *H. Obsoleta*. Obviamente, la prioridad nominal corresponde a éste último epíteto, como lo interpretó Kirby (1892), aun cuando asignara erróneamente su autoría a

Stoll, quien solamente fue autor de un suplemento póstumo a la obra de Cramer.

Llama la atención que Hübner no sólo omitiera la asignación de *metabus* Cramer a su nuevo género, sino que la ubicara aparte en el género *Antarctia* (también nuevo) bajo una tribu y una subfamilia distinta (Apéndice I pág. 207). Corresponde posteriormente a Harrison Dyar (1913) el rescate del nombre *metabus* y su apropiado reconocimiento con el género *Hylesia*; no obstante, resulta curioso y aparentemente contradictorio que habiendo presentado por primera vez esta combinación taxonómica, *Hylesia metabus* (Cramer), dude que el animal representado en la ilustración de Cramer se trate de una *Hylesia* (textualmente, pp. 133: «*This is not at all certainly a Hylesia.*» Dyar, *op. cit.*). Por otro lado, este autor cree reconocer en *Hylesia obsoleta* (Stoll) [*sic*] una especie también dudosa pero distinta de *H. metabus*, y se queja de la pobreza de las ilustraciones de Cramer y de las dificultades que de ella derivan para una identificación confiable («*A female, all pinkish, with ill-defined paler lines. The Cramer figures are mostly very poor and inaccurate in detail, lacking the characteristic appearance of the insects. This makes their identification very difficult. The present species may not be a Hylesia at all.*» Dyar, 1913: 133). Estos casos sustentan la opinión ya expresada en el tercer párrafo de este artículo, que las descripciones e ilustraciones de Cramer serían insuficientes para asociar con seguridad un taxón venezolano con el nombre de *Hylesia metabus*, máxime cuando es imposible ubicar los especímenes tipo originarios de Surinam, sobre los cuales se basaron las descripciones de Cramer. Las obras posteriores de Draudt (1929) y Schüssler (1934) carecen de autoridad ante este problema, ya que, si

bien tienen el mérito de constituir los primeros catálogos taxonómicos más o menos depurados de este grupo de polillas satúrnidas, y en el caso de Draudt de contribuir con algunas especies nuevas, no van más allá de recopilar parcialmente las opiniones de Kirby (1892) y confiar en la revisión preliminar de Dyar (1913), determinando la preservación de ambos nombres en las listas nominales de los Hemileucinae americanos.

Para complicar aún más el escenario, la especie que nos ocupa fue descrita después tres veces más con distintos nombres. El primero de los sinónimos modernos fue *Hylesia grisoli*, especie propuesta por Bouvier (1923) para muestras de *H. metabus* obtenidas en Venezuela (estado Miranda) y en la Guayana Francesa (Saint-Laurent-du-Maroni). Lemaire (2002) localizó el tipo putativo en el Museo Nacional de Historia Natural de Francia, recolectado en Caucagua, estado Miranda, en noviembre de 1922 por el naturalista y comerciante Mayeul Grisoli (Apéndice II pág. 207). El mismo había sido previamente advertido en dicha colección y señalado con una etiqueta roja por P. Viette. Más tarde, Floch & Abonnenc (1944) describieron *Hylesia urticans* en la Guayana Francesa, que resultó obviamente un sinónimo subjetivo posterior de *H. metabus*. De esta descripción no existe ni siquiera una serie de especímenes testigos, aunque es evidente que se trata del mismo taxón venezolano. *Hylesia caripitox* fue descrita por Orfila (1951) con base en especímenes recolectados en Caripito, estado Monagas, Venezuela. El holotipo macho (guardado en el Museo Argentino de Ciencias Naturales) fue examinado por Lemaire durante la elaboración de su última monografía del género *Hylesia*, lo cual le permitió concluir que se trataba de un nuevo sinónimo de *H. metabus*.

TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN

Regnum Animalia, Phylum Arthropoda, Classis Insecta, Ordo Lepidoptera, Subordo Glossata, Divisio Ditrysia, Sectio Cossina, Subsectio Bombycina, Superfamilia Bombycoidea, Familia Saturniidae, Subfamilia Hemileucinae.

Familia Saturniidae, subfamilia Hemileucinae

La familia Saturniidae se considera monofilética y contiene aproximadamente 1480 especies, incluidas en 165 géneros (Lemaire & Minet, 1999). Dentro de ella

se distinguen los Hemileucinae americanos por la siguiente combinación de caracteres: machos con antenas desnudas, desprovistas de escamas; pilíferos y márgenes clipeales sin cerdas; antenas cuando son cuadrípectinadas, con ramas apicales usualmente adyacentes a la rama basal del siguiente segmento; palpos labiales ocasionalmente fusionados; alas posteriores sin venas transversales (o apenas vestigiales), sin prolongaciones en forma de colas; alas anteriores sin ocelos; protuberancia frontal presente; presencia de conos antenales simples (Kristensen, 1999, 2003).

Género *Hylesia* Hübner, [1820]

Hylesia Hübner, [1820]: 186. Especie típica: *Phalaena Bombyx Canitia* [sic] Cramer, [1780]: 28, pl. 304, Fig. D (hembra). Designada posteriormente por Kirby (1892: 792).

Antarctia Hübner, [1820]: 191. Especie típica: *Phalaena Bombyx Metabus* [sic] Cramer, [1775]: 117, lám. 74, Fig. D (hembra). Designada posteriormente por Watson, Fletcher & Nye (1980: 11).

Hylosia Hübner; Herrich-Schäffer, [1855]: 90 [error tipográfico].

Micrattacus Walker, 1855: 1199 (clave) (*nomen nudum*). Especie típica: *Micrattacus nanus* Walker, 1855: 1335, No. 1. Por monotipia subsecuente.

Hyelosia Hübner; Berg, 1875: 157 [error tipográfico; distinto de *Hyelosia* Hübner, 1818 (Geometridae)].

Hylesia metabus (Cramer, [1775])

Phalaena Bombyx Metabus [sic] Cramer, [1775]: 117, lám. 74, Fig. D (hembra)

Phalaena Attacus Obsoleta [sic] Cramer, [1780]: 28, lám. 304, Fig. C (hembra)

Hylesia Boarmia [sic] Hübner, [1820]: 186, No. 1920.

Antarctia Metabus [sic] (Cramer); Hübner, [1820]: 181, No. 1966.

Hylesia Boarmia [sic] Hübner; Kirby, 1892: 846, No. 3 [como sinónimo de *obsoleta* Stoll].

Hylesia metabus (Cramer) [sic]; Dyar, 1913: 133; Draudt, 1929: 756; Schüssler, 1934: 397.

Hylesia obsoleta (Stoll) [sic]; Dyar, 1913: 133; Draudt, 1929: 758; Schüssler, 1934: 399.

Hylesia Grisoli [sic] Bouvier, 1923: 358, Fig. 2 (macho).

Hylesia grisoli Bouvier; Draudt, 1929: 758; Schüssler, 1934: 390 [ambos como sinónimo de *H. andrei* Dognin]; Lamy & Lemaire, 1983: 189; Lemaire, 2002: 204 [ambos como sinónimo de *H. metabus*].

Hylesia urticans Floch & Abonnenc, 1944: 1, Figs. 1-4.

Hylesia caripitox Orfila, 1951: 120, Fig. 1 (macho).

Hylesia metabus (Cramer); Lamy & Lemaire, 1983: 178, 179, 186, 189, Fig. 1, A, B; Vassal, 1987: 1-146; Lemaire & Venédicoff, 1989: 29, No. 162; Lemaire, 1996: 42; No. 558; 2002: 203-206, lám. 18, Figs. 1-4.

Hylesia urticans Floch & Abonnenc; Lamy & Lemaire, 1983: 178, 179, 189; Lemaire, 2002: 204 [ambos como sinónimo de *H. metabus*].

Hylesia obsoleta (Cramer); Lamy & Lemaire, 1983: 189; Lemaire, 2002: 203 [ambos como sinónimo de *H. metabus*].

Hylesia boarmia Hübner; Lamy & Lemaire, 1983: 189; Lemaire, 2002: 203 [ambos como sinónimo de *H. metabus*].

Hylesia caripitox Orfila; Lamy & Lemaire, 1983: 189; Lemaire, 2002: 204 [ambos como sinónimo de *H. metabus*].

Localidad típica: Surinam (por designación original).

Especímenes tipos:

1 Neotipo (hembra), Surinam (Museo Nacional de Historia Natural, París, Francia). Un único ejemplar fue designado subsecuentemente por Lemaire (2002: 204) como neotipo para los nombres *metabus* Cramer y *obsoleta* Cramer, tras asumir la pérdida de las series típicas originales (machos y hembras). Se discute este caso ampliamente en la sección «Remarks» sobre esta especie en la monografía de Lemaire (*op. cit.*, pp. 205).

1 Lectotipo (macho), Venezuela, Miranda, Caucagua, nov. 1922 (donado por M. Grisol, 1923) (Museo Nacional de Historia Natural, París, Francia), designado subsecuentemente por Lemaire (2002: 204) para la especie *Hylesia grisoli* Bouvier.

1 Holotipo (macho), Venezuela, [Monagas], Caripito (Guido d'Avanzo) (Museo Argentino de Ciencias Naturales, Buenos Aires, Argentina). Por designación original para la especie *Hylesia caripitox* Orfila (1951: 120).

Nota: No se designó ningún espécimen tipo en la descripción de *Hylesia urticans* Floch & Abonnenc (1944: 1). Se desconoce la existencia del mismo (Lemaire, 2002).

Rasgos morfológicos generales

Hylesia es un género de polillas o mariposas nocturnas de tamaño mediano a pequeño, con alas oscuras, generalmente desprovistas de caracteres prominentes en las alas, o en el caso de poseer algunas marcas características, estas son muy tenues o poco definidas. Corrientemente presentan dimorfismo sexual marcado. La hembra suele ser bastante más grande, corpulenta y pesada que el macho, y tiene antenas simples, contrariamente el macho posee antenas cuadrípectinadas o plumosas.

También, la forma de las alas puede variar entre los dos sexos de la misma especie, así como el tipo de escama que recubre alas y cuerpo. En el caso de las hembras, las escamas de algunas especies pueden ser muy urticantes.

Dentro de la subfamilia Hemileucinae (Saturniidae) el género *Hylesia* posee, después de *Automeris* Hübn., el mayor número de especies (110+). Lemaire divide *Hylesia* en dos grupos con base en una combinación de caracteres morfológicos. El primer grupo queda definido por la presencia de una protuberancia frontal y la fórmula de las espinas tibiales 0-2-3. Dentro de este clado, y siguiendo la subdivisión que hace el mismo Lemaire, *H. metabus* se ubica en el subgrupo 4 por la presencia de escamas con ocho estrías longitudinales (Lamy & Lemaire, 1983) y la ausencia de ocelos en las alas posteriores. Este subgrupo es un complejo compuesto por ocho especies, una de las cuales, *H. cedomnibus* Dyar, es simpátrida con *H. metabus* en la Guayana Francesa, y se ha encontrado en la región de Imataca (Edo. Bolívar) en Venezuela. Al final de este capítulo se presenta, en el Apéndice III (pág. 208), una lista de las especies de *Hylesia* conocidas en Venezuela.

Descripciones originales de Cramer, [1775]

Phalaena Bombyx Metabus Cramer, [1775] (p. 117): «Fig. D. *Metabus*. Les Antennes de cette Phalène, dont les deux surfaces ont la même couleur, sont garnies de petits poils; mais celles des Mâles sont visiblement plumacées; la Trompe est imperceptible. Elles ont le corps sort velu, mais les ailes ont si peu de duvet ou de plumes écailleuses, qu'elles semblent être transparentes; tandis que la couleur rouge-sale résulte uniquement des poils farineux dont ces ailes sont couvertes. C'est une Phalène Fileuse (*Phal. Bombyx.*) qui vient de Suriname & qui se trouve avec les deux suivantes dans la Collection sus-mentionnée. [Mr. Le Ministre E. F. Alberti]».

Phalaena Attacus Obsoleta Cramer, [1780] (p. 28): «Fig. C. *Obsoleta*. Les bandes transversales d'un blanc sale sur les ailes supérieures sont transparentes, & les quatre ailes ont en-dessous une couleur pâle de chair, sans aucun dessein. Les ailes en général ont peu de duvet & sont presque entièrement transparentes, ce qui les fait paroître comme usées. Les antennes des Mâles sont Pectinées. Il appartient aux Phalènes Atlas & se trouve à Suriname.»

Redescripción de la morfología externa del insecto adulto

Antenas aproximadamente de igual longitud que el tórax, amarillo anaranjado; filiforme en hembras, plumosa en machos (27 segmentos, 20 de ellos cuadripectinados en el macho); en estos últimos el flagelo es desnudo, mientras que en las hembras generalmente presenta una cobertura de escamas en su base. Palpos labiales y región frontal de la cabeza de color pardo anaranjado, patas y tórax amarillo, a veces grisáceo (marrón en los individuos más pigmentados), abdomen amarillo, más oscuro dorsalmente (anillado de negro en individuos más oscuros). Alas: Longitud del ala anterior: macho: 21-25 mm; hembra: 24-32 mm, elongada sin prolongación apical, color de fondo extremadamente variable, de amarillento a pardo rosáceo, a veces grisáceo, con líneas blanquecinas, antemedial casi recta, casi imperceptible en los individuos más claros, posmedial recta o ligeramente curva hacia la costa cerca de su base, banda submarginal bordeada distalmente de blanco, mancha discal más oscurecida que en el área medial; mancha blanca en la celda discal, proximalmente a la mancha discal, y una segunda en el área terminal entre la costa y la vena R5. El ala posterior coloreada como la anterior, marcas claras muy tenues. Inferiormente el color de fondo es más opaco que en la cara superior, con difusión blanquecina o rosada, y una mancha subapical anterior muy bien definida. En la hembra el abdomen es generalmente amarillo. Ala anterior más elongada que en el macho, subelíptica. En general el patrón de coloración es el mismo que en machos, pero la apariencia de tonos más tenues y con predominancia del carácter translúcido de las alas (Figura 1 hembra).



Figura 1. Habitus (cara superior) de hembra adulta de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]). Ejemplar criado en cautiverio, procedente de poblaciones de la región de Yaguaraparo, Edo. Sucre, Venezuela.

La coloración de este insecto varía ampliamente. Las alas de *Hylesia metabus* poseen un diseño muy simple pero altamente variable, tanto en poblaciones locales como entre poblaciones comparadas a lo largo y ancho de su amplísima distribución geográfica. Sin embargo, no es posible discernir razas geográficas que justifiquen la denominación de subespecies. Lemaire (2002) asume que las poblaciones originarias de regiones cercanas a la costa en la Guayana Francesa suelen poseer el color de fondo de las alas más amarillento o tirando a rosado, con las manchas claras bastante débiles. En Venezuela, particularmente en el estado Sucre, existe gran variación en la tonalidad del color de las alas, pero predomina siempre el tono gris rosáceo con manchado claro que va de tenue a bien marcado. En general, los individuos más oscuros suelen ser los machos, y en esos casos el oscurecimiento general del fondo de las alas va acompañado de mayor contraste y definición en las manchas de color claro. La plasticidad fenotípica exhibida por *H. metabus* en Venezuela posiblemente se deba a los efectos selectivos de las condiciones ambientales locales, toda vez que se encontró que el polimorfismo genético de la especie es mínimo (ver páginas 33-44 en el presente volumen). La morfología de las escamas y setas ha sido ampliamente estudiada por Lamy & Lemaire (1983) y en el presente volumen (ver páginas 47-56).

Descripción de la genitalia

Piñango *et al.* (2008) realizaron un estudio de la morfología de las estructuras genitales de machos y hembras de *Hylesia metabus*, y con base en dicho trabajo, a nuevas observaciones y a información comparativa extraída de Lemaire (2002), se produjeron las descripciones siguientes.

La genitalia masculina presenta un *tegumen* robusto y muy abovedado; octavo esterno bilobulado; *uncus* simple, robusto, obtuso y fuertemente esclerotizado, dirigido hacia atrás; valvas redondeadas y robustas, bilobuladas, con un *sacculus* prominente y ampliamente fusionado con la costa, espina interna larga, naciendo cerca del ápice de la valva, la base se dirige primero anteriormente y medialmente se curva hacia atrás, proyectándose a los lados del *uncus*, brazos posteriores se unen al *tegumen*; placa ventral de la *transtilla* subtriangular; *sacculus* vesicular y redondeado, casi tan ancho como la estructura completa, deprimido dorsoventralmente; *aedeagus* acentuadamente arqueado en la porción distal,

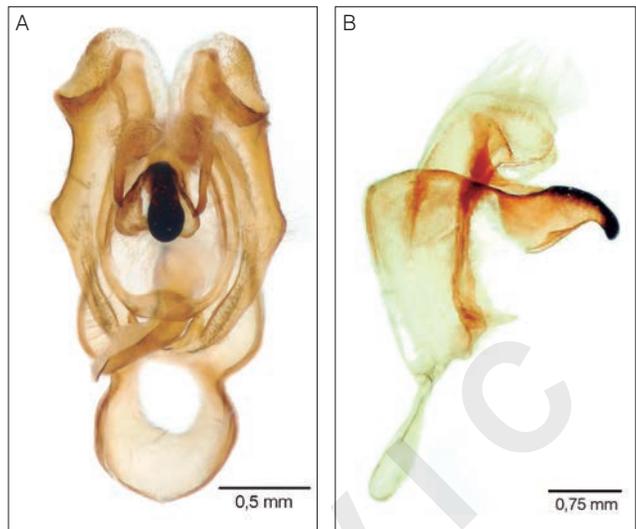


Figura 2. Aspecto general de la armadura genital masculina de *H. metabus*. A: vista postero-anterior, el *sacculus* es extremadamente ancho; B: vista lateral, mostrando las valvas por encima de la base del *uncus*. *Uncus* muy obtuso y esclerotizado; *sacculus* deprimido dorsoventralmente.



Figura 3. *Aedeagus* curvo de *H. metabus*, con poca asimetría. A: vista lateral; B: vista dorsal.

ventralmente cóncavo, ápice en forma de flecha. No presenta *cornuti* en la *vessica* (Figuras 2 y 3).

En el caso de la genitalia femenina, de acuerdo con el estudio comparativo de Lemaire (2002), las hembras de *H. metabus* poseen la esclerotización en forma de escudo del octavo esternito más ancha que las especies más parecidas, especialmente *H. canitia* (Cramer). Este segmento tiene un par de bandas laterales esclerotizadas que son libres anteriormente y se unen posteriormente a una estructura en forma de escudo, por detrás del *ostium*



Figura 4. Aspecto general de la armadura genital femenina y órganos asociados (particularmente la bursa copulatrix) de *H. metabus*.

bursae. Ductus *bursae* largo y membranoso. *Corpus bursae* aproximadamente el doble del largo de las anapófisis, globular y membranoso. Apófisis anteriores y posteriores bien desarrolladas y aproximadamente de igual tamaño (Figura 4).

Distribución geográfica

Hylesia metabus se distribuye ampliamente en la zona tropical de Suramérica, a elevaciones menores, al este de la cordillera de los Andes y más frecuentemente en ambientes costeros, áridos o

semiáridos. Se ha reconocido ampliamente su presencia en Surinam, Guayana Francesa, Guyana, Venezuela, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia.

Muchos datos biológicos sobre esta especie se tratan detalladamente en otros capítulos de la presente monografía (ver páginas 15-24), pero en general conviene resumir que se conoce bastante bien su ciclo de vida y sus asociaciones con más de veinte especies distintas de plantas huésped (Floch & Abonnenc, 1944; Hudson, 1985; Vassal, 1987 y Lemaire 2002).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Beatriz Herrera-Malaver y Cristina Sainz-Borgo (Universidad Simón Bolívar) por su contribución en la recolección y mantenimiento de material para este estudio; a Edmundo Guerrero (Instituto de Zoología Agrícola, Universidad Central de Venezuela) por las microfotografías de las estructuras genitales aquí publicadas; a Ediciones IVIC por facilitar la fotografía de *H. metabus*, tomada en la Unidad de Fotografía Científica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. A los editores, correctores de estilo y diseñador de este libro, por su extraordinaria paciencia, especialmente a P. Estrada.

BIBLIOGRAFÍA

- Berg C (1875) Lepidópteros patagónicos observados en el viaje [sic] de 1874. Suplemento a la descripción de los lepidópteros patagónicos. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias Exactas de la Universidad de Córdoba* 1: 63-102, 155-158.
- Bouvier E-L (1923) Observations sur quelques Saturniens recueillis au Vénézuéla par M. Grisol. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle* 29: 353-359.
- Chainey JE (2003) The authorship and dates of Pieter Cramer's *De Uitlandsche Kapellen*: A request for comments from lepidopterists. *Bulletin of Zoological Nomenclature* 60:145-146.
- Cramer P ([1775]) *De Uitlandsche Kapellen voor komende in de drie Waereld-deelen Asia, Africa en America. I del. Beschryving van Plaat I-XCVI. [Papillons exotiques des trois parties du Monde l'Asie, l'Afrique, et l'Amérique. Tome Premier. Description des Planches I-XCVI]*. S. J. Baalde / Barthelemy Wild, Amsterdam / Utrecht. 1 (1-7): xxx + 16 + 132 pp., pls. 1-84.
- Cramer P ([1780]) *De Uitlandsche Kapellen voor komende in de drie Waereld-deelen Asia, Africa en America. I del. Beschryving van Plaat CCLXXXIX-CCCIV. [Papillons exotiques des trois parties du Monde l'Asie, l'Afrique, et l'Amérique. Tome Quatrième. Description des Planches CCLXXXIX-CCCIV]*. S. J. Baalde / Barthelemy Wild, Amsterdam / Utrecht. 4: 28 pp., pls. 289-304.
- d'Abrera B (1995) *Saturniidae Mundi. Saturniid Moths of the World. Part I*. Goecke & Evers, Keltern, 177 pp.
- d'Abrera B (1998) *Saturniidae Mundi. Saturniid Moths of the World. Part III*. Goecke & Evers, Keltern, ix + 171 pp.
- Dognin P (1912) Hétérocères nouveaux de l'Amérique du Sud. *Mémoires de la Société entomologique de Belgique* 19: 121-177.
- Dognin P (1923) *Hétérocères nouveaux de l'Amérique du Sud. Fasc. XXI*. Oberthür, Rennes, 38 pp.
- Dos Passos CF (1958) The dates and authorships of some names proposed by Cramer and Stoll in *De Uitlandsche Kapellen voorkomende in de drie Waereld-deelen Asia, Africa en America*, and Stoll alone in *Aanhangel van het werk, de Uitslandsche Kapellen, voorkomende in de drie Waereld-deelen Asia, Africa en America, door den here Pieter Cramer [1775]-1791*. *Lepidopterists' News* 12:195-198.
- Draudt M (1929) 12 Familie: Saturnidae [sic]. In: A Seitz (ed), *Die Gross-Schmetterlinge der Erde, 6 (Die Amerikanischen Spinner und Schwärmer)*. A. Kernen, Stuttgart, pp. 713-827, pls. 101-137, 142.
- Dyar HG (1913) Description of new species of saturnian moths in the collection of the United States National Museum. *Proceedings of the United States National Museum* 44: 121-134.
- Fleming H (1945) The Saturnoidea (moths) of Kartabo, British Guiana, and Caripito, Venezuela. *Zoologica* 30: 73-80, 1 pl.
- Fleming H (1952) The Saturnoidea (moths) of Rancho Grande, North-Central Venezuela. *Zoologica* 37: 203-207.

- Floch H & E Abonnenc (1944) Sur la Papillonite guyanaise. Description du papillon pathogène: *Hylesia urticans*. *Institut Pasteur de Cayenne et du Territoire de l'Inini* 89: 1-7.
- Hemming F (1937) *Hübner: A bibliographical and systematic account of the entomological works of Jacob Hübner and of the supplements thereto by Carl Geyer, Gottfried Franz von Frölich, and Gottlieb August Wilhelm Herrich-Schäffer*. 2 volumes. Royal Entomological Society of London, London, frontisp. + XXXIV + 605 pp. + [iii]; xii + 274 pp.+ [ii].
- Herrich-Schäffer GAW ([1855]) Synopsis familiarum Lepidopterorum *In: Systematische Bearbeitung der Schmetterlinge von Europa, zugleich als Text, Revision und Supplement zu J. Hübner's Sammlung europäischer Schmetterlinge*. 6 Band. G. J. Manz, Regensburg, pp. 81-152.
- Hübner J (1818) *Zuträge zur Sammlung exotische Schmetterlinge*. [J Hübner], Augsburg, pp. 9-16.
- Hübner J ([1820]) *Verzeichniss bekannter Schmettlinge [sic]*. [J Hübner], Augsburg, pp. 177-208.
- Hudson JE (1985) Trials of yellow lamps for reducing plagues of itch moths in Surinam. *IPLÉ Lighting Journal* 50: 42-44.
- Kirby WF (1892) *A Synonymic Catalogue of Lepidoptera Heterocera (Moths), vol. 1: Sphinges and Bombyces*. Gurney & Jackson, London, 951 pp.
- Kristensen NP (ed) (1999) *Handbuch der Zoologie / Handbook of Zoology. Band/Volume IV. Arthropoda: Insecta. Teilband/Part 35. Lepidoptera, Moths and Butterflies. Volume 1: Evolution, Systematic and Biogeography*. Walter de Gruyter, Berlin/New York, x + 491 pp. + [i].
- Kristensen NP (ed) (2003). *Handbuch der Zoologie / Handbook of Zoology. Band/Volume IV. Arthropoda: Insecta. Teilband/Part 36. Lepidoptera, Moths and Butterflies. Volume 2: Morphology, Physiology, and Development*. Walter de Gruyter, Berlin/New York, xii + 564 pp.
- Lamy M & C Lemaire (1983) Contribution à la systématique des *Hylesia*: étude au microscope électronique à balayage des «fléchettes» urticantes (Lep. Saturniidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France* 88 (150^{ème} anniv.): 176-192.
- Lemaire C (1972) Description d'Attacidae (= Saturniidae) nouveaux du Venezuela et du Pérou [Lep.]. *Bulletin de la Société Entomologique de France* 77(1): 29-41, 2 pls.
- Lemaire C (1980) Un Hemileucinae inédit de la Gran Sabana vénézuélienne [Lep. Attacidae]. *Bulletin de la Société Entomologique de France* 84(7-8): 201-204.
- Lemaire C (1985) Quatre Hemileucinae sud-américains inédits [Lepidoptera, Saturniidae]. *Revue Française d'Entomologie (N. S.)* 7(2): 49-54.
- Lemaire C (1988) Description de neuf espèces nouvelles du genre *Hylesia* Hübner (Saturniidae Hemileucinae). *Lambillionea* 88 (1-2): 20-27; (3-4): 59-72.
- Lemaire C (1996) Saturniidae. *In: Heppner JB (ed) Atlas of Neotropical Lepidoptera. Checklist. Part 4B*. Association for Tropical Lepidoptera / Scientific Publishers, Gainesville, FL, pp. 28-49 + xix-l + pp. 62-84.
- Lemaire C (2002) *The Saturniidae of America: Les Saturniidae Américains. Hemileucinae (= Attacinae)*. 3 vols. Goecke & Evers, Keltern. 1388 pp., 214 pls.
- Lemaire C & J Minet (1999) The Bombycoidea and their relatives *In Kristensen NP (ed) Handbuch der Zoologie / Handbook of Zoology. Band/Volume IV. Arthropoda: Insecta. Teilband/Part 35. Lepidoptera, Moths and Butterflies. Volume 1: Evolution, Systematics, and Biogeography*. Walter de Gruyter, Berlin/New York, pp. 321-353.
- Lemaire C & N. Venédicoff (1989) Catalogue and biogeography of the Lepidoptera of Ecuador I. Saturniidae, with a description of a new species of *Meroleuca* Packard. *Bulletin of the Allyn Museum* 129: 1-60.
- Orfila RN (1951) Notas sobre Lepidoptera Saturnioidea 2. Una especie nueva de *Hylesia* (Hemileucid.) dermaritogena de Venezuela. *Publicaciones de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina* 23: 119-121.
- Piñango Bustamante JE, B Herrera-Malaver, CV Liendo-Barandiaran, C Sainz-Borgo & JV Hernández (2008) Genitalia description of *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae: Hemileucinae) *In XXIII International Congress of Entomology*. Durban, South Africa. July, 6 to 12, 2730 pp. (abstract No. 3222).
- Schüssler H (1934) Saturniidae 2. Subfam. Saturniinae et 3. Subfam. Ludiinae I. *En: Strand E (ed): Lepidopterorum catalogus. Part 58*. W. Junk, Berlin, pp. 325-484.
- Vassal J-M (1987) *Biologie et écologie d'Hylesia metabus, agent de la papillonite en Guyane française. Mise en place d'une structure de lutte intégrée*. ORSTOM, Cayenne, 146 pp, 37 pls.
- Walker F (1855) *List of the Specimens of Lepidopterous Insects in the Collection of the British Museum*. British Museum, London, 5: pp. 977-1257; 6: pp. 1259-1507.
- Watson A, DS Fletcher & IWB Nye (1980) Noctuoidea (part). *In: Nye IWB (ed) The Generic Names of the Moths of the World. Vol. 2*. British Museum (Natural History), London, frontisp. + xiv + 228 pp.

Variabilidad, estructura genética y filogenia de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae)

Hernán Cequea¹, Jazzmin Arrivallaga^{*2}, Cristina Sainz-Borgo^{2,3} y José V. Hernández E.³

¹Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

²Departamento de Estudios Ambientales, Laboratorio de Ecología Molecular de Insectos. Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

³Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edif. Física y Electrónica I, piso 1, Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

*jarrivillaga@usb.ve

Resumen

Hylesia metabus es una especie de importancia médica, la cual ha sido señalada como una especie con variabilidad en los patrones de coloración en la fase larval y adulta, picos poblacionales discretos a escala espacial y temporal, distribución geográfica restringida y conformada en metapoblaciones. Estas observaciones han sugerido la hipótesis de considerar la especie en Venezuela como un complejo de especie. La presente investigación tuvo como objetivo central evaluar distintas poblaciones geográficas de la palometa, mediante el uso de técnicas convencionales (citogenética e isoenzimas) y modernas (ADN mitocondrial) bajo un enfoque taxonómico. Los resultados obtenidos indican que esta especie de lepidóptero es una especie monofilética con bajo grado de polimorfismo genético, sin estructura genética, pero con plasticidad fenotípica.

Abstract

Variability, Genetic Structure and Phylogeny of *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae)

Hylesia metabus is a medically important moth species, which shows a number of features such as: variability in the color patterns of larvae and adults, discrete population peaks in time and space, restricted geographical distribution and the presence of metapopulations, suggesting the possible existence of a species complex in Venezuela. In this study we evaluated the taxonomy of geographically separated populations of this pest using both conventional (cytogenetic and isoenzyme) and molecular (mitochondrial DNA) techniques. The results obtained indicate that *H. metabus* is a monophyletic species, which shows phenotypic plasticity but is genetically unstructured.

Palabras clave Key words

Especie plena, genética, *Hylesia*, lepidopterismo, variabilidad.
Genetics, *Hylesia*, lepidopterism, valid species, variability.

PRESENTACIÓN

En el neotrópico se han reportado distintas especies del género *Hylesia* Hubner, 1820 (palometa peluda, en Venezuela), de la familia Saturniidae. Esta familia incluye algunas especies urticantes causantes de «lepidopterismo» en el hombre.

En Venezuela *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) representa un problema ambiental y de salud pública, debido a la presencia de setas urticantes en el abdomen de las hembras que pueden causar una patología caracterizada por dermatitis, conjuntivitis, queratitis, problemas respiratorios, bronquitis, rinofaringitis, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, disneas y tos (Pesce & Delgado 1971; Vásquez 1990; Benaim *et al.* 1991; Fornés & Hernández 2001; Rodríguez-Morales *et al.* 2005).

El género *Hylesia* Hubner 1820, es exclusivamente neotropical y ha sido reportado desde México hasta Argentina, encontrándose especies con distribución restringida, lo que ha generado la descripción de varias especies endémicas, que taxonómicamente pueden representar problemas de validación, sugiriéndose sinonimias de especies dada la similaridad morfológica (Lemaire 2002).

Específicamente, *H. metabus* está señalada para Venezuela, Guayana y Surinam. La historia taxonómica de *H. metabus* Cramer, 1775, indica que es una especie morfológica basada en caracteres diagnósticos (Lamy & Lemaire 1983; Lemaire 2002).

En Venezuela, esta especie se encuentra distribuida principalmente en los estados nororientales (Sucre, Delta Amacuro y Monagas). Sin embargo, también ha sido reportada para los estados Miranda, Nueva Esparta y Zulia (Vásquez 1990; Fornés & Hernández 2000) y recientemente se ha recolectado en el estado Bolívar. Este patrón de distribución geográfica discontinua y en parches, brinda un escenario interesante para un estudio de variabilidad genética espacial y temporal.

En años recientes se ha observado una variabilidad fenotípica de las fases larvales (cuerpo de la larva) y adultos (en las alas), en relación al patrón de coloración (claras y oscuras), lo que ha sugerido la existencia de más de una especie de *Hylesia* en las áreas en las que se ha reportado para Venezuela.

Este patrón de coloración clara y oscura de las alas, puede indicar cambios en el genoma que son detecta-

dos a través de la determinación del número básico de cromosomas (x), cambios en la secuencia de los genes en los cromosomas (mediante el análisis de las regiones de eucromatina en los brazos de los mismos o del comportamiento de los cromosomas en meiosis I y II) y mutaciones de genes para adaptarse a las condiciones ambientales (Lewontin 1978; Cequea 1985; Cequea *et al.* 2003, 2006, 2009). Estas variaciones fenotípicas pudieran estar asociadas a un polimorfismo genético o a la existencia de una diferenciación genética entre las poblaciones de *H. metabus*.

Algunos aspectos de la bioecología son relevantes para estudios genéticos de *H. metabus*. En primer lugar, el ciclo de vida sincronizado de 100 a 105 días (Vásquez *et al.* 1984; Vásquez 1990; Fornés & Hernández 2000) que producen 3-4 ciclos de vuelo anual de adultos, genera poblaciones de adultos discretas. Además, existen controladores biológicos naturales de larvas y pupas, que regulan la emergencia de adultos en algunas localidades de Venezuela (Hernández *et al.* 2009). Estos aspectos (depredación y ocurrencia de poblaciones en pulsos temporales y espaciales) constituyen causales potenciales de efectos de cuello de botella y deriva genética que determinarían la existencia de estructura genética y flujo génico dentro y entre las poblaciones locales.

Esta hipótesis de existencia de estructura genética se fundamenta en que la existencia de variabilidad en una especie puede cambiar a escala espacio-temporal a través de varias fuerzas genéticas tales como mutaciones, deriva genética, migraciones y selección natural, modulada por factores ecológicos y biogeográficos que promueven el aislamiento reproductivo entre poblaciones (Stutz 1976; Ayala & Kiger 1980; Jackson 1985; Slatkin 1985; Griffiths *et al.* 2000), y puede ser evaluada con base en la existencia de variantes alélicas y sus frecuencias, mediante técnicas genéticas (Griffiths *et al.* 2000). Dentro de las técnicas genéticas empleadas frecuentemente en estudios de variabilidad y diferenciación, los análisis de las enzimas mediante la electroforesis (isoenzimas) y el comportamiento de los cromosomas mitóticos y meióticos (citogenética) han sido ampliamente usadas (Morrison & Rajhathy 1959; Ayala 1976; Gottlieb 1977; Crawford 1983; Thorpe 1983; Cequea 1985, 1991; Arrivillaga *et al.* 2000; Cequea *et al.* 2003, 2006).

Recientemente, el desarrollo de la biología y genética molecular han permitido abordar los problemas de identificación de especies y de genética de poblaciones, empleando para ello marcadores moleculares, como el uso de regiones codificantes y conservadas de ADN mitocondrial (COI, cytoB, 12S, 16S, NDH4-5) y genes nucleares (28S, 18S, ITS 1-2) (Simon *et al.* 1994).

Otros enfoques de población han sido empleados para evaluar la significancia de la variación o diferenciación dentro de poblaciones de insectos, como por ejemplo, el uso de métodos filogenéticos utilizando como caracteres la composición nucleotídica de ADN, estimándose las relaciones intraespecíficas entre las variantes alélicas (haplotipos) determinadas entre y dentro las poblaciones de una especie. Definiéndose las especies con base en criterios de monofilia (linajes con una misma historia evolutiva no independientes), el concepto de especie filogenética y argumentos filogeográficos (Avice *et al.* 1987; Arrivillaga *et al.* 2002; 2003).

Todos estos criterios genéticos ampliamente usados en el estudio de especies de insectos del orden Lepidoptera (Goulson 1993; Keyghobadi *et al.* 2005), permiten obtener un mayor número de evidencias para contestar preguntas biológicas relacionadas con *H. metabus*. ¿Cómo saber si es una especie válida? ¿Si es una especie polimórfica? ¿Representa un complejo de especies? ¿Hay asociación de las formas de color con genotipos diferentes? ¿Las poblaciones geográficas son un grupo natural? ¿Los periodos de vuelo en los adultos o la discontinuidad geográfica, generan diferenciación espacial y temporal entre las poblaciones locales o geográficas?

Por lo antes expuesto, es una necesidad obligatoria evaluar las poblaciones de este lepidóptero desde un contexto genético y filogenético para tratar de responder estas interrogantes. En este sentido, se realizaron estudios de citogenética, isoenzimas y filogenia molecular a fin de obtener información genética sobre esta especie y tener una aproximación más natural de aspectos taxonómicos y genéticos de *H. metabus* en Venezuela.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Estudio citogenético

Entre el 2004 y 2008 en Venezuela, un número total de 1000 larvas del quinto instar de *H. metabus* con variaciones de color claras y oscuras, fueron recolectadas en los mangles rojos (*Rhizophora mangle* L.), cerca de las localidades de Patao (Lat. N 10° 38' 29,9"; Long. O 62° 04' 09,0"), Mapire (Lat. N 10° 38' 42,6"; Long. O 62° 08' 59,2") en el municipio Valdez, Yaguaraparo (Lat. N 10° 32' 43,2"; Long. O 62° 49' 05,7") en el municipios Cajigal y Guanoco (Lat. N 10° 08' 56,6"; Long. O 62° 56' 18,6") en el municipio Benítez, en el estado Sucre. Las larvas de las poblaciones de Patao, Mapire, Yaguaraparo y Guanoco son consideradas como una sola población muestral. Además, se recolectaron larvas alrededor de Pedernales (estado Delta Amacuro), (Lat. N 09° 48' 12,0"; Long. O 62° 10' 33,4") y Morichal Largo (estado Monagas), (Lat. N 08° 55' 32,2"; Long. O 63° 06' 51,5").

Las larvas fueron trasladadas y mantenidas hasta el quinto estadio en el laboratorio de Control de Vectores del Instituto de Investigaciones y Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IBCA-UDO), bajo las siguientes condiciones de cría: tempera-

tura ambiente = 24 ± 2 °C y HR = 60 ± 5 % , fotoperíodo normal de 12:12 h.

Para llevar a cabo el estudio citológico en primer lugar se sumergieron las larvas en una solución de colchicina de 0,1 % m/v por una hora para inhibir la formación de las fibras del huso acromático. Las cabezas y los testículos de los machos (larvas) fueron removidos y expuestos a una solución de KCL al 4 % durante 20 minutos con el objetivo de incrementar el volumen celular. Posteriormente fueron fijados en 3:1 metanol: ácido acético por 24 horas a temperatura ambiente y, finalmente transferidos a etanol 70 %. Las cabezas y los testículos fueron transferidos a un portaobjeto y expuestos a ácido acético al 60 % por tres minutos para ablandar el tejido y, finalmente, coloreado con orceina FLP al 1,25 % durante 4 minutos y aplastados (Cequea 1985). Un mínimo de 20 meiocitos por población se analizaron en diacinesis para detectar las configuraciones cromosómicas: univalentes, círculos y cadenas bivalentes, trivalentes y tetravalentes.

Los siguientes símbolos fueron usados: oII=bivalente con dos quiasmas, cII = bivalente con un quiasma, Cx=promedio de quiasmas por célula, n = número básico

de cromosomas, p =coeficiente de quiasma (derivado de dividir el promedio de quiasmas observado por el número máximo de quiasmas teóricamente por bivalente), q mayúscula es $1 - p$ o ausencia de quiasmas. No. = número.

Las ecuaciones siguientes: $cII = (Cx - n) \times No.$ de células y $cII = n - (Cx - n) \times No.$ de células, se aplicaron a las configuraciones meióticas observadas en diacinesis. Estas ecuaciones predicen el número esperado de círculos y cadenas bivalentes en los individuos diploides normales. Cuando hay un mínimo de uno y un máximo de dos quiasmas por bivalente, éstos tienen un apareamiento normal en paquiteno y la distribución de los quiasmas no es aleatoria, con un valor de P (coeficiente de quiasmas) mayor a 0,5 (Jackson 1984). Una prueba de Ji-cuadrado fue aplicada con el objetivo de determinar si las configuraciones observadas en diacinesis se ajustan al modelo de acuerdo al método no aleatorio (NA).

Estudio isoenzimático

En el estudio de isoenzimas se evaluaron sólo tres enzimas, las cuales han sido ampliamente usadas en estudios de variabilidad genética. La fosfatasa alcalina presenta diferentes formas, tales como las fosfatasas alcalinas del hígado (ALP_L), hueso (ALP_B), intestino (ALP_I) y placenta (PL), con distintas propiedades y que son presumiblemente codificadas en loci génicos separados (Fishman & Ghosh 1967; Beratis *et al.* 1970; Moss 1970; Fernley 1971; Donald & Rodson 1973; Fishman 1974). Mientras que la enzima Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT) presenta dos loci autosómicos GOT_S y GOT_M que determinan las formas soluble y mitocondrial de la enzima (Chen & Giblett 1971; Hackel *et al.* 1972). Por último, las esterasas (Es) son comunes en diferentes tipos de tejidos y presentan una gran variabilidad en los organismos (Welch & Lee 1974; Coates *et al.* 1975).

Para el análisis enzimático, las larvas de aproximadamente 42 a 45 mg fueron maceradas en 1 ml de solución tampón (0,2 M Tris; 0,025 M ácido cítrico 1:1, pH 7,6) y centrifugadas a 2000 rpm durante 15 min para separar el sobrenadante. Las muestras correspondientes a las larvas fueron insertadas en el gel (20x14x0,5 cm) mediante recuadros de papel Whatman N° 3 (aproximadamente 6x5 mm) humedecidos en los respectivos homogenizados. El gel fue preparado con almidón hidrolizado de papas al 12,5 % (Sigma, lote N° 122H0776). La electroforesis se realizó a 10 °C en nevera, aplicando una

diferencia de potencial de 200 V entre los extremos del gel durante 4-5 horas hasta que el marcador de corrida, (azul de bromofenol al 10 % en búfer Tris/HCl a pH 8,00) migrara una distancia de 8,0 cm desde el sitio de inserción de las muestras.

El revelado de las enzimas se realizó en la oscuridad a 30 °C con las soluciones siguientes: Fosfatasa alcalina (ALP) (50 ml agua, 25 mg β -naptil fosfato de sodio, 61,5 mg $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ y 25 mg Fast Blue RR). Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT) (50 ml búfer 0,1 M Tris-HCl pH 8,3, 50 mg L-ácido aspártico, 50 mg ácido α -ketoglúterico, 75 mg Fast Blue BB y 2,5 mg de Piridoxal-5-fosfato). Esterasa (ES) 50 ml búfer 0,05 M fosfato de potasio pH = 6,0; 2,5 ml *N*-propanol, 20 mg β -naptil acetato, 30 mg α -naptil acetato y 25 mg Sal Fast Garnet GBC (Boyer 1961; Selander *et al.* 1971; Stuber *et al.* 1988).

Los geles fueron escaneados inmediatamente después de coloreados, utilizando el programa Photoimpact 10. Una prueba de Ji-cuadrado se aplicó sobre la frecuencia de fenotipos de GOT de las poblaciones de los estados Sucre, Delta Amacuro y Monagas para determinar si estas poblaciones se ajustaban al equilibrio de Hardy-Weinberg. Este parámetro permite establecer que la composición genética de una población permanece en equilibrio, mientras no actúe la selección natural y no se produzca ninguna mutación.

Estudio filogenético

A fin de contar con una identificación morfológica válida basada en los caracteres diagnósticos descritos por (Lemaire 2002), se usaron claves y se disecó los genitales de machos y hembras adultos para confirmar la identificación taxonómica de la especie bajo estudio. Por otra parte, el uso de larvas es problemático durante la extracción de ADN, dado a que se obtiene un gran número de impurezas y cantidades altas de ARN que pueden inhibir la amplificación de regiones de ADN vía PCR, por lo que el estudio se realizó con la fase adulta.

Para los estudios moleculares se recolectaron pupas de distintas localidades (Mapire, Guanoco, El Paujil (Edo. Sucre), Pedernales (Edo. Delta Amacuro), Morichal (Edo. Monagas) durante diferentes ciclos de vuelo entre enero de 2004 y diciembre de 2007. El material fue transportado al laboratorio de Ecología Química del Comportamiento de la Universidad Simón Bolívar, para esperar la emergencia de los adultos, los cuales fueron

Tabla 1. Cebadores utilizados en la amplificación de 12S y COI.

Autores	Cebador	Secuencia	Tamaño
Kambhampati & Smith (1995)	12S SR-J- 4199	5' TACTATGTTACGACTTAT 3'	430 pb.
	SR-N- 14594	5' AAAC TAGGATTAGATACCC 3'	
Kambhampati & Smith (1995)	COI CI-J-1632	5'GGTAAAATTTAAATATAAACTTC 3'	570 pb.
	CI-N-2191	5' TGATCAAATTTATAAT 3'	

identificados según los caracteres propuestos por Lemaire (2002). La genitalia fue disecada (hembras y machos, relación 1:1 por localidad), luego el tórax fue preservado en seco a -20 °C en viales individuales hasta su utilización. Las hembras fueron disecadas en cámaras especiales para evitar su manipulación directa y minimizar el contacto con las setas urticantes.

La extracción del ADN genómico se realizó con el método de Arrivillaga *et al.* (2002) con modificaciones menores, a partir de material proveniente de hembras y machos adultos de *H. metabus* preservados previamente a -20 °C. Para la extracción se disecaron los músculos del tórax de los adultos. A partir del ADN genómico extraído se obtuvieron productos de amplificación de los fragmentos

mitocondriales citocromo c unidad 1 (COI) y 12S (fragmento ribosomal), mediante cebadores específicos vía PCR (Tabla 1). Los productos amplificados fueron enviados a secuenciación para utilizar a posteriori las bases nucleotídicas como los caracteres empleados para estimar la filogenia con métodos cladísticos.

Para los análisis cladísticos se utilizó el método de máxima parsimonia empleando el programa informático PAUP 4.0 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (Swofford 2002). Entre las opciones del análisis se incluyeron los *gaps* (ausencia de base luego del alineamiento) como quinta base, se realizaron búsquedas heurísticas con remuestreo tipo TBR (disección y reconexión de ramas, para determinar el árbol más corto dentro de los más parsimoniosos), con 100 réplicas aditivas azarosas, con repesaje de caracteres y 1000 réplicas de *bootstrap* (Arrivillaga *et al.* 2003). Las distancias genéticas fueron calculadas, utilizando la distancia de Kimura de dos parámetros (K2P, basado en que las tasas de las transiciones y transversiones son diferentes e independientes), como criterio de diferenciación entre los haplotipos determinados por secuenciación.

DESCRIPCIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Citogenética

En las seis poblaciones larvales estudiadas se evidenció que el número diploide (2n) de cromosomas observados en las células neuroblásticas es de 62 con una longitud de 0,6-1,0 µm. Además, los cromosomas metafásicos encontrados son monocéntricos. El tipo y morfología de cada cromosoma fue difícil de analizar en los cromosomas metafásicos debido al pequeño tamaño de los mismos (0,6-1,0 µm), pero se observó que los cromosomas tenían un

centrómero (Figura 1). Las comparaciones cromosómicas entre los dos fenotipos de larvas (claras y oscuras, Figura 2), indican la carencia de diferenciación cromosómica con base a los parámetros evaluados (2n, tamaño y tipos de cromosomas). Estos resultados son concordantes con el análisis de cromosomas meióticos en 30 machos adultos, empleando 198 células en diacinesis, en las cuales se observaron 31 cromosomas bivalentes en cada una (Figura 3).



Figura 1. Cromosomas mitóticos de *Hylesia metabus*.



Figura 2. Larvas clara y oscura de *Hylesia metabus*.

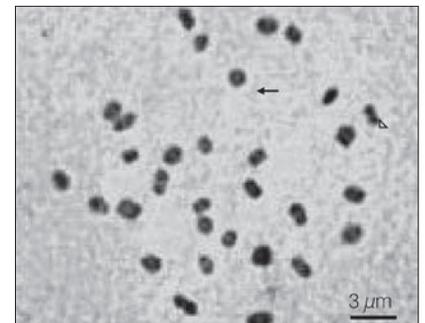


Figura 3. Diacinesis con 31 bivalentes. La flecha muestra un círculo bivalente y el triángulo una cadena bivalente.

Tabla 2. Apareamiento de los cromosomas en diacinesis, promedio de quiasma por célula ($\bar{X}_{qma}/célula$) y valores de p y q para las localidades de Sucre, Delta Amacuro y Monagas de *Hylesia metabus*.

Localidad	Configuraciones meióticas en diacinesis	$\bar{X}_{qma}/célula$	Valor p	Valor q	Número de células
Patao	6 (29 oll, 2 cll)	59,10	0,9532	0,0468	20
	10 (28 oll, 3 cll)				
	4 (27 oll, 4 cll)				
Mapire	8 (29 oll, 2 cll)	59,35	0,9532	0,0428	23
	15 (28 oll, 3 cll)				
Yaguaraparo	5 (29 oll, 2 cll)	58,86	0,9500	0,0500	21
	8 (28 oll, 3 cll)				
	8 (27 oll, 4 cll)				
Guanoco	25 (29 oll, 2 cll)	59,23	0,9553	0,0447	65
	30 (28 oll, 3 cll)				
	10 (27 oll, 4 cll)				
Pedernales	10 (29 oll, 2 cll)	59,33	0,9674	0,3260	30
	20 (28 oll, 3 cll)				
Morichal Largo	14 (29 oll, 2 cll)	59,18	0,9545	0,0455	39
	18 (28 oll, 3 cll)				
	7 (27 oll, 4 cll)				

\bar{X} =Promedio

p = coeficiente de quiasma (derivado de dividir el promedio de quiasmas observado por el número máximo de quiasmas teóricamente por bivalente).

q = 1 - p o ausencia de quiasmas.

Las configuraciones meióticas observadas en diacinesis por cada localidad se muestran en la Tabla 2. Las configuraciones cromosómicas fueron comparadas (con base en las observadas y esperadas) de acuerdo al método no aleatorio (NA), obteniéndose un Ji-cuadrado de cero (Tabla 3).

Tabla 3. Números observados (Obs) de bivalentes en las poblaciones de *Hylesia metabus* de los estados Sucre, Delta Amacuro y Monagas comparados con valores esperados aplicando el método no aleatorio (NA).

Estado	Población	N° de células	Cx	p	Configuraciones cromosómicas		
					oll	cll	X ²
Sucre	Patao	20	59,10	0,95	Obs 562	58	0
					NA 562	58	
	Mapire	23	59,35	0,96	Obs 652	61	0
					NA 652	61	
	Yaguaraparo	21	58,86	0,95	Obs 585	66	0
					NA 585	66	
Guanoco	65	59,23	0,96	Obs 1835	180	0	
				NA 1835	180		
Delta Amacuro	Pedernales	30	59,33	0,97	Obs 850	80	0
					NA 850	80	
Monagas	Morichal Largo	39	59,18	0,95	Obs 1099	110	0
					NA 1099	110	

Cx= Promedio de quiasma por célula. p= Coeficiente de quiasma

oll= Bivalente con dos quiasmas. cll= Bivalente con un quiasma.

Nuestros análisis indican que los cromosomas tuvieron un apareamiento normal en el estado de paquiteno de la meiosis y en las configuraciones cromosómicas en diacinesis fueron observados uno y dos quiasmas. De acuerdo a estas configuraciones, se observaron 29 círculos bivalentes y dos cadenas bivalentes en 54 meiocitos (Figura 3), lo cual sugiere la hipótesis de la existencia de una recombinación simple en cada uno de los dos brazos de los cromosomas homólogos en paquiteno.

Por lo tanto, podemos concluir que el cariotipo de *H. metabus* esta constituido de 58 cromosomas metacéntricos y 4 submetacéntricos. Los 27 y 28 círculos bivalentes observados pueden ser el resultado de la terminalización de algunos quiasmas al final de la profase I de la meiosis o por el rompimiento de los quiasmas por el método de aplastamiento. Las configuraciones meióticas esperadas en diacinesis como resultado de las recombinaciones en cada uno de los brazos de los cromosomas metacéntricos, submetacéntricos y telocéntricos han sido reportadas por Cequea & Nirchio (1998). El tamaño tan pequeño de los cromosomas de *H. metabus* es común en saturnidos, igual que en otros lepidópteros (Gupta 1964; Suomalainen 1969). La presencia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos y larvas con coloración clara y oscura podría indicar cambios en el orden de los genes para adaptarse a determinadas condiciones ambientales no detectadas en este estudio.

Estos rearrreglos de un grupo de genes pueden producir complejos de genes con una gran adaptabilidad que permite la colonización de nuevas áreas que, a través del tiempo y en ausencia de la recombinación, podría conducir al aislamiento ecológico (Dobzhansky 1951). Esto podría explicar las observaciones de campo de la presencia de las larvas de esta especie en plantas de *Anacardium occidentale* L (Merrey), *Syzgium malaccense* L (Pomalaca), *Erythrina poeppigiana* Walp (Bucare) (Vásquez 1990, 1994), *Hura crepitans* L (Jabillo) (Vásquez 1990, 1994, Osborn *et al.* 2001), *Sysigium cumini* L (Guayaba Pesgua) (Vásquez 1990, 1994,

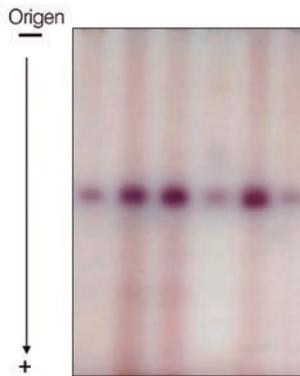


Figura 4. Fenotipos electroforéticos de ALP (fosfatasa alcalina).

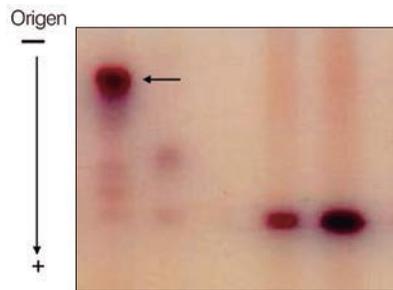


Figura 5. Fenotipos electroforéticos de ALP (fosfatasa alcalina). Fenotipo con una movilidad electroforética diferente indicado con una flecha.

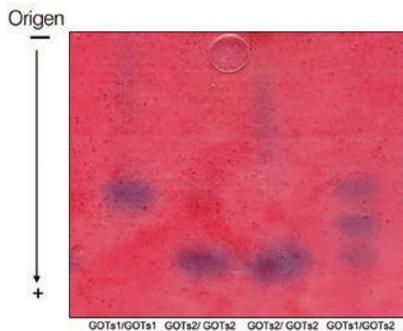


Figura 6. Fenotipos electroforéticos de GOT (Glutamato-oxaloacetato-transaminasa).

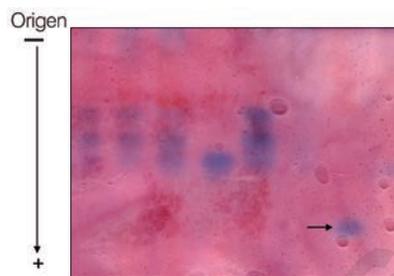


Figura 7. Fenotipos electroforéticos de GOT (Glutamato-oxaloacetato-transaminasa). Fenotipo con una movilidad electroforética diferente indicado con una flecha.

Tabla 4. Fenotipos de la Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT) en las poblaciones del estado Sucre.

Población	GOT1/GOTs1	GOTs1/GOT2	GOTs2/GOT2
Patao	35	90	105
Mapire	5	25	15
Yaguaraparo	15	35	55

Cortez 2003), *Psidium guajava* L (Guayaba) (Vásquez 1990, 1994, Osborn *et al.* 2001, Cortez 2003), entre otros, además de su amplia distribución geográfica en los estados Sucre, Monagas, Bolívar y Delta Amacuro.

El análisis no aleatorio de las configuraciones meióticas en diacinesis resultó en un valor de cero (Tabla 3),

Tabla 5. Distribución de los fenotipos de Glutamato-oxaloacetato-transaminasa en las poblaciones naturales de *Hylesia metabus*.

Población	Homocigotos GOTs1/GOTs1	Heterocigotos GOTs1/GOT2	Homocigotos GOT2/GOT2	Total
Sucre	55	150	175	380
Delta Amacuro	10	50	30	90
Monagas	30	70	110	210

lo cual permite concluir que los bivalentes de *H. metabus* tienen un apareamiento normal en paquiteno de la meiosis, con la misma frecuencia de recombinación con uno y dos quiasmas distribuidos de una manera no aleatoria. En general, esta característica es considerada normal para los especímenes diploides normales (2n) que presentan cromosomas monocéntricos, (Cequea & Nirchio 1998; Otero 2002; Cequea *et al.* 2003; 2006).

Actualmente estamos en el proceso de analizar las diferentes fases de la meiosis I y II en el tejido gonadal de *H. metabus*, con el objetivo de identificar las configuraciones cromosómicas características de las inversiones y translocaciones y así determinar la evolución de las poblaciones de este lepidóptero.

Isoenzimas

La fosfatasa alcalina (ALP) se presentó como un monómero (ALP1) en todas las poblaciones estudiadas (Figura 4). También se observó un fenotipo con una movilidad electroforética diferente (Figura 5). La Glutamato-oxaloacetato-transaminasa se presentó como un dímero donde se identificaron dos fenotipos homocigotos (GOT1/GOT1 y GOT2/GOT2) y uno heterocigoto (GOTs1/GOT2) (Figura 6). Además, se observó la presencia de un alelo atípico en la población de Sucre con una migración electroforética diferente a los alelos GOTs1 y GOT2 (Figura 7). Los fenotipos de la Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOTs) en la población detectada en las localidades de Patao, Mapire y Yaguaraparo del estado Sucre se muestran en la Tabla 4. Por otra parte, los resultados del análisis fenotípico de 380, 90 y 210 larvas de las poblaciones de los estados Sucre, Delta Amacuro y Monagas, respectivamente, se muestran en la Tabla 5. Los valores para p y q pueden ser estimados a partir de:

$$p = \text{frecuencia del alelo GOTs1}$$

$$q = \text{frecuencia del alelo GOT2}$$

Donde $p+q=1$. Los valores de p y q en las poblaciones de Sucre, Delta Amacuro y Monagas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de p y q de Glutamato-oxaloacetato-transaminasa en las poblaciones naturales de *Hylesia metabus*.

Población	Valor P	Valor Q
Sucre	0,34	0,66
Delta Amacuro	0,39	0,61
Monagas	0,31	0,69

p = coeficiente de quiasma (derivado de dividir el promedio de quiasmas observado por el número máximo de quiasmas teóricamente por bivalente). q = 1 - p o ausencia de quiasmas.

Tabla 7. Desviación de los fenotipos de Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOTs) del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Población		GOTs1/GOTs1	GOTs1/GOT2	GOT2/GOT2
Sucre	Observado	55	150	175
	Esperado	44	171	165
	$\chi^2 = 5,940$ p < 0,05 (df = 1)			
Delta Amacuro	Observado	10	50	30
	Esperado	14	43	33
	$\chi^2 = 2,554$ p < 0,05 (df = 1)			
Monagas	Observado	30	70	110
	Esperado	20	90	100
	$\chi^2 = 10,444$ p < 0,05 (df = 1)			

La aplicación de la prueba de Ji-cuadrado en las poblaciones estudiadas se muestra en la Tabla 7. La población del Delta Amacuro ($\chi^2 = 2,554$) se ajustaba al equilibrio de Hardy-Weinberg (p > 0,05), pero las poblaciones de Sucre ($\chi^2 = 5,940$) y Monagas ($\chi^2 = 10,444$) no estaban en equilibrio (p < 0,05).

Las esterasas presentaron cuatro fenotipos electroforéticos 1, 2, 3 y 4 (Figura 8), donde se identificaron tres zonas denominadas I, II y III. Estos fenotipos estuvieron presentes en las tres poblaciones analizadas. En la zona I se identificaron dos bandas con movilidad anódica diferente, la más lenta denominada EstI1/EstI1 y la más rápida EstI2/EstI2. La distribución de las bandas en la zona I en las poblaciones de Sucre, Delta Amacuro y Monagas se indica en la Tabla 8. Los individuos heterocigotos en esta zona no se identificaron con claridad. La zona II se caracterizó por dos bandas invariables en todos los individuos

Tabla 8. Distribución de los fenotipos de la región I de esterasas en las tres poblaciones naturales de *Hylesia metabus*.

Población	Homocigotos EST1/EST1	Homocigotos EST2/EST2	Total
Sucre	60	30	90
Delta Amacuro	23	17	40
Monagas	70	40	110

duos analizados en las tres poblaciones. En la zona III se presentó una sola banda. En la población de Sucre se observaron 170 larvas con presencia de esta banda y 240 larvas sin ellas. En la población del Delta Amacuro el 33 % de las larvas presentaron esta banda y en la población de Monagas el 30 %.

Los resultados de los análisis enzimáticos en este estudio muestran que la fosfatasa alcalina se presentó como una banda invariable en todos los individuos (Figura 4);

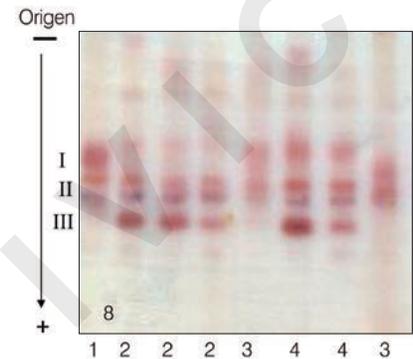


Figura 8. Fenotipos electroforéticos de ES (Esterasa).

sin embargo, en dos individuos de la población de Sucre se presentó un fenotipo con una movilidad electroforética diferente (Figura 5). La ausencia de variación de esta enzima puede ser debida a que los individuos de esta especie son descendientes de una sola población donde las hembras son fecundadas por machos de la misma población, por lo que el flujo de genes de diferentes poblaciones estuvo ausente, produciendo poblaciones de individuos genéticamente idénticos.

En años recientes *H. metabus* ha sido encontrada en plantas de guayaba (*Psidium guajava*) (Osborn *et al.* 2001; Cortez 2003) y uva pesgua (*Syzygium cumini*) (Cortez 2003) y aguacate (*Persea americana* Mill). Los individuos que colonizan nuevas plantas hospedadoras pueden experimentar roturas en sus cromosomas tales como inversiones paracéntricas, pericéntricas y translocaciones recíprocas desiguales (Griffiths *et al.* 2000), donde genes separados en el cromosoma o presentes en cromosomas no homólogos pueden ser colocados juntos, confiriéndoles a estos complejos de genes ciertas ventajas adaptativas. Además, si un brazo de un cromosoma adquiere una combinación particular de genes, se esperaría que pudiera recibir nuevas combinaciones de genes por inversiones y translocaciones originando así individuos de gran adaptabilidad a diferentes hábitats. Esto expli-

caría la distribución que tiene esta especie en los estados Sucre, Monagas, Delta Amacuro, Nueva Esparta, Miranda y Zulia.

Las roturas espontáneas en los cromosomas han sido detectadas en algunos géneros de plantas y animales (Lewis & John 1963; John & Lewis 1968). También las roturas pueden ocurrir en un sitio funcional de un cistron no duplicado o en un cistron duplicado en algún lugar en el genoma, en el que el gen puede mutar produciendo un nuevo alelo que puede traducirse en una banda enzimática adicional de movilidad anódica diferente en el gel. La presencia de un alelo con una movilidad electroforética diferente en relación a los alelos normales observados en las larvas de *H. metabus* en fosfatasa alcalina y Glutamato-oxalacetato-transaminasa (Figuras 5 y 7) pueden ser debidas a una mutación del gen normal, o a la presencia de una larva perteneciente a una especie diferente del género *Hylesia*.

Los resultados de la Glutamato-oxalacetato-transaminasa en las poblaciones analizadas indican que el alelo (GOTs2) aparece con mayor frecuencia que el alelo GOTs1 y puede cambiar a través de las generaciones en éstas y en otras poblaciones donde esta mariposa sea introducida. El porcentaje de los heterocigotos en las poblaciones de Sucre es 39,47 %, en Delta Amacuro 55,55 % y en Monagas 33,33 %.

Las poblaciones de Sucre y Monagas no están en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), en cambio la población de Delta Amacuro sí está ($p > 0,05$), por lo que las frecuencias de los alelos GOTs1 y GOT2 se mantienen constantes de generación en generación, a menos que la selección natural, el flujo de genes o la deriva genética cambien las frecuencias de estos alelos en estas poblaciones. Por su parte, las poblaciones de Sucre y Monagas alcanzan el equilibrio en la siguiente generación.

Las esterasas presentaron cuatro fenotipos en las larvas analizadas, lo que indica que el gen para esta enzima presenta una serie de alelos múltiples responsables de la presencia y ausencia de estas bandas en los individuos. Posiblemente los fenotipos electroforéticos observados en la zona I sean el resultado de un gen con dos alelos, ya que pueden distinguirse dos bandas con movilidad anódica diferente (Figura 8). Sin embargo, no se hizo el análisis correspondiente debido a que los individuos heterocigotos no se identificaron con claridad. En recientes recolectas de *H. metabus* se ha encontrado una variación en el color de las alas de gris a azul pálido.

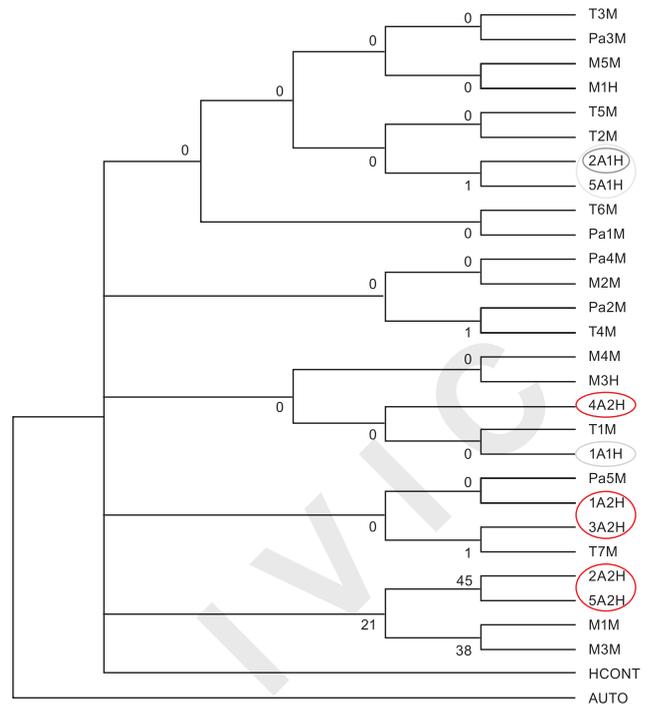


Figura 9. Filogenia intraespecífica de *Hylesia metabus*. MP consenso utilizando el gen COI (MP: análisis de máxima parsimonia, T: Caño Tilin, Pa: El Paujil, M: Mapire, A: Angosturita; H: hembra, M: macho). Se señalan los valores de soporte en las ramas (*bootstrap*).

El estudio de ALP, GOT y esterasas indica que tanto las larvas claras como las oscuras presentan los mismos fenotipos electroforéticos por lo que la variación fenotípica en las alas de estas mariposas puede ser el resultado de la plasticidad fenotípica que presenta esta especie a requerimientos del medio ambiente.

El estudio enzimático de ALP, GOT y EST en las poblaciones de los estados Sucre, Delta Amacuro y Monagas mostró que no existe diferenciación genética en los genes que codifican estas enzimas, debido a que los fenotipos electroforéticos se presentaron idénticos tanto en las larvas claras como en oscuras en estas poblaciones.

Filogenia

Los análisis filogenéticos resultan en la obtención de árboles (soluciones topológicas) que indican la ausencia de estructura filogenética, apoyado por la baja diferenciación entre los haplotipos determinados (valores de distancia intralocalidad= $K2P=0,00-0,007$, valores de distancia interlocalidad= $K2P=0,000-0,006$) independiente de la localidad, periodo de vuelo, sexo y patrón de coloración. Además, se evidencia la existencia de un grupo natural, monofilético, para los haploespecie, con

base en el grupo externo utilizado; secuencias de COI de *Automeris fieldi* e *Hylesia continua*, disponibles en el Genbank (NCI base de datos).

La monofilia determinada para los dos marcadores de COI y 12S (Figura 9) evidencia que *H. metabus* es un grupo natural, que taxonómicamente representa a una especie simple genética muy homogénea, con ausencia de estructura genética (basado en la politomía observada). Además, la ausencia de estructura filogenética, al menos en base a los marcadores evaluados, indica la au-

sencia de diferenciación fenotípica (patrones de coloración), diferenciación geográfica (por localidad y estado), diferenciación ecológica (espacial entre poblaciones del estado Sucre o periodos de vuelo entre 2004 y 2007) correlacionada al genotipo. Esto implica que las variaciones observadas son sólo parte de la variación poblacional de *H. metabus* y sólo generan plasticidad fenotípica y un bajo grado de polimorfismo genético, sin causar divergencia entre las poblaciones y restricción en el flujo genético entre las mismas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los estudios genéticos, realizados con tres técnicas independientes, indican que *H. metabus* en Venezuela no es un complejo de especies sino una especie simple, polimórfica y genéticamente válida. Además, los criterios morfológicos considerados para su identificación en el campo, tanto para las formas larvales como para las adultas, son adecuados para una identificación certera, debido a que las variaciones en los patrones de coloración son parte de la variabilidad natural de esta especie. Sin embargo, sería interesante comparar las poblaciones de Venezuela de *H. metabus* con ejemplares de Surinam y Guayana Francesa, al igual que con otras especies de *Hylesia* para obtener resultados más robustos.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos dar las gracias al personal de la Gerencia de Saneamiento Ambiental del Programa *Hylesia*, Región XI Fundasalud y al Proyecto Reto *Hylesia* por su ayuda en la recolecta de las larvas. Este estudio fue financiado en parte por el Ministerio del Poder Popular para la Ciencia y Tecnología, Venezuela a través del Proyecto Reto *Hylesia metabus* y el Decanato de Investigaciones de la Universidad Simón Bolívar, GID-12.

BIBLIOGRAFÍA

Arrivillaga J, Rangel Y, Oviedo M & M Feliciangeli (2000) Genetic divergence among Venezuelan populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology* 37:325-330.

Arrivillaga J, Norris D, Feliciangeli M & G Lanzaro (2002) Phylogeography of the Neotropical sandfly *Lutzomyia lon-*

gipalpis inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infection Genetics and Evolution* 2:83-95.

Arrivillaga J, Mutebi J, Piñango H, Norris D, Alexander B, Feliciangeli M & G Lanzaro (2003) The taxonomic status of genetically divergent populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) based on the distribution of mitochondrial and isozyme variation. *Journal of Medical Entomology* 40:615-627.

Avisé J, Arnold J, Ball R, Bermingham E, Lamb T, Neigel J, Reeb C & N Sauters (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetic and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.

Ayala F (1976) *Molecular Evolution*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, USA. 277 pp.

Ayala F & J Kiger (1980) *Modern Genetics*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park. California, EE. UU. 844 pp.

Benaim C, Pernía B & R Rojas (1991) Dermatitis caused by moths of *Hylesia* genus (Lepidoptera: Saturniidae) in North-eastern states of Venezuela. I. Bioecology of *H. metabus* Cramer. Clinical features of lepidopterism determined by this species. *American Journal of Contact Dermatitis* 2:213-221.

Beratis N, Seegers W & K Hirschhorn (1970) Properties of placental alkaline phosphatase I. Molecular size and electrical charge of the various electrophoretic components of the six common phenotypes. *Biochemical Genetics* 4:689-705.

Cequea H (1985) Estudio citogenético de los híbridos F1 de cinco especies de *Machaeranthera* (Compositae). *Acta Científica Venezolana* 36:265-279.

Cequea H (1991) *Análisis citogenético de siete especies de Passiflora L.* (Passifloraceae). Trabajo de Ascenso. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 127 pp.

Cequea H & M Nirchio (1998) Cytogenetic analysis of the natural tetraploid *Crotalaria stipularia* Desvaux. *Acta Científica Venezolana* 49:38-41.

- Cequea H, Díaz de Cequea D, Imery J & M Nirchio (2003) Cytogenetic study of paracentric inversions in *Tridax procumbens* (Compositae). *Cytologia* 68:329-333.
- Cequea H, Díaz-Cequea D, Imery J & M Nirchio (2006) Identification of paracentric inversions in *Capsicum annuum* (Solanaceae). *Cytologia* 71:325-330.
- Cequea H, D DdC, Imery J & M Nirchio (2009) Cytogenetic analysis of five *Crotalaria* species (Papilionaceae). *Boletín Centro Invest. Biol. Univ. del Zulia* 43:47-58.
- Chen S & E Giblett (1971) Genetic variation of soluble glutamic-oxaloacetic transaminase in man. *American Journal of Human Genetics* 23:419-424.
- Coates P, Mestriner M & D Hopkinson (1975) A preliminary genetic interpretation of the esterase isozymes of human tissues. *Annals of Human Genetics* 39:1-20.
- Cortez L (2003) Comparación de la sobrevivencia en larvas de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) al suministrarles una dieta de tres especies de hospederos alternos. *I Jornadas de Hylesia metabus*. Yaguaraparo, estado Sucre.
- Crawford D (1983) Isozymes in plant genetics and breeding. En: Tanksley S & T Orton (Eds.) *Phylogenetic and Systematic Inferences from Electrophoretic Studies. Part A*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, Holanda. 257-287 pp.
- Dobzhansky T (1951) *Genetics and the Origin of Species*. Columbia Univ. Press. New York, USA. 364 pp.
- Donald I & E Rodson (1973) Rare variants of placental alkaline phosphatase. *Annals of Human Genetics* 37:303-313.
- Fernley H (1971) Mammalian alkaline phosphatase. En: Boyer P (Ed.) *The Enzymes*. Academic Press. New York, USA. 417-447 pp.
- Fishman W (1974) Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *American Journal of Medicine* 56:617-650.
- Fishman W & N Ghosh (1967) Isoenzymes of human alkaline phosphatase. *Advances in Clinical Chemistry* 10:255-370.
- Fornés L & J Hernández (2000) Algunos aspectos de la biología de *H. metabus* (Cramer 1778) (Lepidoptera. Saturniidae). *Boletín de Entomología Venezolana* 15:127-145.
- Fornés L & J Hernández (2001) Reseña histórica e incidencia en la salud pública de *Hylesia metabus* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) en Venezuela. *Entomotropica* 16:137-141.
- Gottlieb L (1977) Evidence for duplication and divergence of the structural gene for phosphoglucosomerase in diploid species of *Clarkia*. *Genetics* 86:289-307.
- Goulson D (1993) Allozyme variation in the butterfly *Maniola jurtina* (Lepidoptera: Satyrinae) (L.): evidence for selection. *Heredity* 71:386-393.
- Griffiths A, Gelbart V, Miller J & R Lewontin (2000) *Genética moderna*. McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid, España. 676 pp.
- Gupta Y (1964) Chromosomal studies in some Indian Lepidoptera. *Chromosoma (Berl)* 15:540-561.
- Hackel E, Hopkinson D & H Harris (1972) Population studies on mitochondrial glutamate-oxaloacetate transaminase. *Annals of Human Genetics* 35:491-496.
- Hernández J, Osborn F, Herrara B, Liendo-Barandiaran C, Perozo J & D Velásquez (2009) Parasitoides larva-pupa de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región nororiental de Venezuela: un caso de control biológico natural. *Neotropical Entomology* 38:243-250.
- Jackson R (1984) Chromosome pairing in species and hybrids. En: Grant W (Ed.) *Plant Biosystematics*. Academic Press. Toronto, Canadá. 67-68 pp.
- Jackson R (1985) Genomic differentiation and its effect on gene flow. *Systematic Botany* 100:391-404.
- John B & K Lewis (1968) The chromosome complement. *Protoplasmatologica* 6:1-206.
- Keyghobadi N, Roland J & C Strobeck (2005) Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Molecular Ecology* 14:1897-1909.
- Lamy M & C Lemaire (1983) Contribution a la systématique des *Hylesia*: étude au microscope électronique a balayage des flechettes urticantes. Systematics of the *Hylesia* spp study with scanning electron microscopy. *Bulletin Société Entomologique de France* 88:176-192.
- Lemaire C (2002) *The Saturniidae of America: Les Saturnidae Américains. Hemileucinae (= Attacinae)*. Evers Keltern, Alemania. 1388 pp.
- Lewis K & B John (1963) *Chromosome Marker*. Little, Brown and Company, USA. 489 pp.
- Lewontin R (1978) Adaptation. *Scientific American* 239:157-169.
- Morrison J & T Rajhathy (1959) Cytogenetic studies in the genus *Hordeum*. III. Pairing in some interspecific hybrids. *Canadian Journal Genetic Cytology* 1:65-77.
- Moss D (1970) The heterogeneity of human alkaline phosphatase. *FEBS Symposium* 18:227-239.
- Osborn F, Motabán L & J Gutiérrez (2001) Crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) alimentadas con cuatro diferentes plantas hospederas. *Saber* 31:14-22.
- Otero K (2002) *Estudio citogenético de las especies Synedrella nodiflora (L.) Gaerth; Tridax procumbens L. y Vernonia cinerea (L.)*. Tesis. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 39 pp.
- Pesce H & A Delgado (1971) Pharmacological studies on caterpillar venom. *Venomous Animals and their Venoms* 48:119-156.
- Rodríguez-Morales A, Arria M, Rojas-Mirabal J, Borges E, Benitez J, Herrera M, Villalobos C, Maldonado A, Rubio N & C Franco-Paredes (2005) Lepidopterism due to exposure to the moth *Hylesia metabus* in northeastern Venezuela. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* 73:991-993.
- Selander R, Smith M, Yana S, Johnson W & J Gentry (1971) Biochemical polymorphism and systematic in the genus *Peromyscus*. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). Studies in Genetics VI. *Univ. Texas Publ.* 7103:49-90.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H & P Flook (1994) Evolution weight and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilations of conserved

- polymerase chain reaction primer. *Annals of the Entomological Society of America* 87:651-700.
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 16:393-430.
- Stuber C, Wendel J, Godman M & J Smith (1988) *Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis and enzymes from maize (Zea mays L.)*. Technical Bulletin 286, North Carolina, Agricultural Research Service. Norte Carolina, USA. 87 pp.
- Stutz H (1976) Genetically controlled chromosome breakage as an isolation barrier in the origin and maintenance of *Secale ancestrale*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 18:105-109.
- Suomalainen E (1969) Chromosome evolution in the lepidoptera. *Chromosomes Today* 2:131-138.
- Swofford, DL (2002) *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 142 pp.
- Thorpe J (1983) Enzyme variation, genetic distance and evolutionary divergence in relation to levels of taxonomic separations. *Syst. Assoc. Special.* 24:131-152.
- Vásquez L (1990) Estudio bioecológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer en el oriente de Venezuela. *Saber* 3:14-20.
- Vásquez, L (1994) Estudio bioecológico y estrategias de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región oriental. Períodos 1985-1987 y 1991-1993. Informe del Consejo de Investigación, Universidad de Oriente, Venezuela. 93 pp.
- Vásquez L, Olivares M & A Villegas (1985) Ciclo biológico y estacionalidad de la palometa *Hylesia* sp. (Lepidoptera, Saturniidae) en la región Oriental venezolana. IX Congreso Venezolano de Entomología. San Cristóbal, Edo. Táchira, Venezuela. 108 pp.
- Welch S & J Lee (1974) The population distribution of genetic variants of human esterase D. *Humangenetik* 24:329-331.

SECCIÓN II
Sistema urticante

Ediciones IVIC

Morfología de las setas urticantes de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])

Jessicca Rodríguez^{*1}, Frances Osborn², Ulf Lundberg³
y José V. Hernández E.⁴

¹Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

²Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apartado 245, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

³Centro de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

⁴Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edif. Física y Electrónica I, piso 1, Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

*jnrmr@gmail.com

Resumen

Las setas abdominales de las hembras adultas de *Hylesia metabus* (Saturniidae) causan una severa dermatitis en los humanos; sin embargo, las setas de los machos no producen tales sintomatologías. El objetivo de este trabajo fue determinar si existen diferencias morfológicas en las estructuras de las setas de las hembras comparado con las de los machos, que podrían evidenciar una función urticante. Para ello, se describió en detalle la morfología externa e interna de las setas abdominales de los adultos de esta especie y se evaluó el efecto de las mismas sobre el comportamiento de hormigas. Las setas se clasificaron en cuatro tipos, S1, S2, S3 y S4. En las hembras, las S1 y S2 presentan una estructura porosa. Las S3 tienen pequeñas espinas a lo largo de la seta y las S4 presentan espinas en la base, para luego aplanarse, con espinas a los lados, antes de volver a afilarse hacia el ápice. En los machos, el único tipo de seta presente es el S1. En las estructuras celulares por debajo de las setas se observaron tres tipos de reservorios: los RI que contienen una sustancia homogénea y estructuras poco diferenciadas, los RII que contienen una sustancia amorfa y los RIII, asociados a las setas S3, los cuales están rodeados por células con abundantes microvellos y mitocondrias. Grupos de huevos desprovistos de setas fueron examinados y acarreados por hormigas del género *Pheidole*, mientras que éstas evitaron entrar en contacto con las posturas cubiertas de setas. La morfología externa de las S3 y la ultraestructura de los RIII sugiere que podrían estar relacionados a las propiedades urticantes de esta polilla. El hecho de que las hormigas evitaron los huevos cubiertos por las setas indica que éstas protegen a los huevos de algunos insectos depredadores.

Abstract

Morphology of the Urticating Setae of *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])
The abdominal hairs (setae) from female *Hylesia metabus* (Saturniidae) adults cause a severe dermatitis in humans. Setae from males do not produce these symptoms. The aim of this study was to compare setae structures in males

Palabras clave Key words

Hylesia metabus, morfología, setas urticantes, ultraestructura.
Hylesia metabus, morphology, ultrastructure, urticating setae.

and females in order to determine whether structure could be linked to an urticating function in the latter. The external and internal morphology of the abdominal setae in adult moths was described in detail, and the effects on ant behavior were evaluated. The setae were classified into four types, S1, S2, S3 and S4. In females, the S1 and S2 setae have a porous structure, the S3 have small barbs along their length, and the S4 have numerous barbs at the base, but further up flatten out, with barbs along both sides, before tapering off at the apex. S1 are the only type found in males. In the cellular structures under the setae, three reservoir types were observed: the RI type contains a homogeneous substance and un-differentiated structures, the RII type contains an amorphous substance, and the RIII type, associated with the S3 setae, is surrounded by cells with abundant microvilli and mitochondria. Egg masses not covered by setae were examined and carried by *Pheidole* ants, whereas covered eggs were largely avoided. The external morphology of the S3 setae and the ultrastructure of the RIII reservoirs suggest that they may be related to the urticating properties reported for this moth. Ant avoidance of setae covered eggs suggests that these protect the eggs from at least some predators.

PRESENTACIÓN

Dentro del orden Lepidoptera (Linneo, 1758), nueve familias: Megalopygidae, Limacodidae, Nymphalidae, Lasiocampidae, Saturniidae, Notodontidae, Lymantridae, Arctiidae y Noctuidae tienen especies que poseen setas que al entrar en contacto con la piel producen urticaria. En la familia Saturniidae, las especies de los géneros *Hylesia*, *Automeris*, *Citheronia* y *Eudyarina* son registradas como urticantes (Hómez *et al.* 1995). De éstas, *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]), es de particular interés en Venezuela, ya que se caracteriza por ser la responsable de accidentes urticantes, en especial en el estado Sucre, principalmente en los municipios Cajigal, Mariño, Benítez y Libertador, ubicados en la península de Paria (Vásquez 1990); en el estado Monagas, en los municipios Maturín y Aguasay; y más recientemente, en el estado Bolívar, municipio Raúl Leoni.

Hylesia metabus, conocida comúnmente como «palometa peluda», es una polilla de pequeño tamaño, color marrón, con actividad nocturna, que aparece generalmente en regiones cercanas a ríos y manglares, aunque también ha sido reportada en zonas boscosas sin ríos. Los abdómenes de las hembras adultas están cubiertos de setas, las cuales son extremadamente urticantes. Las hembras utilizan estas setas para cubrir las masas de

huevos y se ha especulado que protegen a los huevos de depredadores y parasitoides (obs. pers.).

Para describir los efectos de la urticaria causados por miembros del orden Lepidoptera se han empleado dos términos médicos: el «lepidopterismo» y el «erucismo». El lepidopterismo describe los efectos producidos por larvas y adultos de mariposas sobre seres humanos. La vía de penetración de las setas incluye inhalación, contacto dérmico e ingestión (Wirtz 1984). El término erucismo es empleado ocasionalmente para describir los efectos causados por larvas de mariposas. Los lepidópteros pueden ser clasificados como «fanerotóxicos», los cuales son capaces de introducir una toxina en la piel a través del uso ofensivo de setas venenosas y los «criptotóxicos» que producen emanaciones repelentes o volátiles que son proyectadas por medio de la emisión de un tubo (Wirtz 1984). Tanto el erucismo como el lepidopterismo se caracterizan por presentar los siguientes síntomas: dermatitis inflamatoria, vesículas y erosiones, nódulos, neuritis, dolor de cabeza, náuseas, vómitos, calambres y diarreas (Pesce & Delgado 1971).

Aun cuando existen numerosas especies de Lepidoptera señaladas como urticantes, sólo se ha estudiado la morfología en detalle de unas pocas, como

por ejemplo: *Thaumetopoea* spp., *Euproctis* spp. y *Anaphe venata* Butler (Bleumink *et al.* 1982; De Jong *et al.* 1982; Lamy & Lemaire 1983; Lamy 1984; Novak *et al.* 1987; Lamy & Novak 1988; Fornés 1998). Es característica común de estas especies que en sus setas se observen púas (afiladas o redondas), dirigidas hacia el extremo distal que se proyectan desde su superficie (Lamy & Lemaire 1983; Lamy 1984; Novak & Lamy 1987). Normalmente las setas urticantes reportadas son pequeñas (150-450 μm), aunque *A. venata* posee setas largas que van desde 10.000 a 15.000 μm .

Con respecto a *Hylesia metabus*, Tyzzer (1907) fue el primero en demostrar que los tejidos irritantes de los adultos de esta especie son producto de pelos urticantes microscópicos (citado por Pelissou & Lamy 1988). Tisseuil (1935) dilucidó que en los adultos las hembras son las únicas responsables de la dermatitis; ellas poseen las setas pruriginosas en el abdomen y una vez que oviponen recubren los huevos con dichas setas por medio de contorsiones; con el supuesto propósito de protegerlos de depredadores y parásitos (Fornés 1998).

Los estudios morfológicos realizados con los adultos de *H. metabus* demuestran que las setas abdominales están implantadas en cúpulas que son protuberancias cuticulares con una densidad de hasta 50.000 / mm^2 (Lamy 1984; Pelissou & Lamy 1988). Las setas son huecas internamente y esta cavidad en la extremidad distal mide de 10-20 μm (Novak *et al.* 1987).

Se han realizado estudios de la morfología externa de las setas y algunos autores registran un solo tipo que se presenta como flechas con pequeñas proyecciones a lo largo de la misma (Lamy & Lemaire 1983; Lamy 1984; Olivares & Vásquez 1984). Por su parte, Vásquez (1990) señala tres tipos de setas, presentes en los abdomenes de las hembras, y considera que dos de estos tipos son urticantes. Sin embargo, las únicas setas ilustradas son similares a las previamente descritas por Lamy & Lemaire (1983).

Internamente, existen tres tipos de células que en conjunto forman la glándula exocrina responsable de la producción, almacenamiento y liberación de las sustancias irritantes: las células tricógenas, responsables de la formación de setas urticantes; las células termógenas que producen el casquillo de fijación de estas setas; y las células cuticulares (Lamy 1984; Pelissou & Lamy 1988). Los estudios realizados sugieren que, en general, la ultraestructura de las glándulas urticantes de los Lepidópteros es parecida a la de *Thaumetopoea processionea*

L. donde cada seta está insertada en un casquillo de fijación, el cual está conectado a un canal o reservorio que se encuentra rodeado por una prolongación de la célula tricógena. En esta especie, cada seta es producida por una sola célula tricógena, las cuales, en conjunto, forman una glándula urticante situada debajo de la cutícula (Lamy 1984).

La hipodermis de la extremidad abdominal de *H. metabus* es igual a la de *Thaumetopoea* spp; ambas presentan una monocapa con tres tipos de células: tricógenas (de gran tamaño, formadoras de las setas urticantes), termógenas (que producen las cúpulas de fijación de las espinas urticantes) y cuticulares. Las células tricógenas emiten una prolongación citoplasmática que comunica al canal de implantación de las setas. Esta prolongación posee numerosos microvellos (Novak & Lamy 1987; Pelissou & Lamy 1988).

El trabajo más reciente y detallado de la morfología externa de las diferentes tipos de setas de *H. metabus* fue el realizado por Rodríguez *et al.* (2004), quienes describieron cuatro tipos de setas encontrados en los abdomenes de hembras y machos de *H. metabus*. Además, Rodríguez (2001) describió la ultraestructura de tres glándulas asociadas a las setas abdominales de las hembras adultas de *H. metabus*.

Se conoce que las setas de los insectos pueden cumplir una función protectora contra los enemigos naturales (Wirtz 1984) En este sentido, las hormigas son reconocidas como depredadores de los insectos y pueden influir en la distribución de éstas (Basset 1996; Krüger & McGavin 1998). Las especies dominantes en un ecosistema son normalmente depredadores generalistas, y con una tendencia a ser agresivas (Leston 1973). Las hormigas del género *Pheidole* han sido señaladas como depredadoras de lepidópteros plagas del maíz (Perfecto 1990) y del algodón (Gravena & DaCunha 1991). Estas hormigas se encuentran comúnmente en la vegetación y probablemente entran en contacto con los huevos y las larvas de los lepidópteros de forma regular. Es por ello que consideramos interesante evaluar el comportamiento de las hormigas hacia las masas de huevos de *H. metabus*, utilizando como modelo a las hormigas del género *Pheidole*.

En este capítulo se describe la morfología externa y ultraestructura de las setas abdominales de los adultos de *H. metabus*. Por otra parte, se determina la efectividad de las setas que cubren a las masas de huevos como protectoras contra la depredación de las hormigas.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

La microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET) son usadas para estudiar las estructuras morfológicas externas e internas de los organismos vivos, las cuales son invisibles a simple vista.

En este trabajo se empleó la MEB para estudiar la morfología externa de las setas abdominales de *H. metabus* y la MET para realizar estudios de la ultraestructura de las células glandulares responsables para la producción, almacenamiento y liberación de la sustancia (o las sustancias) urticantes.

Sitios de recolección y procesamiento preliminar de las muestras

En zonas de manglar, ubicadas en los alrededores de Yaguaraparo, municipio Cajigal, estado Sucre, se recolectaron pupas hembras y machos de *H. metabus*, las cuales se diferenciaron por tamaño y características morfológicas (ver páginas 15-24, Figura 4). Estas muestras se trasladaron al laboratorio.

Las pupas se aislaron una por una en bolsas plásticas hasta la eclosión de los adultos. Se disecaron mariposas vivas bajo agua destilada con la ayuda de un microscopio estereoscópico marca Zeiss, usando una cápsula de Petri con cera y alfileres entomológicos. Se realizaron cortes en los abdómenes para dividirlo en tres zonas distintas: ventral, dorsal y lateral. Para estudiar la morfología externa de las setas se utilizaron machos y hembras; mientras que para el estudio de la ultraestructura se emplearon únicamente hembras.

Microscopía electrónica de barrido

Las muestras para microscopía electrónica de barrido fueron separadas en trozos de aproximadamente 1 mm³, colocadas en viales de vidrio y deshidratadas en una estufa a 40 °C durante 48 horas en presencia de Silica Gel. Luego, las mismas fueron cubiertas con oro/paladio durante 10 minutos en una unidad de cubrimiento iónico DCM-10. Posteriormente, fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio electrónico de barrido marca Philips SEM 505 y JEOL T-300 (Stobbs & Shaw 1964; Rodríguez *et al.* 2004).

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras para ser usadas en microscopía electrónica de transmisión se sumergieron inmediatamente en prefijador fresco (glutaraldehído al 2,5 % y paraformaldehído al 1 % en solución búfer fosfato salino de pH = 7,2 y 260 mOsm /1,4 °C). A continuación, se procedió a retirar el prefijador, luego se lavó dos veces con búfer fosfato por 20 minutos.

Las muestras se fijaron con tetróxido de osmio al 1 % acuoso en PBS por 1 hora y 45 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavaron en dos oportunidades los tejidos en búfer fosfato por 10 minutos cada uno. Se deshidrataron las muestras en una serie de alcoholes (etanol al 50, 70, 80 y 90 %) por 10 minutos en cada concentración; luego se pasaron dos veces por alcohol al 100 % por 15 minutos cada una. Se mezcló etanol al 100 % con el óxido de propileno en proporción 1:1 por 15 minutos. Luego se retiró la mezcla y se le añadió óxido de propileno por 15 minutos. Todo este proceso se realizó a 4 °C.

Se descartó el óxido de propileno para comenzar la infiltración, añadiendo una mezcla de óxido de propileno más resina con las siguientes proporciones: (3:1), (1:1), (1:3), una vez por cada proporción. Se colocó en la estufa por cinco minutos para evaporar el óxido de propileno en exceso y se le añadió la resina pura, la cual se preparó mezclando: SPI.PON 812 (3,24 g), DDSA (2 g), NMA (1,78 g) y DMP-30 (0,12 g). Después de 24 horas se retiraron las muestras de la resina, se colocaron en moldes para realizar la inclusión en resina fresca bajo un microscopio estereoscópico marca Zeiss y se dejaron en la estufa a 60 °C por 48 horas para que ocurriese la polimerización. Posteriormente, se sacaron las muestras de los moldes y se realizó el tallado de los bloques en un ultramicrotomo marca Reichert-Jung con cuchilla de vidrio.

Los cortes finos (60-70 nm) se realizaron con el ultramicrotomo con cuchillas de diamante, colocándolos sobre una rejilla de cobre (200 mesh). El contraste se realizó colocando unas gotas de acetato de uranilo al 2 % en una cápsula de Petri. Luego se colocaron las rejillas sobre las gotas, con los cortes hacia abajo, por cinco horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron tres veces con agua destilada por 10 minutos cada

una y inmediatamente se colocaron las rejillas sobre gotas de citrato de plomo durante cinco minutos. Finalmente, se lavaron tres veces con agua destilada por 10 minutos cada una. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico de transmisión, marca Hitachi H-600.

Ensayos de comportamiento

Los ensayos de comportamiento fueron realizados en el laboratorio, de acuerdo con la metodología utilizada por Osborn & Jaffé (1998) con algunas modificaciones. Se recolectaron dos colonias de *Pheidole* sp. en el campo y se mantuvieron en el laboratorio, en recipientes plásticos de 1 m de diámetro y una profundidad de 50 cm, a una temperatura constante de 25 °C y una humedad relativa de 70-80 %. Un trípode metálico de 40 cm de altura fue colocado en cada recipiente, sobre el cual se ubicó una plataforma de vidrio de 20 cm², el cual sirvió como el área de forraje. Dos tapas plásticas con un diámetro de 5 cm y una profundidad de 1 cm fueron situadas sobre las plataformas de vidrio, dentro de las cuales se colocó un trozo de tela tipo mosquitero remojado en agua y uno remojado en agua y miel en una proporción de 1:1. Cada dos días se depositaron sobre el área de forraje, insectos que habían sido capturados mediante redes entomológicas.

Cada bioensayo constaba de dos tratamientos. En uno de éstos, se colocó una masa de huevos sin la cober-

tura de las setas sobre el área de forraje de las colonias de las hormigas (tratamiento 1) y en el otro se colocó una masa de huevos con la cobertura de las setas (tratamiento 2). Las masas de huevos sin setas se prepararon removiendo las setas con un par de pinzas, y luego lavando los huevos en agua destilada. En cada tratamiento, el comportamiento de las hormigas hacia la masa de huevos fue observado durante 15 minutos. Los tratamientos se realizaron de manera consecutiva y el primer tratamiento fue seleccionado de manera aleatoria. Se realizaron un total de nueve bioensayos, alternando entre las colonias de las hormigas, de manera que cada colonia participó en sólo un bioensayo por día.

Experimentos preliminares permitieron definir las siguientes respuestas etológicas de las hormigas *Pheidole* hacia las masas de huevos: (1) Exploración: las hormigas tocan los huevos con sus antenas por un periodo de >1 segundo, (2): Tocar: las hormigas tocan los huevos con sus mandíbulas por un periodo de >1 segundo, (3) Caminar sobre: las hormigas caminan sobre los huevos, (4) Acarrear: las hormigas llevan los huevos a sus nidos.

Los resultados fueron analizados mediante una prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, donde se comparó cada comportamiento realizado por las hormigas (exploración, tocar, caminar sobre y acarrear) con respecto a las masas de huevos cubiertas con las setas y las masas de huevos desnudas de setas (Siegel & Castellan 1988).

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS

Morfología externa de las setas abdominales de *Hylesia metabus*

En la Tabla 1 se presentan las medidas de las setas de las hembras y los machos.

En las secciones dorsales de los abdómenes de las hembras se encontraron dos tipos de setas que se denominaron S1 y S2 (Tablas 1 y 2, Figuras 1A, B y C). Las S1 muestran una estructura porosa y con los ápices redondeados (Figura 1A). Las setas tipo S2 tienen una estructura porosa similar a la de las S1. La estructura es cilíndrica

en la base, aplanándose hacia el extremo distal en forma de escudo, con el ápice en forma de W (Figuras 2A y B).

En las secciones ventrales se identificaron tres tipos de setas, las S1, las S3 y las S4. Las setas tipo S3

Tabla 1. Medidas de los diferentes tipos de setas abdominales de adultos de *Hylesia metabus*.

Tipo de seta	Ancho en la base (µm)		Ancho máximo (µm)		Largo (mm)		Ancho de la apertura del bolsillo (µm)	
	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE	\bar{X}	DE
S1	5,1	0,1	11	6,3	2	29,1	7,3	0,2
S2	5,7	0,1	46	2,7	0,2	12,8	7,7	0,4
S3	2,9	0,2	8	0,7	0,19	15	4	0,6
S4	5,5	1,2	58,6	3,8	1	32	7	0,4

n = 20 para cada uno de los tipos de seta. Fuente: Rodríguez *et al.* (2004). DE = Desviación estándar.

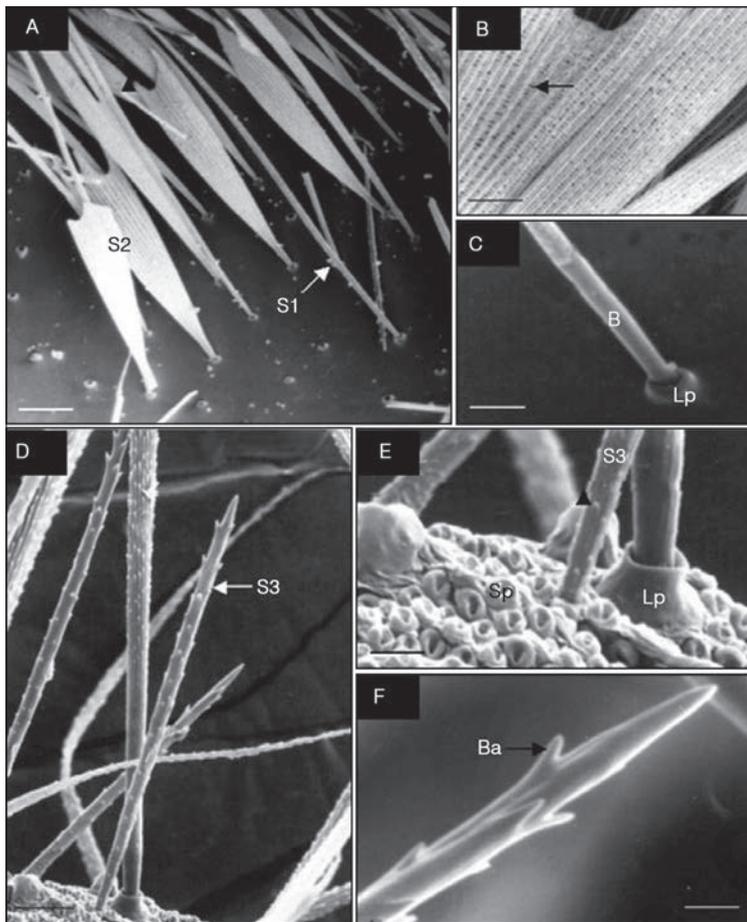


Figura 1. Setas abdominales de hembras adultas de *Hylesia metabus*. 1A) Vista general de la región dorsal del abdomen, mostrando las setas tipo S1 y S2. 1B) Detalle de las setas tipo S2.) Obsérvese la porosidad de la seta (flecha). 1C). Detalle de la base de una seta tipo S1. B: base de la seta, Lp: Bolsillo grande. 1D) Vista general de las setas tipo S3. 1E) Detalle de la base de una seta tipo S3. Sp: Bolsillo pequeño. Lp: Bolsillo grande. Observe las bárbulas redondeadas (▲). 1F) Detalle del ápice de una seta tipo S3. Observe las bárbulas afiladas (Ba).

(Tablas 1 y 2, Figuras 1D, E y F) son cilíndricas, delgadas y lisas, sin huecos o poros, posean bárbulas a todo lo largo de la seta, tienen una base redondeada (Figura 1E) y su extremo distal es afilado (Figura 1F). Las setas tipo S4 tienen una morfología más compleja que los otros tipos: en la base la superficie está cubierta de numerosas bárbulas afiladas y se aplana hasta un ancho de aproximadamente 60 μm , con bárbulas triangulares a lo largo de ambos lados (Tabla 1, Figuras 2A, B, C). Hacia el ápice, las setas se estrechan hasta formar un tubo cilíndrico, donde, en un caso, se observa una gota de secreción (Figura 2D). Las setas tipo S4 también fueron observadas en las secciones laterales de los abdómenes de las hembras (Tabla 2).

Las setas tipo S1, S2 y S4 están insertadas en bolsillos con diámetros de 7 a 7,7 μm (Tabla 1, Figuras. 1C,

1E, 2B, 2E), mientras que las setas tipo S3, lo están en bolsillos con diámetros de 3,2 a 4,6 μm (Tabla 1, Figuras. 1E y 2E). La densidad de estos bolsillos varía según su posición sobre el abdomen. En las partes dorsales del abdomen, donde se ubican las S1 y S2, los bolsillos tienen una densidad de aproximadamente 1000/mm² (Figuras 1C y E). Los bolsillos en las partes laterales del abdomen, donde se encuentran las S4, tienen una densidad de 3500/mm² (Figura 3b). En la zona ventral del abdomen, se observaron bolsillos grandes, donde se insertan las S1 y S4, los cuales tienen una densidad de 2000/mm² y bolsillos pequeños donde se ubican las S3, que son muy abundantes, aproximadamente 50.000/mm² (Figuras 1E y 2E).

En las posturas, se observan la presencia de las setas tipos S1, S3, S4 siendo estas últimas las más abundantes. Un hecho resaltante fue que en los machos sólo se observaron las setas tipo S1.

Según la morfología externa de las setas, se sugiere que las setas tipo S1 y S2 probablemente no están asociadas a las propiedades urticantes de *H. metabus*, debido a su naturaleza porosa y la carencia de bárbulas o puntas agudas. Además, las setas tipo S1 se encuentran solamente en los machos, las cuales no provocan reacciones urticantes al ponerse en contacto con la piel.

La morfología de las setas tipo S3 y S4, exclusivas a las hembras, sugiere que pueden estar estrechamente relacionadas con las propiedades urticantes de las mismas. Las setas urticantes descritas en las larvas del género *Thaumetopoea* (Notodontidae) muestran un largo similar (150-250 μm) y comparten algunas de las características estructurales de las setas tipo S3 de *H. metabus*: bárbulas pequeñas y agudas, apuntando hacia el ápice (Lamy & Novak 1988). Setas urticantes similares a las S3 han sido descritas en diferentes especies del género *Hylesia* por Lamy & Lemaire (1983), quienes reportaron que en *H. metabus* las setas miden de 100 a 225 μm y tienen una apertura en la zona distal. Posteriormente, Novak & Lamy (1987) señalan que esta «apertura» pudiera ser para liberar la sustancia urticante.

Las setas tipo S4 fueron descritas por primera vez por Rodríguez (2001). Su morfología (bárbulas afiladas

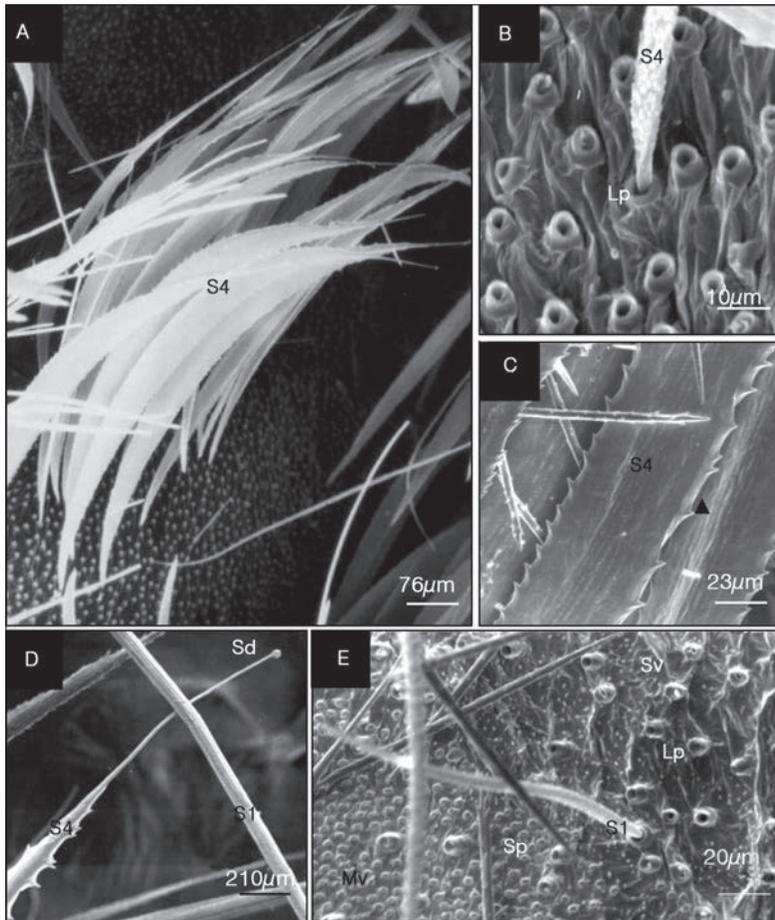


Figura 2A Vista general de la región lateral del abdomen de la hembra cubierta con las setas tipo S4. 2B) Detalle de la base de una seta tipo S4. Lp: Bolsillo grande. 2C) Detalle de la sección media de una seta tipo S4. Observe las bárbulas laterales (▲). 2D) Detalle del ápice de una seta tipo S4. Observe la gota de secreción (Sd). S1: Seta tipo 1. 2E) Detalle del cambio en los tamaños de los bolsillos entre la región ventral anterior y ventral medio del abdomen de las hembras. Sv: región ventral anterior, Mv: región ventral medio, Sp: bolsillo pequeño, Lp: bolsillo grande. S1: Seta tipo 1.

Tabla 2. Ubicaciones relativas de las setas y los reservorios en los abdómenes de las hembras adultas de *Hylesia metabus*.

Zona del abdomen	Tipo de seta	Tipo de reservorio
Dorsal	S1, S2	RI
Lateral	S4	RIII
Ventral	S3	RI, RII, RIII

Fuentes: Rodríguez (2001), Rodríguez *et al.* (2004).

en la base y triangulares a lo largo de la parte aplanada) sugiere que pueden segregar una sustancia urticante. La gota de secreción observada en el ápice de una de estas setas también indica que contienen una sustancia líquida. Además, las setas están asociadas al aparato ovipositor en las hembras y son el tipo de seta más abundante en las posturas, las cuales son sumamente urticantes.

Ultraestructura de las setas de *Hylesia metabus*

En las estructuras celulares debajo de las setas se identificaron tres tipos de reservorios: el reservorio tipo I (RI), observado de las zonas ventrales y dorsales de los abdómenes de las hembras (Tabla 2), contiene una sustancia homogénea y las células que lo rodean no tienen estructuras bien diferenciadas excepto por los núcleos grandes que se aprecian en la base (Figura 3). El reservorio tipo II (RII), el cual se encontró en la zona ventral, contiene una sustancia amorfa en su interior y está aparentemente conectado a la estructura celular debido a la presencia de canales (Tabla 2, Figura 4). El reservorio tipo III (RIII), observado de las zonas ventrales y laterales, está rodeado por células tricógenas, cuyas membranas forman microvellos adyacentes al reservorio. Estas células contienen abundantes mitocondrias y están rodeadas por las células termógenas (Tabla 2, Figura 5).

De los tres tipos de reservorios, el RIII tiene las características más típicas de una glándula urticante. Este reservorio contiene células termógenas que rodean a las células tricógenas, las cuales llevan en su interior mitocondrias distribuidas en la zona cerca-

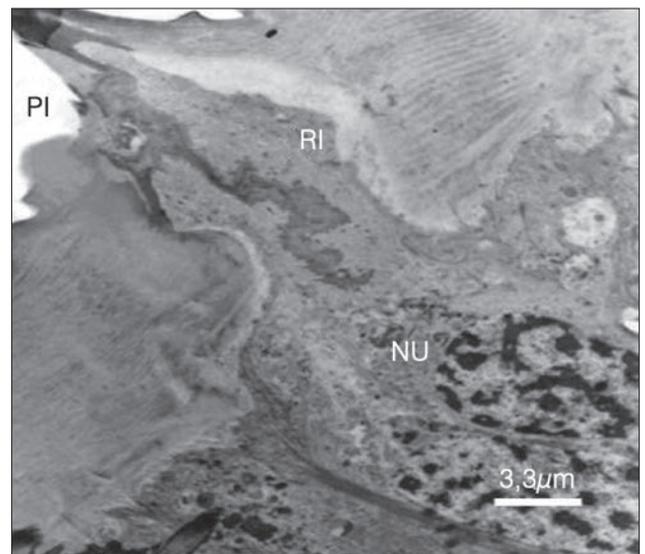


Figura 3. Sección longitudinal del reservorio tipo I (RI). PI: Punto de inserción, NU: Núcleo.

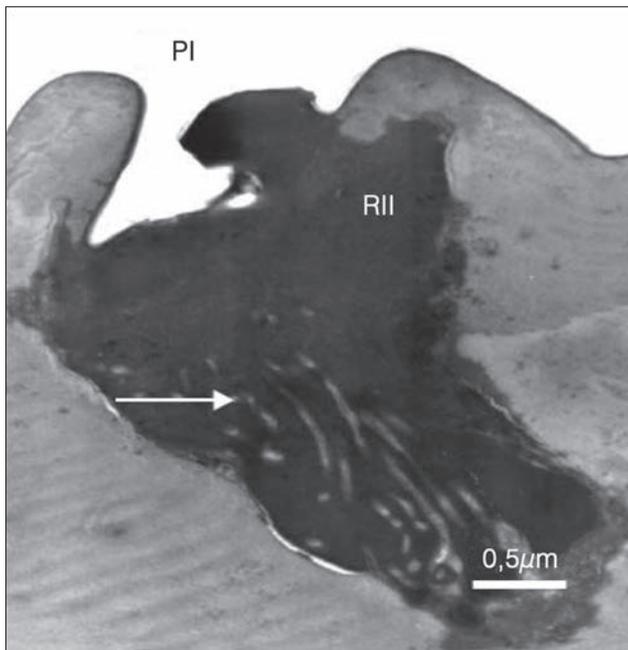


Figura 4. Sección longitudinal del reservorio tipo II (RII). Obsérvense los canales (flecha) PI: Punto de inserción.

na a los microvellos. La presencia de mitocondrias indica las grandes cantidades de energía utilizada, así como un transporte activo de sustancias hacia el reservorio, los microvellos aumentan la superficie y, por lo tanto, el transporte de sustancias desde la célula tricógena hacia el reservorio. La estructura y composición de este reservorio sugiere que podría ser el responsable de la producción y transporte del compuesto urticante. Pelissou & Lamy (1988) estudiaron la ultraestructura del abdomen de las hembras de esta especie y describieron un solo tipo de reservorio al que señalaron como responsable de la producción del compuesto urticante (descrito por Rodríguez 2001, como RIII). Sin embargo, Pelissou & Lamy (1988) mencionan la ausencia de mitocondrias en la célula tricógena, las cuales sí fueron observadas por Rodríguez (2001), lo cual implica que estas células están metabólicamente activas.

En *H. metabus*, la estructura del reservorio tipo III es parecida a la de otras especies de lepidópteros: existen canales que atraviesan la cutícula, los cuales se conectan con una prolongación citoplasmática que está dirigida hacia la superficie cuticular, la cual a su vez, está conectada con la célula tricógena. Ésta emite prolongaciones que se insertan en el interior de la célula termógena (Lamy & Lemaire 1983; Pelissou & Lamy 1988).

La organización de las células del RIII es similar a las células asociadas con las setas urticantes de larvas

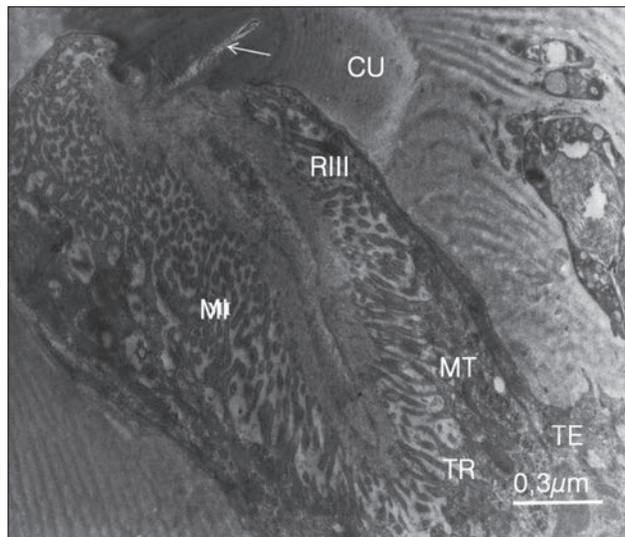


Figura 5. Sección longitudinal del reservorio tipo III (RIII). Observe la seta tipo S3 saliendo del reservorio (flecha). CU: cutícula, MI: microvellos, MT: mitocondria, TR: célula tricógena, TE: célula termógena.

del género *Thaumetopoea* (Novak & Lamy 1987), en las que los pelos están colocados individualmente en cavidades que están hacia el final del extremo apical de los canales, con la cutícula transversa y conectados con la célula tricógena. En las larvas de *Euproctis* spp., los procesos citoplasmáticos de la célula tricógena penetran a través del citoplasma de la célula termógena y la cutícula transversa, tal como sucede en adultos de *H. metabus*, con la diferencia de que estos primeros son estrechos y no contienen reservorio. Sin embargo, hay áreas con microvellosidades debajo de la prolongación citoplasmática, las cuales podrían transportar la sustancia urticante acumulada de la célula tricógena hasta la cavidad de la seta (Kawamoto *et al.* 1978).

Si el reservorio RIII es responsable de la producción de la sustancia urticante en *H. metabus*, debe estar asociado a una o ambas setas (S3 y S4). En la Tabla 2 se muestran las ubicaciones relativas de las setas y los reservorios. Se puede apreciar que las setas S4 están aparentemente asociadas con las RIII (además, están ubicadas cerca del aparato ovipositor y son abundantes en las posturas). Sin embargo, en la figura 5, se puede apreciar que una seta muy parecida a las S3 esta insertada en el canal del reservorio de un RIII, lo que implica que por lo menos las setas S3 son transportadoras de la sustancia urticante. En esta misma figura se puede observar que la seta es claramente hueca, lo que concuerda con las descripciones de Novak *et al.* (1987). Es posible, entonces, que la aparente asociación por ubicación de las RIII

con las S4 se deba a una falla en la precisión al cortar los abdómenes.

Ensayos de comportamiento

En la Tabla 3 se muestran los resultados de los experimentos con las hormigas. Se puede observar que hay una diferencia significativa entre las respuestas de las hormigas en las categorías de «exploración» y «acarrear» hacia los dos tratamientos (masas de huevos desprovistas de o cubiertas con setas). Un total de 18 hormigas exploraron las masas de huevos desprovistos de setas, mientras que ninguna hormiga exploró las masas de huevos cubiertas con setas. De la misma manera, hubo un total de 16 hormigas que acarrearón los huevos sin cubierta de setas a su nido, pero ninguna hormiga acarrearó los huevos con setas. En general, las hormigas ignoraron los huevos cubiertos con setas y evitaron ponerse en contacto con ellas.

Estos ensayos mostraron que las hormigas no fueron repelidas por las setas abdominales que cubrían los

Tabla 3. Respuestas de *Pheidole* sp. a las masas de huevos desprovistas de o cubiertas con setas de *Hylesia metabus*.

Respuesta	Masas de huevos sin setas (tratamiento 1)	Masas de huevos con setas (tratamiento 2)	Valor de Z	Probabilidad de que no hubo diferencia entre los tratamientos
Exploración	18	0	-2,842	0,014*
Caminar sobre	22	8	-0,287	0,796
Tocar	10	0	-1,835	0,258
Acarrear	16	0	-2,85	0,014*

Los números en la segunda y tercera columnas se refieren al número total de hormigas que respondieron a las masas de huevos en cada una a las categorías de respuesta, al sumar los resultados de todas las nueve réplicas.

*Denota una diferencia significativa en la respuesta de las hormigas entre los dos tratamientos (Prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney). Fuente: Rodríguez *et al.* (2004).

huevos; no se observó comportamiento de alarma y simplemente los ignoraban o los evitaban. Sin embargo, las masas de huevos sin su capa protectora de setas fueron llevadas al nido de las hormigas. Esto sugiere que la capa protectora no disuade a las hormigas por sus propiedades urticantes, sino que sirve para esconder los huevos de éstas. Es posible, sin embargo, que las propiedades urticantes podrían ser dirigidas a mamíferos o aves que también son depredadores potenciales de los huevos de *H. metabus*.

CONCLUSIONES

Existen cuatro tipos de setas que cubren los abdómenes de las hembras de *H. metabus*. De ellos, las S3 y S4 tienen características compatibles con la producción de la sustancia urticante. Sin embargo, la evidencia ultraestructural indica que son únicamente las setas S3 las que están asociadas a glándulas responsables de la producción, almacenamiento y transporte de sustancias utilizadas en la defensa de esta especie. Los ensayos con las hormigas indican que las setas protegen a los huevos de algunos depredadores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al personal de la Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias, Región XI (Gsace XI) y a la Fundación para el Mejoramiento de la Salud en el municipio Cajigal (Funmesaludca) por su ayuda en la recolecta de

los adultos y las posturas de *Hylesia metabus* y al Centro de Ingeniería de Superficies-Universidad Simón Bolívar y Glen Rodríguez por la asistencia técnica. Este trabajo recibió apoyo financiero del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Proyecto # CI-5-1901-0820198 y Fonacit (Fondo de Investigación Regional), de la Universidad Simón Bolívar y del Proyecto Reto *Hylesia metabus* (Ministerio de Poder Popular para la Ciencia y Tecnología e Industrias Intermedias).

BIBLIOGRAFÍA

- Basset Y (1996) Local communities of arboreal herbivores in Papua New Guinea: predictors of insect variables. *Ecology* 77:1906-1919.
- Bleumink E, M De Jong, Kawamoto F, Meyer G, Kloosterhuis A & I Slijperpal (1982) Protease activities in the spicule venom of *Euproctis* caterpillar. *Toxicon* 20:607-613.

- De Jong M, Kawamoto F, Bleumink E, Kloosterhuis A & G Meijer (1982) A comparative study of the spicule venom of *Euproctis caterpillar*. *Toxicon* 20:477-485.
- Fornés L (1998) *Aspectos de la biología y comportamiento sexual de Hylesia metabus (Lepidoptera: Saturniidae)*. Trabajo de Grado. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. 50 pp.
- Gravena S & H DaCunha (1991) Predation of cotton leafworm first instar larvae, *Alabama argillacea* (Lep. Noctuidae). *Entomophaga* 36:481-491.
- Hómez J, Soto R, de Soto S, Méndez H & P Mármol (1995) *Parasitología*. Ediluz. Maracaibo, Venezuela. 450 pp.
- Kawamoto E, Suto C & N Kumada (1978) Studies on the venomous spicules and spines of moth caterpillar. I. Fine structure development of venomous spicules of the *Euproctis* caterpillar. *Journal of Medical Science & Biology* 31:291- 299.
- Krüger O & GC McGavin (1998) The influence of ants on the guild structure of Acacia insect communities in Mkomazi Game Reserve, north-east Tanzania. *African Journal of Ecology* 36: 213-220.
- Lamy M (1984) La processionnaire du colatier: *Anaphae venata* Butler (Lepidoptera: Thaumetopoeidae): papillon urticant d'Afrique. *Insect Science and its Application* 5:83-86.
- Lamy M & C Lemaire (1983) Contribution á la systématique des *Hylesia*: Etude au microscope électronique a balayage des «flechettes» urticantes. *Hylesia* spp. *Bulletin Societé Entomologique de France* 88:176-192.
- Lamy M & F Novak (1988) Mise en place et différenciation de l'appareil urticant de la Chenille processionnaire du chêne (*Thaumetopoea processionea* L.) (Lepidoptera: Thaumetopoeidae.) au cours de son développement larvaire. *Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale* 9:55-65.
- Leston D (1973) The ant mosaic - tropical tree crops and the limiting of pests and diseases. *Pest Articles & News Summaries* 19:978-986.
- Novak F & M Lamy (1987) Étude ultrastructurale de la glande urticante de la chenille processionnaire du pin, *Thaumetopoea pityocampa* Schiff (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 16:263-270.
- Novak F, Pelissou V & M Lamy (1987) Comparative morphological, anatomical and biochemical studies of the urticating apparatus and urticating hairs of some lepidopteras: *Thaumetopoea pityocampa* Schiff, *T. processionea* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae.) and *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* 88:141-146.
- Olivares M & L Vásquez (1984) Morfología externa de escamas de *Hylesia* sp. a nivel de microscopía electrónica. IX Congreso Venezolano de Entomología. San Cristóbal, Venezuela. 20 pp.
- Osborn F & K Jaffé (1998) Chemical ecology of the defense of two butterfly larvae against ants. *Journal of Chemical Ecology* 24:1173-1186.
- Pelissou V & M Lamy (1988) Le papillon cendre: *Hylesia metabus* (= *H. urticans* Floch et Abonnenc) (Lepidopteres: Saturniidae) papillon urticant de Guyane Française: etude cytologique de son appareil urticant. *Insect Science and its Applications* 9:185-189.
- Perfecto I (1990) Indirect and direct effects in a tropical agroecosystem: the maize-plant-ant system in Nicaragua. *Ecology* 7:2125-2134.
- Pescé H & A Delgado (1971) Poisoning from adult moths and caterpillars. En: *Venomous Animals and their Venoms, Vol III, Venomous Invertebrates*. Ed: Bürcchel W, Buckley E. Academic Press. USA. Pp 119-156.
- Rodríguez J (2001) *Morfología externa e interna de setas abdominales de hembras adultas de Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae). Trabajo de grado. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 32 pp.
- Rodríguez J, Hernández J, Fornés L, Lundberg U, Arocha-Piñango C & F Osborn (2004) External morphology of abdominal setae from male and female *Hylesia metabus* adults (Lepidoptera: Saturniidae) and their function. *Florida Entomology* 87:32-36.
- Siegel S & N Castellan (1988) *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill Book Company. New York, London. 399 pp.
- Stobart R & J Shaw (1964) Salt and water balance: excretion. En: Rockstein E (Ed) *The Physiology of Insects*. Academic Press. New York, London. 189-235 pp.
- Tisseuil J (1935) Contribution á l'étude de la papillonite guyanaise. *Bulletin of the Exotic Pathology Society* 28:719-721.
- Tyzzer EE (1907) The pathology of the brown tail moth dermatitis. *Journal of Medical Research* 16:43-64
- Vásquez L (1990) Estudio bioecológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer en el oriente de Venezuela. *Saber* 3:14-20.
- Wirtz R (1984) Allergic and toxic reactions to non-stinging arthropods. *Annual Review Entomology* 29:47-69.

Toxinología de la polilla *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])

Ulf Lundberg^{*1}, Víctor Salazar², Evelyn León³, Luis Javier González⁴ y Yanet Támbara Hernández³

¹ Centro de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apdo. 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

² Servicio de Microscopía de Luz, Centro de Bioquímica y Biofísica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

³ Unidad de Proteómica, Centro de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

⁴ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.

*ulundber@ivic.gob.ve

Resumen

Las hembras adultas de la polilla neotropical *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) poseen minúsculas espículas (setas), cargadas de sustancias urticantes en su interior. Estas setas son liberadas en cantidades enormes durante los vuelos nocturnos de apareamiento. La incrustación dérmica de las setas, y posterior liberación de toxinas en la dermis o la epidermis, da origen a una dermatitis intensa, a veces incapacitante, en humanos. El cuadro clínico (lepidopterismo) se caracteriza por presentar erupciones cutáneas vesículo-papilares de larga duración, que pueden persistir durante semanas. La toxina ha mostrado ser una proteasa alcalina que es capaz de causar una reacción de hipersensibilidad retardada (tipo 4). Es una glucoproteína altamente resistente a la degradación proteolítica. Los glicanos presentes son neutros adosados a residuos de asparagina. Son de tipo híbrido con N-acetilglucosamina y galactosa en las ramificaciones terminales. Estos glicanos son extremadamente raros en los insectos y nunca han sido reportados anteriormente en Lepidoptera. En el presente capítulo resumimos las características toxinológicas, bioquímicas y estructurales de la toxina identificada.

Abstract

Toxinology of the *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) Moth

The adult females of the neotropical moth *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) possess minute spicules (setae) filled with urticating substances in their hollow interior. Copious amounts of these setae are released during nocturnal mating flights. The penetration of the setae in the skin and posterior release of the toxin in the dermis/epidermis gives rise to an intense, and at times incapacitating, dermatitis among humans. This clinical condition (lepidopterism) is characterized by papulo-vesicular dermal lesions in affected areas which may last for several weeks. The toxin is an alkaline protease capable of inducing a retarded type 4 hypersensitivity reaction. It is a glycoprotein highly resistant to proteolytic degradation. The glucanes present in the toxin are of the neutral N-linked hybrid type with N-acetylglucosamine and Galactose in their terminal ramifications. These glucanes are extremely rare in insects, and have never been reported previously in Lepidoptera. In the present chapter we outline the toxinologic, biochemical, and structural characteristics of the toxin identified.

Palabras clave Key words

ESI-MS, glucoproteína, lepidopterismo, toxina.
ESI-MS, Glucoprotein, Lepidopterism, Toxin.

PRESENTACIÓN

Las larvas de aproximadamente 12 familias de Lepidoptera son capaces de causar un cuadro clínico conocido como lepidopterismo. Éste se caracteriza por manifestaciones dermatológicas en el sitio de exposición, como por ejemplo: dermatitis y urticaria, además de condiciones generalizadas como asma, osteocondritis, síndrome de coagulación diseminada, insuficiencia renal y hemorragia intracerebral (Díaz 2005). Entre las familias de Lepidoptera con propiedades urticantes conocidas están: Arctiidae, Anthelidae, Bombycidae, Euprotidae, Lasiocampidae, Limacodidae, Lymantriidae, Megalopygidae, Noctuidae, Nymphalidae, Notodontidae y Saturniidae (Matheson 1950; Riley & Johannsen 1938; Roth & Eisner 1962; Wirtz 1984). En la mayoría de los casos, las setas urticantes se encuentran en las larvas. Sin embargo, en algunas especies los insectos adultos son portadores de ellas, como en el caso de los géneros *Acyphas* y *Euproctis* en la familia Lymantriidae y en el género *Hylesia* en la familia Saturniidae. Las lesiones cutáneas están clasificadas como una dermatitis macropaular y vesiculopapular de inicio retardada, acompañada de un prurito intenso (Benaim-Pinto *et al.* 1991, Díaz 2005). Las lesiones normalmente tienen una duración de 7 a 21 días, pero en algunos casos pueden persistir por meses.

El género *Hylesia* está conformado por un grupo de polillas neotropicales que habitan desde el estado de Arizona de los Estados Unidos hasta la provincia de Patagonia en el extremo sur de Argentina (De Camargo 2007). Se han identificado alrededor de 118 especies en este género, de los cuales 25 han sido reportadas en Venezuela (<http://cbe.ivic.gob.ve/ulfesp002.html>). La mayoría de las especies de *Hylesia* identificadas en Venezuela no causa problemas entre la población, con la notable excepción de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]). Esta polilla se considera un problema mayor de salud pública para los habitantes que vive en las cercanías de los manglares del golfo de Paria (golfo Triste) en la región nororiental de Venezuela (Fornés & Hernández, 2001).

El ciclo biológico de *H. metabus* dura aproximadamente 101 días, dando origen a 3,65 generaciones sucesivas cada año (Boyé 1932; Benaim-Pinto *et al.* 1991). Las hembras adultas liberan cantidades enormes de setas urticantes microscópicas cargadas de toxina durante los vuelos de apareamiento al final de cada ciclo reproduc-

tivo (Salazar *et al.* 2010). Presuntamente la presencia de este tipo de defensa podría ser para:

- Resguardar y asegurar el éxito reproductivo del vuelo de cópula contra la amenaza de especies depredadoras (murciélagos, aves, etc.), ya que durante el vuelo, las setas urticantes permanecen en grandes cantidades sobre las hembras y en los alrededores del lugar del vuelo.
- Proteger los huevos y las larvas recién nacidas de depredadores y parásitos. (Rodríguez *et al.* 2004).

Los hembras adultas tienen un fototropismo positivo muy marcado, y por lo tanto son atraídos en grandes números por el sistema de alumbrado público de los pueblos cercanos a los manglares habitados por *H. metabus*. En consecuencia, durante las épocas de vuelo de los adultos, tanto el sistema de alumbramiento público como las luces eléctricas dentro de los domicilios tienen que ser apagados después de la puesta del sol para evitar la invasión de las polillas. Además, la mayoría de las actividades diurnas son restringidas, como por ejemplo la agricultura, la pesca artesanal, las actividades docentes y deportivas.

La naturaleza y mecanismos de acción de las sustancias urticantes en los lepidópteros han sido temas controversiales. La presencia de histamina en las setas urticantes de *Hylesia* sp. ha sido citada previamente como posible agonista de las lesiones (Dinehart *et al.* 1987). Sin embargo, el efecto es de muy corta duración, por lo que parece poco probable que juegue un papel de importancia en las lesiones inflamatorias causadas por *H. metabus*, tomando en cuenta la larga duración de las mismas. En efecto, en estudios recientes no se ha podido corroborar los hallazgos del estudio anterior (Dinehart *et al.* 1987; Benaim-Pinto *et al.* 1992; Lundberg *et al.* 2007) por lo que debe haber otros factores causantes de la reacción inflamatoria.

Sustancias enzimáticas con actividades proteolíticas parecidas a las serina proteasas han sido reportadas en orugas del género *Euproctis* (Lymantriidae) (Bleumink *et al.* 1982). Una proteína con un peso molecular de 28 kD, extraída de las setas de las larvas de *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Thau-

metopoeidae) causó reacciones dérmicas similares a las causadas por la toxina de *H. metabus* (Lamy *et al.* 1986). Varios estudios han demostrado la presencia de proteínas con actividades inflamatorias en las setas urticantes de *H. metabus* (Benaim-Pinto *et al.* 1992). En estos estudios se reportaron, además, la presencia de una enzima con actividad proteolítica con un peso molecular de 32 kDa (determinado por cromatografía de permeación de geles). El pH óptimo para la actividad enzimática es 9,0 (Lundberg *et al.* 2002).

La toxina de *H. metabus* tiene un peso molecular de 38 kD aproximadamente cuando se estudia mediante electroforesis en poliacrilamida en estado nativo. Esta toxina es una proteasa alcalina con características pare-

cidas a las enzimas pertenecientes a la familia de serina proteasas. Al ser analizada por electroforesis en presencia de sustancias reductoras de enlaces sulfidriles «condiciones disociantes» se evidenciaron dos componentes: una glucoproteína de un peso molecular de 29 kD (HMT-29) y una proteína con un peso molecular de 31 kD (HMT-31) (Lundberg *et al.* 2007).

En este capítulo presentamos evidencias de que la glucoproteína presente en la toxina contiene N-glicanos neutros de tipo híbrido, los cuales hasta los momentos no han sido reportados en los insectos. Estudios inmunohistopatológicos muestran que la toxina está presente en las setas urticantes de las hembras adultas y en las posturas de huevos (ver páginas 47-56).

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Extracción y purificación de las toxinas

La extracción se realizó esencialmente como ha sido descrito por Lundberg *et al.* (2007). Los cuerpos deshidratados de los adultos o las posturas de huevos eclosionadas (aproximadamente 170 adultos o 150 posturas) se sumergieron en 50 ml de una solución Tris de 50 mM pH 9,0 suplementada con 0,5 M de cloruro de sodio con agitación por 48 h (la alta fuerza iónica es necesaria para lograr una extracción eficiente de la toxina). Los extractos obtenidos de los adultos se usaron para estudiar las diferencias entre los sexos mientras que para los estudios bioquímicos, estructurales e histopatológicos se utilizaron las posturas como materia prima para la purificación de la toxina, ya que en ellas hay muy pocos contaminantes y la toxina resulta ser muy pura. Los extractos obtenidos de esta manera se centrifugaron a 5.000 rpm por 45 min en una centrífuga refrigerada de mesa y la toxina se precipitó en forma fraccionada usando sulfato de amonio al 35 y 60 % de saturación. Los precipitados obtenidos al 60 % de saturación mostraron una alta actividad proteolítica mientras que los precipitados que se obtuvieron al 35 % de saturación no tuvo actividad alguna. Los precipitados obtenidos al 60 % de saturación de sulfato de amonio fueron disueltos en un volumen mínimo de solución Tris 50 mM pH 8,5 suplementada con cloruro de sodio al 50 mM (solución A), y se centrifugaron a 20.000 rpm en una centrífuga Sorvall RC-5B en un rotor HB4 por 2 horas. Posteriormente,

se dializaron dos veces contra 3 litros de la solución A. Finalmente, los dializados se concentraron 10 veces utilizando una cámara de ultrafiltración (Amicon 800, Millipore Co. Billerica, MA 01821, USA). La determinación de la concentración proteica se hizo mediante la metodología de Bradford (Bradford 1976) y la actividad amidolítica se determinó usando el sustrato cromogénico S1-2302 (Lundberg *et al.* 2007).

Este método de purificación de la toxina de *H. metabus* se usa rutinariamente en la Unidad de Toxinas de Invertebrados del IVIC debido a que proporciona una alta recuperación de proteínas con alta actividad biológica. Además, ha demostrado ser un método altamente reproducible y confiable. Aunque hasta los momentos ha sido empleado exclusivamente para la purificación de las toxinas de *H. metabus*, podría ser aplicable a otras especies de este género.

Estudios electroforéticos

En el estudio electroforético se midió la migración de muestras de proteínas sometidas a un campo eléctrico en un gel de poliacrilamida en presencia del detergente dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Este procedimiento fue usado para:

- Separar los subcomponentes de la toxina en su estado nativo para comparar los extractos de las

setas provenientes de adultos (machos y hembras) y las posturas;

- Separar los subcomponentes de la toxina contenido en las setas provenientes de las hembras en presencia de sustancias reductoras de puentes disulfuro (condiciones disociantes),
- Demostrar la actividad proteolítica de la toxina a través de la degradación de fibrinógeno bovino en condiciones disociantes durante un periodo de 24 h (ver la sección de Actividad enzimática a continuación).

Los estudios electroforéticos se realizaron en minigeles de acrilamida de 10 % (Mini PROTEAN 3, Bio Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, USA) utilizando el sistema descrito por Laemmly (1970). Para visualizar los componentes de las proteínas en el gel se utilizó el método de coloración con *Coomassie Brilliant Blue* (Andrews 1986) o el método de visualización de glicoproteínas con ácido periódico en combinación con el reactivo de Schiff (Jay *et al.* 1990).

Actividad enzimática

La actividad amidolítica de la toxina purificada en sustratos cromogénicos fue evaluada según Lundberg *et al.* (2002). La actividad proteolítica fue evaluada al incubar Albúmina Bovina (BSA), fibrinógeno bovino o caseína a una concentración de 3 mg/ml con 5 µg de la toxina purificada en un tampón de Tris de 50 mM pH 8,5 suplementado con 50 mM de NaCl. Muestras de 20 µL fueron tomadas a los 0, 5, 15, 30 y 60 min y a las 4 y 24 h. En el caso de las muestras de fibrina y fibrinógeno se hicieron las incubaciones con y sin 0,1 M de ácido ε-aminocapróico (EACA) como inhibidor

del sistema fibrinolítico. Las mismas fueron tratadas con la solución de muestra de Laemmly, calentadas a 95 °C por 5 min y analizadas mediante SDS-PAGE en un gel de 10 % de acrilamida.

Estudio de cinética enzimática

La relación k_{cat}/K_m relaciona la velocidad de formación del producto (P) del complejo sustrato-enzima (k_{cat}) a una saturación de 50 % de los sitios catalíticos de la enzima (K_m). Esta relación fue evaluada usando los sustratos cromogénicos S-2302, S-2238, S-2444, S-2288, S-2222, S-2266, y S-2251 (Chromogenix AB, Mölndal, Suecia) (Lundberg *et al.* 2002). Los sustratos tienen una secuencia de reconocimiento que le confiere la especificidad como sustrato ubicada inmediatamente N-terminal del sitio de clivaje enzimático. En la parte C-terminal del péptido hay un cromóforo (paranitroanilina), que al ser clivado absorbe luz a 405 nm lo que sirve como indicador. Las estructuras y especificaciones de estos sustratos se pueden ver en la Tabla 1. Experimentalmente, el sustrato cromogénico (200 µM) fue incubado con la toxina purificada (5 µg/ml) en un tampón de Tris 50 mM pH 8,5 suplementado con 50mM de NaCl y la absorbancia a 405 nm se registró en función del tiempo. La concentración del sustrato a un momento determinado se obtuvo mediante:

$$S = S_0 - P$$

donde S es la concentración del sustrato en un momento determinado y S_0 la concentración inicial del sustrato. P es la concentración de p-nitroanilina determinado espectrofotométricamente a 405 nm. El logaritmo natural de la concentración del sustrato en un momento determinado ($\ln S$) fue calculado y graficado en función del tiempo. La diferencial de la curva (-Kobs) fue usada para el cálculo de K_{cat} mediante la siguiente ecuación.

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{obs}}{E_t}$$

Donde k_{obs} es la constante de primer orden y E_t es la concentración de la enzima en moles por litro. La velocidad de formación de 1/p-nitroanili-

Tabla 1. Estructura y especificaciones de los sustratos cromogénicos estudiados.

Fórmula	Código	K_3/K_m	Especificidad
H-D-Pro-Phe-Arg-pNA	S-2302	$4.47 \cdot 10^6$	Caligreina Plasmática
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	S-2238	$1.87 \cdot 10^6$	Trombina
H-D-PiroGlu-Gly-Arg-pNA	S-2444	$1.35 \cdot 10^6$	Urokinasa
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	S-2288	$1.11 \cdot 10^6$	Activador tisular del plasminógeno (t-PA)
H-D-Val-Leu-Arg-pNA	S-2266	$7.10 \cdot 10^5$	Calicreina glandular
H-D-Pro-Phe-Lys-pNA	S-2251	$4.31 \cdot 10^4$	Pasmina

na fue graficada en función de 1/sustrato, según Lineweaver & Burk (1934). Los valores de K_m y V_{max} fueron calculados a partir de las ecuaciones lineales obtenidas por el método de los mínimos cuadrados.

Determinación del pH óptimo

La determinación del pH óptimo para la actividad enzimática se hizo usando el extracto purificado (5 µg/ml) y el sustrato S1-2302 (0,5 mM). El medio de incubación fue un tampón de acetato, Tris o borato, a una concentración de 50 mM en presencia de 150 mM de NaCl para cubrir el rango de pH desde 3,0 hasta 11,0. La absorbancia a 405 nM fue determinada continuamente y la velocidad inicial de liberación de p-nitroanilina fue graficada en función del pH.

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica mediante la cual se puede elucidar las estructuras de compuestos químicos usando el patrón de fragmentación de las mismas y la posterior detección de las masas de los fragmentos. El método genera un espectro de masas, el cual nos permite determinar la estructura química del analito en cuestión. Los componentes de las muestras fueron separados por HPLC, ionizados mediante evaporación ESI y analizados por MS.

Los estudios de espectrometría de masas se emplearon para identificar la estructura de uno de los subcomponentes de las proteínas contenidas en la sustancia urticante de *H. metabus*. Para ello, se utilizó una de las bandas obtenidas por los estudios de electroforesis (marcada con un recuadro azul en la Figura 1) ya que se había determinado previamente que se trataba de una glicoproteína por coloración con ácido periódico/Schiff (Lundberg *et al.* 2007). La banda fue recortada y desteñida en una solución de bicarbonato de amonio (250 mM) suplementado con 30 % de acetonitrilo (v/v) a temperatura ambiente con agitación. La banda recortada se lavó con 500 µl de agua (MilliQ, USA) durante 5 min y se cortó en pequeños cubos de aproximadamente 1 mm³ a los cuales se añadió acetonitrilo hasta su total deshidratación. El exceso de acetonitrilo fue eliminado y los fragmentos de gel fueron secados completamente en una centrífuga evaporadora (Savant, USA). Los cubos fueron rehidratados en una solución de bicarbonato de amonio (50 mM)

suplementada con tripsina a una concentración de 12,5 ng/µl y luego incubados a 37 °C en un mezclador termostataado durante toda la noche. Los péptidos se extrajeron al sumergir el gel en 20 µl de agua durante 1 hora luego extraídos usando microcolumnas de fase reversa (ZipTipC18TM, Millipore, EUA). Los péptidos fueron lavados repetidamente con una solución de ácido fórmico al 5 % (v/v) y posteriormente eluidos en un volumen de 2-3 µl de una solución de acetonitrilo al 60 % (v/v), suplementada con ácido fórmico al 1 % (v/v). Los productos de la digestión triptica fueron cargados en unas agujas capilares de borosilicato cubiertos con oro (Micromass, RU) e introducidos en la fuente de ionización de un espectrómetro de masas híbrido con geometría ortogonal equipado con una fuente de nanospray (QTOF-2TM, Micromass, RU). Los voltajes del cono y el capilar fueron de 35

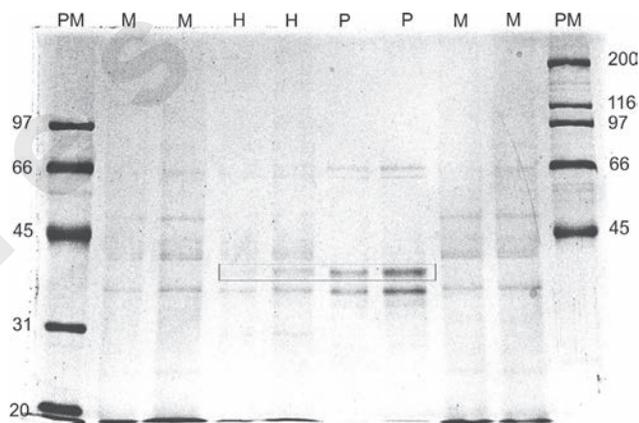


Figura 1. Análisis por electroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de extractos de adultos y posturas de *H. metabus*.

Patrón de migración electrofoética en condiciones no disociantes (nativos) de los extractos de los adultos de ambos sexos y las posturas de *Hylesia metabus*. PM: patrones de peso molecular. M: machos, H: hembras. P: posturas de huevos.

y 900 voltios, respectivamente. Los espectros de masas ESI-MS fueron adquiridos en un rango de peso molecular de 350-2000 Da. Las señales más intensas en el espectro ESI-MS fueron seleccionadas para su posterior secuenciación por ESI-MS/MS. El gas de colisión empleado fue el argón y se utilizó una energía de colisión apropiada para producir una fragmentación extensiva de los péptidos seleccionados que permitiese su secuenciación y posterior comparación por alineamiento con secuencias homólogas en las bases de datos (Shevchenko *et al.* 2001; Mackey *et al.* 2002).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Estudios electroforéticos

En la Figura 2 se muestra el patrón proteico de los extractos acuosos de los adultos (machos y hembras) y las posturas de huevos eclosionadas, en un gel de acrilamida en condiciones no disociantes (condiciones na-

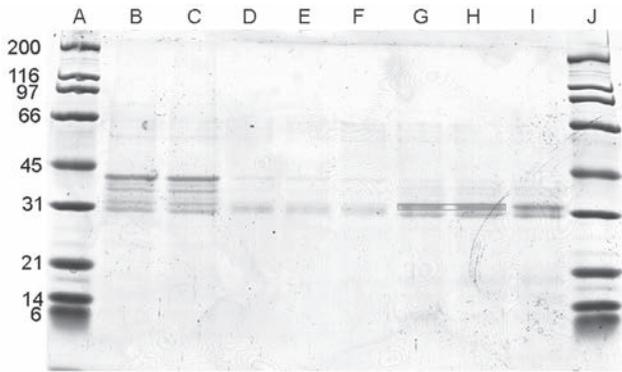


Figura 2. Análisis por electroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) de la toxina de *H. metabus*.

Patrón de migración electroforético en condiciones disociantes de la toxina de *H. metabus*. A y J: marcadores de peso molecular. B y C: extracto sin purificar. D, E y F: Precipitado obtenido al 35 % de saturación con sulfato de amonio. G, H e I: Precipitado obtenido al 60 % de saturación con sulfato de amonio. La banda marcada con un recuadro azul corresponde a HMT-60.

tivas, ver métodos). Como puede verse, las hembras y las posturas muestran una banda de un peso molecular de aproximadamente 38 kD, que no se evidencia en los machos. Por lo tanto, parece probable que la toxicidad esté asociada a este componente, ya que son únicamente las hembras y las posturas que poseen propiedades urticantes. En la Figura 2 se observa un gel representativo del extracto crudo de posturas y los precipitados obtenidos con 35 y 60 % de saturación de sulfato de amonio respectivamente. La actividad tóxica es más alta en el precipitado de 60 % de sulfato de amonio (Figura 2: carriles G, H y I), siendo aproximadamente 2,5 veces mayor que el extracto crudo (Figura 2: carriles B y C). Se puede concluir que la actividad de

la toxina está asociada a las dos bandas de 29 y 31 kD que se ven en el precipitado de 60 % y que también están presentes en el extracto crudo. La coloración con el reactivo de ácido periódico/Shiff para la detección

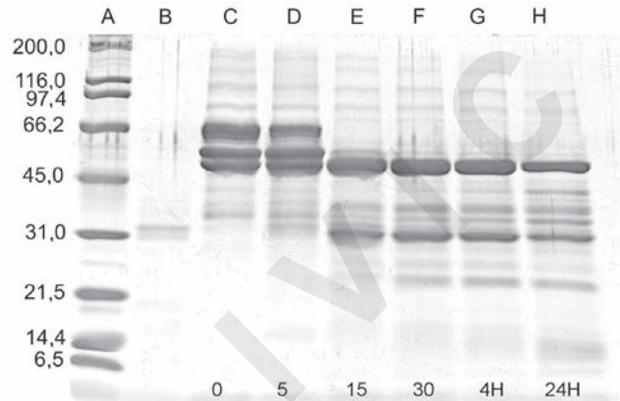


Figura 3. Degradación proteolítica del fibrinógeno bovino causado por HMT-60.

Degradación proteolítica progresiva del fibrinógeno bovino causado por la toxina de *H. metabus* (HMT-60) analizado por electroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras de enlaces sulfhidrilo. A: patrón de pesos moleculares. B: Toxina sola (HMT-60) 5 µg. C: 60 µg de fibrinógeno bovino. D: 60 µg de fibrinógeno bovino incubado con 5 µg de HMT-60 por 5 minutos. E: Idem 15 minutos. F: Idem 30 minutos. G: Idem 4 horas. H: Idem 24 horas.

de carbohidratos mostró que la banda superior en el precipitado de 60 % (Figura 2, recuadro azul) es una glicoproteína (datos no publicados). Esta banda fue recortada y usada para los estudios de espectrometría de masas de los glicanos.

Actividad proteolítica/enzimática

En estudios preliminares de las propiedades de la toxina se ha mostrado que se trata de una proteasa con una actividad notable en el ensayo de degradación de fibrina in vitro (Lundberg *et al.* 2002). En este estudio se muestra que la toxina degrada el fibrinógeno en forma progresiva (Figura 3). Como se puede apreciar, las tres bandas prominentes en el carril C

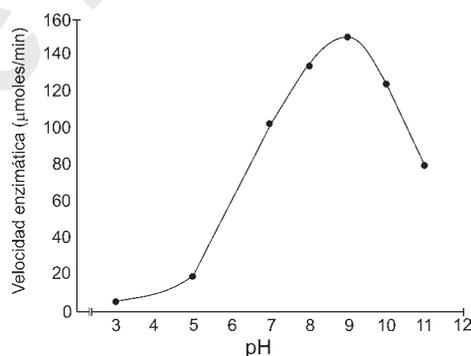


Figura 4. Actividad amidolítica del sustrato cromogénico S1-2302 en función del pH.

0,5 mM del sustrato cromogénico S1-2302 incubado con 5 µg de toxina purificada (HMT-60) en tampones de acetato, tris o borato, a una concentración de 50 mM en presencia de 0,15 M de NaCl para cubrir el rango de pH desde 3,0 hasta 11,0. La velocidad de liberación inicial de p-NA fue determinado espectrofotométricamente y se graficó en función del pH del búfer tampón.

representan la cadena $\text{A}\alpha$ (64 kD), $\text{B}\beta$ (56 kD) y γ (47 kD). La degradación es progresiva, siendo la cadena γ la más resistente mientras que las cadenas $\text{A}\alpha$ y $\text{B}\beta$ son totalmente degradadas a las 24 h.

Nos hicimos la pregunta de si la degradación del fibrinógeno/fibrina de la toxina podría ser explicada por una activación del sistema fibrinolítico, o si más bien la proteólisis fue una consecuencia directa de la actividad proteolítica de la toxina. Para entender el mecanismo de acción de la toxina de *H. metabus* se hicieron experimentos de degradación de fibrinógeno/fibrina en presencia del inhibidor del sistema fibrinolítico: ácido ϵ -aminocapróico (EACA). Es de notar que en experimentos en las mismas condiciones, pero en presencia de EACA, el patrón de degradación fue igual, de manera que la degradación probablemente no es mediada por el sistema fibrinolítico (datos no publicados) y en consecuencia probablemente se debe a la actividad proteolítica directa.

La actividad tóxica ha sido estudiada extensamente con sustratos tripeptídicos sintéticos (sustratos cromogénicos) y en bioensayos in vitro e in vivo (Salazar *et al.* 2010). La actividad más alta se encontró en el precipitado de 60 % de sulfato de amonio (Figura 2, carriles G, H e I). En la Tabla 1 están resumidas las estructuras de los sustratos cromogénicos y la velocidad de la actividad catalítica. Como se puede apreciar, la especificidad de la proteasa fue mayor para el sustrato S-2302, que es un sustrato diseñado para la calicreina (Pro-Phe-Arg) y menor para el sustrato S-2251 (Val-Leu-Lys). Basado en estos estudios, se ha postulado que la toxina de *H. metabus* tiene una actividad parecida a la calicreina y que su actividad, se podría atribuir, en parte, a la liberación de bradiquinina y lisilbradiquinina (Lundberg *et al.* 2002).

Dependencia del pH

En la Figura 4 se muestra la actividad enzimática en sustrato S1-2302. Como se puede apreciar, la máxima acti-

vidad enzimática de la toxina ocurre a un pH aproximadamente 9,0. A un pH de menor o igual a 5,0 no hay actividad, y a un pH mayor de 10,5 ocurre una inhibición irreversible de la enzima. El efecto estimulador de un pH alrededor de 9 podría explicar el hecho de que el uso de jabones comerciales, que tienen un pH alcalino, empeoran notablemente la dermatitis causada por *H. metabus*.

Análisis por espectrometría de masas

El espectro nanoESI-MS obtenido de una región del cromatograma nano-HPLC, donde eluyen

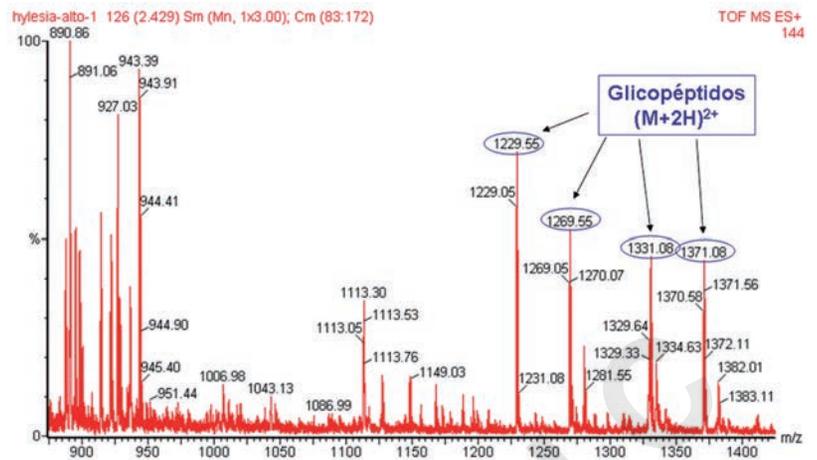


Figura 5. Espectro ESI-MS de los péptidos neutros N-glicosilados de la toxina de *H. metabus* (HMT-31).

Espectro obtenido de una región del cromatograma HPLC donde eluyen los péptidos N-glicosilados neutros. Los cuatro iones m/z 1229, 1269, 1331 y 1371 están señalados como glicopéptidos doblemente cargados mediante las flechas.

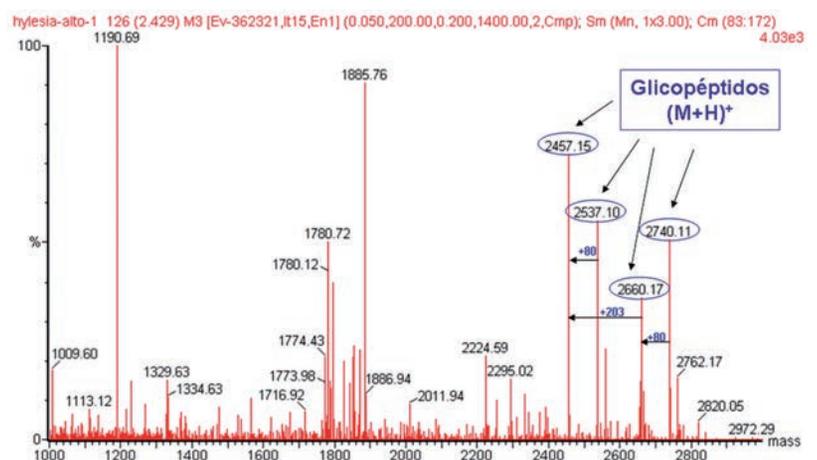


Figura 6. Espectro deconvolucionado de los péptidos neutros N-glicosilados de la toxina de *H. metabus* (HMT-31).

Espectro deconvolucionado de los péptidos neutros N-glicosilados de la toxina de *H. metabus* (HMT-31) mostrados en la figura 5 señalando los correspondientes glicopéptidos de una 2457, 2537, 2660 y 2740.

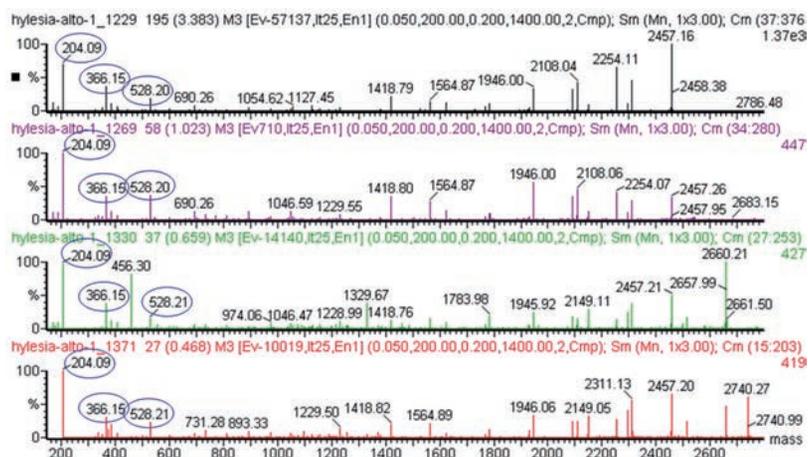


Figura 7. Espectros MS/MS de los péptidos con m/z 1229, 1269, 1331 y 1371. Los espectros MS/MS deconvolucionados de los péptidos con m/z 1229, 1269, 1331 y 1371 mostrados en la figura 5 (desde arriba hacia abajo) mostrando la presencia de los iones m/z 204,09 [HexNAc]⁺, 366,15 [HexNAc-Hex]⁺ y 528,21 [HexNAc-Hex₂]⁺ (resaltados con óvalos de color azul en la figura).

los péptidos N-glicosilados. Se señalan cuatro iones (1229/1269/1331/1371) que son doblemente cargados, como glicopéptidos (Figura 5). En la Figura 6 se observa el resultado de la deconvolución de este espectro, originando todos los iones como (M+H)⁺. Se señalan también cuatro iones de m/z 2457, 2537, 2660 y 2740 como glicopéptidos y las diferencias de masas entre ellos.

Como puede observarse, el ión m/z 2537,10 es 80 uma mayor que el m/z 2457,15 y de la misma manera el ión m/z 2740,11 es 80 uma mayor que

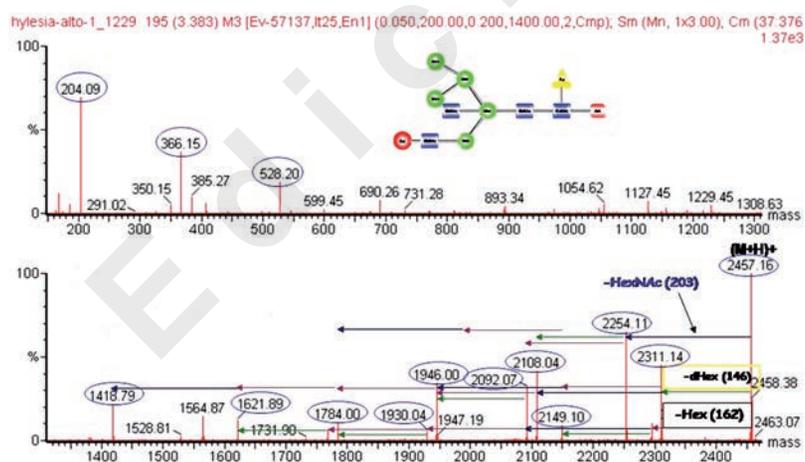


Figura 8. Espectro MS/MS y patrón de fragmentación del ión m/z 1229. Reconstrucción de una estructura de glicano híbrido a partir de la fragmentación del ión m/z 1229. Las pérdidas de 146 uma [dHex] (flechas color verde), 162 uma [Hex] (flechas color rojo) y 203 [HexNAc] (flecha color negro) a partir del ión precursor m/z 2457,16 indica que estos tres residuos son terminales. La estructura del glicano híbrido está se muestra en la parte superior de la figura.

el m/z 2660,17. Esta diferencia de 80 uma ocurre debido a una fosforilación (HPO₃), que es una de las modificaciones postraduccionales más ampliamente distribuidas en la naturaleza. Entre los aminoácidos más susceptibles a ser fosforilados están la serina y la treonina. Si tenemos en cuenta la secuencia de los sitios potenciales de N-glicosilación [Asn-X-Ser/Thr/Cys], siendo X diferente de prolina, es muy probable que estos glicopéptidos, contengan aminoácidos como Ser/Thr en su secuencia y que estos aminoácidos estén fosforilados.

Los espectros MS/MS deconvolucionados de los iones m/z 1229, 1269, 1331, y 1371 muestran la presencia indiscutible de los iones reporteros correspondientes a las estructuras [HexNAc]⁺ (m/z 204), [HexNAc-Hex]⁺ (m/z 366) y [HexNAc-Hex₂]⁺ (m/z 528) lo que afirma que estos iones corresponden a glicopéptidos (Figura 7). Por otra parte, la ausencia de iones m/z (292/657) y m/z (308/673), que corresponden a las estructuras [Neu5Ac]⁺, [HexNAc-Hex-Neu5Ac]⁺, o [Neu5Gc]⁺, [HexNAc-Hex-Neu5Gc]⁺, respectivamente, indican la ausencia de glicanos cargados como el ácido N-acetil (Neu5Ac) ó N-glicolil (Neu5Gc) neuramínico. Esto significa que se está en presencia de glicopéptidos neutros.

En la Figura 8 se describe más detalladamente la propuesta de las estructuras de los glicanos más probables, a partir del patrón de fragmentaciones observada en el espectro ESI-MS/MS del ión m/z 1229 (Figura 5). Las pérdidas de 146 uma (dHex), 162 uma (Hex) y 203 uma (HexNAc) a partir del ión precursor m/z 2457,16 indican que estos tres residuos son terminales. Todas las fragmentaciones de este ión precursor por las diferentes rutas, hasta el ión m/z 1418,79 (mostradas en la figura mediante flechas), justifican la estructura propuesta. Debe enfatizarse sin embargo, que esta propuesta es preliminar, pues para poner con rigor una estructura dada, debe utilizarse una

mas observados en los individuos susceptibles expuestos a las setas urticantes de *H. metabus*.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado en parte por el proyecto institucional N° 656 del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) titulado: «Caracterización de la sustancia urticante de la mariposa *Hylesia metabus* («palometa peluda») e identificación de inhibidores de la misma», por el proyecto institucional N° 972 del IVIC, titulado: «Secuenciación proteómica y clonación de las toxinas presentes en las posturas y hembras adultas de la polilla *Hylesia metabus*» y el Proyecto Reto *Hylesia metabus*, financiado por el Ministerio del Poder Popular de Ciencia y Tecnología y ejecutado a través de Fundacite, estado Sucre. Agradecemos al Centro de Biología Estructural del IVIC y en particular a su fundador, Dr. Raúl Padrón, por haber apoyado la realización de este trabajo. Quisiéramos también dar las gracias al director de Fundacite Sucre el profesor Jesús Noriega y demás miembros por su apoyo al Proyecto Reto: *Hylesia metabus*. Finalmente, agradecemos la paciencia y la colaboración del personal de campo que recolectó el material biológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews AT (1986) *Electrophoresis: Theory Techniques and Biochemical and Clinical Applications*. 2nd Ed. Oxford University Press, New York. 336 pp.
- Benaïm-Pinto C, Pernía-Rosales B & R Rojas-Peralta (1991) Dermatitis caused by moths of *Hylesia* genus (Lepidoptera, Saturniidae) in north-eastern states of Venezuela. I. Bioecology of *H. metabus* Cramer. Clinical features of lepidopterism determined by this species. *American Journal of Contact Dermatitis* 2:213-221.
- Benaïm-Pinto C, Pernía-Rosales B & R Rojas-Peralta (1992) Dermatitis caused by moths of *Hylesia* genus (Lepidoptera, Saturniidae) in north-eastern states of Venezuela: II Biochemistry and Immunoallergy of substances responsible for dermal lesions. *American Journal of Contact Dermatitis* 3:5-15.
- Benvenuti LA, Cardoso JLC & RHP Morales (1998) Cutaneous leukocytoclastic vasculitis from contact with *Hylesia* moths (Lepidoptera: Saturniidae). *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92:428-429.
- Blumink E, de Jong MCJM, Kawamoto F, Meyer GT, Kloosterhuis AJ & IJ Sliper-Pal (1982) Protease activities in the spicule venom of *Euproctis caterpillars*. *Toxicon* 20:607-613.
- Boyé R (1932) La papillonite guyanaise. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 25:1099-1107.
- Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- De Camargo, AJA (2007) A new species of *Hylesia* Hübner (Lepidoptera, Saturniidae, Hemilucinae from Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Zoologia* 24:1-5.
- Díaz JA (2005) The evolving global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of caterpillar envenoming. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72:347-357.
- Dinehart S M, Jorizzo JL, Soter NA, Noppakun N, Voss WR, Hokanson JA & EB Smith (1987) Evidence for histamine in the urticating hairs of *Hylesia* moths. *Journal of Investigative Dermatology* 88:691-693.
- Fornés L & JV Hernández (2001) Reseña histórica e incidencia en la salud pública de *Hylesia metabus* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) en Venezuela. *Entomotropica* 16:137-141.
- Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB & RA Dwek (1996) A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Analytical Biochemistry* 240:210-226.
- Jay GD, Culp DJ & MR Jhanke (1990) Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes. *Analytical Biochemistry* 185:324-330.
- Laemmly UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lamy MMH, Pastureaud F, Novak F, Ducombs G, Vincendeau P, Maleville J & L Texier (1986) Thaumetopoein: An Urticating Protein From the Hairs and Integument of the Pine Processionary Caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff., Lepidoptera, Thaumetopoeidae). *Toxicon* 24:347-356.
- Lineweaver H & D Burk (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* 56:658-666.
- Lundberg, U, Osborn F, Carvajal Z, Gil A, Guerrero, B & CL Arocha-Piñango (2002) Isolation and partial characterization of a protease with kallikrein-like activity from the egg-nests of *Hylesia metabus* (Cramer, 1775) (Lepidoptera: Saturniidae), preliminary communication. *Revista Científica FCV-LUZ* 12:97-102.
- Lundberg, U, Salazar V, Tovar M & J Rodríguez (2007) Isolation and partial characterization of proteins with vaso degenerative and proinflammatory properties from the egg-nests of *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Medical Entomology* 44:440-449.
- Mackey AJ, Haystead TA & WR Pearson (2002) Getting more from less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences. *Molecular & Cellular Proteomics* 1:139-47.

- Matheson R (1950) *Medical Entomology* (2nd Edition). Comstock Publications, Ithaca, New York. 620 pp.
- Riley WA & OA Johansen (1938) *Medical Entomology. A Survey of Insects and Allied Forms which Affect the Health of Man and Animals*. McGraw-Hill, New York. 476 pp.
- Rodríguez J, Hernández JV, Fornés L, Lundberg U, Arocha-Piñango CL & F Osborn (2004) External morphology of abdominal setae from male and female *Hylesia metabus* adults (Lepidoptera: Saturniidae) and their function. *Florida Entomologist* 87:30-36.
- Roth LM & T Eisner (1962) Chemical defenses of arthropods. *Annual Review of Entomologist* 7:107-136.
- Shevchenko A, Sunyaev S, Loboda A, Bork P, Ens W & KG Standing (2001) Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Analytical Chemistry* 73:1917-26.
- Vicente S (1952) Dermatitis producidas por mariposas. Algunas observaciones sobre un brote estudiado en Venezuela. *Acta Científica Venezolana* 3:88-90.
- Wirtz RA (1984) Allergic and toxic reactions to non-stinging arthropods. *Annual Review of Entomology* 29:47-69.

Abreviaciones usadas

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
PAGE	Electroforesis en Gel de Poli(acrilamida)
GU	Unidades de glucosa (Guile <i>et al.</i> 1996)
MS	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por nebulización eléctrica
MALDI	(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
TOF	Detección de masas basados en tiempo de vuelo
uma	Unidades de masa atómica

Efectos de la toxina de las setas urticantes de la polilla *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae), en modelos experimentales. Estudio histopatológico

Víctor Salazar*¹, Ulf Lundberg², Ricardo Gámez³ y Franklin Méndez⁴

¹Servicio de Microscopía de Luz, Centro de Bioquímica y Biofísica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Carretera Panamericana, km 11, estado Miranda, Apartado 20632, San Martín, Caracas 1020A, Venezuela.

²Centro de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

³Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias y Tecnología. Departamento de Biología. Ciudad Universitaria-Campus Bárbula, estado Carabobo, Apartado 3336, Valencia 2005, Venezuela.

⁴Laboratorio de Estructura Supramolecular, Centro de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

*vsalazar@ivic.gob.ve

Resumen

El género *Hylesia* (Lepidoptera, Saturniidae) está conformado por un grupo de polillas neotropicales que abundan en Centro y Suramérica, *Hylesia metabus* es una de las especies de este género encontrada en Venezuela, la Guayana Francesa y Trinidad. En Venezuela, esta polilla es muy abundante en los manglares y los caños adyacentes al delta del Orinoco, en el oriente del país. Durante las épocas de apareamiento, las hembras adultas liberan cantidades enormes de minúsculas setas urticantes en el medio ambiente pudiendo ocasionar una dermatitis papulo-vesicular a los pobladores de las zonas adyacentes a los manglares. Se han aislado y caracterizado sustancias proteicas con propiedades proinflamatorias de las setas urticantes y se ha estudiado sus efectos en un modelo animal, utilizando el cobayo (*Cavia porcellus*), mediante métodos bioquímicos y de histopatología. En este capítulo trataremos algunos aspectos de la histopatología de la toxina de *H. metabus* a escala sistémica, la respuesta de los efectores celulares tempranos y la localización de la toxina mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Abstract

Effects of the Toxin from the Urticating Setae of the Moth, *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) in Experimental Models. A Histopathological Study

The genus *Hylesia* (Lepidoptera, Saturniidae) is made up of a group of neotropical moths distributed in Central and South America. One of the species in this genus found in Venezuela, French Guiana and Trinidad Island has been identified as *Hylesia metabus*. In Venezuela these moths are abundant in the mangrove swamps close to the Orinoco Delta in the eastern part

Palabras clave

Dermatitis, fibrina, histopatología, lepidopterismo, macrófagos, mastocitos, neutrófilos.

Key words

Dermatitis, fibrin, histopathology, lepidopterism, macrophages, mast cell, neutrophils.

of the country. During the reproductive phase of the life cycle, the adult females release huge quantities of miniscule urticating setae into the surrounding environment, which can produce a severe papulo-vesicular dermatitis amongst the inhabitants of zones adjacent to the mangroves. Proteins with proinflammatory properties have been isolated and characterized from the egg nests of *H. metabus* using biochemical methods. In addition, the inflammatory response to the egg nest extract and components isolated from it have been studied in experimental models, using the guinea pig (*Cavia porcellus*). In this chapter we discuss aspects of the histopathology of the *H. metabus* toxin at a systemic level, the response of the early effector cells and the localization of the toxin using immunohistochemical techniques.

PRESENTACIÓN

Existen reportes de lesiones dermatológicas luego del contacto con orugas irritantes desde la Antigua Grecia. Durante el Imperio romano, Plinio el Viejo y Galeno escribieron sobre las propiedades irritantes de los lepidópteros. En el continente americano la primera reseña fue realizada por el padre José de Anchieta en 1569 en sus «Cartas desde São Vicente» (Cox-Cardoso & Haddad 2005; Díaz 2005).

El lepidopterismo es un término médico general usado para describir los efectos dañinos que las larvas y los adultos de mariposas y polillas pueden causar en humanos; estos problemas incluyen los asociados con inhalación, ingestión, contacto dérmico y penetración de los tejidos por productos o estructuras en cualquier etapa del ciclo de vida (Wirtz 1984; Battisti *et al.* 2011). Sin embargo, hay una gran confusión con respecto a la terminología referente a los eventos adversos del contacto con lepidópteros; algunos autores especifican más detalladamente los efectos de los lepidópteros al usar los términos lepidopterismo y erucismo: el contacto con larvas, mariposas, capullos o partes de ellos que pueden causar reacciones exclusivamente cutáneas es considerado como erucismo. Por el contrario, si causan síntomas sistémicos tanto con reacciones cutáneas o sin ellas, es denominado lepidopterismo (Hossler 2009, 2010a). En el caso del erucismo, otros investigadores han sido aún más concisos al definirlo como el término usado para describir los accidentes o enfermedades producidas por el contacto de la piel con setas de larvas de las familias Megalopygidae y Saturniidae. En este caso, los síntomas están caracterizados por un dolor local intenso, picazón, enrojecimiento seguido

por vesiculación y afección de los ganglios linfáticos (adenopatía) (Ramos *et al.* 2004). Debido a que las reacciones a las formas adultas y larvales de lepidópteros pueden causar una variedad de síntomas cutáneos o sistémicos, o ambos, es más fácil evitar el uso de ambos términos y en su lugar, clasificar las reacciones basadas en los síntomas predominantes (p. ej., urticaria inducida por contacto con orugas procesionarias del género *Thaumetopoea*). De esta manera, el clínico puede continuar usando términos descriptivos familiares, tales como urticaria eczematosa y este enfoque ayudará tanto con el diagnóstico así como con el tratamiento (Hossler 2010a; Battisti *et al.* 2011).

En general, las interacciones entre lepidópteros y humanos son poco frecuentes y los eventos adversos ocurren, típicamente, en unos pocos individuos expuestos. Sin embargo, varias especies de lepidópteros presentan una abundancia estacional, ocasionando una frecuencia en la exposición y a síntomas cutáneos o sistémicos. Esto es bien conocido en el noreste de los Estados Unidos donde las orugas de la polilla gitana (*Lymantria dispar* L. 1759), desfolian grandes extensiones de bosques en el verano (Hossler 2010a).

Entre las especies de lepidópteros causantes de lesiones a humanos, las del género *Hylesia* son notables porque son unas de las pocas en las cuales el adulto es responsable de causar efectos nocivos. Entre las especies de este género causantes de lepidopterismo está *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]), objeto de estudio de este trabajo. Esta especie ha sido señalada para Surinam, Guayana Francesa y en Venezuela como el principal lepidoptero dañino (Hassing & Bauer 2008;

Hossler 2009). En Venezuela, *H. metabus* puede ser tan prevalente que las escuelas y tiendas cierran temprano y los agricultores y pescadores no pueden trabajar a causa del temor al prurito y al malestar incapacitante (Hossler 2010a).

H. metabus, conocida comúnmente como «palometa peluda» (Figura 1A), es una polilla nocturna distribuida principalmente en el noreste de Venezuela. Dicha especie habita los manglares del golfo de Paria, estado Sucre, extendiéndose hasta los estados Monagas y Delta Amacuro. Sin embargo, es en el estado

Sucre donde alcanza mayores densidades poblacionales, hasta constituir un problema grave de salud pública para los pobladores de este estado (Osborn, 2005). Además, en el género *Hylesia* también se conocen las siguientes especies como causantes de lepidopterismo: *Hylesia alinda* Druce, 1886 (Fernández *et al.* 1992); *Hylesia frigida* Schaus, 1911; *Hylesia lineata* Druce, 1886; *Hylesia nigricans* Berg, 1875; *Hylesia valvex* Dyar, 1913 e *Hylesia metapyrrha* Walker, 1855 (Fornés & Hernández 2001; Specht *et al.* 2007). La distribución de algunas de estas especies se presenta en la Tabla 1 (ver páginas 15-24).

La hembra de *H. metabus* tiene setas abdominales extremadamente urticantes, conocidas también como *flechette*, las cuales utiliza para cubrir las posturas de huevos, con el fin de protegerlos de depredadores y parásitos (Figura 1B) (Battisti *et al.* 2011). Estas espículas urticantes al entrar en contacto con la piel del hombre y partirse liberan una sustancia urticante que es responsable de causar dermatitis prolongadas, lesiones cutáneas papuloeritematosas con ligera degeneración vascular y un prurito intenso que empeora con el roce (Fornés & Hernández 2001; Benaim-Pinto 2002). En algunas personas estos síntomas están acompañados por una reacción alérgica y se han reportado trastornos respiratorios, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, artralgias, queratitis y conjuntivitis, entre otros; la duración de las lesiones es muy variable, de 3 hasta 15 días (Benaim-Pinto 2002; Hossler 2009). Es común observar

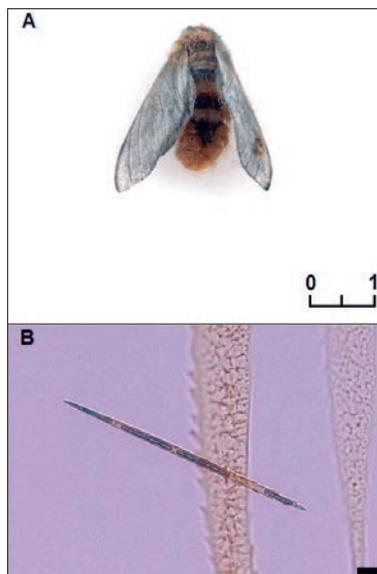


Figura 1. A) Hembra de *H. metabus*. B) Fotografía de una seta vista mediante microscopía de contraste de fases. Barras: A): 1 cm, B): 10 μ m.

afecciones de tipo respiratorio en los casos de lepidopterismo por *H. metabus* y otras especies, sin embargo la asociación con lesiones en los pulmones no ha sido estudiada de manera sistemática en humanos y persiste la sospecha de daños a otros órganos (Rodríguez-Morales *et al.* 2005). Usualmente, la exposición ocurre cuando las polillas son atraídas por la luz de las áreas habitadas. Los accidentes pueden presentarse como brotes epidémicos, dada la sincronización de la eclosión de los adultos en esta especie. Sin embargo, las setas pueden persistir en la vegetación y enseres y conservan el poder urticante por mucho tiempo con la posibilidad de producir lesiones, inclusive si la polilla es un ejemplar muerto y seco (De Roodt *et al.* 2000; Hossler 2010a).

Patología, sintomatología y tratamiento

Las reacciones a los lepidópteros se dan en muchas formas y ocurren sobre todo en la piel, por ser el punto de interacción más común con los elementos del medio ambiente; entre ellas tenemos: erupciones papulares, pápulas y placas urticarianas pruríticas o pápulas y placas eritematosas escamosas en las áreas expuestas. En consecuencia, se requiere de diagnóstico cuidadoso y un estudio completo de la historia clínica. Por lo tanto, los pacientes que tienen una historia de exposición a orugas o polillas, y un conocimiento general de las especies peligrosas, pueden ayudar al médico a realizar el diagnóstico correcto (Hossler 2010b; Battisti *et al.* 2011). En el caso del género *Hylesia*, las setas producen un cuadro de dermatitis urticariana y las manifestaciones que generalmente se han estudiado son predominantemente de tipo dermatológico (Figuras 2 y 3), con una respuesta inmunológica típica, caracterizada por una masiva infiltración de neutrófilos y linfocitos, necrosis de queratinocitos y degeneración hidrópica de las células basales. En la literatura siempre se habla de reacciones alérgicas como consecuencia del lepidopterismo, sin embargo, es necesario ser más específicos en cuanto a esta forma de descripción, puesto que una reacción inmune caracterizada por dermatitis no necesariamente se corresponde con una reacción alérgica estrictamente hablando (Battisti *et al.* 2011).

Pocas horas después del contacto con las setas de *H. metabus*, las lesiones cutáneas primarias consisten principalmente en una urticaria aguda o bien en una derma-

titis papuloeritematosa con discreta degeneración vesicular; en algunos pacientes se da un edema que puede abarcar zonas extensas (Figura 2A) o bien de manera focalizada (Figura 2B). Las pápulas son pequeñas, aisladas o confluentes, sensibles al tacto y causan un prurito persistente. Se produce un infarto ganglionar intenso, característico y doloroso con frecuentes elementos hemorrágicos en las áreas pruriginosas. En las primeras 24-48 horas, la lesión puede evolucionar hacia la formación de vesículas (Figura 3A) y más raramente necrosis en las áreas de contacto (Figura 3B). Las lesiones evolucionan acompañadas de prurito intenso para remitir en un período variable que oscila entre 7 y 14 días tras el inicio de los primeros síntomas, pero por repetidos contactos con nuevas setas, puede sobrevenir una exposición secundaria, eczematización y liquenificación, tardando entonces semanas e incluso meses en desaparecer. Otros tipos de lesiones cutáneas son las erupciones monomórficas (pequeñas pápulas duras, rodeadas por vesículas pequeñas), manifestaciones del tipo de una dermatitis herpetiforme y casos de nódulos inflamatorios subcutáneos, los cuales son los más refractarios a las terapias convencionales (Rodríguez-Acosta *et al.* 1998; Paniz-Mondolfi *et al.* 2011).

Entre los síntomas distintos a los cutáneos producidos por *H. metabus*, tenemos los siguientes: malestar general, artralgias, efectos psicológicos, accesos agudos de asma bronquial, insomnio y depresión. El daño a las mucosas es común en el lepidopterismo, siendo la conjuntivitis la manifestación más frecuente hallada en las personas afectadas, también pueden producirse úlceras corneales, granulomas conjuntivos y hasta ceguera (Battisti *et al.* 2011), aunque en Venezuela esta última condición no se ha reportado hasta ahora. En relación a las manifestaciones orofaríngeas, lo que más frecuentemente se halla es el eritema en labios, lengua, paladar y mucosa bucal. Por otra parte, en sujetos afectados por

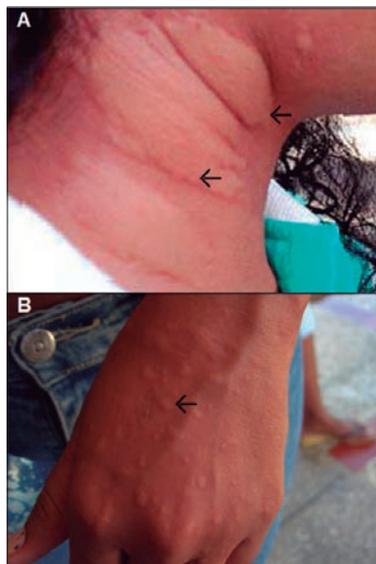


Figura 2. Edema en individuos expuestos a las setas de *H. metabus* luego de 30 minutos de exposición; las flechas en A) y B) indican zonas edematosas, las cuales pueden variar de individuo a individuo.



Figura 3. Edemas y vesículas eritematosas en individuos expuestos a las setas de *H. metabus*. A) La flecha indica zonas edematosas focalizadas y dispersas. B) Las flechas indican vesículas eritematosas con degeneración y formación de pústulas a las 48 horas luego de la exposición.

H. metabus existe la sensibilización de tipo atópico (Glasser *et al.* 1993; De Roodt *et al.* 2000; Benaim-Pinto 2002).

Las setas han sido vistas profundamente encajadas dentro de la dermis y el aumento del prurito con el rascado se debe quizá al hecho de que se adhieren muy firmemente, siendo difícil su salida debido a su morfología de tipo barbado. Además del trauma mecánico provocado por la introducción de las setas, está la presencia de factores tóxicos, lo cual ha sido un tema de cierto debate. Dinehart *et al.* (1987) aislaron histamina de las setas de *Hylesia*; sin embargo en sus preparaciones usaron el tegumento completo de especímenes vivos y pudo haber contaminación. La histamina, en cantidades nanomolares sólo explicaría la acción urticante y el prurito intenso e inmediato, pero no el daño extensivo y el efecto necrotizante observado en la dermatitis causada por *H. metabus* (Benaim-Pinto 2002; Hossler 2010a).

Lundberg *et al.* (2002, 2007) no detectaron histamina en setas aisladas de *H. metabus* y demuestran, mediante métodos cromatográficos, que la toxina contenida en las mismas está compuesta de cinco fracciones, principalmente glucoproteínas, con propiedades de proteasas con afinidades para diferentes sustratos e inducen respuestas inmunológicas, distintas a las que ocasiona la toxina completa. Además, estudiaron su efecto en un modelo experimental mediante un estudio histopatológico, el cual mostró infiltrados leucocitarios perivasculares, formado predominantemente de neutrófilos, y concluyeron que la dermatitis es causada por los componentes glucoproteínicos de la toxina.

El tratamiento del lepidopterismo y erucismo es sintomático y de soporte; en la literatura médica se indican diversas opciones terapéuticas. Las lesiones pruríticas y eritematosas producidas por el contacto con las setas de *Hylesia* se han controlado mediante drogas antihistamínicas y esteroides. En general, el uso de drogas que logran una inmunosupresión parcial y reversible del sistema inmunológico se ha convertido en la alternativa para el lepidopterismo causado por *H. metabus* (Mulaney *et al.* 1998; Rodríguez-Acosta *et al.* 1998; Lee *et al.* 1999; Paniz-Mondolfi *et al.* 2011). No obstante el uso de tratamientos inmunosupresivos puede tener consecuencias perjudiciales a largo plazo como lo sería la reincidencia de los síntomas luego de una aparente mejoría. Por lo tanto, en las poblaciones afectadas por *H. metabus*, se debe considerar una mayor atención y observación de aquellos pacientes con alteraciones de mayor impacto en su cuadro clínico.

La alternativa de tratamientos inmunológicos es una opción bastante estable y usada en muchos casos; la neutralización de las toxinas circulantes por antisueros hiperinmunes heterólogos es el tratamiento usado para muchos accidentes causados por animales venenosos, como en el caso de los venenos de himenópteros donde la inmunoterapia es muy efectiva en proteger a pacientes alérgicos de reacciones anafiláctica (Ruëff *et al.* 2004; Gonçalves *et al.* 2007). En el caso de las patologías causadas por lepidópteros, el suero hiperinmune antilonómico, obtenido de caballos inyectados con extractos de setas de *Lonomia*, es un tratamiento efectivo para el envenenamiento causado por el contacto con orugas de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Gonçalves *et al.* 2007).

Estudios histopatológicos previos

El enfoque más directo para estudiar el potencial de las proteínas que causan reacciones tóxicas es la evaluación de las características de la respuesta inmune que pueden inducir. En general, este enfoque está dirigido a estudiar xenobióticos capaces de inducir alergias y es válido para una gran cantidad de compuestos y organismos. Sin embargo, existen considerables variaciones entre las respuestas inmunológicas, lo que ha llevado al desarrollo de métodos bien establecidos y ampliamente aceptados que facilitan la identificación precisa de potenciales alérgenos proteicos para humanos y, al establecimiento de ensayos de riesgos de sensibilización en animales (Huby *et al.* 2000; Germolec *et al.* 2004).

Los estudios histopatológicos se fundamentan en la histoquímica, que, con sus técnicas muy particulares, proporciona información que permite explicar el efecto de los agentes tóxicos en modelos tanto in vivo como in vitro. La histoquímica y la citoquímica, estudian la composición y comportamiento de los materiales biológicos en relación con su estructura original, bien sea en los tejidos (histológico), a escala celular (citológico) o en organelos (morfológico submicroscópico) y está diseñada para solventar en forma directa un problema molecular sobre una base celular, lo cual crea un panorama más detallado de la respuesta de los tejidos a un estímulo. Por lo tanto, los métodos histoquímicos son excelentes herramientas para probar hipótesis específicas sobre los mecanismos de acción de compuestos químicos o toxinas (Coleman 2000; Asan 2002; Asan & Drenckhahn 2004; Taatjes & Roth 2005; Coleman 2006).

El tipo de examen semicuantitativo de los parámetros histológicos debe también comprender una descripción histológica cuidadosa de los tipos de lesiones, incluyendo alteraciones focales, necrosis celular, granulomas y cualquier detalle considerado como fuera de lugar en un tejido normal. El uso de la evaluación histopatológica, como una prueba primaria, puede ser ventajosa por dos razones: 1) la toxicidad potencial puede probarse durante los estudios toxicológicos sin la necesidad de animales adicionales, 2) no se requiere de técnicas específicas, o equipos adicionales, para probar la función inmunológica (Germolec *et al.* 2004). El conocimiento sobre la patología de las más diversas enfermedades está basado los métodos histológicos, y el lepidopterismo no es la excepción.

Son pocos los estudios en histopatología del lepidopterismo por el género *Hylesia*. Leger & Mouzels (1918) describieron los primeros casos de dermatitis debido a *Hylesia* sp. en la Guayana Francesa, a partir de allí se ha estudiado la histopatología de la dermatitis generada por especies del género *Hylesia* en pacientes y en algunos modelos experimentales y concluyeron que la histopatología de la exposición en el lepidopterismo es inespecífica y en general se presenta con edema epidérmico, infiltrado linfocítico perivascular y eosinófilos, la necrosis epidérmica y vasculitis rara vez aparece. La sintomatología sistémica del lepidopterismo involucra una cantidad diversas de manifestaciones como vómitos, linfadenopatías, taquicardia, arritmias, neuropatías periféricas y convulsiones (Ziprkowski & Rolant

1972; Wirtz 1984; Everson 1990). Se han descrito las espinas embebidas de las polillas y orugas de *Hylesia*, *Euproctis chrysorrhoea* L., 1758 y *Megalopyge opercularis* JE Smith, 1797. Los granulomas con o sin setas, o espinas embebidas se han demostrado en los casos de oftalmia nodosa. Además de los granulomas con setas embebidas, se ha visto la dermatitis inespecífica asociada a afecciones en las articulaciones (artritis o artralgias) (Hossler 2010b). En todo caso, el efecto a órganos distintos a la piel se ha estudiado muy poco con escasos ejemplos donde se estudie daños adicionales a la dermatitis, uno de ellos es el de la polilla *Thaumetopoea wilkinsoni* Tams, 1924 (Finkelstein *et al.* 1988). Durante la fase aguda, pueden encontrarse, en la epidermis, las siguientes características: membrana basal intacta, abundante células basales con degeneración hidrópica y picnosis, edema intercelular que da como resultado depósitos de fluido seroso, capilares ensanchados, edema e infiltrado perivascular denso compuesto de linfocitos, histiocitos y neutrófilos. En la fase crónica, pueden hacerse evidentes granulomas foliculares del tipo tuberculoide, tanto en la dermis papilar y reticular, así como en el tejido subcutáneo con neutrófilos en su interior. En los pacientes previamente sensibilizados, se han observado reacciones perivasculares profundas con infiltración linfocítica y eosinofílica (Casala *et al.* 1967; Jörg 1969; Zaias *et al.* 1969; Dinehart *et al.* 1985).

Los efectos del lepidopterismo o erucismo, causado por distintas especies de polillas, se ha considerado como limitado a la piel, sin embargo Lundberg *et al.* (2007) estudiaron los efectos de la toxina en la piel de cobayos (*Cavia porcellus* L., 1758) mediante métodos histopatológicos y análisis de imágenes y concluyeron que puede haber un efecto sistémico más allá de la dermatitis. En otros modelos se ha visto que las reacciones de tipo alérgico pueden causar una reacción que involucra a todo el sistema inmunológico con daños a otros órganos, bien sea a corto o a largo plazo (Pastor *et al.* 2003). Dependiendo de la naturaleza del antígeno, la activación de células inmunológicamente activas con el potencial para producir interleucinas pueden mantener una respuesta exacerbada con daños en órganos internos, a veces en forma irreversible (Guo *et al.* 2002) y donde la dermatitis pueden ser sólo una respuesta secundaria a un evento (Fan *et al.* 2003).

El objetivo de este trabajo es estudiar los efectos de la toxina de *H. metabus* en modelos de experimentación, de forma tal que nos permita obtener información de los posibles efectos que pueden ocurrir en humanos. Se presenta evidencia de la localización de la toxina en las setas, de cómo ocurre la penetración de éstas en el organismo, y de los efectos cutáneos y sistémico que tiene la toxina y sus componentes en modelos in vivo así como los primeros eventos de respuesta la inmunológica estudiado in vitro con células inmunológicamente competentes.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Los efectos de la toxina de *H. metabus* se estudiaron en tanto in vivo como in vitro. Los experimentos in vivo se realizaron en cobayos (*Cavia porcellus*) y ratones (*Mus musculus*) y se estudiaron los efectos de la toxina completa y sus componentes mediante métodos histológicos en la piel y órganos internos. Se realizaron experimentos exponiendo la piel de los ratones a las setas. Para las pruebas in vitro se usaron células peritoneales residentes murinas y se estudió el efecto que tiene la toxina completa sobre éstas. La localización de la toxina en las setas, la piel de los animales tratados con éstas, en los sitios de inoculación de la toxina purificada y en las células peritoneales tratadas in vitro se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas fluorescentes. Todos los expe-

rimentos realizados con los modelos animales (cobayos y ratones) se llevaron a cabo de acuerdo a las normas bioéticas del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (<http://www.ivic.gob.ve/bioetica/?mod=Reglamento.php>).

Obtención y purificación cromatográfica de las toxinas de las setas

La obtención, purificación y separación de las diferentes fracciones del veneno fueron realizadas mediante los procedimientos descritos en Lundberg *et al.* (2002, 2007). Para extraer el veneno de las setas se tomaron 5 g de cubierta superficial de las posturas con sus respectivas setas y se incubaron con 50 ml de tam-

pón Tris 50 mM a pH 8,50 en NaCl (tampón Tris) al 0,5 M por 24 horas. Este extracto fue concentrado mediante la adición de sulfato de amonio sólido hasta alcanzar una concentración de 60 %. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en tampón Tris y se dializaron con el mismo tampón, esta fracción del extracto se conoce como toxina purificada y se denominó HM-PT60. La separación cromatográfica se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 y 12 % con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Las bandas de proteínas se revelaron mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 y para la detección de glucoproteínas se usó la técnica del ácido periódico-Schiff (Jay *et al.* 1990). La separación analítica de la fracción HM-PT60 se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un sistema Waters 626 LC, usando una columna de intercambio iónico Protein-PakQ8HR (Waters, Milford, MA). Las fracciones separadas se concentraron mediante liofilización y se resuspendieron en tampón Tris. Una descripción más detallada de los procedimientos mencionados, así como la separación de las cinco fracciones componentes de HM-PT60, se puede consultar en Lundberg *et al.* (2007).

Morfología de las setas

La morfología de las setas de las hembras y las posturas de *H. metabus* se estudiaron mediante microscopía óptica y mediciones morfométricas. Las setas se montaron en diferentes medios: cloruro de sodio al 0,9 % (p/v), ácido clorhídrico 1N, glicerina : PBS (50 : 50), aceite de inmersión Nikon tipo A y agua destilada. Con cada medio utilizado se hizo el registro fotográfico usando las siguientes modalidades de microscopía: polarización, contraste de fases y epifluorescencia; para ésta última se utilizaron filtros con diferentes rangos de excitación correspondiente a la luz ultravioleta: UV-2A (330-380 nm), B-2A (450-490 nm) y G-2A (510-560 nm). Se realizó la medición del largo y ancho de 50 setas montadas en aceite de inmersión Nikon tipo A usando el *software ImageJ* (versión 1.41o) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Estudio de la respuesta celular inmune

Para estudiar los eventos tempranos de la respuesta celular inmune se realizaron experimentos con macrófa-

gos y mastocitos peritoneales, extraídos de ratones de la cepa BALB/c, (*Mus musculus* L.), los cuales se prepararon usando métodos convencionales, (ver Apéndice IV pág. 209), se trataron con la fracción HM-PT60 a una concentración de 1 µg/ml y se incubaron a diferentes tiempos: 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos y 1 hora. Los cambios de morfología fueron observados mediante microscopía de contraste de fases. La toxina fue detectada mediante métodos inmunohistoquímicos y microscopía de fluorescencia (ver Apéndice VI pág. 212).

Estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos

Los estudios histopatológicos se realizaron para evaluar los daños causados por la fracción HPM-PT60 (en las aurículas, pulmones, corazón, hígado y bazo) en cobayos. Para la detección de la toxina se preparó un antisuero contra la fracción HM-PT60, se purificaron los anticuerpos y su especificidad se comprobó mediante *immunoblot* (ver Apéndice VI pág. 212, Figura 33). Se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas para localizar la toxina de *H. metabus* en: 1) las setas, 2) en setas insertadas en la piel de especímenes expuestos a éstas y 3) en la piel de las aurículas, en el modelo para estudiar los efectos cutáneos.

Estudios histopatológicos

Para los estudios histopatológicos se prepararon dos grupos de cobayos con cinco especímenes cada uno; el peso de los cobayos fue de 300,00 a 350,00 g. En un grupo se estudiaron las reacciones en la piel (aurículas) y en el otro, los efectos en pulmones, corazón, hígado y bazo.

Efectos cutáneos

Para determinar el efecto de la fracción HM-PT60 y sus componentes en la piel, se realizó un bioensayo in vivo mediante la inyección subcutánea, en la parte dorsal de la aurícula de cobayos. Los animales se inocularon intradérmicamente con HM-PT60 y las fracciones componentes (1, 2, 3, 4, 5 y 6) (7 grupos de cinco animales cada uno), usando una jeringa Gilson teniendo cuidado de no tocar el cartílago auricular que separa las superficies dorsal y ventral; la cantidad inoculada fue el equivalente a 25 µg de proteínas totales o 5 µg de proteínas purificadas mediante HPLC, en un

volumen total de 25 µl. Las fracciones se resuspendieron en PBS (NaCl 0,15 M en solución reguladora de fosfato a 10 mM a pH 7,4). Los animales del grupo control recibieron 25 µl de cloruro de sodio al 0,90 % (p/v) estéril. Se tomó como tiempo óptimo un período de cuatro horas, después de la inoculación, basado en observaciones previas de las reacciones de la piel (Lundberg *et al.* 2007); luego de transcurridas las cuatro horas los especímenes se anestesiaron con tiopental (Pentothal® Abbot) a 50 mg/kg, inyectado intraperitonealmente y se realizó la fijación mediante perfusión cardíaca y se procesaron las aurículas por métodos estandarizados de histopatología (ver Apéndice V pág. 209).

Estudio de los efectos sistémicos en pulmón, corazón, hígado y bazo

Los efectos sistémicos de HM-PT60 se evaluaron en cinco grupos de cobayos (n = 5); los especímenes se inyectaron intradérmicamente, en la espalda, con 25 µg de HM-PT60 en 100 µl de cloruro de sodio al 0,90 % (p/v) estéril; los del grupo control recibieron 100 µl de NaCl al 0,90 % estéril. Los cobayos se anestesiaron con tiopental (Pentothal® Abbot) a 50 mg/kg después de 1, 24, 48 y 96 horas. Se realizó la fijación mediante perfusión cardíaca y se procesaron los órganos de interés por métodos estandarizados de histopatología (ver Apéndice V pág. 209).

Estudios inmunohistoquímicos

Preparación de las setas

Para la localización de la toxina en las setas, se tomaron pequeñas porciones de la masa de setas. Éstas se adhirieron a portaobjetos tratados con polilisina y se fijaron en acetona fría a -20 °C durante 10 minutos. Luego, se secaron al aire y se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento por métodos inmunohistoquímicos (ver Apéndice VI pág. 212).

Preparación de muestras de piel de ratones expuestos a setas

Dos grupos de ratones BALB/c (27,45 g ± 2,41 g; n = 5) se expusieron a las setas de *H. metabus*, por períodos de 15 minutos y 1 hora. Las espaldas de los ratones se depilaron usando tijeras, tratando de eliminar el pelo sin cortar la piel (por esta razón no se usó ningún

rasurado mecánico) y se les frotaron con las setas (0,50 mg de la masa de setas de la postura), durante 1 minuto usando un hisopo de algodón, sin aplicar presión excesiva. Después de transcurrir 15 minutos y 1 hora de exposición a las setas los ratones fueron anestesiados con tiopental (Pentothal® Abbot) a 25 mg/kg, mediante una inyección intraperitoneal. Posteriormente, se cortó la zona de la piel tratada con las setas y los animales se sacrificaron aplicando una sobredosis del anestésico. La piel se incluyó en gel crioprotector Cryomatrix® (Shandon), y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Se obtuvieron secciones de 8 µm con un criostato, se montaron en láminas tratadas con polilisina y se fijaron en acetona fría a -20 °C durante 10 minutos, se secaron al aire y se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento por métodos inmunohistoquímicos (ver Apéndice VI pág. 212).

Determinación de la concentración de fibrinógeno sanguíneo

Utilizando métodos bioquímicos se determinó la concentración de fibrinógeno en los animales utilizados para estudiar el efecto sistémico de la toxina; trabajos preliminares asocian el efecto de la misma a una alteración en las concentraciones de fibrinógeno y la deposición de fibrina (Lundberg *et al.* 2007). A los especímenes utilizados para el grupo control, 24 y 48 horas de los estudios sobre los efectos sistémicos de HM-PT60, se les determinó la concentración de fibrinógeno sanguíneo y se denominaron grupos A (control), B (24 horas) y C (48 horas). Antes de la fijación por perfusión, se extrajo la sangre por punción cardíaca para la obtención del plasma, el cual se congeló a -30 °C hasta su uso. Para determinar la concentración de fibrinógeno, se usó el método de Ingram (1952): se indujo la formación de coágulos usando trombina bovina en NaCl al 15 mM tamponizado con Tris 50 mM a pH 7,4. Los coágulos se lavaron en agua destilada y se deshidrataron en acetona durante 30 minutos, se secaron en una estufa a 50 °C durante 24 h y finalmente se pesaron en una balanza analítica de precisión.

Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el programa estadístico PAST (Paleontological Statistics, versión 1.15 en <http://folk.uio.no/ohammer/past>) (Hammer *et al.* 2001), con el cual se realizaron las pruebas de Kruskal-Wallis, la prueba a posteriori de Tukey y la prueba de t-Student.

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de la morfología de las setas.

Localización de la toxina en las setas y en secciones de piel tratadas con setas

Las setas de *H. metabus* se encuentran entremezcladas con escamas largas y muy plegables, tienen un largo de $293,54 \pm 27,99 \mu\text{m}$ y en su parte más ancha miden $11,25 \pm 1,63 \mu\text{m}$; no son birrefringentes cuando se estudian con luz polarizada, indicando la carencia de una estructura linealmente ordenada a escala molecular. Son barbadas, dando el aspecto de ser serruladas; los dos extremos están claramente diferenciados: uno con pequeñas espinas y el otro carece de éstas; terminan en una punta aguda, lo cual le da el aspecto de una flecha (Figura 4A). Son huecas y estos espacios están ocupados por

aire (Figura 4B); son autofluorescentes en todos los rangos de longitud de onda que se probaron; es de particular importancia destacar que hacia la punta

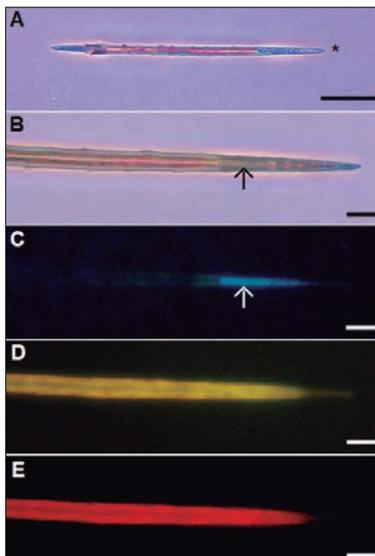


Figura 4. Seta de *H. metabus*. A) La foto corresponde a una imagen obtenida mediante microscopía de contraste de fases, el asterisco indica la punta de la seta. B) Ampliación de la punta de la seta, la flecha indica el contenido de la misma. C) Material autofluorescente usando el cubo UV-2A (rango de excitación: 330-380 nm). La flecha indica el material autofluorescente que se corresponde con lo indicado en B. D) Imagen de la seta donde se observa la autofluorescencia de las paredes usando el filtro B-2A (rango de excitación 450-490 nm). E) Imagen de la seta en donde se observa la autofluorescencia de las paredes usando el filtro G-2A (rango de excitación: 510-560 nm). La seta se montó en aceite de inmersión. Barras: A) 20 μm , B) a E) 5 μm .

de la seta se encuentra un depósito de material que no se disuelve en aceite de inmersión, pero sí en solución de ácido clorhídrico, éste material es autofluorescente en el rango de 330 a 380 nm (Figuras 4C-4E). El uso de un anticuerpo para la toxina de *H. metabus* permitió su localización en las setas, la cual es la punta de la misma en la zona del material autofluorescente y en las paredes alrededor de la zona hueca (Figuras 5A y 5B).

En los animales tratados con las setas, éstas atraviesan la epidermis hasta llegar a la dermis, con una orientación particular: la punta es la que penetra y el extremo más ancho con las espinas queda fuera o en la epidermis y generalmente se quiebra en la zona vacía donde se localiza la toxina (Figuras 6A, B); sin embargo, la mayor parte se quiebra en la epidermis. Se ha detectado la toxina tanto en las setas que penetran en la dermis como en la matriz extracelular circundante. No se observó una infiltración masiva de leucocitos pues la cantidad de setas que se localizaron en la dermis fueron pocas, de 5 a 7 por sección de piel (secciones de 2 mm de largo por 300 μm de diámetro).

Las setas urticantes (macrotriquia) de los lepidópteros se encuentran en una variedad de formas, pero pueden ser funcionalmente divididas en dos grupos, depen-

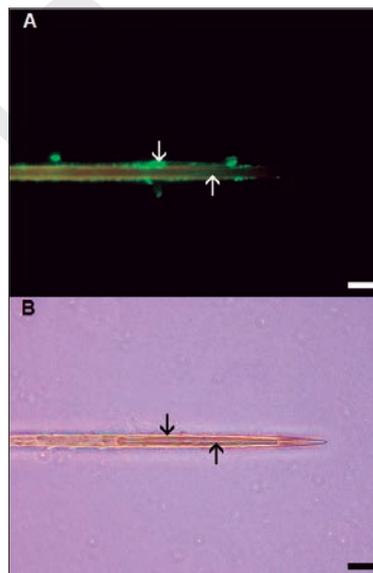


Figura 5. Seta de *H. metabus*, A) Foto tomada mediante microscopía de fluorescencia de la localización de la toxina, las flecha indica el material fluorescente correspondiente a la toxina. B) Seta vista mediante microscopía de contraste de fases. Barras: 10 μm .

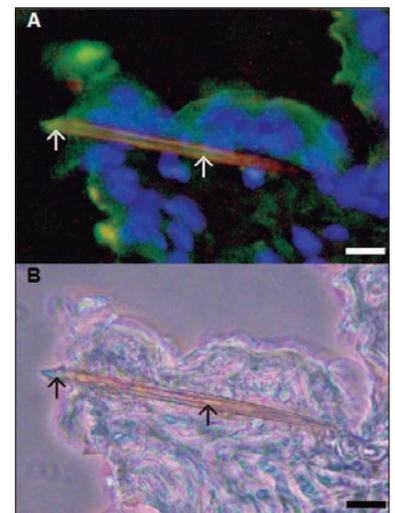


Figura 6. Fotografías de setas insertadas en la dermis de ratones. A) localización de la toxina en la seta y sus inmediaciones (en color verde) mediante microscopía de fluorescencia (flechas), B) La misma imagen mediante microscopía de contraste de fases. Barras: 10 μm .

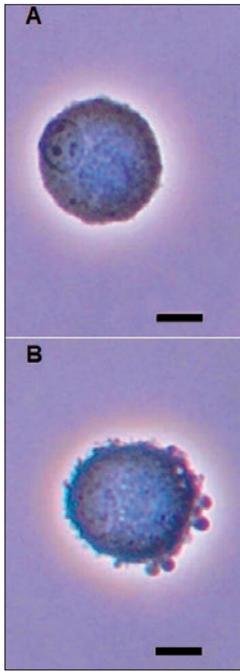


Figura 7. Macrófagos peritoneales murinos en una preparación control tratados con solución salina estéril a A) 5 min y B) 25 min. Barras: 5 μ m.

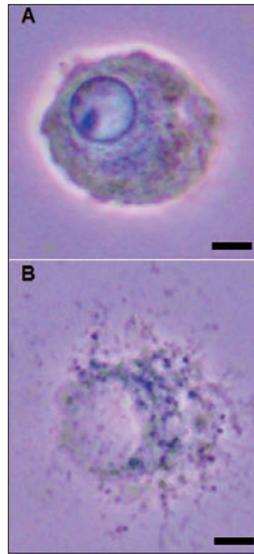


Figura 8. Macrófagos peritoneales murinos tratados con la toxina de *H. metabus* a 1 μ g/ml por 5 min (A) y 10 min (B). Barras: 5 μ m.

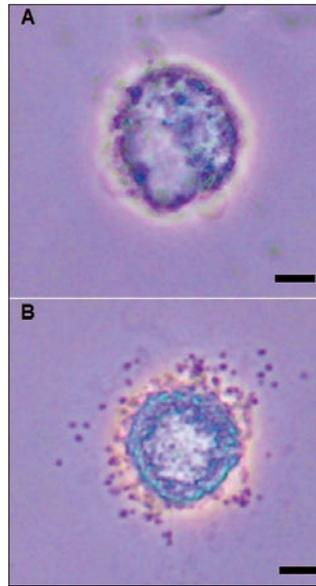


Figura 9. Mastocitos peritoneales murinos tratados con la toxina de *H. metabus* a 1 μ g/ml por 5 min (A) y 10 min (B). Barras: 5 μ m.

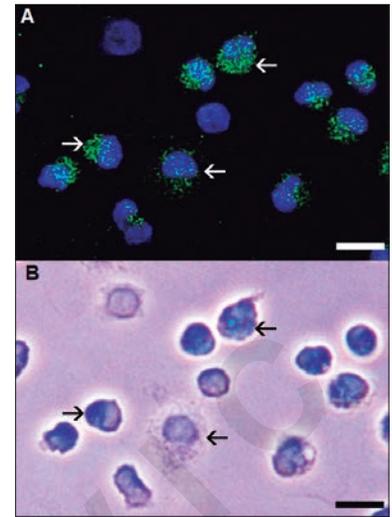


Figura 10. Macrófagos peritoneales tratados con la toxina de *H. metabus* por 1 h. La foto A) corresponde a una imagen de microscopía de fluorescencia de la localización de la toxina (en color verde) mediante inmunohistoquímica; las flechas señalan macrófagos típicos con la toxina enlazada B) La misma imagen mediante microscopía de contraste de fases. Barras: 5 μ m.

diendo de la presencia o ausencia de glándulas exocrinas en su base. Las de tipo contentivas van desde individuales hasta grupos de ellas montadas en tubérculos (se cree que para incrementar su efectividad), y pueden cubrir zonas extensas del cuerpo del insecto; la densidad de las setas puede ser muy elevada tanto como 60.000 setas/mm² en las larvas de la polilla *Thaumetopoea pityocampa* Schiff.

Las macrotriquias venenosas pueden ser sólidas y terminar en una punta desprendible, suelen ser huecas y llenas de toxina pudiendo hundirse en vasos sanguíneos superficiales; la descarga de veneno ocurre cuando la sección terminal se rompe (Wirtz 1984; Battisti *et al.* 2011). En el caso de *H. metabus* el mecanismo de inyección de toxina se corresponde con el de la fractura de éstas. Rodríguez *et al.* (2004) estudiaron las setas abdominales de las hembras en *H. metabus* mediante microscopía electrónica de barrido y describieron cuatro tipos, clasificados por su morfología y el tipo S3 es la que contiene la toxina y corresponde a las denominadas setas verdaderas (Battisti *et al.* 2011). La descripción de las S3 se realizó estando adheridas al tegumento, donde «la base» corresponde a la zona aguzada sin espinas y «el ápice» al extremo con barbas. Sin embargo, para las des-

prendidas del abdomen de la hembra y de las posturas las referencias para su identificación y descripción son el extremo barbado y el extremo sin espinas, siendo este último es el que denominamos punta de la seta, y es el que penetra en la piel.

Estudio de la respuesta celular inmune en células peritoneales residentes

La toxina de *H. metabus* causó alteraciones morfológicas en macrófagos y mastocitos peritoneales a los pocos minutos de estar en contacto con estas células. Normalmente los macrófagos se adhieren al vidrio y cambian muy poco su forma (Figuras 7A y B). A los 5 y 10 minutos de incubación con HM-PT60, los macrófagos presentaron extensiones protoplasmáticas y degranulación (Figuras 8A y B), mientras que los mastocitos empezaron a degranular a partir de los 10 minutos (Figura 9A y 9B). Mediante técnicas inmunohistoquímicas se detectó la toxina en los macrófagos a partir de 1 minuto, incrementándose la fluorescencia con el tiempo de incubación (Figuras 10 y 11). Sin embargo, la toxina se detectó principalmente en la superficie de las células y muy pocas veces en el citoplasma.

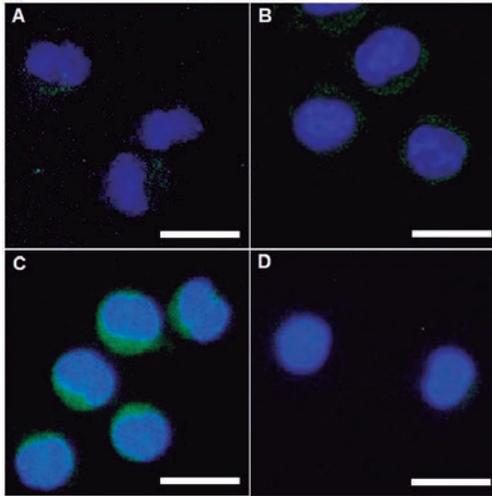


Figura 11. Macrófagos peritoneales donde se localiza mediante inmunohistoquímica la toxina de *H. metabus*, luego de tratarlos con la misma por 5 min (A), 15 min (B) y 1 h (C). La foto D) corresponde a imágenes de los controles los cuales muestran poca autofluorescencia. Barras: 5 μ m.

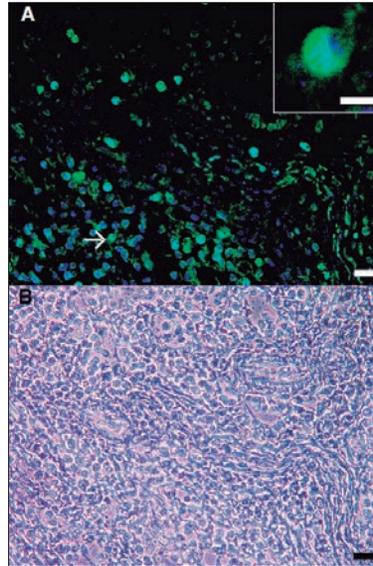


Figura 12. Localización de la toxina de *H. metabus* (en color verde) en leucocitos del sitio de inoculación en la aurícula de cobayos. A) Con microscopia de fluorescencia; el inserto en es una ampliación de la célula indicada mediante la flecha: un macrófago. B) Es la misma zona que A) pero con microscopia de contraste de fases. Barras para A y B: 20 μ m y para el inserto 5 μ m.

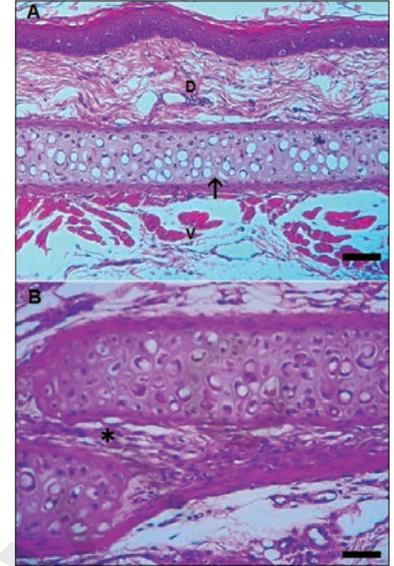


Figura 13. Corte transversal de la aurícula de un espécimen del grupo control. A) El cartílago auricular (flecha) separa la zona dorsal (D) de la ventral (V). B) Sitio de unión de dos cartílagos en el borde de la aurícula, un asterisco indica la zona de tejido conectivo que los une. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 50 μ m.

Estudios histopatológicos

Efectos cutáneos

En los experimentos de la reacción dérmica en las orejas de cobayos, se detectó la toxina en la superficie de los leucocitos infiltrantes en el sitio de inoculación. Los leucocitos fueron del tipo polimorfonucleares y mononucleares, estos últimos con características de macrófagos (Figura 12). En la parte dorsal de la aurícula se observó un gradiente de leucocitos desde el sitio de inoculación hasta la zona distal. Se observó arteritis y acumulación de neutrófilos alrededor de vasos linfáticos y hemorragias de modo focalizado, aunque en algunos casos fueron masivas al igual que la infiltración. En los vasos y en la matriz extracelular se observaron depósitos de fibrina.

En la Figura 13A se muestra una imagen de un corte transversal de la aurícula de un espécimen del grupo control; se observa claramente una región dorsal y otra ventral que están separadas por el cartílago auricular (indicado por una flecha), el cual es avascular y de mayor espesor que la epidermis. En la Figura 13B se muestra el sitio de unión de dos cartílagos en el borde de la aurícula, unidos por tejido conectivo. El sitio de

inoculación de la fracción HM-PT60; la infiltración fue masiva en la zona dorsal y no fue evidente en la parte ventral que está separada de la dorsal por el cartílago auricular (Figura 14).

En la zona de infiltración, se observaron los procesos asociados al reclutamiento y migración de neutrófilos, como la diapédesis y paso a través del endotelio de capilares (Figura 15A). Además de los neutrófilos, los monocitos formaron parte del infiltrado (Figura 15B) y ambos se observaron en acúmulos dentro de los vasos sanguí-

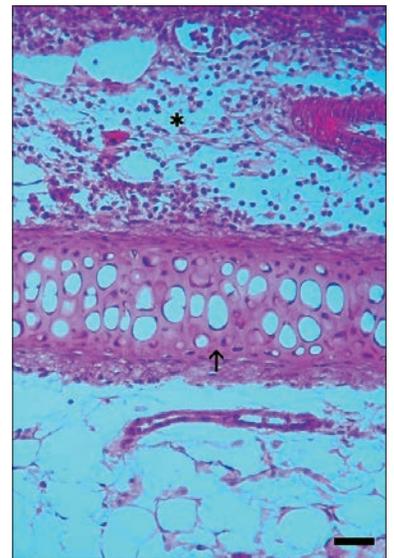


Figura 14. Zona dorsal del sitio de inoculación en la aurícula de cobayos tratados con la toxina de *H. metabus*. La parte dorsal (asterisco) muestra infiltración de leucocitos, mientras que la parte ventral no presenta infiltración en la matriz extracelular. La flecha indica el cartílago auricular. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 10 μ m.

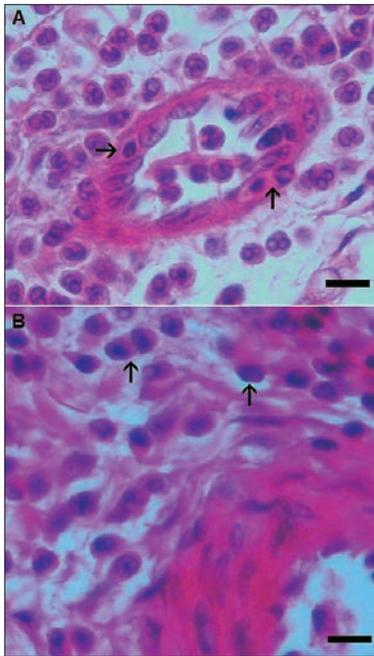


Figura 15. Sitio de inoculación en la parte dorsal de la aurícula de cobayos tratados con la toxina de *H. metabus*. A) En esta imagen se muestran neutrófilos en la matriz extracelular y en diapédesis pasando desde un capilar a través del endotelio, hacia la matriz extracelular (flechas) B) En la zona adyacente a la indicada en A) las flechas señalan monocitos en la matriz extracelular. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 10 μm .

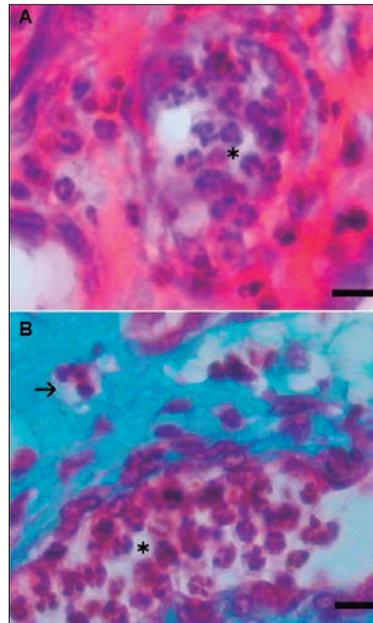


Figura 16. Sitio de inoculación en la parte dorsal de la aurícula de cobayos tratados con la toxina de *H. metabus*. A) En esta imagen se muestran neutrófilos en la matriz agregados en el interior de un vaso sanguíneo (asterisco) y en la matriz extracelular. B) Imagen de un vaso sanguíneo lleno de neutrófilos que se infiltran hacia la matriz extracelular (asterisco). La flecha indica a un neutrófilo en la matriz extracelular con un halo hialino indicativo de la degradación que ha sufrido la misma. Tinción: A) PAS, B) Tricrómico de Gomori. Barras: 10 μm .

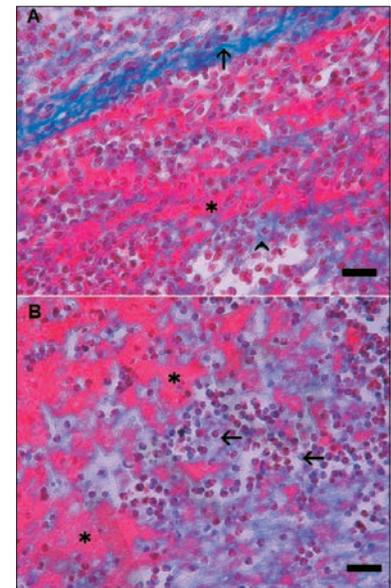


Figura 17. Sitio de inoculación en la parte dorsal de la aurícula de cobayos tratados con la toxina de *H. metabus*. A) En esta fotografía se muestra la degradación extensiva que sufre la matriz extracelular por neutrófilos activados (cabeza de flecha), una considerable deposición de fibrina (asterisco) y fibras de colágeno sin degradar (flecha). B) Degradación de la matriz extracelular por neutrófilos (flechas) en las adyacencias de los depósitos de fibrina (asterisco). Tinción: Tricrómico de Gomori. Barras: 10 μm .

neos (Figura 16A) y en la matriz extracelular (Figura 16B) donde los neutrófilos causaron la degradación de la ésta. En las Figuras 16B y 17 se demuestra la degradación en la matriz extracelular; la sección se coloreó mediante la técnica del tricrómico de Gomori, con la cual se colorean de azul las fibras de colágeno (Figura 17A, indicadas por la flecha) y se observa la pérdidas de la afinidad tintorial de la matriz y zonas de lisis alrededor de los neutrófilos. En especial, es notable la gran cantidad de depósitos de fibrina, sola o asociada a neutrófilos (en rojo). La pérdida de la matriz se hace más notable cuando grupos de neutrófilos degradan las zonas adyacentes a los depósitos de fibrina (Figura 17B).

Durante la infiltración ocurre una distribución en gradiente de los leucocitos, que evidencia los efectos quimiotácticos. Aunque la infiltración ocurre principalmente en la parte dorsal de la aurícula, (Figura 18A), sin embargo, en los vasos sanguíneos de la zona ventral se observaron aglomeraciones de leucocitos atrapados en masa de fibrina, lo cual sugiere un posible efecto sistémico

del veneno a causa de una respuesta inmune generalizada (Figura 18B) y la necesidad de realizar estudios de otros órganos. En muchas zonas del sitio de inoculación se observaron pequeñas hemorragias focalizadas cerca del cartílago (Figura 19A), así como la infiltración masiva de neutrófilos en la matriz extracelular y la aglomeración de leucocitos dentro de los vasos (Figura 19B).

La fracción HM-PT60 se compone de seis subfracciones obtenidas mediante separación cromatográfica, usando la metodología descrita por Lundberg *et al.* (2007). Cada subfracción tiene un efecto diferente a HM-PT60; muchas de las manifestaciones como infiltración de leucocitos con preponderancia de neutrófilo y pocos monocitos son comunes en algunas de ellas.

Las fracciones 1 y 6 no causaron ninguna reacción inflamatoria o hemorrágica; además, las muestras de tejido no mostraron ninguna diferencia cuando se compararon con las del grupo de control. La fracción 2 produce una fuerte hemorragia con formación de hematoma, (Figura 20A). La fracción 3 causa hemorragias, aunque con una

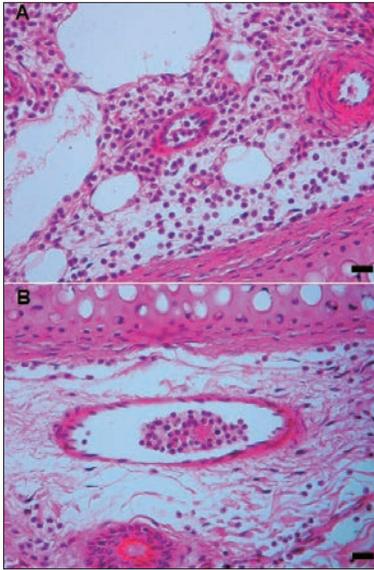


Figura 18. Imagen del sitio de inoculación en aurículas de cobayos tratados con la toxina de *H. metabus*. A) Parte dorsal de la aurícula mostrando infiltración. B) zona ventral de las aurículas con poca infiltración pero con los vasos llenos de agregados de leucocitos y fibrina. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 15 μm .

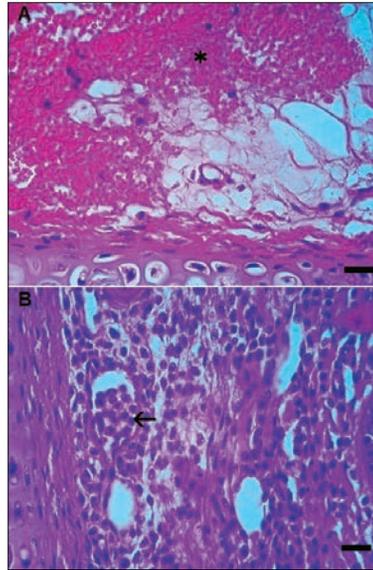


Figura 19. Hemorragias e infiltración leucocitaria en el sitio de inoculación en aurículas de cobayos tratados con la toxina de *H. metabus*. A) Hemorragia (asterisco) cerca del cartilago auricular en la zona dorsal de la aurícula. B) Infiltración masiva desde los vasos sanguíneos en las proximidades del cartilago auricular. La flecha indica la agregación de leucocitos en un vaso sanguíneo. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 20 μm .

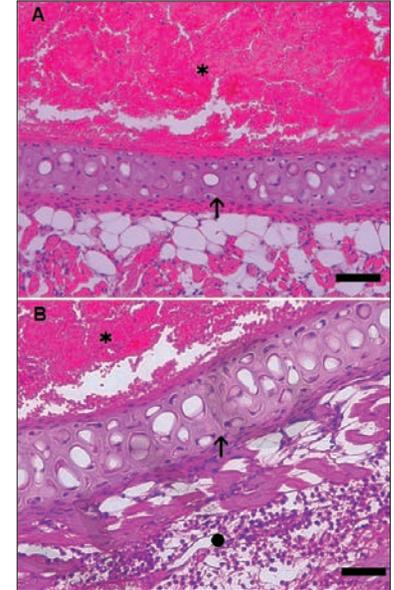


Figura 20. Sitio de inoculación en aurículas de cobayos tratados con las fracciones 2 y 3, ambos subcomponentes de la fracción HM-PT60. A) Hemorragia en la dermis causada por la fracción 2 en la zona dorsal de la aurícula (asterisco); hay poca infiltración de leucocitos. La flecha señala el cartilago auricular. B) Hemorragia en la dermis causada por la fracción 3 en la zona dorsal de la aurícula (asterisco) y una infiltración masiva de leucocitos en la parte ventral (circulo negro). La flecha señala el cartilago auricular. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 30 μm .

severidad menor que la fracción 2, infiltración moderada y poca deposición de fibrina (Figura 20B). La fracción 3 ocasiona reacciones muy particulares, lo cual se demuestra muy bien en el modelo de la aurícula: en el sitio de inoculación ocurren hemorragias y daños a los vasos, pero es en la parte ventral de la aurícula donde ocurre la infiltración de leucocitos, lo cual la diferencia sustancialmente de la fracción 2 (Figura 20B). Con la fracción 2 no hay formación de fibrina y la reacción inflamatoria es leve con poca infiltración compuesta de neutrófilos circundando la zona inoculada (Figura 21A), además de los daños a los vasos sanguíneos ocurre la degradación de coágulos (Figura 21B).

Las fracciones 4 y 5 causan una respuesta celular caracterizada por infiltración masiva, depósitos de fibrina

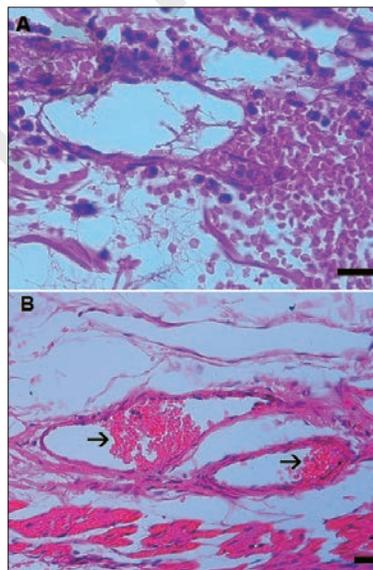


Figura 21. Sitio de inoculación en aurículas de cobayos tratados con la fracción 2, un subcomponente de la fracción HM-PT60. A) Daños causados a vasos con la consecuente hemorragia en la dermis; hay poca infiltración de leucocitos. B) Disociación de coágulos en venas y arterias (flechas). Tinción: Hematoxilina y eosina. Barras: 15 μm .

y arteritis, aunque no con la intensidad de HM-PT60. La fracción 4 ocasiona una moderada reacción inflamatoria con poca infiltración, mientras que la fracción 5 produce una mucho más severa. Ninguna de estas dos fracciones causa hemorragias. No se encontró una característica particular en la respuesta inflamatoria celular causada por estas dos fracciones, diferente a las de HM-PT60.

En los animales tratados con la fracción HM-PT60 y los del grupo control no se observó condritis auricular, la cual se caracteriza histopatológicamente por inflamación granulomatosa focal o multifocal con destrucción de la placa cartilaginosa, formación de nuevos nódulos cartilagosos y metaplasia ósea; por lo tanto se descarta que un daño al cartilago, fueran la causa de la infiltración o contribuyeran a ella.

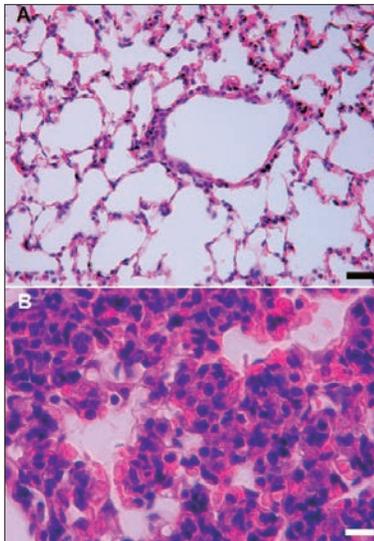


Figura 22. Pulmones de cobayos de A) los grupos control y B) a 1 h luego de la inoculación con la toxina de *H. metabus*. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 10 μ m.

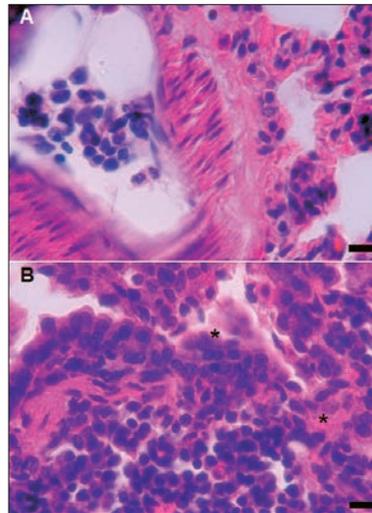


Figura 23. Pulmones de cobayos inoculados con la toxina de *H. metabus* A) a las 24 h y B) 48 h, los asteriscos indican zonas de necrosis. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 10 μ m.

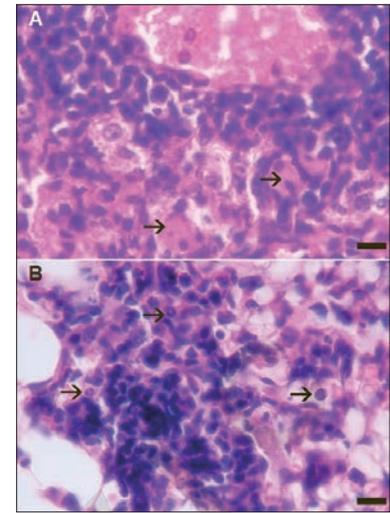


Figura 24. Pulmones de cobayos inoculados con la toxina de *H. metabus* a A) 48 h, las flechas señalan membranas depósitos de fibrina en el espacio alveolar y B) 96 h, las flechas indican neutrófilos. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 10 μ m.

Efectos sistémicos

La sospecha de un efecto sistémico de la toxina de *H. metabus* condujo a realizar un estudio histopatológico de los órganos internos. Se observó un daño progresivo en un período de 1 a 96 horas en cuatro órganos: pulmón, hígado, corazón y bazo.

Pulmón

En los pulmones de los especímenes inoculado con la fracción HM-PT60, a 1 hora de exposición, se observó una acumulación progresiva de leucocitos, principalmente polimorfonucleares y la morfología del tejido pulmonar fue anormal (Figura 22A, 22B). A 24 horas se observaron acumulaciones de neutrófilos en los vasos sanguíneos (Figura 23A) y depósitos de fibrina en las paredes alveolares, los cuales atrapan leucocitos y forman microtrombos que terminaran por necrosar el tejido, como se observa a los 48 horas (Figura 23B). En el grupo de 48 horas la depósitos de fibrina ocurre

en las paredes de los alvéolos (Figura 24A); desde las 48 horas y hasta las 96 horas se observó la presencia de neutrófilos y acumulación de fibrina en el espacio alveolar (Figuras 24A y 24B). Todas estas reacciones ocasionan un aumento en el volumen del parénquima con una consecuente reducción del espacio alveolar, resultando en una incapacidad mecánica progresiva del pulmón hasta el colapso.

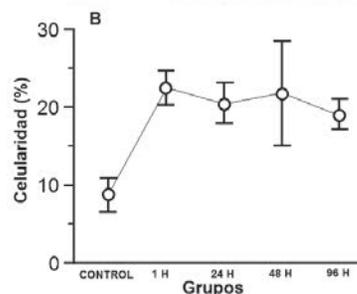
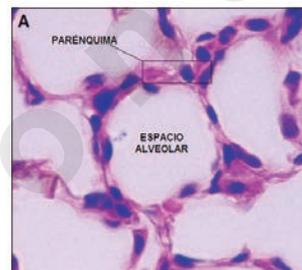


Figura 25. Diagrama esquemática del cambio en el tejido pulmonar en cobayos inoculados con la toxina de *H. metabus*. A) Microfotografía del pulmón normal donde se indican el espacio alveolar y el parénquima. B) Gráfico que representa los cambios de celularidad en el modelo de lepidopterismo durante 96 horas. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar para 5 cobayos en cada grupo.

En la Figura 25A se indican el espacio alveolar y el parénquima en el pulmón de un animal del grupo control. La Figura 25B se muestra el comportamiento de la celularidad en el pulmón luego de la inoculación de la fracción HM-PT60. La celularidad es la cantidad de células por área de superficie y es proporcional a la cantidad de núcleos por superficie, este parámetros se calcularon mediante análisis de imágenes con el objeto de hacer comparaciones cuantitativas; se hallaron diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis, entre los grupos tratados con la toxina y el grupo control ($p < 0,05$). La celularidad

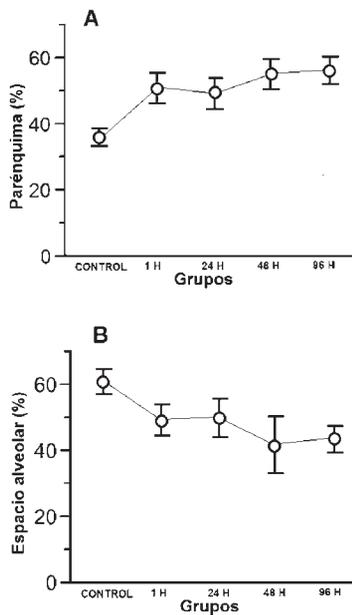


Figura 26. Gráficos que representan los cambios en el parénquima y espacio alveolar en el modelo de lepidopterismo durante 96 horas. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar para 5 cobayos en cada grupo.

aumenta 2,51 veces en la primera hora con respecto al grupo control ($p < 0,001$) lo cual se debe a la infiltración de leucocitos; a partir de la primera hora la celularidad permanece constante a lo largo de las 96 h del experimento, pues no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de 24 h - 48 h y 48 h - 96 h ($p > 0,05$).

Las superficies del parénquima y el espacio alveolar también fueron afectados por la HM-PT60. En la Figura 26A y 26B se representan los cambios de la superficie del parénquima y espacio alveolar en cada grupo experimental y el grupo control. A una hora el volumen del parénquima aumentó 1,2 veces y el espacio alveolar disminuye en la misma proporción; se hallaron diferencias estadísticamente significativas, para ambos variables, entre los grupos inoculado a cada tiempo y el grupo control ($p < 0,001$, pero no entre los grupos de 24 h - 48 h y 48 h - 96 h ($p > 0,05$)).

Corazón

En el corazón se observó una mayor presencia de leucocitos al aumentar el tiempo de exposición a la toxina. A una hora y a las 24 horas, se detectaron áreas focalizadas en el miocardio con acumulaciones

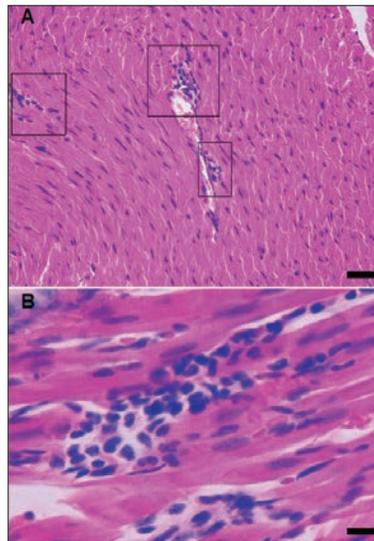


Figura 27. Corazón de cobayos a las 24 h de la inoculación con la toxina de *H. metabus*. A) Los recuadros muestran zonas de infiltración y necrosis en el miocardio. B) Zona de infiltración de polimorfonucleares y necrosis en el miocardio. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: A) 25 μ m, B) 10 μ m.

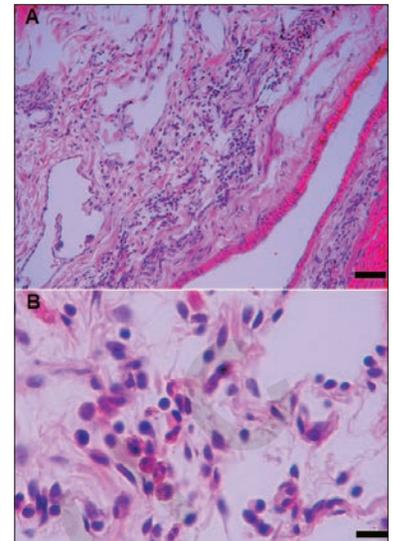


Figura 28. Corazón de cobayos a las 24 h luego de la inoculación con la toxina de *H. metabus*. A) Zona del subendocardio donde se muestra infiltración formando pequeñas vegetaciones. B) Ampliación de la zona de infiltración en A). Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: A) 50 μ m, B) 10 μ m.

de leucocitos polimorfonucleares (Figura 27A, 27B,), causando un cambio en la morfología del tejido, cuando se compara con los animales del grupo control; este patrón de infiltración se mantuvo hasta las 96 horas. A 96 horas se observaron áreas de necrosis principalmente en las aurículas. En el subendocardio a las 48 y 96 horas, la infiltración fue por células mononucleares (Figura 28A y B), a diferencia del miocardio donde hubo predominancia de polimorfonucleares. El tejido de las válvulas presentó edema a las 48 y 96 horas, lo cual no ocurrió en el miocardio.

Hígado

En el hígado se observó infiltración leucocitaria en el sistema portal y los sinusoides; en la primera hora la acumulación de neutrófilos células mononucleares, principalmente monocito, ocurrió en las venas del sistema portahepático (Figura 29A) y en pocos sinusoides (Figura 29B). A las 24 h, la infiltración también abarcó el sistema de sinusoides y el parénquima, aunque en los vasos del sistema portal se siguieron reclutando neutrófilos (Figura 30A); a las 48 y 96 horas la infiltración fue en su mayor parte por células mononucleares: linfocitos y macrófagos.

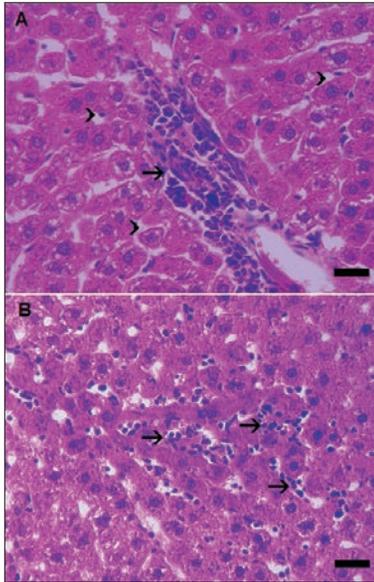


Figura 29. Aspecto general del hígado de cobayos a 1h de la inoculación con la toxina de *H. metabus*. A) La flecha indica la infiltración de polimorfonucleares a través de una vena del sistema portahepático. Las cabezas de flechas señalan sinusoides sin ninguna infiltración. B) Imagen del tejido hepático infiltrado. Las flechas indican leucocitos, predominantemente neutrófilos en los sinusoides. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 25 μ m.

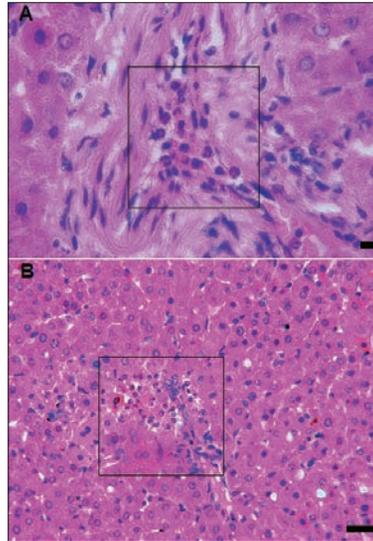


Figura 30. Aspecto general del hígado de cobayos 24 h después de la inoculación con la toxina de *H. metabus*. A) El recuadro muestra una zona de infiltración de polimorfonucleares. B) En el recuadro se muestra una zona de necrosis adyacente al sistema portahepático. Tinción: Hematoxilina y eosina. Barras: A) 10 μ m, B) 25 μ m.

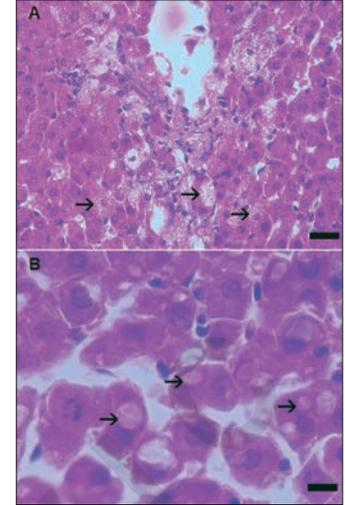


Figura 31. Aspecto general del hígado de cobayos 24 h después de la inoculación con la toxina de *H. metabus*. A) Las flechas indican hepatocitos vacuolados indicando la condición de hígado graso en el estado de esteatohepatitis. B) Esta imagen muestra hepatocitos con vacuolas conteniendo cuerpos de Mallory (flechas) a las 24 h luego de la inoculación con la toxina de *H. metabus*. Tinción: Hematoxilina y eosina. Barras: A) 25 μ m, B) 10 μ m.

Hubo necrosis de hepatocitos a las 24 h (Figura 30B) 48 y 96 horas. En muchas zonas cercanas al sistema de venas porta hepáticas se observaron hepatocitos vacuolizados, dando el aspecto de esteatohepatitis similar al que se observa en un hígado graso (Figura 31A), además de la presencia de cuerpos de Mallory-Denk a partir de las 24 h (Figura 31B).

Bazo

En el bazo no se observaron cambios hasta las 24 horas; en la zona periférica los leucocitos, principalmente neutrófilos, se formaron pequeños granulomas y hubo acumulación de fibrina en los vasos periféricos (Figura 32A, 32B), estos cambios se observaron hasta las 96 horas. En algunos casos estos pequeños granulomas alteran la circulación esplénica.

Cambios en la concentración de fibrinógeno sanguíneo

Hubo un aumento de la concentración de fibrinógeno en las primeras 24 h (Grupo B) ($6,079 \pm 1,576$

mg/100 ml), 1,833 veces la concentración en los especímenes del grupo control (Grupo A) ($3,316 \pm 0,869$ mg/100 ml). A las 48 h (Grupo C), la concentración de fibrinógeno disminuyó, hasta $4,487 \pm 0,637$ mg/100 ml. El análisis de varianza demostró que existen diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre los tres grupos ($p < 0,05$). La comparación de los diferentes grupos mediante la prueba a posteriori de Tukey indica que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y 24 horas ($p < 0,01$), entre el de 24 y 48 horas ($p < 0,05$), pero los grupos control y de 48 horas no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Reacciones inflamatorias producidas por la toxina de *H. metabus*

La composición química y la farmacología de los venenos de lepidópteros son poco conocidas, debido a las dificultades en obtener material puro en las cantidades suficientes y en algunos casos, la información existente es contradictoria. El lepidopterismo puede tener diferentes manifestaciones; por ejemplo, se

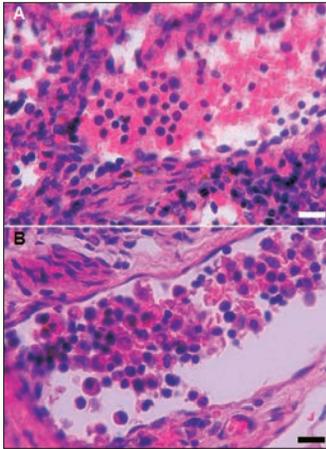


Figura 32. Imagen del bazo a 24 h luego de la inoculación con la toxina de *H. metabus*. A) Zona de una arteria esplénica donde se observa acúmulos de leucocitos y fibrina. B) Vena adyacente al vaso indicado en A) con acumulación de leucocitos monocucleares, en este caso plasmacitos. Tinción: hematoxilina y eosina. Barras: 10 μ m.

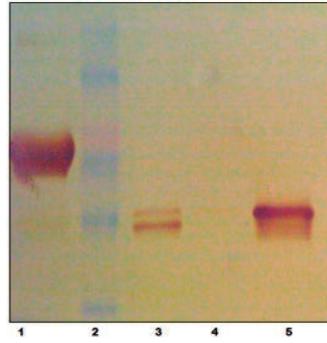


Figura 33. *Immunoblot* para comprobar la afinidad del anticuerpo contra la toxina de *H. metabus*: 1) inmunoglobulina contra veneno, 2) marcadores de peso molecular, 3) veneno completo, 4) albúmina sérica bovina y 5) fracción de veneno precipitada con cloruro de amonio al 60 %.

han descrito cambios en los sistemas de coagulación, acompañado hemorragias como en caso de las setas de las orugas del género *Lonomia* y algunas de estas propiedades de tipo fibrinolítico y hemorrágico han sido demostradas en modelos *in vitro* y murinos (Kellen *et al.* 1995; Seibert *et al.* 2004).

Algunos autores plantean que el contacto con los venenos setales de orugas o polillas neotropicales, da lugar a pocos casos de sensibilización alérgica debido a que no contienen proteínas u otra sustancia capaces de actuar como antígenos; es decir moléculas capaces de suscitar la respuesta inmune con la correspondiente producción de anticuerpos, como en el caso de otras toxinas y xenobióticos (Wirtz 1984; Huby *et al.* 2000). Sin embargo, los componentes activos de muchos venenos de lepidópteros son proteínas, en especial proteinasas y esterasas, cuya presencia parece estar correlacionada con la intensa picazón y con la reacción tardía en humanos a los venenos de orugas y polillas (Chudzinski-Tavassi & Carrijo-Carvalho 2006; Lundberg *et al.* 2007).

En este contexto surgen dos términos que son inmunogenicidad y alergenicidad. La inmunogenicidad es la propiedad que tiene un compuesto, o cuerpo, de desencadenar una respuesta inmunitaria; por su parte, la alergenicidad es una propiedad inmunogénica que posee un xenobiótico de causar una res-

puesta específica, que en mamíferos está mediada por inmunoglobulinas de tipo E. Muchas de las proteínas foráneas, salvo aquellas que están extensamente conservadas, son inmunógenos y algunas son capaces de inducir reacciones alérgicas de tipo inmediato. Para determinar si la inmunogenicidad intrínseca de una proteína ha sido alterada, es necesario probar independientemente su alergenicidad y su antigenicidad, lo cual puede lograrse experimentalmente midiendo simultáneamente tanto la respuesta con IgE (alergénica) e IgG (antigénica) (Huby *et al.* 2000; Kimber *et al.* 2003).

En las dermatitis alérgicas por contacto, existe un componente inmunológico caracterizado por una reacción inicial de hipersensibilidad inmediata o tipo I, el factor principal es la inmunoglobulina E (IgE) y mastocitos como células efectoras. Esta inmunoglobulina es producida por los linfocitos B, después del contacto con sustancias ambientales o alérgenos. Al igual que los anticuerpos de todos los otros isotipos de inmunoglobulinas, la IgE puede enlazarse específicamente a través de sus brazos F(ab) al antígeno proteico que induce su producción, y a través de las regiones constantes (Fc) a receptores específicos para IgE (Fc ϵ R) hallada en la superficie de los mastocitos y basófilos. Cuando dos o más de estas moléculas de IgE se enlazan a sus antígenos específicos, el Fc ϵ R puede entrecruzarse sobre la superficie de la célula iniciando eventos de señalización intracelular, cuyo resultado final es la degranulación liberándose histamina e induciendo la producción de prostaglandinas, leucotrienos y otros mediadores inflamatorios. Esto ejerce diversos efectos en varios tejidos dando lugar a cuadros clínicos característicos de la hipersensibilidad de tipo I o inmediata, mejor conocida como reacción alérgica cuyos síntomas pueden ir desde eritema leve y rinitis aguda hasta un choque anafiláctico fatal (Huby *et al.* 2000; Van der Laan *et al.* 2001).

La histamina, 5-hidroxi-triptamina, y materiales no identificados que estimulan su liberación, también están presentes en espículas y setas de lepidópteros, como en el caso de las larvas de las polillas *Lymantria dispar* donde el contenido de histamina setal va desde 17 a 80 ng/espina, y 86-172 ng/espina para *Dirphia* sp. (Wirtz 1984). Esto ha llevado a muchos investigadores a adjudicarle la responsabilidad de las

reacciones clínicas implicadas en el lepidopterismo. La histamina libre ha sido encontrada en las setas del género *Hylesia* (Dinehart *et al.* 1987); sin embargo, su efecto disminuye en un tiempo corto y explicaría la acción urticante y el prurito inmediato, pero no así su efecto necrosante. Además, los tratamientos anti-histamínicos no erradican los síntomas, lo que sugiere que existen otros componentes urticantes (Dinehart *et al.* 1987; Benaim-Pinto 2002). Benaim-Pinto *et al.* (1992) demostraron que uno de estos componentes es una enzima del tipo tripsina, específica de la especie, pues anticuerpos específicos contra ella no presentaron reacción cruzada con las de otros lepidópteros de la familia Saturniidae.

Lundberg *et al.* (2002, 2007) demostraron que la toxina de las setas de *H. metabus* poseen varios tipos de proteínas, separables en cinco fracciones mediante técnicas cromatográficas y electroforéticas. Cada una de ellas presenta reacciones inmunogénicas, vasodegenerativas y fibrinolíticas diferentes; estas últimas no están asociadas a reacciones inmunogénicas severas, pero sí a reacciones vasodegenerativas.

Para el caso de *H. metabus* las reacciones de hipersensibilidad tardía de tipo I no parecen ser las más comunes en las afecciones producidas por esta polilla; en el modelo estudiado no ocurre una reacción de hipersensibilidad de tipo I. En las poblaciones humanas no se descarta que ciertos individuos estén sensibilizados o tengan propensión a las reacciones alérgicas. En el modelo con cobayos se desarrolla un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica: una reacción inmunogénica muy tóxica causada por neutrófilo parecida a las reacciones de tipo Arthus como la descrita para otras patologías, aunque con sesgos muy particulares, tales como: la participación de macrófagos, hemorragias causadas directamente por efecto de los componentes de la toxina y daños a distintos órganos que se asemejan a los casos de septicemias, conocidas comúnmente como sepsis, en humanos y en modelos animales inducidos por lipopolisacáridos bacteriales.

Las septicemias son el resultado de una respuesta inmune sistémica aguda a una variedad de daños nocivos, en particular a la infección bacteriana. Esta respuesta produce la activación de un número de sistemas de mediadores que incluyen citocinas, leucocitos y la red hemostática y en la cual puede observarse un enlace molecular entre inflamación y coagulación; este proceso de dos vías crea un ciclo vicioso sobre

una espiral descendente que produce lesiones vasculares, disfunción de los órganos y el fallecimiento. Es ampliamente aceptado que la inducción por lipopolisacáridos (LPS) del factor tisular, una molécula procoagulante, en la vasculatura y células leucocíticas causa una activación sistémica de la coagulación del tipo intravascular diseminada (Corral *et al.* 2005).

En el envenenamiento por insectos, serpientes, escorpiones y arañas, además de los signos específicos directamente relacionados a los componentes tóxicos del veneno, los pacientes también pueden desarrollar un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica debido a la activación del sistema inmunológico con la liberación de citocinas proinflamatorias, mediadores quimiotácticos, y vasoactivos e infiltración celular, los cuales juegan un papel preponderante en la patogénesis del envenenamiento, su cuadro clínico y desenlace; también hay evidencia de reacciones de fase aguda con hipertermia o hipotermia, leucocitosis, neutrofilia, linfopenia, eosinofilia, desórdenes de la coagulación y un desbalance en la producción de proteínas con un incremento de proteína C reactiva (Voronov *et al.* 1999; Silveira *et al.* 2004).

Se ha estudiado la respuesta inmune mediada por células en distintos casos de envenenamiento por diversos animales y en muchos casos los leucocitos, y especialmente los neutrófilos, juegan un papel central en la respuesta inflamatoria y en los efectos tóxicos que pueden generar las toxinas in vivo, como en los escorpiones *Tityus discrepans* Pocock, 1897 (D'Suze *et al.* 1999, 2004, 2007), *Tityus serrulatus* Lutz & Mello, 1922 (Paneque Peres *et al.* 2009), arañas del género *Loxosceles* (Tambourgi *et al.* 2005), en *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Ramos *et al.* 2004) y la serpiente *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Silveira *et al.* 2004). En todos los casos la eliminación o inactivación de los leucocitos en los animales de experimentación resulta en la reducción de los efectos dañinos causados por el veneno (Luciano *et al.* 2004; Tambourgi *et al.* 2005; D'Suze *et al.* 2007; Ramos-Rodríguez & Méndez 2008).

Mediante métodos histoquímicos se ha demostrado que las toxinas de *H. metabus* son capaces de inducir una reacción inmediata en mastocitos y macrófagos in vitro y una respuesta inmunogénica a largo del tiempo mediada por neutrófilos con una participación conspicua de monocitos en modelos in vivo. En los macrófagos, la captación de la toxina es

dependiente del tiempo como se demostró mediante el marcaje inmunofluorescente. La activación de células inmunológicamente competentes como neutrófilos, macrófagos y mastocitos es un indicativo del potencial inmunogénico de cualquier compuesto que se tenga como xenobiótico (Kimber *et al.* 2003).

Neutrófilos, monocitos y mastocitos: Células claves en las respuestas inflamatorias inducidas por la toxina de *H. metabus*

Neutrófilos

Los neutrófilos son un componente esencial de la inflamación aguda y de la respuesta inmune innata, su contribución se extiende más allá de su papel tradicional como fagocitos profesionales y destructores de microorganismos. Una de sus principales características es la de migrar fuera de la circulación a través de diferentes barreras en respuesta a estímulos quimioatrayentes (Si-Tahar *et al.* 2001; Graça-Souza *et al.* 2002; Ley 2002; Mayer-Scholl *et al.* 2004; Remick 2007).

Neutrófilos y receptores del tipo Toll

Un prerrequisito esencial para el éxito de la defensa del hospedero es la capacidad de su sistema inmunológico para discriminar entre propio y ajeno. En mamíferos, el sistema inmune puede dividirse desde el punto de vista funcional en dos niveles: inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Mientras que la inmunidad adaptativa es evolutivamente reciente (sólo en vertebrados), la inmunidad innata es muy antigua y está muy conservada en los distintos grupos de organismos (desde protozoarios a mamíferos) y muchos de sus mecanismos fundamentales también se encuentra en plantas (Mushegian & Medzhitov 2001; Menezes & Jared 2002; Koller *et al.* 2009; Moser & Leo 2010). La funcionalidad de la inmunidad adaptativa está basada en el reacomodo de genes específicos, resultando en la generación de, aproximadamente, 10^{11} diferentes especies de receptores para antígenos en la superficie de las células B y T. Por el contrario, el sistema inmune innato es genéticamente fijo y ha desarrollado una estrategia sustancialmente diferente para reconocer patrones moleculares conservados usando receptores

de reconocimiento de patrones (PRR, *pattern recognition receptors*), algunas veces referidos como patrones moleculares asociado a patógenos (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), donde los receptores del tipo Toll (TLR, *Toll-like receptors*) representan receptores de reconocimiento de patrones típicos (Mushegian & Medzhitov 2001; Tsujimoto *et al.* 2005; Brown *et al.* 2006; Rock & Kono 2008; Koller *et al.* 2009; Flannagan *et al.* 2012).

Los TLR son proteínas transmembranales que contiene repeticiones ricas en leucina y un dominio extracelular de reconocimiento de antígenos. Hay 11 diferentes TLR, cada uno de los cuales reconoce componentes que están presentes en diferentes tipos de microorganismos, pero que son químicamente diferentes, por ejemplo, TLR4 reconoce lipopolisacáridos que son componentes de membranas hallados en la mayor parte de las bacterias gramnegativas, TLR2 a lipopéptidos presentes en la gran mayoría de las bacterias grampositivas, TLR9 reconoce las secuencias no metiladas ricas en citosina y guanina del ADN que son abundantes en la mayor parte de los genomas procarióticos, TLR5 reconoce una proteína en los flagelos y por lo tanto puede detectar muchos microorganismos flagelados. Finalmente, TLR3, TLR7 y TLR8 reconocen especies de ARN expresados por muchos virus. Enfocándonos en estos receptores, el hospedero realiza dos cosas notables e importantes: discrimina los componentes propios y ajenos y lo hacen con una cantidad relativamente pequeña de receptores que pueden reconocer muchos virus, bacterias y hongos, a pesar de la gran diversidad que poseen éstos típicos (Rock & Kono 2008; Koller *et al.* 2009; Moser & Leo 2010; Flannagan *et al.* 2012; McGhan & Jaroszewski 2012).

Los TLR representan los principales receptores de reconocimiento de patrones moleculares sobre los neutrófilos y juega un papel crucial en la activación de las funciones de éstos. La estimulación de los neutrófilos con una variedad de ligandos para TLR resulta en un incremento de la actividad fagocitaria, explosión respiratoria y producción de IL-8 *in vitro* (Mushegian & Medzhitov 2001; Koller *et al.* 2009). Todos los TLR estimulan cascadas de cinasa, que finalmente activan el factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB, *nuclear factor kappa B*), el cual controla la expresión de muchas moléculas necesarias para la inflamación aguda, como las citocinas proinflamatorias

(p. ej., IL-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral alfa TNF α), quimiocinas y moléculas de adhesión vascular necesarias para el reclutamiento de leucocitos (Rock & Kono 2008; Flannagan *et al.* 2012).

Neutrófilos e inflamación

Los procesos inflamatorios pueden ser amplificados por los neutrófilos mismos a través de la producción de ácidos grasos bioactivos derivados del ácido araquidónico tales como leucotrieno B₄ (LTB₄), citocinas (por ejemplo: interferón- γ , interleucina-1 [IL-1], factor de necrosis tumoral- α) o quimiocinas (IL-8, oncogen- α relacionada a crecimiento [GRO α]) (Ley 2002; Graça-Souza *et al.* 2002; Pompeia *et al.* 2002). Las citocinas son proteínas secretadas por distintos tipos de células de origen mieloide, o no mieloide, luego de una estimulación inmunogénica. Como una guía práctica se les agrupa dependiendo de su origen; si son producidas por monocitos se les llama monocinas, si las producen linfocitos, linfocinas. Las quimiocinas son citocinas proinflamatorias, péptidos pequeños de 8 a 10 kDa que son sintetizadas por diferentes células tales como fagocitos, células endoteliales, queratinocitos en la piel, fibroblastos, células musculares lisas así como células T adyuvantes y plaquetas; funcionan como quimioatrayentes de células fagocíticas, fundamentalmente en el reclutamiento de monocitos y neutrófilos desde la sangre a los sitios de infección o de lesiones; entre las quimiocinas mejor descritas en el ratón incluyen, CXCL2 (proteína de inflamación derivada de macrófagos-2 o MIP-2), quimioatrayente de neutrófilos inducido por citocinas 1 (CINC-1), CXCL5 (quimiocina CXC inducible por LPS o LIX) y CXCL7 (péptido activante de neutrófilos-2, NAP-2) (Voronov *et al.* 1999; Ley 2002; Duchene *et al.* 2007; Flannagan *et al.* 2012).

Los neutrófilos, entran a los tejidos a través de las vénulas poscapilares, aunque en algunos órganos son transportados por otros vasos, por ejemplo en la circulación pulmonar la migración ocurre a través de los capilares. El enlazamiento de los neutrófilos al endotelio vascular está controlado por las actividades secuenciales de moléculas de adhesión, las cuales median la interacción entre leucocitos y endotelio. Hay tres familias de moléculas de adhesión quienes juegan un papel central en la interacción de los leucocitos con el endotelio: las selectinas, las integrinas y la superfa-

milia de las inmunoglobulinas. Las selectinas son un grupo de glucoproteínas de superficie, esenciales en la marginación de los neutrófilos y su arrollamiento a lo largo del endotelio vascular; sus miembros incluyen las selectinas E (CD62E) y P (CD62P) expresadas en el endotelio y la L-selectina (CD62L) expresada en leucocitos. Las integrinas son heterodímeros con una cadena α y una cadena β común, la cual define las respectivas subfamilias de integrinas (β 1 y β 2); estas moléculas se ubican en la membranas de los leucocitos y median la interacción de estas células con moléculas de adhesión de la matriz extracelular o del endotelio. En el caso de los neutrófilos, en la superficie la L-selectina (CD62L) interactúa con porciones específicas de oligosacáridos en la glucoproteínas de la superficie de las células endoteliales, mientras que en el endotelio selectinas E y P igualmente reconocen oligosacáridos específicos en el neutrófilo. Las selectinas promueven la unión inicial de los neutrófilos bajo el flujo sanguíneo, mientras que las integrinas inducen una adhesión firme (Ley 2002; Brown *et al.* 2006). La superfamilia de inmunoglobulinas comprende las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1, *Intercellular Adhesion Molecules-1*) y molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), las cuales también son responsables por la adhesión de los neutrófilos al endotelio. Las citocinas proinflamatorias y la trombina promocionan la síntesis y aumento de la cantidad de moléculas de adhesión ocasionando la unión de los neutrófilos al endotelio y a la activación de éste (Ayala *et al.* 2002; Gando *et al.* 2004; Moser & Leo 2010).

El arsenal de los agentes citotóxicos de los neutrófilos tradicionalmente se han dividido en mecanismos dependientes del oxígeno e independientes de este elemento y, probablemente, ambos sistemas colaboran en la eliminación de microbios (Mayer-Scholl *et al.* 2004; Von Vietinghoff & Ley 2008). Al estar expuestos a un estímulo apropiado, los neutrófilos liberan una variedad de especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), que incluyen el anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH[•]) y ácido hipocloroso (HOCl) (Graça-Souza *et al.* 2002; Jabłoński *et al.* 2006). La reacción del anión superóxido con óxido nítrico conlleva a la formación de peroxinitrito (ONOO⁻), el cual es responsable por los efectos citotóxicos del NO aunque es una molécula mucho más reactiva que sus

precursores. En un pH fisiológico normal el peroxinitrito puede transformarse en un compuesto mucho más reactivo: el ácido de peroxinitrito (ONOOH) que puede originar a otras especies reactivas tales como el anión hidroxilo (HO^-), dióxido de nitrógeno (NO_2) y el catión nitronio (NO_2^+) (Jabłoński *et al.* 2006; Maniatis & Orfanosa 2008; Flannagan *et al.* 2012).

Después de la adherencia, los neutrófilos secretan varias enzimas tales como mieloperoxidasa y elastasa, desde los gránulos azurofílico, los cuales causan daños al endotelio. Actualmente, se pueden medir en una muestra de sangre las concentraciones de moléculas de adhesión como un marcador de activación de leucocitos y endotelio, la elastasa de neutrófilos como un marcador de la activación de los neutrófilos y la trombomodulina (sTM) como un marcador del daño endotelial (Gando *et al.* 2004; Flannagan *et al.* 2012).

Los neutrófilos en la circulación típicamente tiene un período de vida de aproximadamente 24 horas; sin embargo, los reclutados a los tejidos viven más (hasta varios días) y son modulados por el microambiente local (Hagiwara *et al.* 2009; Koller *et al.* 2009). El tiempo de vida extendido de los neutrófilos infiltrantes en los tejidos incrementa la probabilidad de que estas células induzcan lesiones extracelulares, a través de la liberación descontrolada de radicales del oxígeno y enzimas proteolíticas. La eliminación de neutrófilos mediante apoptosis es un mecanismo homeostático que previene la lesión de los tejidos, que de otro modo ocurrirían luego de la lisis celular. Durante los procesos inflamatorios que involucren coagulopatías, septicemias por ejemplo, la apoptosis de los neutrófilos se halla retardada debido a la activación prolongada del factor nuclear κB y niveles reducidos de caspasa 3, como resultado, existen un mayor número de células con potencial para dañar a los órganos. Parte de este incremento en la esta supervivencia se ha observado en relación directa con la fibrina y el fibrinógeno, este efecto antiapoptótico es mediado a través de las rutas de la cinasas (Whitlock *et al.* 2000; Ley 2002; Brown *et al.* 2006).

Monocitos

Los monocitos constituyen el segundo tipo celular de importancia que se observa como efector en la respuesta inflamatoria causada por la toxina de *H. metabus*. Los monocitos circulantes de la sangre peri-

férica son los precursores de los macrófagos tisulares, por lo tanto proveen una fuente móvil de células funcionalmente competentes del sistema inmune innato; son constituyentes del sistema mononuclear de fagocitos, el cual comprende diferentes subtipos de células dendríticas y macrófagos. La carencia de capacidad fagocítica y de receptores de superficie para ligandos del complemento hace a los monocitos relativamente inertes mientras estén en la sangre. Sin embargo, una vez que dejan la sangre se convierten en macrófagos (definido por su capacidad de fagocitosis) (Duffield 2003). Existen distintas subpoblaciones de monocitos que difieren en su etapa de maduración y en la capacidad de infiltrarse en los sitios de inflamación. La existencia de estos subtipos específicos en diferentes estados patológicos sugiere que las subpoblaciones de monocitos también están especializadas funcionalmente. (Sunderkötter *et al.* 2004; Laskin *et al.* 2011).

Los monocitos nuevos al entrar al sitio inflamado se diferencian en uno de los varios estados fenotípicos, dependiendo del arreglo de información percibida en la superficie por el enlazamiento sus receptores. Colectivamente, estos estados fenotípicos se conocen como activación clásica. Muchos factores conducen a los macrófagos hacia el fenotipo de activación clásica, entre ellos el enlazamiento de receptores de quimiocinas (por ejemplo, MCP-1), la exposición a depósitos de colágeno alterado y la hipoxia. Sin embargo, hay diferencias en los fenotipos de los macrófagos activados por distintos estímulos, lo cual se refleja en el patrón de liberación de citocinas y que, a su vez, puede traducirse en funciones variables, haciendo que el término activación clásica de los macrófagos sea una sobresimplificación. Los macrófagos inflamatorios activados por la vía clásica juegan un papel crucial en la destrucción de la matriz extracelular matriz normal y anormal, a través de la producción de metaloproteinasas (gelatinasas, caseinasas, colagenasas y elastinasas) tanto de forma directa como indirecta (Duffield 2003; Laskin *et al.* 2011; Flannagan *et al.* 2012).

Sin embargo, no todas las citocinas hacen que los macrófagos sean activados por la vía clásica, algunas citocinas, por ejemplo, (IL-10, IL-13) y glucocorticoides causan su «desactivación». El término desactivación es inadecuado, puesto que los macrófagos expuestos a estas citocinas muestran una mayor capacidad para la presentación de antígenos y la fagocitosis de restos y partículas. Los macrófagos activados

alternativamente generan citocinas antiinflamatorias que suprimen la síntesis de citocinas proinflamatorias y son resistentes a la reactivación (Duffield 2003).

Los macrófagos tienen un arsenal de citocinas y radicales libres que han sido descritos como proapoptóticos para diferentes células e incluyen el NO, H₂O₂ y radicales de oxígeno. Algunas de las citocinas derivadas de macrófagos aumentan la proliferación celular en algún contexto, mientras que otras promueven la muerte celular. Los macrófagos parecen emplear diferentes factores inductores de muerte en distintos tejidos. Por ejemplo, la apoptosis en las células musculares lisas ocurre por el enlazamiento del ligando Fas al receptor Fas inductor de muerte celular, mientras que los neutrófilos son inducidos rápidamente a la apoptosis por la liberación de la forma soluble del ligando Fas desde los macrófagos (Duffield 2003; Laskin *et al.* 2011).

Mastocitos

En los casos de lepidopterismo causado por *H. metabus*, no se observa una dermatitis alérgica de manera frecuente, a menos que el paciente esté sensibilizado; en este tipo de reacciones los efectores iniciales son los mastocitos, sin embargo en nuestros experimentos *in vitro* estas células presentan una reacción de degranulación muy rápida lo cual es indicio de una rápida captación de la toxina y de una respuesta muy temprana, la cual no podemos medir por ser escasos en la piel y por que el modelo *in vivo* sólo se realizó en tiempos prolongados. Los mastocitos son células efectoras de la inmunidad que proveen mediadores y citocinas durante enfermedades alérgicas e inflamatorias, son reconocibles por sus grandes gránulos, luego de la coloración con algunos derivados de la tiazina, con los cuales exhiben una tinción metacromática, es decir, presentan un color diferente a la del compuesto usado para su tinción. Estos gránulos contienen mediadores (como serotonina e histamina) que están a la espera de una señal para ser liberados. Independientemente de la ruta de activación, ya sea por IgE o por otro receptor, los mastocitos degranulan y secretan mediadores en el tejido circundante (Bischoff 2007; Francis & Meininger 2010). Los mastocitos derivan de células madres pluripotentes hematopoyéticas en la médula ósea y circulan como células inmaduras, para asumir todas sus funciones sólo cuando llegan

a su destino, a diferencia de los basófilos, los cuales maduran en la médula ósea antes de pasar a la circulación; una vez liberados, los mastocitos sufren un proceso de diferenciación que involucra a numerosos factores que incluyen citocinas específicas tales como el factor de células madres c-Kit, el cual juega un papel crítico en la maduración, desarrollo y acción secretora de estas células (Francis & Meininger 2010).

Los mastocitos expresan otros sitios de enlazamiento y receptores de superficie, tales como los TLR, β 2-integrinas, moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y el receptor para serotonina; suelen localizarse estratégicamente en sitios como las barreras mucosas y vasculares, la piel y en distintos órganos del cuerpo: pulmones, tejido cardíaco, tracto gastrointestinal, riñones e hígado. En estos sitios hay dos tipos de mastocitos, que se diferencian por el tipo de proteasas que poseen: los que tienen sólo triptasa (MT) y los que tienen triptasa y quimasa (MTQ); los MT se hallan principalmente en las mucosas mientras que los MTQ se encuentran en el tejido conectivo y la piel. Los MT producen citocinas del tipo IL-5 e IL-6, mientras que los MTQ liberan IL-4 (Bischoff 2007; Francis & Meininger 2010).

En su papel tradicional, los mastocitos juegan un papel clave en la respuesta inmune asociada a la inmunoglobulina E (IgE), a través de la agregación de los receptores Fc ϵ RI de alta afinidad para IgE, causada por un alérgeno. Al ocurrir el entrecruzamiento del Fc ϵ RI, liberan histamina y otros mediadores. De particular relevancia en la patogénesis de la inflamación alérgica son la histamina y el leucotrieno C₄ (LTC₄), los cuales inducen reacciones epidérmicas, secreciones de moco y electrolitos, contracción del músculo liso y activación de las células nerviosas. Varias revisiones y monografías recientes proveen una descripción completa y detallada de este proceso, entre ellos Bischoff (2007) y Francis & Meininger (2010).

Neutrófilos, monocitos, mastocitos y oligosacáridos de la toxina de *H. metabus*

Los oligosacáridos son una parte integral de las glucoproteínas e influyen en sus propiedades físicas, las cuales pueden incluir: estabilidad, solubilidad, hidrofobicidad y carga eléctrica. Cualquier cambios en los oligosacáridos puede afectar la estabilidad y captación de una proteína y por lo tanto, alterar su poten-

cial antigénico y alergénico (Huby *et al.* 2000; Moser & Leo 2010; Flannagan *et al.* 2012).

Muchas proteínas alergénicas están glucosiladas, aumentando la posibilidad de que los grupos glucosídicos puedan contribuir a su alergenicidad. La capacidad de una proteína para suscitar la manifestación clínica de una respuesta inmunogénica o alérgica, en un individuo sensibilizado, puede reducirse por deglucosilación. Las proteínas y péptidos glucosilados pueden mostrar tasas de captación por parte de las células, cientos de veces mayores que sus contrapartes no glucosiladas. Esto ha sido demostrado para la captación de proteínas por células dendríticas presentadoras de antígenos, donde la captación mediada por receptores produce un incremento cuantitativo en la antigenicidad de péptidos y proteínas de varios ordenes de magnitud (Huby *et al.* 2000; Moser & Leo 2010).

Las glucoproteínas de los lepidópteros presentan un núcleo de α -1,3-fucosa en sus oligosacáridos, lo que las hace muy inmunogénicas, esto se debe a que los núcleos de α -1,3-fucosilación constituyen un epítopo (o determinante antigénico, que es la porción de una molécula que actúa como antígeno, a la que se une un anticuerpo producido contra dicha molécula) para antiseros producidos contra glucoproteínas de plantas, así como para inmunoglobulina E de pacientes alérgicos a materiales de plantas e insectos. De la misma manera, se ha encontrado que los lepidópteros son capaces de sintetizar oligosacáridos compuestos del tipo β -glucano, por poseer la enzima transferasa de β -1,4-*N*-acetil-galactosaminilo, y que son capaces de transferir *N*-acetil-galactosamina desde UDP-*N*-acetil-galactosamina a oligosacáridos enlazados en configuración en β -1,4. Resultados similares han sido hallados en las glucoproteínas del veneno de las abejas (Rendić *et al.* 2008).

Los componentes glucoproteicos de la toxina de *H. metabus* contienen oligosacáridos con estructuras oligomanosídicas y paucimanosídicas, además de *N*-glucanos híbridos, los cuales son poco comunes en insectos (ver páginas 57-68). Estos oligosacáridos tienen un componente mayoritario a base de α -D (+)-manosa y las diversas configuraciones hacen de estas glucoproteínas componentes complejos. Así mismo, sus efectos en el sistema inmune pueden ser complejos, en especial en los mecanismos de activación, como ocurre con otras glucoproteínas, donde no sólo los carbo-

hidratos, sino el patrón de expresión y configuración de enlaces de los disacáridos puede determinar la susceptibilidad relativa de respuestas celulares, produciendo una fuerte reacción inmunológica (Kovalenko *et al.* 2007). Parte de esta variabilidad la podemos observar en los componentes de HM-PT60, mientras que la fracciones 2 y 3, no causan una respuesta inmunológica severa como los otros componentes de la fracción HM-PT60, pero sí presentan una acción vasodegenerativa y hemorrágica muy marcada y se comportan, *in vitro*, como proteasas, similar al resto de los componentes de la fracción HM-PT60 (Lundberg *et al.* 2007).

La presencia de oligosacáridos con manosa y en configuraciones de β -glucanos en la fracción HM-PT60, podría ser la causa de la rápida captación de la toxina. Muchos de los oligosacáridos de la toxina de *H. metabus* contienen manosa en diferentes combinaciones estructurales y aquellos con configuración β -1,4, pueden ser la causa de la rápida degranulación de mastocitos, y responsables la activación y la captación progresiva e incrementada de la toxina de *H. metabus* por parte de macrófagos peritoneales residentes murinos desde tiempos tan cortos como 1 minuto observados en los experimentos *in vitro* (Figura 11).

El zimosano es una partícula derivada de la pared celular de levaduras y está compuesta principalmente de polisacáridos, de los cuales los β -glucanos y los mananos son los constituyentes principales (Brown *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2002). El reconocimiento celular de zimosano no opsonizado es mediado por el receptor de manosa y un receptor de β -glucano, los cuales se han identificado en neutrófilos, células de la línea de monocitos/macrófagos (incluyendo microglia), células NK y fibroblastos. La Dectina-1 (β GR) es el receptor para β -glucano en leucocitos y tiene un papel preponderante en el reconocimiento innato de β -glucano, también está presente un segundo mecanismo que involucra al receptor de manosa; ambos son un receptor de reconocimiento de patrones con un papel importante en la defensa del hospedero (Brown *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2002; Flannagan *et al.* 2012).

Estudio *in vitro* usando macrófagos peritoneales e inmunohistoquímica cuantitativa han demostrado que la incubación de éstos con D(+)-celobiosa (4-O- β -glucopiranosil-glucosa, un disacárido de glu-

cosa con enlace β -1,4), inhibe el enlazamiento de la toxina de *H. metabus* en un 65 % y la manosa en un 75 %; además HM-PT60 fue capaz de inhibir parcialmente la fagocitosis y enlace de *Saccharomyces cerevisiae* por parte de los macrófagos peritoneales y es una prueba funcional del efecto relación que tienen los oligosacáridos, con manosa y con la configuración de β -glucano, en la inmunogenicidad de la toxina (Gamez 2011).

Reacción inflamatoria en la piel

Los neutrófilos son las primeras células en ser reclutadas en los sitios inflamatorios y la acumulación descontrolada contribuye a la disfunción de los órganos (Duchene *et al.* 2007; Stearns-Kurosawa *et al.* 2011). La predominancia de neutrófilos y depósitos de fibrina fueron las características más notables de las reacciones inmunológicas inducidas por la fracción HM-PT60 y algunos de sus componentes, en la piel de los cobayos.

La alteración producida en la piel asociada al lepidopterismo causado por *H. metabus*, es muy parecida al producido por otras especies, sin embargo en el modelo usado en este estudio está asociada a una fuerte reacción inflamatoria mediada por neutrófilos, similar al de la septicemia en humanos y al de modelos experimentales de endotoxemia, donde ocurre todo un conjunto de efectos en distintos sistemas de órganos las cuales se engloban en el denominado síndrome inflamatorio sistémico (en inglés SIRS, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) y se atribuye a la liberación de citocinas proinflamatorias (Rojas *et al.* 2005; Stearns-Kurosawa *et al.* 2011).

El veneno de *H. metabus* puede inducir una hemorragia focalizada en pacientes afectados por las setas; en los animales de experimentación se producen pequeñas hemorragias a causa de las propiedades vasodegenerativas y hemolíticas de algunos de los componentes del veneno, como es el caso de las fracciones 2 y 3. Estas zonas de hemorragia pueden resultar en una sobreestimulación de la respuesta inmune, causada por otras fracciones diferentes a 2 y 3, y posiblemente incrementada por productos derivados de la degradación de la hemoglobina, principalmente el grupo hemo.

El hemo es una molécula de protoporfirina IX complejada con un átomo de hierro (+2); la proto-

porfirina deriva de cuatro grupos pirrólicos que forman un anillo y enlazan al átomo de hierro en el centro y está muy conservada, pues se encuentra desde bacterias hasta mamíferos (Wagener *et al.* 2003; Vijayan *et al.* 2010). El grupo hemo es importante para el transportador de oxígeno y de electrones en las mitocondrias, así como grupo prostético de una gran variedad de proteínas como la hemoglobina, y citocromos (Wijayanti *et al.* 2004). Recientemente se ha reconocido que el hemo tiene potentes propiedades proinflamatorias y está implicado en lesiones a los tejidos durante la inflamación, es capaz de inducir la migración de neutrófilos y monocitos y puede modular varias respuestas relacionadas a neutrófilos tales como la migración, reorganización del citoesqueleto de actina y la producción de especies reactivas del oxígeno a través de la activación de cinasas dependientes de proteína C (Graça-Souza *et al.* 2002; Wagener *et al.* 2003; Vijayan *et al.* 2010). Figueiredo *et al.* (2007), han demostrado que el inicio de la inflamación dependiente de hemo estuvo mediada por interacciones específicas de hemo con TLR-4 en ratones y en modelos *in vitro* usando células mononucleares.

En todos los casos donde se usó la HM-PT60 y las subfracciones se produjo la infiltración y degranulación de neutrófilos y la consecuente degradación de la matriz extracelular en la dermis como lo demuestran las tinciones con tricrómico de Gomori. Esta degradación de la matriz, específicamente del colágeno, puede amplificar la reacción de inflamación, pues los derivados de los componentes de la matriz extracelular se comportan como mediadores inflamatorios (Rock & Kono, 2008). Los glucosaminoglucanos son unos de los principales constituyentes de la matriz e incluyen al ácido hialurónico y el heparán sulfato; los fragmentos de ácidos hialurónicos estimulan la producción de mediadores proinflamatorios desde las células endoteliales y dendríticas *in vitro* y la producción de quimiocinas cuando se inyectan *in vivo* a través de TLR4, el heparán sulfato activa los macrófagos y células dendríticas y estimulan la producción de citocinas proinflamatorias *in vitro* (Zhang *et al.* 2009; McGhan & Jaroszewski 2012); los péptidos derivados de la elastina, colágeno, laminina y fibronectina tienen un comportamiento similar (Rock & Kono 2008; Zhang *et al.* 2009; Abu-Amara *et al.* 2010).

Efectos de la toxina de *H. metabus* sobre el sistema fibrinolítico

En este estudio se demostró que la acción de la toxina de *H. metabus* es sistémica, produciendo una activación generalizada del sistema inmunológico, involucrando neutrófilos, deposición de fibrina lo cual genera lesiones en hígado, corazón, bazo y pulmones. En los pulmones ocurrieron las mayores alteraciones estructurales inducidas por depósitos de fibrina y se da en todos los tiempos que se consideraron para realizar el estudio histopatológico. Un efecto sistémico similar al originado por la toxina de *H. metabus*, fue descrito por D'Suze *et al.* (1999, 2004) para el veneno del escorpión *T. discrepans*, que produce una reacción inflamatoria caracterizada por infiltración de leucocitos, formación de fibrina, coagulación y la acumulación de neutrófilos; los efectos sistémicos del veneno de este escorpión ha sido relacionados a neutrófilos en estudios usando inhibidores para estas células (D'Suze *et al.* 2007).

Durante la reacción inflamatoria generalizada, hay formación de fibrina en diferentes órganos lo cual genera un gasto de fibrinógeno, activándose su producción con el consecuente aumento en la concentración plasmática en las primeras 24 h. El fibrinógeno es un componente importante de la cascada de la coagulación, así como uno de los principales determinantes de viscosidad y flujo sanguíneo, una concentración elevada de esta proteína se asocian con patologías que pueden promover estados hiperfibrinogenemia o de hipercoagulación. Su producción en el hígado está regulada por citocinas y aumenta en la respuesta de fase aguda de la infección y otros procesos inflamatorios y está sujeto a un efecto umbral (Kerlin *et al.* 2004).

La fibrina es el producto final de la cascada de coagulación y por lo tanto juega un papel primordial en la coagulación sanguínea y la circulación, puede actuar en diferentes sistemas debido a su estructura molecular, la cual le provee una variedad de sitios de enlazamiento para receptores celulares con diferentes funciones biológicas. Normalmente, luego de una lesión, la deposición de una matriz rica en fibrina en el intersticio es una parte integral del proceso de reparación de los tejidos, previniendo la pérdida de sangre y sirve como soporte para la migración de células inflamatorias, fibroblastos y células endoteliales que inician la subsecuente formación del tejido de granu-

lación que reparará la lesión. Durante el proceso de reparación, la fibrina es reemplazada por una matriz fibrosa compuesta por colágeno (de Giorgio-Miller *et al.* 2005).

El proceso de formación de fibrina implica la conversión del fibrinógeno en monómeros de fibrina, a través de la acción de la α -thombina. Subsecuentemente, el factor XIIIa estabiliza los monómeros de fibrina polimerizada y vitronectina (de Giorgio-Miller *et al.* 2005). Sin embargo, su papel no está restringido a la sangre, puesto que los componentes de la coagulación y la cascada fibrinolítica también residen en los tejidos, y regulan la formación y degradación de la fibrina en una variedad de patologías caracterizadas por la disrupción de la integridad vascular; en estas enfermedades el fibrinógeno gana acceso a los tejidos debido al daño vascular y la fibrina formada contribuye al proceso patogénico (Degen *et al.* 2001; Akassoglou & Strickland 2002).

Actualmente, se acepta que la coagulación intravascular diseminada (DIC, *Disseminated Intravascular Coagulation*) refleja un desorden inflamatorio que puede originarse de la microvasculatura, el cual, si es suficientemente severo, puede producir disfunción de órganos. Las alteraciones de la coagulación y fibrinólisis en DIC están mediadas por diferentes citocinas proinflamatorias. La actividad persistente de la fibrina-trombina está estrechamente enlazada a SIRS y al síndrome de disfunción múltiple de órganos (MODS, *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*) (Ayala *et al.* 2002; Gando *et al.* 2004). La coagulación intravascular inducida por trombina amplifica la respuesta inflamatoria incrementando la permeabilidad vascular, activando las células endoteliales para producir citocinas proinflamatorias y otros mediadores provocando la acumulación de neutrófilos (Gando *et al.* 2004; de Giorgio-Miller *et al.* 2005).

Daño tisular y alteraciones histológicas en órganos

Daño tisular

A pesar de las diferencias sintomatológicas causadas por los venenos de diferentes especies, parece subyacer un mecanismo similar en la forma de acción donde están implicados los principales efectores celulares de la respuesta inmunológica durante la

inflamación: neutrófilos y macrófagos. La activación de neutrófilos y macrófagos durante un proceso de inflamación pueden producir, muerte celular, daño tisular y disfunción de los órganos. En las secciones correspondientes a la histopatología de órganos se tratará este aspecto fundamental en el estudio del lepidopterismo por *H. metabus*.

Existen varios mecanismos por los cuales una lesión a los tejidos puede causar inflamación. En una infección, el papel de la inflamación es claro: la vasodilatación muy rápidamente incrementa el suministro de defensas transportadas por la sangre al sitio afectado, además, el incremento de la permeabilidad vascular permite que proteínas solubles, tales como anticuerpos y componentes del complemento se vacíen en el ambiente local, donde pueden atacar a los microbios invasores. Sin embargo, puede haber formas de daño estéril que también activan la inflamación, por ejemplo la estimulación traumática de los mastocitos puede ocasionar la liberación de agentes proinflamatorios, si el trauma causa hemorragias entonces los mecanismos hemostáticos pueden generar mediadores inflamatorios, como en el caso del hemo, mencionado anteriormente. Además, la muerte celular por necrosis es un inductor universal y potente de la inflamación estéril, lo cual se ve en las quemaduras y en el infarto al corazón (Rock & Kono 2008).

El daño tisular es un término un tanto vago. En su forma más amplia es un concepto que implica alteraciones de las estructuras celulares, la inducción de la muerte celular y la destrucción progresiva de la matriz extracelular, la cual sostiene la arquitectura celular y cuyos componentes son cruciales para la homeostasis y funciones de los tejidos normales, resultando en la destrucción de la arquitectura de los tejidos y disfunción de los órganos (Duffield 2003; Proskuryakov *et al.* 2003; Rock & Kono 2008; Stearns-Kurosawa *et al.* 2011).

Las células pueden morir por un número diferente de mecanismos. Dos de los principales tipos de muerte celular son la necrosis (oncosis) y la apoptosis. Funcionalmente, las células apoptóticas mantienen la integridad de la membrana plasmática e incapacitan los sistemas homeostáticos y de señalamiento, además el ADN se escinde específicamente para inutilizarlo y es un proceso no inflamatorio puesto que las vesículas intracelulares tóxicas no se liberan al exterior y el ADN se dispone de una manera segura, de modo

que logran contener componentes que pueden funcionar como señales proinflamatorias y antes de que las células se desintegren son rápidamente ingeridas por los fagocitos residentes. Sin embargo, el concepto de que la apoptosis no es inflamatoria, no siempre es correcto; las células apoptóticas pueden estimular a los macrófagos a generar mediadores, tales como interleucina-10 (IL-10) o factor transformante de crecimiento β (TGF- β) y en ciertas condiciones pueden inducir inflamación, debido a un proceso conocido como necrosis secundaria en la cual su membrana se hace permeable a macromoléculas. Si este proceso ocurre antes de que la célula apoptótica sea ingerida por un fagocito, entonces su contenido intracelular, el cual contiene componentes proinflamatorios, será liberado y estimulará la respuesta del hospedero (Proskuryakov *et al.* 2003; Rock & Kono 2008; Stearns-Kurosawa *et al.* 2011).

La muerte por necrosis ocurre en respuesta a muchos tipos de lesiones y agentes (trauma, infarto, toxinas, entre otros), por lo tanto, es típicamente el resultado de un proceso patológico y se asocia con la pérdida de la integridad de la membrana plasmática con lo cual se liberan componentes celulares preexistentes que funcionan como señales proinflamatorias (Rock & Kono 2008). Una de las moléculas que ha sido implicada en el inicio de la respuesta inflamatoria hacia las células necróticas es la proteína 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1, *High Mobility Group Box 1 Protein*), la cual está presente en todas las células. Normalmente se enlaza a la cromatina y tienen un papel en el plegamiento del ADN y regulación de la transcripción de los genes (Rock & Kono 2008).

Pulmón

El tracto respiratorio representa el sitio primario para el contacto íntimo con microorganismos patógenos y partículas aéreas. Por consiguiente, el sistema inmune pulmonar tiene que mantener un balance crítico entre tolerar los estímulos ambientales y proveer una efectiva línea de defensa contra patógenos dañinos. Esta función se logra mediante una sofisticada interrelación de elementos celulares móviles y constitutivos de la respuesta inmune, entre las cuales, las células epiteliales alveolares y de las vías aéreas representan los componentes esenciales de la barrera. Los neutrófilos y macrófagos alveolares juegan un

papel principal en el reconocimiento y eliminación de patógenos invasores en respuesta a una infección pulmonar, además de ser capaces de activar células epiteliales a través de la liberación de IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (Tsujimoto *et al.* 2005; Koller *et al.* 2009; Laskin *et al.* 2011).

El endotelio es una capa única de células epiteliales planas que recubre el interior de todos los vasos sanguíneos y es estructural y funcionalmente heterogénea, dependiendo del órgano y ubicación del lecho vascular. Un aspecto íntimamente asociado al endotelio es la permeabilidad microvascular, la cual se refiere a la facilidad de paso o transporte de solutos a través de los vasos de intercambio (por ejemplo, capilares y vénulas poscapilares) y es el principal determinante del suministro de nutrientes a los tejidos; las alteraciones patológicas de este proceso, o hiperpermeabilidad, contribuyen a la génesis de diferentes patologías (Maniatis & Orfanosa 2008). El endotelio microvascular pulmonar es un órgano en sí, que es metabólicamente activo y esencial para el mantenimiento adecuado de la homeostasis cardiovascular y sistémica; los estímulos nocivos que comprometen la integridad estructural y funcional del endotelio pulmonar pueden generar un edema pulmonar no cardiogénico y a la inflamación del parénquima (Dhillon *et al.* 2005; Maniatis & Orfanosa 2008).

Una de las principales características del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica es que define el alto riesgo de lesiones a los pulmones (Rojas *et al.* 2005); el pulmón fue el órgano más afectados por la toxina de *H. metabus* y presentan las características histopatológicas propias de un daño agudo al pulmón, con infiltración masiva de neutrófilos en el parénquima pulmonar y deposición de fibrina, como en los síndromes inflamatorios sistémicos con coagulación diseminada, como en las septicemias y los modelos de endotoxemia usando LPS.

El daño agudo al pulmón (ALI, *Acute Lung Injury*) y su forma severa, el síndrome de incapacidad respiratoria aguda (ARDS *Acute Respiratory Distress Syndrome*), resultan de numerosas causas y son responsables por una mortalidad elevada. El desarrollo del ALI está asociado a una variedad de desórdenes clínicos y puede ser directo (por ejemplo, neumonía) e indirecto (por ejemplo, trauma o septicemia). En el ALI con lesión directa, las células epiteliales alveolares son las primeras en ser alteradas, mientras que

en la indirecta empieza con alteraciones en las células endoteliales; de esta forma, el daño alveolar es el sine qua non de todo ALI (Mochizuki *et al.* 2005; Ochs 2006; Hagiwara *et al.* 2009; Matthay & Zemans 2011).

Las más ampliamente aceptadas y actualizadas definiciones de ALI y ARDS están basadas en las recomendaciones del Comité de la Conferencia de Consenso Europeo Americano (AECC, *American European Consensus Conference Committee*). Ambos, se definen como síndromes de inflamación, siendo el ALI, un continuo de respuestas patológicas al daño del parénquima pulmonar y el ARDS, un síndrome de inflamación pulmonar persistente y agudo con incremento en la permeabilidad vascular caracterizado por infiltrado bilateral del pecho, hipoxia y exclusión de una causa cardiogénica. Mientras que la definición del AECC es simple de aplicar en un ámbito clínico y refleja la variabilidad en la severidad del daño clínico del pulmón, su principal desventaja es que no contiene ninguna información de la causas subyacentes (Gando *et al.* 2004; Ochs 2006; Allen *et al.* 2007; Matthay & Zemans 2011).

Las causas más comunes de ALI y ARDS son la septicemias, quemaduras, neumonía, aspiración del contenido gástrico, trauma severo con conmoción, transfusiones múltiples, entre otras; diferentes toxinas, xenobióticos y agentes físicos pueden dañar directamente las células endoteliales y epiteliales induciendo inflamación del parénquima pulmonar (Imanaka *et al.* 2001; Mochizuki *et al.* 2005; Kang *et al.* 2009). Entre algunos casos estudiados de agentes causantes del ALI se encuentran:

- Causas mecánicas, como por ejemplo, el daño del pulmón inducido por ventilación (VILI, *Ventilator-Induced Lung Injury*). La formación de la membrana hialina, edema pulmonar y deterioro en la oxigenación son típicas del daño al pulmón que pueden ser causados por ventilación mecánica mediante alta presión o elevados volúmenes. Se han sugerido que las células y mediadoras inflamatorias juegan un papel importante en la patogénesis del VILI (Imanaka *et al.* 2001; Matthay & Zemans 2011).
- Agentes químicos, como los compuestos fluorinados. El perfluoroisobutileno (PFIB) es un

compuesto altamente tóxico que puede originarse de la combustión de compuestos derivados de los fluorocarbonos polimerizados, tales como el teflón (politetrafluoroetileno) o como un producto secundario de la producción de tetrafluoroetileno. Una breve exposición por inhalación de PFIB puede resultar en una lesión severa del pulmón que se caracteriza por edema pulmonar, permeabilidad alterada, incapacitación y hasta el fallecimiento (Wang *et al.* 2001).

· Toxinas. La toxina botulínica purificada, cuando es atomizada en forma de aerosol es capaz de inducir ALI y ARDS (Taysse *et al.* 2005). Los lipopolisacáridos de distintas bacterias gramnegativas y venenos de distintos animales de diferentes grupos taxonómicos, como en el caso de *T. discrepans* (D'Suze *et al.* 1999).

Las características histopatológicas del ALI se han denominado colectivamente daño alveolar difuso y puede dividirse en una fase exudativa temprana, la cual dura aproximadamente una semana y una fase fibroproliferativa tardía que ocurre durante la segunda y tercera semana. La fase exudativa está caracterizada por necrosis de las células epiteliales, alveolares o endoteliales, edema alveolar e intersticial proteínico, permeabilidad capilar incrementada, hemorragia alveolar, infiltración de células inflamatorias, especialmente neutrófilos y membrana hialina constituida por fibrina, proteínas plasmáticas y surfactantes. En la fase fibroproliferativa, aumenta la cantidad de células epiteliales alveolares del tipo II, engrosamiento del septo alveolar y, finalmente, grados variantes de fibrosis alveolar e intersticial (Mochizuki *et al.* 2005; Rojas *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2005; Ochs 2006; Maniatis & Orfanosa 2008).

La ruptura de la barrera endotelial y epitelial produce un edema alveolar proteínico y junto a otros factores, tales como la elastasa de neutrófilos, a una mecánica alterada del sistema respiratorio y del intercambio de gases (Hiemstra 2002; Zhou *et al.* 2005; Ochs 2006). Los surfactantes del alveolo hacen posible su integridad y que no colapse durante el flujo de gases; la fibrina es un potente inhibidor de la función de los surfactantes, de aquí que tanto la permeabilidad y la fibrina incrementen de manera concertada un desarreglo mecánico en la función pulmonar (Allen *et al.* 2007).

Los componentes de la toxina de *H. metabus* tienen actividad similar a la calicreína tisular *in vitro*, la cual es una proteasa de serina implicada en el sistema fibrinolítico; la toxina *in vitro* es capaz de degradar el fibrinógeno (Lundberg *et al.* 2002, 2007); sin embargo, *in vivo* se produce con coagulación diseminada en todo el organismo, siendo los pulmones los órganos más afectados. La fracción HM-PT60, y sus componentes, producen la infiltración y degranulación de neutrófilos y la consecuente degradación de la matriz extracelular y la deposición de fibrina, dos características asociadas con ALI y ARDS, y están implicados tanto en la formación de fibrina como en la producción de proteinasas, causantes de las alteraciones histopatológicas observadas en pulmones.

Los neutrófilos son capaces de disparar la cascada de coagulación por la formación de un complejo con el factor VII/VIIa, generando trombina la cual es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina (Forsyth *et al.* 2001). Además de esta vía, recientemente se descubrió que la inducción de fibrina puede ser mediada por neutrófilos estimulados por antígenos que son capaces de expresar el factor tisular induciendo la producción de fibrina en reacciones de tipo Arthus (Imamura *et al.* 2002; Corral *et al.* 2005; Tsujimoto *et al.* 2005; Manly *et al.* 2011). Las proteinasas de serina producidas por los neutrófilos producen lesiones a los tejidos en los sitios de inflamación, entre estas enzimas la elastasa es de gran importancia junto a la catepsina G. Esta forma de acción de los neutrófilos se ha observado en las septicemias, donde juega un papel central en la producción de fibrina y en el daño causado a los pulmones por secreción de elastasas (Guo *et al.* 2002; Imamura *et al.* 2002; Kawabata *et al.* 2002; Manly *et al.* 2011). La concentración de elastasa neutrofílica en plasma está significativamente elevada en pacientes con ALI y ARDS (Uchida *et al.* 2009).

La elastasa de neutrófilos es una proteinasa de serina glucoproteica de 29 kDa del tipo quimiotripsina con varias isoformas que difieren en su grado de glucosilación. Es almacenada en los gránulos azurofílicos en su forma activa hasta que es liberada luego de la exposición del neutrófilo a estímulos inflamatorios. Tiene un papel bactericida y actúa como agente proinflamatorio; el hecho de que la elastasa de neutrófilos incremente la producción de IL-8 sugiere la inducción autocrina que pudiera dirigir, potencialmente,

la hiperacumulación de neutrófilos (Kuwahara *et al.* 2006). Una vez liberada la elastasa de los neutrófilos es completamente activa, debido a que funciona óptimamente en un ambiente neutro, y degrada elastina, colágenos, laminina y otros componentes de la matriz extracelular, dañando las células endoteliales y ocasionando lesiones a los órganos (Kawabata *et al.* 2002; Tsujimoto *et al.* 2005; Kuwahara *et al.* 2006; Uchida *et al.* 2009; Flannagan *et al.* 2012).

A pesar de las recientes mejoras en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares del SIRS, ALI/ARDS, hay pocas estrategias terapéuticas efectivas para el daño agudo a pulmón; se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de la elastasa de neutrófilos, como el sivelestat (ONO 5046, N-[2-[[[4-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi)-fenil]-sulfonil]-amino]-benzoil]-glicina), reduce las lesiones pulmonares asociado con el SIRS en humanos y el inducido por LPS en modelos animales para ALI y ARDS. (Gando *et al.* 2004; Tsujimoto *et al.* 2005; Mori *et al.* 2007; Hagiwara *et al.* 2009; Uchida *et al.* 2009; Kawahara *et al.* 2010).

Los macrófagos juegan un papel central en la respuesta inflamatoria, liberando citocinas que controlan eventos claros en la iniciación, resolución y procesos de reparación de la inflamación (Henderson *et al.* 2003). Los neutrófilos juegan un papel importante en el daño a pulmón, sin embargo, a lo largo del tiempo, no es el único tipo de leucocito presente en esta reacción, sino que los monocitos también forman parte de los leucocitos infiltrantes y luego de 24 h, su presencia se hace más conspicua, y estas células pueden ejercer efectos degradativos a través de la producción de proteasas (Laskin *et al.* 2011) aunque su acción puede ser más tardía, en la etapa fibroproliferativa del daño alveolar difuso; la estrecha interacción con macrófagos alveolares (que eliminan neutrófilos apoptóticos) y células epiteliales pulmonares (que estimulan neutrófilos a través de la secreción de citocinas) perfilan el resultado de la respuesta inmune bronquio alveolar (Beck-Schimmer *et al.* 2005; Falasca *et al.* 2008; Maniatis & Orfanosa 2008).

Hígado

El hígado juega un papel importante en la respuesta inmune innata, suministrando la primera línea de defensa contra microbios y toxinas que atra-

viesan la barrera intestinal. Las células de Kupffer, los macrófagos residentes de este órgano, son críticas para la rápida eliminación de microorganismos de la circulación sistémica. Aunque las células de Kupffer de por sí son altamente fagocíticas y capaces de remover microorganismos, también facilitan la generación de respuesta inflamatoria que producen el reclutamiento de neutrófilos, monocitos, linfocitos B y T y células asesinas naturales (NK, *Natural Killer*). Los mediadores de la inflamación neutrofilica generados por las células de Kupffer incluyen el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucinas (IL-1 y IL-6), quimiocinas y ROS, los cuales activan los neutrófilos en la microvasculatura hepática ocasionando eventos que culminan en la muerte de los hepatocitos (Ramaiah & Jaeschke 2007a; Uchida *et al.* 2009).

Los tipos de daños al hígado mediados por neutrófilos en diferentes modelos animales se han asociado a la isquemia y reperfusión, endotoxemia, hepatitis alcohólica, colestasis obstructiva, toxicidad por xenobióticos, como acetaminofen (APAP) y α -naftil-isotiocianato (ANIT), o por el aumento de los mediadores de la inflamación (Ramaiah & Jaeschke 2007ab). No obstante la acumulación y activación de neutrófilos en los sinusoides y vénulas postsinusoidales, típicamente no causan daño lesiones al tejido; en general, la extravasación en el parénquima es necesaria para que los neutrófilos los causen (Ley 2002; Ramaiah & Jaeschke 2007ab; Uchida *et al.* 2009).

En el hígado de los especímenes inoculados con la fracción HM-PT60, se observaron las características de una condición de esteatohepatitis con prominencia de los neutrófilos dentro de las lesiones centrolobulares, balonamiento de los hepatocitos y cuerpos de Mallory-Denk, pudiendo asociar las lesiones en el hígado a la existencia de un proceso inflamatorio sistémico causado por esta toxina. Algunas de las alteraciones observadas en el hígado nos indican un primer indicio de esta condición, la vemos a partir de las 24 h con la presencia de los cuerpos de Mallory-Denk. Los cuerpos de Mallory-Denk, se describieron por primera vez como inclusiones citoplasmáticas en los hepatocitos de individuos con enfermedades hepáticas causadas por el alcohol, pero también se hallaron en pacientes con esteatohepatitis no alcohólica, así como en neoplasmas hepatocelulares malignos y comparten características morfológicas y fisicoquímicas con otros cuerpos de

inclusión, tales como los cuerpos esferoides asociados con esclerosis lateral amiotrófica, y contienen citoqueratinas 8 y 18 (Nakamichi *et al.* 2002; Tiniakos *et al.* 2010). La patogénesis de la esteatohepatitis está relacionada al estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos, endotoxemia, activación de las células estrelladas hepáticas y una compleja red de citocinas en la cual la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF)- α es preponderante, aunque juegan un papel las interleucinas 1, 6 y 8 (Lefkowitz *et al.* 2002; Tiniakos *et al.* 2010).

Las lesiones en el hígado son necróticas y causadas por neutrófilos, aunque no se descarta la acción de las proteasas transportadas por vía sanguínea. El estudio histopatológico plantea un patrón que varió en el tiempo, pues hubo un cambio en la infiltración desde neutrófilos a neutrófilos y células mononucleares, principalmente monocitos, sin embargo se siguen observando necrosis asociada a neutrófilos, después de las 24 horas. Las proteasas y los ROS derivados de neutrófilos, son capaces de causar daño hepatocelular directamente. Los efectos citotóxicos de las proteasas pueden contribuir al proceso de daño total durante una hepatitis neutrofílica prolongada (Ramaiah & Jaeschke 2007ab; Uchida *et al.* 2009). Otro caso de respuesta inflamatoria sistémica con desarrollo de una condición de esteatohepatitis, causada por un aumento de interleucinas en una condición tipo septicemia parecida a la de *H. metabus*, la encontramos con el veneno del escorpión *T. discrepans* (D'Suze *et al.* 2004).

Corazón

El corazón presentó necrosis e infiltración de neutrófilos en el miocardio durante las primeras 24 h. Posteriormente, la infiltración pasó a ser de neutrófilos y células mononucleares y se extendió hasta el subendocardio; las características histopatológicas del tejido a 48 h son similares a las de una endocarditis asociada con necrosis del tejido, ésta se reconoce por la deposición de fibrina y acumulación de leucocitos en las válvulas (Lepidi *et al.* 2002, 2003). En general las alteraciones observadas se asemejan a las condiciones que habitualmente ocurren en las patologías cardíacas asociada a septicemias y a los daños por isquemia y reperfusión; en todos los casos son los neutrófilos los principales agentes de las lesiones en

el tejido. Los hallazgos de numerosos investigadores muestran que los neutrófilos inyectados en la circulación coronaria de los corazones de cobayos expuestos a isquemia y reperfusión inducen una disfunción miocárdica manifestándose con signos clínicos, tales como un incremento en el diámetro diastólico del extremo ventricular izquierdo y disminución la contractibilidad ventricular (Seligmann *et al.* 2001; Pompeia *et al.* 2002; Tamion *et al.* 2010).

Hay un acuerdo general de que es la respuesta del hospedero, y no la infección misma, la que determina el desenlace de la sepsis y que tiene una relevancia particular en el desarrollo de fallas cardíacas (Falasca *et al.* 2008). Los LPS bacteriales inducen disfunción ventricular izquierda y causan la liberación de citocinas con propiedades de depresión cardíaca (Hunter & Doddi 2009).

Es probable que los receptores del tipo Toll-4 sean un pivote en la disfunción de los miocitos inducida por endotoxinas, debido a que proveen un enlace crítico entre los estimulantes inmunes producidos por los microorganismos y el inicio de la respuesta inmune. Los experimentos *in vitro* sugieren que los receptores del tipo Toll-4 sobre macrófagos y neutrófilos están implicados en disfunción miocárdica, probablemente a través de la liberación de especies reactivas del oxígeno y las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF- α (Rudiger & Singer 2007; Hunter & Doddi 2009; Schmittinger *et al.* 2010; Tamion *et al.* 2010; McGhan & Jaroszewski 2012). Hay que tener en cuenta que la toxina de *H. metabus* induce focos hemorrágico con lesión en eritrocitos pues sus componentes son proteasas con propiedades hemolíticas (Lundberg *et al.* 2002, 2007) y vasodegenerativas pudiendo generarse el compuesto hemo, el cual puede amplificar la respuesta mediada por neutrófilos vía TLR4 (Figueiredo *et al.* 2007; Vijayan *et al.* 2010); esta ruta puede estar implicada en la generación de lesiones que se observan en el corazón; sin embargo este es un aspecto que es poco conocido no solo para *H. metabus* sino para otros insectos con venenos hemolíticos.

Bazo

El bazo contiene elementos vasculares y linfoides; es un sitio de hematopoyesis y en algunas especies remueve eritrocitos envejecidos y defectuosos, así como material particulado y bacterias circulantes del

suministro de sangre. El bazo es el sitio de toxicidad directo e indirecto, blanco de algunos carcinógenos y de metástasis de neoplasmas malignos surgidos en otros sitios (Suttie 2006).

Las lesiones en el bazo parecen ser más una consecuencia de la reacción inmunológica amplificada que un daño directo en su estroma. Una característica resaltante en este órgano es la formación de grandes acúmulos de leucocitos inmersos en masa de fibrina en la zona periférica subyacente a la cápsula y en la zona correspondiente a la pulpa roja, los cuales, generalmente, ocasionan problemas de embolismo. Una alteración de la circulación esplénica siempre compromete este órgano, generando alteraciones en la producción de plaquetas, linfocitos y en la persistencia de eritrocitos dañados y envejecidos, llegándose en algunos casos a tener como alternativa la esplenectomía (Steiniger *et al.* 2001).

Un esquema general del efecto sistémico causado por la toxina de *H. metabus*

En este trabajo se han utilizado modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* para estudiar el lepidopterismo causado por *H. metabus*, son modelos bien conocidos y utilizados sobre todo en histopatología. El enfoque del trabajo es prioritariamente de tipo histopatológico, y aunque los métodos histológicos son bastantes robustos y general suficiente información en distintos sistemas de órganos quedan aún muchos aspectos sin tratar, por ejemplo los mecanismos a escala molecular que están implicados en cada alteración que se observó; no obstante la información que se tiene permite hacer un bosquejo general de como la toxina genera lesiones en el modelo experimental *in vivo*.

Uno de los principales aspectos que puede influir en la intensidad de la afección por la toxina de *H. metabus* es que los daños parecen estar asociados a la cantidad de toxina que recibe un individuo en cada contacto con setas de esta polilla, de lo cual no existen estudios. Por otro lado, el sitio en que se insertan las setas, la piel o en las mucosas, puede definir mucha de la sintomatología observada (Dinehart *et al.* 1985; Battisti *et al.* 2011). Muchas espículas pueden quedar en la epidermis, como se observó en los ratones tratados con setas, y por efectos mecánicos reinsertarse en la dermis y comenzar de nuevo otro evento de reacciones inmunológicas. Este mecanismo puede

explicar las lesiones crónicas o prurito persistente que se presenta en algunos pacientes previamente sensibilizados, donde se ha observado infiltración linfocítica y eosinofílica como en el síndrome de Well, donde el contacto persistente con insectos se ha descrito como el factor iniciador de la enfermedad (Melski 1990). Los efectos que se observan en la piel son la consecuencia de una respuesta inmune mediada por neutrófilos, que tienen un efecto en otros órganos y que dependiendo de cada especie, puede tener una sintomatología y desarrollo particular

Al introducirse la toxina en la dermis los primeros efectores pueden ser mastocitos y neutrófilos que se activan por oligosacáridos de los componentes glucoproteicos de la toxina, en especial los que poseen configuración de β -glucano o que contienen manosa, al enlazarse a receptores del tipo TLR que están en la superficie de estas células. La activación de estas células inicia el proceso de inflamación, sin embargo para neutrófilos se da un reclutamiento y activación siendo capaces de inducir la formación de fibrina y amplificar la reacción inflamatoria mediante citocinas; otros agentes capaces de amplificar la reacción son los derivados de la hemoglobina que provienen de las hemorragias y hemólisis que generan algunos componentes de la toxina o productos de la degradación de la matriz extracelular causada por la degranulación de neutrófilos y macrófagos. La activación generalizada de neutrófilos ocasiona un efecto inflamatorio sistémico que se manifiesta con daño en pulmón (ALI), hígado y corazón del tipo que ocurre en las septicemias con posterior participación de células mononucleares de la línea monocito-macrófagos; órganos como el bazo presentan lesiones a causa de la deposición de fibrina.

Algunos investigadores describen un panorama muy diferente, plantean que el pretratamiento de las setas de insectos y arácnidos, con agentes químicos o calentamiento no evitan la reacción inflamatoria y creen que es necesario definir otros mecanismos para explicar las reacciones que generan las setas y plantean la hipótesis de que a la quitina de las setas, y sus derivados, son los promotores y reguladores de las reacciones inflamatorias. Sin embargo, es necesario que se realicen estudios directos de los mecanismos moleculares subyacentes a una exposición a quitina de setas (Battisti *et al.* 2011). Aunque la quitina es un buen candidato para generar respuesta inflamatoria,

en *H. metabus*, no parece ser el caso, aunque la posibilidad de un mecanismo adyuvante y de amplificación debido a este polisacárido no puede ser descartado.

Los modelos animales han permitido la identificación de mediadores específicos y moléculas de adhesión implicadas en las SIRS inducidas experimentalmente, pero las conclusiones, hasta ahora, no han tenido efectos clínicos contundentes. Un factor importante es que en los seres humanos los neutrófilos representan la principal población de células en la sangre, mientras que en los ratones, el animal que se usa regularmente en los modelos de sepsis, representan una población minoritaria; otro ejemplo de diferencias es el caso de la integrina $\beta 1$, CD49d, que es expresada constitutivamente en neutrófilos murinos, pero en humanos está virtualmente ausente en los neutrófilos de los individuos sanos y sólo se detecta en una pequeña población de células en pacientes con septicemia (Brown *et al.* 2006). Una diferencia crucial es que los ratones son muy resistentes, compa-

rado con otras especies, a las endotoxinas y cuando se quiere inducir daños en los pulmones, son necesarias grandes dosis para causar un efecto mensurable, además las lesiones producidas son moderadas y transitorias aún con dosis letales. A pesar de estas posibles objeciones, el modelo murino es especialmente atractivo debido al catálogo de ratones manipulados genéticamente para identificar eventos importantes en la patogénesis pulmonar (Rojas *et al.* 2005).

Aunque se carece de un modelo animal que inequívocamente mimetice los aspectos claves del ALI humano, éstos han sido útiles en los estudios de la patología pulmonar (Ochs 2006). Esta misma consideración debe ser tomada en cuenta al evaluar el modelo usando cobayos que se presenta en este trabajo; aunque no refleje fielmente lo que ocurrirá en un humano que estén en contacto con la toxina de *H. metabus*, las conclusiones son válidas al momento de considerar los posibles daños a la salud de las personas afectadas.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La toxina de *Hylesia metabus* es un complejo de glucoproteínas inmunogénicas, las cuales son estimuladoras de las células inmunológicamente activas y generan una fuerte respuesta inmunológica sistémica en modelos de experimentación, ocasionando lesiones en los pulmones, hígado, corazón y bazo. Los hallazgos de alteraciones y lesiones en órganos internos en modelos experimentales, sugieren que pueden ocurrir daños sistémicos en pacientes que han estado en contacto con las setas de esta polilla.

Actualmente el uso de inmunosupresores, esteroides principalmente, en el tratamiento del lepidopterismo por *H. metabus* puede generar inconvenientes y ocasionar la reincidencia de los síntomas luego de una aparente mejoría; la preparación de antisuero e inmunoglobulinas específicas para las toxinas de *H. metabus* podría contribuir al estudio de la cinética de la toxina en humanos, lo cual ayudaría a desarrollar un mejor tratamiento de los casos de exposición a corto y largo plazo.

Por lo tanto, en las poblaciones afectadas por *H. metabus*, se debe considerar una mayor atención y observación de aquellos pacientes con alteraciones de

mayor impacto en su cuadro clínico para determinar si hay efectos sistémicos, lo cual ayudará al mejor tratamiento y prevención de daños a largo plazo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff MD, Magelhaes PJ & SJ Ram (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11:36-42.
- Abu-Amara N, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B & A Seifalian (2010) Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks - A review. *Liver Transplantation* 16:1016-1032.
- Akassoglou K & S Strickland (2002) Nervous system pathology: The fibrin perspective. *Journal of Biological Chemistry* 383:37-45.
- Allen GB, Leclair T, Cloutier M, Thompson-Figueroa J & JHT Bates (2007) The response to recruitment worsens with progression of lung injury and fibrin accumulation in a mouse model of acid aspiration. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular* 292:L1580-L1589.
- Asan E (2002) Progress in focus: recent advances in histochemistry and cell biology. *Histochemistry and Cell Biology* 118:507-525.
- Asan E & D Drenckhahn (2004) News and views in histochemistry and cell biology. *Histochemistry and Cell Biology* 122:593-621.

- Ayala A, Chung, CS, Lomas, JL, Song GY, Doughty LA, Gregory SH, Cioffi WG, LeBlanc BW, Reichner J, Simms HH & PS Grutkoski (2002) Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice. *American Journal of Pathology* 161:2283-2294.
- Bard F, Mazelin L, Péhoux-Longin C, Malhotra V & P Jurdic (2003) Src regulates Golgi structure and KDEL receptor-dependent retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 278:46601-46606.
- Baschong W, Suetterlin R & RH Laeng (2001) Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49:1565-1571.
- Battisti A, Holm G, Fagrell B & S Larsson (2011) Urticating hairs in arthropods: Their nature and medical significance. *Annual Review of Entomology* 56:203-220.
- Beck-Schimmer B, Schwendener R, Pasch T, Reyes L, Booy C & RC Schimmer (2005) Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respiratory Research* 6:61.
- Benaim-Pinto C, Pernía-Rosales B & R Rojas-Peralta (1992) Dermatitis caused by moths of *Hylesia* genus (Lepidoptera, Saturniidae) in northeastern states of Venezuela: II. Biochemistry and immunoallergy of substances responsible for dermal lesions. *American Journal of Contact Dermatitis* 3:5-15.
- Benaim-Pinto C (2002) Reacciones cutáneas indeseables producidas por insectos. *Dermatología Venezolana* 40:87-94.
- Bischoff SC (2007) Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature Reviews Immunology* 7:93-104.
- Bradbury P & KC Gordon (1990) Connective tissue and stains. En: Bancroft JD, Stevens A (Eds.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Livingston Churchill, Londres, Reino Unido. pp 119-142.
- Brown CM (2007) Fluorescence microscopy - avoiding the pitfalls. *Journal of Cell Science* 120:1703-1705.
- Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong SYC & S Gordon (2002) Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 196:407-412.
- Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM & DF Treacher (2006) Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368:157-169.
- Casala A, Bianchi C, Sánchez JV, Bianchi O & R Balsa (1967) Granuloma de las manos por nidos de lepidópteros (*Hylesia nigricans*). *Archivos Argentinos de Dermatología* 12:307-314.
- Chen HC & RV Farese (2002) Determination of adipocyte size by computer image analysis. *Journal of Lipid Research* 43:986-989.
- Chudzinski-Tavassi AM & LC Carrijo-Carvalho (2006) Biochemical and biological properties of *Lonomia obliqua* bristle extract. *Journal of Venomous Animal and Toxins Including Tropical Diseases* 12:156-171.
- Coleman R (2000) Histochemistry in the new millenium - a time to change our terminology? *Acta Histochemica* 102:241-246.
- Coleman R (2006) The long-term contribution of dyes and stains to histology and histopathology. *Acta Histochemica* 108:81-83.
- Collins TJ (2007) ImageJ for microscopy. *BioTechniques* 43:S25-S30.
- Cook HC (1990) Carbohydrates. En: Bancroft JD, Stevens A (Eds.) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Livingston Churchill, Londres, Reino Unido. pp. 188-193.
- Corral J, Yélamos J, Hernández-Espinosa D, Monreal Y, Mota R, Arcas I, Miñano A, Parrilla P & V Vicente (2005) Role of lipopolysaccharide and cecal ligation and puncture on blood coagulation and inflammation in sensitive and resistant mice models. *American Journal of Pathology* 166:1089-1098.
- Cox-Cardoso AE & V Haddad (2005) Accidents caused by lepidopterans (moth larvae and adult): study on the epidemiological, clinical and therapeutic aspects. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 80:573-578.
- D'Suze G, Comellas A, Pesce L, Sevcik C & R Sánchez-de-León (1999) *Tityus discrepans* venom produces a respiratory distress syndrome in rabbits through an indirect mechanism. *Toxicon* 37:173-180.
- D'Suze G, Salazar V, Díaz P, Sevcik C, Azpurua H & N Bracho (2004) Histopathological changes and inflammatory response induced by *Tityus discrepans* scorpion venom in rams. *Toxicon* 44:851-860.
- D'Suze G, Díaz P, Salazar V, Sevcik C & J Brazón (2007) Effect of leukocyte inhibitors benzydamine and cyclophosphamide, on lung injury caused by *Tityus discrepans* scorpion venom. *Toxicon* 50:1116-1125.
- de Giorgio-Miller A, Bottoms S, Laurent G, Carmeliet P & S Herrick (2005) Fibrin-induced skin fibrosis in mice deficient in tissue plasminogen activator. *American Journal of Pathology* 167:721-732.
- De Roodt AR, Salomón OD & TA Orduna (2000) Accidentes por lepidópteros con especial referencia a *Lonomia* sp. *Medicina* (Buenos Aires) 60:964-972.
- Degen JL, Drew AF, Palumbo JS, Kombrinck KW, Bezerra JA, Danton MJ, Holmback K & TT Suh (2001) Genetic manipulation of fibrinogen and fibrinolysis in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 936:276-290.
- Dhillon SS, Mahadevan K, Bandi V, Zheng Z, Smith CW & RE Rumbaut (2005) Neutrophils, nitric oxide, and microvascular permeability in severe sepsis. *Chest* 128:1706-1712.
- Díaz JH (2005) The evolving global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of caterpillar envenoming. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72:347-357.
- Dinehart SM, Archer ME, Wolf JE, McGravan MH, Reitz C & EB Smith (1985) Caripito itch: dermatitis from contact with *Hylesia* moths. *Journal of the American Academy of Dermatology* 13:743-747.
- Dinehart SM, Jorizzo JL & NA Soter (1987) Evidence for histamine in the urticating hairs of *Hylesia* moths. *Journal of Investigative Dermatology* 88:691-693.
- Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, Cayla C, Pesquero J, Bader M, Perretti M & A Ahluwalia (2007) A novel inflammatory

- pathway involved in leukocyte recruitment: role for the Kinin b1 receptor and the chemokine CXCL51. *Journal of Immunology* 179: 4849-4856.
- Duffield JS (2003) The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical Science* 104:27-38.
- Everson GW (1990) Caterpillar envenomations: a prospective study of 112 cases. *Veterinary and Human Toxicology* 32:114-119.
- Falasca L, Grazia Farrace M, Rinaldi A, Tuosto L, Melino G & M Piacentini (2008) Transglutaminase type II is involved in the pathogenesis of endotoxic shock. *Journal of Immunology* 180:2616-2624.
- Fan L, Busser BW, Lifsted TQ, Lo D & TM Laufer (2003) Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100:3386-3391.
- Farioli-Vecchioli S, Nardacci R, Falciatori I & S Stefanini (2001) Catalase immunocytochemistry allows automatic detection of lung type II alveolar cells. *Histochemistry and Cell Biology* 115:333-339.
- Fernández G, Morales E, Beutelspacher C, Villanueva A, Ruiz C & HC Stetler (1992) Epidemic dermatitis due to contact with a moth in Cozumel, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46:560-563.
- Figueiredo RT, Fernández PL, Mourao-Sa DS, Porto BN, Dutra FF, Alves LS, Oliveira MF, Oliveira PL, Graça-Souza AV & MT Bozza (2007) Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* 282:20221-20229.
- Finkelstein Y, Raikhlin-Eisenkraft B & U Taitelman (1988) Systemic manifestations of erucism: A case report. *Veterinary and Human Toxicology* 30:573-574.
- Flannagan RS, Jaumouillé V & S Grinstein (2012) The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology and Mechanisms of Disease* 7:49-86.
- Fornés L & JV Hernández (2001) Reseña histórica e incidencia en la salud pública de *Hylesia metabus* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) en Venezuela. *Entomotropica* 16:137-141.
- Forsyth CB, Solovjov DA, Ugarova TP & EF Plow (2001) Integrin α (M) β (2)-mediated cell migration to fibrinogen and its recognition peptides. *Journal of Experimental Medicine* 193:1123-1133.
- Francis H & CJ Meininger (2010) A review of mast cells and liver disease: what have we learned? *Digestive and Liver Disease* 42:529-536.
- Freyria AM, Paul J, Belleville J, Broyer P & R Eloy (1991) Rat peritoneal macrophages procoagulant and fibrinolytic activities. An expression of the local inflammatory response. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99A:517-524.
- Gómez HR (2011) Efecto in vitro de la toxina de *Hylesia metabus* (Cramer,1775) (Lepidoptera: Saturniidae) sobre macrófagos peritoneales de ratones BALB/c. Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad de Carabobo, Valencia-Venezuela 120 pp.
- Gao J, Qian F, Szymanski-Exner A, Stowe N & J Haaga (2002) In vivo drug distribution dynamics in thermoablated and normal rabbit livers from biodegradable polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 62:308-314.
- Gando S, Kameue T, Matsuda N, Sawamura A, Hayakawa M & H Kato (2004) systemic inflammation and disseminated intravascular coagulation in early stage of ALI and ARDS: role of neutrophil and endothelial activation. *Inflammation* 28:237-244.
- Germolec DR Nyska A, Kashon M, Kuper CF, Portier C, Kommineni C, Johnson KA & MI Luster (2004) Extended histopathology in immunotoxicity testing: interlaboratory validation studies. *Toxicology Science* 78:107-115.
- Glasser CM, Cardoso JL, Bruno GC, Domingos MF, Moraes RH & RM Ciaravolo (1993) Epidemic outbreaks of dermatitis caused by butterflies of the genus *Hylesia* (Lepidoptera: Hemileucidae) in São Paulo State, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 27:217-220.
- Gonçalves LRC, Sousa-e-Silva MCC, Tomy SC & IS Sano-Martins (2007) Efficacy of serum therapy on the treatment of rats experimentally envenomed by bristle extract of the caterpillar *Lonomia obliqua*: comparison with epsilon-aminocaproic acid therapy. *Toxicon* 50:349-356.
- Graça-Souza AV, Arruda MAB, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C & PL Oliveira (2002) Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* 99:4160-4165.
- Groat RA (1949) Initial and persisting staining power of solutions of iron-hematoxylin lake. *Stain Technology* 24:157-163.
- Guo RF, Riedemann NC, Laudes IJ, Sarma VJ, Kunkel RG, Dille KA, Paulauskis JD & PA Ward (2002) Altered neutrophil trafficking during sepsis. *Journal of Immunology* 169:307-314.
- Hammer Ø, Harper DAT & PD Ryan (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:9 pp.
- Hassing RJ & AGC Bauer (2008) Pruritic dermatitis on an oil tanker after a visit to French Guyana. *Travel Medicine* 15:464-465.
- Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, Hasegawa A & T Noguchi (2009) Neutrophil elastase inhibitor (sivelestat) reduces the levels of inflammatory mediators by inhibiting NF- κ B. *Inflammation Research* 58:198-203.
- Henderson RB, Hobbs JAR, Mathies M & N Hogg (2003) Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* 102:328-335.
- Herber DL, Severance EG, Cuevas J, Morgan D & MN Gordon (2004) Biochemical and histochemical evidence of nonspecific binding of α 7nAChR antibodies to mouse brain tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 52:1367-1375.
- Hiemstra PS (2002) Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochemical Society Transactions* 30:116-120.
- Hossler EW (2009) Caterpillars and moths. *Dermatologic Therapy* 22:353-366.
- Hossler EW (2010a) Caterpillars and moths: Part I. Dermatologic manifestations of encounters with Lepidoptera. *Journal of the American Academy of Dermatology* 62:1-10.

- Hossler EW (2010b) Caterpillars and moths: Part II. Dermatologic manifestations of encounters with Lepidoptera. *Journal of the American Academy of Dermatology* 62:13-28.
- Huby RDJ, Dearman RJ & I Kimber (2000) Why are some proteins allergens? *Toxicology Science* 55:235-246.
- Hunter JD & M Doddi (2009) Sepsis and the heart. *British Journal of Anaesthesia* 104:3-11.
- Imamura T, Kaneda H & S Nakamura (2002) New functions of neutrophils in the Arthus reaction: expression of tissue factor, the clotting initiator, and fibrinolysis by elastase. *Laboratory Investigation* 82:1287-1295.
- Imanaka H, Shimaoka M, Matsuura N, Nishimura M, Ohta N & H Kiyono (2001) Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF- β 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anaesthesia Analgesia Journal* 92:428-436.
- Ingram G (1952) The determination of plasma fibrinogen by the clot-weight method. *Biochemical Journal* 51:583-585.
- Jabłoński J, Jabłońska E, Iwanowska J, Marcińczyk M & J Moniuszko-Jakoniuk (2006) the influence of human neutrophils on N-nitrosodimethylamine (NDMA) synthesis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 28:93-102.
- Jay GD, Culp DJ & MR Jhanke (1990) Silver staining of extensively glycosylated proteins on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels: enhancement by carbohydrate-binding dyes. *Analytical Biochemistry* 185:324-330.
- Johansson AC, Visse E, Widegren B, Sjögren HO & P Siesjö (2001) Computerized image analysis as a tool to quantify infiltrating leukocytes: a comparison between high and low-magnification images. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49:1073-1079.
- Jörg M (1969) Subcutaneous inflammatory nodule caused by spicules of *Hylesia fulviventris* (Lepidoptera). *Boletín Chileno de Parasitología* 24:146-150.
- Kang D, Nakayama T, Togashi M, Yamamoto M, Takahashi M, Kunugi S, Ishizaki M & Y Fukuda (2009) Two forms of diffuse alveolar damage in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Human Pathology* 40:1618-1627.
- Kawabata K, Hagio T & S Matsuoka (2002) The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *European Journal of Pharmacology* 451:1-10.
- Kawahara Y, Ninomiya I, Fujimura T, Funaki H, Nakagawara H, Takamura H, Oyama K, Tajima H, Fushida S, Inaba H & M Kayahara (2010) Prospective randomized controlled study on the effects of perioperative administration of a neutrophil elastase inhibitor to patients undergoing video-assisted thoracoscopic surgery for thoracic esophageal cancer. *Diseases of the Esophagus* 23:329-339.
- Kelen EMA, Picarrelli ZF & AC Duarte (1995) Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). *Journal of Toxicology - Toxin Reviews* 14:283-308.
- Kerlin B, Cooley BC, Isermann BH, Hernández I, Sood R, Zogg M, Hendrickson SB, Mosesson MW, Lord S & H Weiler (2004) Cause-effect relation between hyperfibrinogenemia and vascular disease. *Blood* 103:1728-1734.
- Kimber I, Stone S & RJ Dearman (2003) Assessment of the inherent allergenic potential of proteins in mice. *Environmental Health Perspective* 111:227-231.
- Koller B, Bals R, Roos D, Korting HC, Griese M & D Hartl (2009) Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease. *European Journal of Clinical Investigation* 39:535-547.
- Kovalenko EI, Abakushina E, Telford W, Kapoor V, Korchagina E, Khaidukov S, Molotkovskaya I, Sapozhnikov A, Vlaskin P & N Bovin (2007) Clustered carbohydrates as a target for natural killer cells: a model system. *Histochemistry and Cell Biology* 127:313-326.
- Kuwahara I, Lillehoj EP, Lu W, Singh IS, Isohama Y, Miyata T & KC Kim (2006) Neutrophil elastase induces IL-8 gene transcription and protein release through p38/NF- κ B activation via EGFR transactivation in a lung epithelial cell line. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 291:L407-L416.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR & JD Laskin (2011) Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 51:267-288.
- Lee D, Pitetti R & M Casselbrant (1999) Oropharyngeal manifestations of Lepidopterism. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 125:50-52.
- Lefkowitz JH, Haythe JH & N Regent (2002) Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis. *Modern Pathology* 15:699-704.
- Leger M & P Mouzels (1918) Dermatose prurigineuse déterminée par des papillons Sartunides du genre *Hylesia*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 11:104-107.
- Lepidi H, Durack DT & D Raoult (2002) Diagnostic methods, current best practices, and guidelines for histologic evaluation in infective endocarditis. *Infectious Disease Clinics of North America* 16:339-361.
- Lepidi H, Houpiqian P, Liang Z & D Raoult (2003) cardiac valves in patients with Q fever endocarditis: microbiological, molecular, and histologic studies. *Journal Infectious Disease* 187:1097-1106.
- Ley K (2002) Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunology Review* 186:8-18.
- Luciano MN, da Silva PH, Chaim OM, dos Santos VLP, Franco CRC, Soares MFS, Zanata SM, Mangili OC, Gremski W & SS Veiga (2004) Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 52:455-467.
- Lundberg U, Osborn FR, Carvajal Z, Gil A, Guerrero B & CL Arocha-Piñango (2002) Isolation and partial characterization of a protease with kallikrein-like activity from the egg-nests of *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae), preliminary communication. *Revista Científica (FCV-LUZ)* 12:97-102.
- Lundberg U, Salazar V, Tovar M & J Rodríguez (2007) Isolation and partial characterization of proteins with vasodegen-

- erative and proinflammatory properties from the egg-nests of *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Medical Entomology* 44:440-449.
- Magliozzi R, Nardacci R, Scarsella G, Di Carlo V & S Stefanini (2003) Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochemistry and Cell Biology* 120:41-49.
- Maniatis NA & SE Orfanosa (2008) The endothelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Current Opinion in Critical Care* 14:22-30.
- Manly DA, Boles J & N Mackman (2011) Role of Tissue Factor in Venous Thrombosis. *Annual Review of Physiology* 73:515-525.
- Manoonkitiwongsa PS, McMillan PJ, Schultz RL, Jackson-Friedman C & PD Lydena (2001) A simple stereologic method for analysis of cerebral cortical microvessels using image analysis. *Brain Research Protocols* 8:45-57.
- Matthay MA & RL Zemans (2011) The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6:147-163.
- Mayer-Scholl A, Averhoff P & A Zychlinsky (2004) How do neutrophils and pathogens interact?. *Current Opinion in Microbiology* 7:62-66.
- McGhan LJ & DE Jaroszewski (2012) The role of toll-like receptor-4 in the development of multi-organ failure following traumatic haemorrhagic shock and resuscitation. *Injury* 43:129-136.
- McNamara G (2005) Color balancing histology images for presentations and publication. *Journal of Histotechnology* 28:81-88.
- Melski JW (1990) Well's syndrome, insect bites, and eosinophils. *Dermatologic Clinics* 8:287-293.
- Menezes H & C Jared (2002) Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 132:1-7.
- Mochizuki M, Ishii Y, Itoh K, Iizuka T, Morishima Y, Kimura T, Kiwamoto T, Matsuno Y, Hegab AE, Nomura A, Sakamoto T, Uchida K, Yamamoto M & K Sekizawa (2005) Role of 15-Deoxy $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂ and Nrf2 pathways in protection against acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171:1260-1266.
- Moser M & O Leo (2010) Key concepts in immunology. *Vaccine* 28S:C2-C13.
- Mori H, Nagahiro I, Osaragi T, Kotani K, Nakanishi H, Sano Y, Date H & N Shimizu (2007) Addition of a neutrophil elastase inhibitor to the organ flushing solution. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 32:791-795.
- Mulvaney JK, Gatenby PA & JG Brookes (1998) Lepidopterism: two cases of systemic reactions to the cocoon of a common moth, *Chelepteryx collesi*. *Medical Journal of Australia* 168:610-611.
- Mushegian A & R Medzhitov (2001) Evolutionary perspective on innate immune recognition. *Journal of Cell Biology* 155:705-710.
- Nakamichi I, Hatakeyama S & KI Nakayama (2002) Formation of Mallory body-like inclusions and cell death induced by deregulated expression of keratin 18. *Molecular Biology of the Cell* 13:3441-3451.
- Ochs M (2006) Stereological analysis of acute lung injury. *European Respiratory Review* 15:115-121.
- Osborn F (2005) La palometa peluda (*Hylesia metabus*) como problema. Creación del Grupo Multidisciplinario Interinstitucional para su Estudio y Control. XXIX Jornadas Venezolanas de Microbiología «Dr. Vidal Rodríguez Lemoine» Cumaná del 9 al 11 de noviembre de 2005. <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeVeinticinco/JornadaMicrobiologia/ArchivosHTML/S24.pdf> (archivo consultado y descargado el 15 de marzo de 2009).
- Ozkan O, Adigüzel S, Ates C, Bozyigit I & A Filazi (2006) Optimization of antiscorpion venom production. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 12:390-399.
- Paneque Peres AC, Nonaka PN, Camillo de Carvalho PT, Toyama MH, Melo e Silva CA, de Paula Vieira R, Dohlhoff M, Zamuner SR & LV Franco de Oliveira (2009) Effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on lung mechanics and inflammation in mice. *Toxicon* 53:779-785.
- Paniz-Mondolfi AE, Pérez-Alvarez AM, Lundberg U, Fornés L, Reyes-Jaimes O, Hernández-Pérez M & E Hossler (2011) Cutaneous lepidopterism: dermatitis from contact with moths of *Hylesia metabus* (Cramer 1775) (Lepidoptera: Saturniidae), the causative agent of Caripito itch. *International Journal of Dermatology* 50:535-541.
- Pastor CM, Rubbia-Brandt L, Hadengue A, Jordan M, Morel P & JL Frossard (2003) Role of macrophage inflammatory Peptide-2 in cerulein-induced acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Laboratory Investigation* 83:471-478.
- Pearse AGE (1972) *Histochemistry Theoretical and Applied*. Vol 1 (tercera edición). Little Brown & Co. Boston. 759 pp.
- Pompeia C, Freitas JJS, Kim JS, Zyngier SB & R Curi (2002) Arachidonic acid cytotoxicity in leukocytes: implications of oxidative stress and eicosanoid synthesis. *Biology of the Cell* 94:251-265.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG & VL Gabaib (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research* 283:1-16.
- Ramaiah SK & H Jaeschke (2007a) Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicologic Pathology* 35:757-766.
- Ramaiah SK & H Jaeschke (2007b) Hepatic neutrophil infiltration in the pathogenesis of alcohol-induced liver injury. *Toxicology Mechanisms and Methods* 17:431-440.
- Ramos AT, Gonçalves LRC, Ribeiro OG, Rocha Campos AC & OA Sant'Anna (2004) Effects of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. *Toxicon* 43:761-768.
- Ramos-Rodríguez HG & JD Méndez (2008) Necrotic araneism. A review of the *Loxosceles* genus. I. General as-

- pects, distribution and venom composition. *Advances in Environmental Biology* 2:9-19.
- Regitnig P, van Paasen R & O Tsybrovskyy (2003) How to improve microscopic images obtained with consumer-type digital cameras. *Histopathology* 42:503-508.
- Reinhardt AK, Bottoms SE, Laurent GJ & RJ McAnulty (2005) Quantification of collagen and proteoglycan deposition in a murine model of airway remodeling. *Respiratory Research* 6:1-13.
- Remick DG (2007) Pathophysiology of sepsis. *American Journal of Pathology* 170:1435-1444.
- Rendić D, Wilson IBH & K Paschinger (2008) The glycosylation capacity of insect. *Croatica Chemica Acta* 81:7-21.
- Rock KL & H Kono (2008) The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology. Mechanisms of Disease* 3:99-126.
- Rodríguez J, Hernández JV, Fornés L, Lundberg U, Arocha-Piñango C & F Osborn (2004) External morphology of abdominal setae from male and female *Hylesia metabus* adults (Lepidoptera: Saturniidae) and their function. *Florida Entomologist* 87: 30-36.
- Rodríguez-Acosta A, Rubiano H, Reyes M & CT Fernández (1998) Dermatitis causada por *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Hemileucidae) en la región costera del estado del Delta del Amacuro, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 50:215-217.
- Rodríguez-Morales AJ, Arria M, Rojas-Mirabal J, Borges E, Benítez JA, Herrera M, Villalobos C, Maldonado A, Rubio N & C Franco-Paredes (2005) Lepidopterism due to exposure to the moth *Hylesia metabus* in northeastern Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 73:991-993.
- Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J & KL Brigham (2005) Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 288:L333-L341.
- Rossner M (2002) Figure manipulation: assessing what is acceptable. *Journal of Cell Biology* 158:1151.
- Rossner M & KM Yamada (2004) What's in a picture? The temptation of image manipulation. *Journal of Cell Biology* 166:11-15.
- Rudiger A & M Singer (2007) Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Critical Care Medicine* 35:1599-1608.
- Ruëff F, Wolf H, Schnitker J, Ring J & B Przybilla (2004) Specific immunotherapy in honeybee venom allergy: a comparative study using aqueous and aluminium hydroxide adsorbed preparations. *Allergy* 59:589-595.
- Santinelli A, Mazzucchelli R, Colanzi P, Tinca A & R Montironi (2002) Image processing, diagnostic information extraction and quantitative assessment in pathology. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 6:93-106.
- Schmittinger CA, Wurzinger B, Deutinger M, Wohlmuth C, Knotzer H, Torgersen C, Dünser MW & WR Hasibeder (2010) How to protect the heart in septic shock: A hypothesis on the pathophysiology and treatment of septic heart failure. *Medical Hypotheses* 74:460-465.
- Seibert CS, Oliveira MRL, Gonçalves LRC, Santero ML & IS Sano-Martins (2004) Intravascular hemolysis induced by *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract: An experimental model of envenomation in rats. *Toxicon* 44:793-799.
- Seligmann S, Bock A, Leitsch T, Schimmer M, Simsek Y & HP Schultheiss (2001) Polymorphonuclear granulocytes induce myocardial dysfunction during ischemia and in later reperfusion of hearts exposed to low-flow ischemia. *Journal of Leukocyte Biology* 69:727-731.
- Si-Tahar M, Sitaraman S, Shibahara T & JL Madara (2001) Negative regulation of epithelium-neutrophil interactions via activation of CD44. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 280:C423-C432.
- Silveira KSO, Boechem NT, do Nascimento SM, Murakami YLB, Barboza APB, Melo PA, Castro P, de Moraes VLG, Rocco PRM & WA Zin (2004) Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by *Bothrops jararaca* venom. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 139:167-177.
- Silverman AJ, Sutherland AK, Wilhelm M & R Silver (2000) Mast cells migrate from blood to brain. *Journal of Neuroscience* 20:401-408.
- Specht A, Formentini AC & E Corseuil (2007) Biological aspects of *Hylesia metapyrrha* (Lepidoptera; Saturniidae; Hemileucinae) in laboratory. *Brazilian Journal of Biology* 67:173-177.
- Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S & DG Remick (2011) The pathogenesis of sepsis. *Annual Review of Pathology. Mechanisms of Disease* 6:19-48.
- Steiniger B, Barth P & A Hellinger (2001) The perifollicular and marginal zones of the Human splenic white pulp. *American Journal of Pathology* 159:501-512.
- Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA & PJM Leenen (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *Journal of Immunology* 172:4410-4417.
- Suttie AW (2006) Histopathology of the spleen. *Toxicologic Pathology* 34:466-503.
- Swedlow JR & WE Kevin (2009) Open source bioimage informatics for cell biology. *Trends in Cell Biology* 19:656-660.
- Taatjes DJ & J Roth (2005) Recent progress in histochemistry and cell biology: the state of the art. *Histochemistry and Cell Biology* 124:547-574.
- Tambourgi DV, Paixão-Cavalcante D, Gonçalves de Andrade RM, Fernandes-Pedrosa MF, Magnoli FC & BP Morgan BP (2005) *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. *Journal of Investigative Dermatology* 124:725-731.
- Tamion F, Bauer F, Richard V, Laude K, Renet S, Slama M & C Thuillez (2010) Myocardial dysfunction in early state of endotoxemia role of heme-oxygenase-1. *Journal of Surgical Research* 158:94-103.
- Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martínez-Pomares L, Gordon S & SYC Wong (2002) The β -glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the sur-

- face of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *Journal of Immunology* 169:3876-3882.
- Taysse L, Daulon S, Calvet JH, Delamanche S, Hilaire D, Bellier B & P Breton (2005) Induction of acute lung injury after intranasal administration of toxin botulinum a complex. *Toxicologic Pathology* 33:336-342.
- Tiniakos DG, Vos MV & EM Brunt (2010) Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5:145-171.
- Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Kawarabayashi N, Takayama E, Kinoshita M, Seki S, Hiraide H, Moldawer LL & H Mochizuki (2005) Neutrophil elastase, Mip-2, and Tlr-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* 23:39-44.
- Uchida Y, Freitas MCS, Zhao D, Busuttill RW & JW Kupiec-Weglinski (2009) The inhibition of neutrophil elastase ameliorates mouse liver damage due to ischemia and reperfusion. *Liver Transplant* 15:939-947.
- Van der Laan N, de Leij LFMH & HJ ten Duis (2001) Immunohistopathological appearance of three different types of injury in human skin. *Inflammation Research* 50:350-356.
- Verveer PJ & PIH Bastiaens (2008) Quantitative microscopy and systems biology: seeing the whole picture. *Histochemistry and Cell Biology* 130:833-843.
- Vijayan V, Mueller S, Baumgart-Vogt E & S Immenschuh (2010) Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World Journal of Gastroenterology* 16:3112-3119.
- Von Vietinghoff S & K Ley (2008) Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *Journal of Immunology* 181:5183-5188.
- Voronov E, Apte RN & S Sofer (1999) The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 5:5-33.
- Wagener FA, Volk HD, Willis D, Abraham NG, Soares MP, Adema GJ & CG Figdor (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacological Reviews* 55:551-571.
- Wang H, Ding R, Ruan J, Yuan B, Sun X, Zhang X, Yu S & W Qu (2001) Perfluoroisobutylene-induced acute lung injury and mortality are heralded by neutrophil sequestration and accumulation. *Journal of Occupational Health Psychology* 43:331-338.
- Whitlock BB, Gardai S, Fadok V, Bratton D & PM Henson (2000) Differential roles for α (M) β (2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms. *Journal of Cell Biology* 151:1305-1320.
- Wijayanti N, Katz N & S Immenschuh (2004) Biology of heme in health and disease. *Current Medicinal Chemistry* 11:981-986.
- Wirtz RA (1984) Allergic and toxic reactions to non-stinging arthropods. *Annual Review of Entomology* 29:47-69.
- Zaias N, Ioannides G & D Taplin (1969) Dermatitis from contact with moths (Genus *Hylesia*). *The Journal of the American Medical Association* 207:525-527.
- Zhang J, Wang H, Xiao Q, Liang H, Li Z, Jiang C, Wu H & Q Zheng (2009) Hyaluronic acid fragments evoke kupffer cells via TLR4 signaling pathway. *Science in China - Series C: Life Sciences* 52:147-154.
- Zhou Z, Kozlowski J & DP Schuster (2005) Physiologic, biochemical, and imaging characterization of acute lung injury in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172:344-351.
- Ziprkowski L & F Rolant (1972) Study of the toxin from the poison hairs of *Thaumtopoea wilkinsoni* caterpillars. *Journal of Investigative Dermatology* 58:274-277.

SECCIÓN III
Los enemigos naturales

Ediciones IVIC

Daños ultraestructurales en larvas de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) causados por un patógeno bacteriano

María Tovar* y Frances Osborn

Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

*mtovarsanchez@yahoo.com

Resumen

Existen diferentes patógenos que atacan a los insectos, entre ellos los virus, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos. Se investigó la presencia de microorganismos patógenos en el intestino medio de larvas de *Hylesia metabus*, mediante microscopía electrónica de transmisión. Larvas a las que se les suministró una solución de larvas muertas de *H. metabus* licuadas, mostraron daños ultraestructurales, incluyendo vesiculación de la membrana apical, disminución de los microvellos, hinchamiento de algunos organelos y vacuolización intra y extracelular. Aunque la solución suministrada pudo haber contenido diversos patógenos, los daños observados son característicos de una infección bacteriana.

Abstract

Ultrastructural Damages in *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) Larvae are Caused by a Bacterial Pathogen

Several pathogen groups attack insects including virus, bacteria, protozoa, fungi and nematodes. We investigated the presence of pathogenic microorganisms in the midguts of *Hylesia metabus* larva, using transmission electronic microscopy. Larvae fed with a solution of liquefied dead *H. metabus* larvae showed ultrastructural damages, including blebbing of the apical membrane, a reduction in the number of microvilli, swelling of some organelles, and intra and extracellular vacuolization. Although the solution given to the larvae may have contained several pathogens, the damages observed are characteristic of a bacterial infection.

Palabras clave Key words

Infección bacteriana, larvas, ultraestructura.
Larvae, bacterial infection, ultrastructure.

PRESENTACIÓN

Existen diferentes tipos de organismos patógenos que atacan a los insectos, entre ellos los virus, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos. Los primeros en detectar patologías en los insectos fueron los griegos: Aristóteles (384-322 A.C.) observó que las abejas presentaron anomalías o enfermedades que él describió como «óxidos» (Steinhaus 1956), y los chinos quienes hacían reportes de enfermedades en el gusano de la seda en el siglo 7 A.C. (Wang 1965). Sin embargo, no fue sino hasta 1835 cuando Agostino Bassi, identificó el primer patógeno, un hongo, que luego fue nombrado *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, agente causal de una enfermedad infecciosa en el gusano de la seda (Steinhaus 1956; 1975).

A partir de mediados del siglo XIX se sabía que los microorganismos patógenos eran los que causaban las enfermedades en los insectos. A finales del siglo XIX y principios del siglo XX hubo un creciente interés en los hongos como agentes de control de los insectos plaga. No obstante, los intentos fallaron o no fueron aplicados fuera del ámbito de los trabajos de investigación (Tanada & Kaya 1993).

En 1901, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner, 1911 fue aislado del gusano de la seda, *Bombyx mori* L. 1758, (Ishiwata 1901). Luego de muchos años de investigaciones, *Bt* y formulaciones comerciales basadas en los diferentes serotipos de *Bt*, han llegado a ser muy exitosas y hoy en día son los controladores biológicos más utilizados contra los insectos plaga. Sin embargo, representantes de todos los grupos de patógenos; bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoa (mayormente los microsporidios) son actualmente utilizados de manera exitosa contra una amplia gama de insectos plaga de cultivos y de la salud pública (Tanada & Kaya 1993).

Los diferentes patógenos producen diversos signos y síntomas en los insectos afectados, entre ellos, cambios en el color del insecto, visualización directa del patógeno, comportamiento aberrante del insecto, cambios en la forma y textura del cadáver y el olor del mismo, los cuales ayudan al investigador a distinguir entre los patógenos y permiten realizar un diagnóstico preliminar de la posible causa de una infección (Tabla 1).

Otras técnicas, entre ellas la microscopía electrónica, también pueden ayudar a elucidar cuáles son el o los patógenos responsables de una enfermedad.

La microscopía electrónica de transmisión permite visualizar las estructuras internas de las células de un organismo y detectar los cambios que son consecuencia de una infección por un entomopatógeno.

Las poblaciones de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) son controladas actualmente con una cepa comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*); sin embargo, el valor del insecticida biológico y el alto costo de las aplicaciones han promovido la búsqueda de controles alternativos. Una fuente potencial son los controladores naturales, entre ellos los parásitos y patógenos de la zona donde habita *H. metabus*. Los patógenos autóctonos tienen la ventaja que perturban menos al ambiente que los controladores introducidos y tienen menos impacto sobre otros organismos.

En experimentos preliminares de campo realizados por Vásquez (1990) se encontró que uno o más patógenos causaron una mortalidad de 80 % en larvas de cuarto y quinto instar de *H. metabus*. Las larvas enfermas presentaban sintomatologías que sugerían la presencia de una infección bacteriana o viral; se tornaron flácidas, aletargadas, dejaban de alimentarse y finalmente morían. En este trabajo se investiga la presencia de patógenos en los intestinos de larvas enfermas de *H. metabus* mediante microscopía electrónica de transmisión, para verificar cuál o cuáles podrían ser los responsables de la mortalidad en las larvas.

Tabla 1. Síntomas más típicos de los grupos de agentes entomopatógenos de mayor importancia (Lacey & Brooks 1997).

Grupo	Síntoma
Virus	Enfermedad aguda. Produce cambios en la coloración del insecto infectado y a veces vómito o diarrea. Al morir, el integumento se torna flácido y frágil.
Nemátodos	Enfermedad aguda. Produce cambios en la coloración. Se puede visualizar los nemátodos a través de la cutícula.
Hongos	Enfermedad aguda. Se puede observar la presencia del micelio y esporas sobre el integumento del insecto. Al morir se momifica.
Bacteria	Enfermedad aguda. Produce cambios en la coloración del integumento y pérdida del apetito. Al morir el insecto se torna flácido inicialmente para luego secarse y contraerse.
Microsporidios	Enfermedad crónica. Causa un crecimiento irregular, letargo, pérdida del apetito y la malformación de pupas y adultos, éstos últimos con la fecundidad y longevidad reducidas.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Aproximadamente 50 larvas sanas del quinto instar de *H. metabus* se recolectaron de los manglares cerca del poblado de Yaguaraparo, distrito Cajigal, estado Sucre, Venezuela y se trasladaron al Instituto de Investigaciones de Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA), Universidad de Oriente, donde se mantuvieron en recipientes plásticos a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de 60-70 %. Las larvas enfermas o muertas posiblemente por patógenos también se recolectaron y se mantuvieron separadas de las larvas sanas.

Las larvas enfermas y las muertas fueron licuadas y con ellas se preparó una solución con agua destilada estéril a una concentración de 1:10. Esta fue suministrada a 10 de las larvas sanas abriendo para ello su aparato bucal y suministrando, con la ayuda de una microjeringa, 3 μl de la misma. Las larvas se dejaron durante seis horas en recipientes plásticos con hojas frescas de su planta hospedera, *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo). Como controles se utilizaron 10 larvas que fueron tratadas de la misma manera, pero solamente con agua estéril.

Transcurridas las seis horas, se prepararon los intestinos de las larvas infectadas y los respectivos

controles para examinarlos mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, se extrajeron los intestinos medios, se cortaron en trozos de 1mm^3 y se sumergieron inmediatamente en prefijador fresco (glutraldehído al 25 % y paraformaldehído al 1 %) en una solución búfer fosfato (PBS), pH 7,2 y 260 mOsm/l. Después de tres lavados con PBS pH 7,2, se posfijaron los intestinos en una solución de tetróxido de osmio (OsO_4) al 1 % en una PBS durante 90 minutos, luego los tejidos se lavaron en búfer fosfato tres veces, y se deshidrataron en una serie creciente de etanol (Stobbart & Shaw 1964; Crossley & Waterhouse 1969; Lu & Chow 1991). Las muestras, después de la deshidratación fueron infiltradas con óxido de propileno, e incluidas en la resina epóxica Polybed 812®, para luego ser incubadas a 60°C por 48 horas. Se realizaron cortes ultrafinos, de 60-70 nm, con un ultramicrotomo Reichart-Jung, y se tiñeron con acetato de uranilo al 6 % por cinco minutos y citrato de plomo por tres minutos. Las observaciones y fotografías se hicieron en un microscopio electrónico de transmisión marca Hitachi, modelo H-600 (Tovar 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

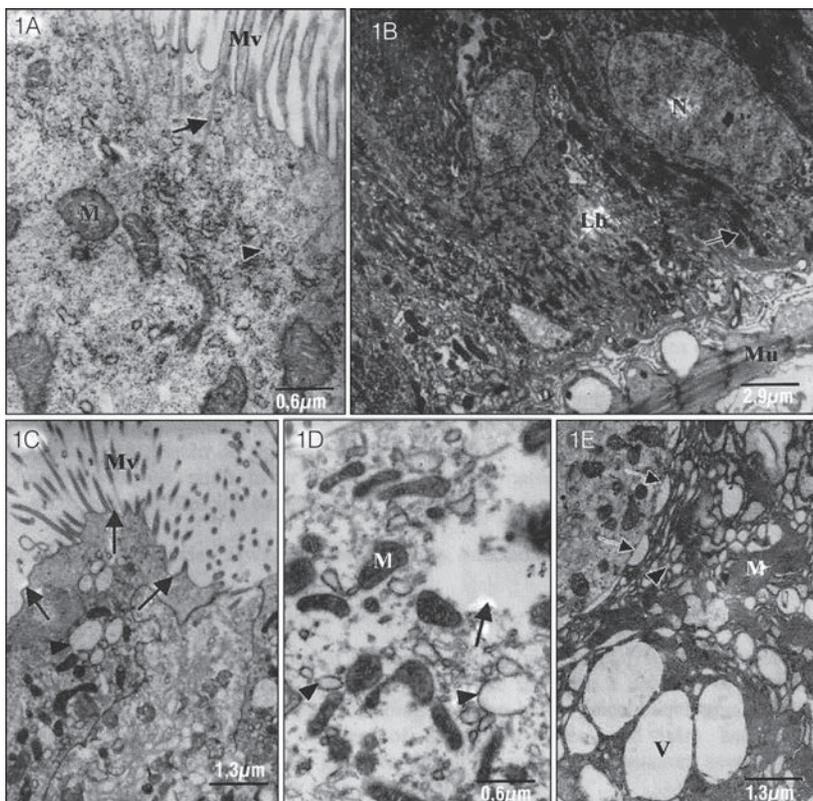
Las micrografías de la ultraestructura del intestino medio de las larvas sanas muestran un tejido compacto típico de células del intestino, con numerosos microvellos en la zona apical, mitocondrias y retículo endoplasmático rugoso (Figura 1A). La zona basal del intestino se encuentra muy plegada, con mitocondrias repartidas entre los pliegues formando el laberinto basal. Debajo de la membrana basal está el tejido muscular, los nervios y traqueolas (Figura 1B).

En las larvas infectadas, las células se elevaron e hincharon (vesiculación) en la zona apical y hubo una disminución notable de los microvellos además de la desaparición de los microfibrillas (Figura 1C). Los organelos se hincharon, especialmente las mitocondrias y el retículo endoplasmático rugoso (Figuras 1C y D) y hubo un esclarecimiento del citoplasma y una desintegración del tejido en general (Figura 1D). En el laberinto basal aparecieron numerosas vacuolas y una separación de los pliegues y de las membra-

nas entre las células (Figura 1E). No se observó la presencia de cuerpos virales en ninguna de las larvas examinadas.

Los fenómenos de las alteraciones del epitelio, como lo son el hinchamiento y vesiculación de las células en la zona apical, evidencian en las larvas infectadas las características de una patología bacteriana (Ebersold *et al.* 1977; Charles & de Barjac 1983). Este tipo de infección ha sido reportado en varias especies de insectos contagiados con *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), como por ejemplo: *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera) (Percy & Fast 1983), *Corcyra cephalonica* (Stainton, 1866) (Lepidoptera) (Chiang *et al.* 1986), *Bovicola ovis* Schrank (1781), (Anoplura) (Hill & Pinnock 1998), *Chironomus thummi thummi* Kieffer (1911) y *Psectrocladius psilopterus* (Kieffer, 1906) (Diptera) (Yiallourous *et al.* 1999), entre otros. La desaparición de las microfibrillas fue reportado en *B. mori* infectada con *Bt* (Percy & Fast 1983).

El hinchamiento del retículo endoplasmático rugoso también es consistente con observaciones en larvas de



Figuras 1A y B. Intestino medio de larvas sanas de *Hylesia metabus*. Figura 1A. Zona apical. M: mitocondria, Mv: microvellos, flecha: microfibrillas, (▲): retículo endoplasmático rugoso. Figura 1B. Zona basal Mu: músculo, Lb: laberinto basal, N: núcleo, flecha: mitocondria. Figuras 1C-E. Intestino medio de larvas infectadas. Figura 1C. Zona apical. Mv: microvellos, note la vesiculación de la membrana apical (flecha), la desaparición de las microfibrillas y el hinchamiento del retículo endoplasmático rugoso (▲). Figura 1D. Detalle de los daños intracelulares. Note el esclarecimiento del citoplasma, la aparición de espacios (flecha) y el hinchamiento del retículo endoplasmático rugoso (▲). Figura 1E. Zona basal. Note la separación de los pliegues (▲) y de las membranas celulares (flecha). M: mitocondria, V: vacuola.

mosquitos y lepidópteros infectadas con *Bt* y es aparentemente causado por un ingreso de agua a la célula y a sus organelos (Ebersold *et al.* 1977; Charles & de Barjac 1983; Bauer & Pankratz 1992). Por otro lado, el rompimiento de la membrana nuclear es otro síntoma de necrosis de la célula (Percy & Fast 1983). La vacuolización y rompi-

miento de las membranas celulares en el laberinto basal han sido reportados para *C. thummi thummi* y *P. psilopterus* infectadas con *B. thuringiensis* var. *san diego*, en las que se observó la unión de vacuolas basales para formar grandes vacuolizaciones del citoplasma (Bauer & Pankratz 1992).

Percy & Fast (1983) señalan que los cambios ultraestructurales en los intestinos de insectos tratados con *Bt* son indicadores de daños celulares generalizados y necrosis y no son atribuibles a una acción específica de la toxina de *Bt*. Los daños producidos por el agente patógeno en los intestinos de *H. metabus* también son respuestas generalizadas. La carencia de cuerpos virales en las muestras indica que los daños ultraestructurales observados fueron probablemente producidos por una o más bacterias patógenas.

Osborn *et al.* (2002) aislaron e identificaron 29 cepas de bacterias de larvas de *H. metabus* sanas y larvas infectadas con el mismo homogenato de larvas muertas que se utilizó para infectar las larvas en este trabajo. Entre estas cepas se identificaron: *Providencia rettgeri* (Hadley 1918), *Alcaligenes faecalis* Castellani & Chalmers 1919 y *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. De éstas, solamente *P. aeruginosa* fue patógena, causando una mortalidad de entre 60 y 93,3 % en larvas del quinto estadio de *H. metabus* (Osborn 2002). Sin embargo, debido a que *P. aeruginosa* es un patógeno facultativo de humanos inmunocomprometidos, no se pudo recomendar su uso en un programa de control biológico de *H. metabus*.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Aunque la solución de larvas muertas pudo haber contenido diversos patógenos, entre ellos, hongos, virus y microsporidios, los daños ultraestructurales observados en los intestinos de las larvas tratadas son características de una infección bacteriana. En tal sentido, se recomienda seguir realizando estudios microbiológicos con el objetivo de identificar

bacterias gram positivas que pudieron ser las responsables de la sintomatología observada.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de Fundacite-Sucre y del Programa *Hylesia metabus*, Dirección General de Salud Ambiental

y Contraloría Sanitaria, Región IV, Maturín, Monagas por su invaluable apoyo en la recolección de las larvas. Este estudio fue financiado en parte por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Proyecto No. CI-5-1901-0820198 y por Conicit a través del FIR (Fondo de Investigación Regional).

BIBLIOGRAFÍA

- Bauer L & S Pankratz (1992) Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. san diego on midgut cells of the Cottonwood leaf beetles. *Journal of Invertebrate Pathology* 60:15-25.
- Crossley A & D Waterhouse (1969) The ultrastructure of the osmeterium and the nature of its secretion in *Papilio* larvae (Lepidoptera). *Tissue and Cell* 1:525-554.
- Chiang A, Yen D & W Peng (1986) Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 47:333-339.
- Charles J & H de Barjac (1983) Actino des cristeux de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L. en microscopie électronique. *Annals of Microbiology* 134A:197-218.
- Ebersold H, Lüthy P & M Mueller (1977) Changes in the fine structure of the gut epithelium of *Pieris brassicae* induced by the δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Bulletin de la Société Entomologique Suisse* 50:269-276.
- Hill C & D Pinnock (1998) Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the alimentary canal of the sheep louse *Bovicola ovis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 72:9-29.
- Ishiwata S (1901) On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* 1:114:1-5.
- Lacey L & WM Brooks (1997) Initial handling and diagnosis of diseased insects. Chapter I. En: Lacey LA, ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego, California, Academic Press. 1-15 pp.
- Lu C & Y Chow (1991) Fine structure of the larval osmeterium of *Papilio demoleus libanius* (Lepidoptera: Papilionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 84:294-302.
- Osborn F (2002) Primer reporte de un microsporidio parasítico en larvas de *Hylesia metabus* Cramer, 1775 (Lepidoptera: Saturniidae). *Entomotopica* 17:185-188.
- Percy J & P Fast (1983) *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *Journal of Invertebrate Pathology* 41:86-98.
- Steinhaus E (1956) Microbial control – the emergence of an idea. *Hilgardia* 26:107-160.
- Steinhaus E (1975) *Disease in a minor chord*. Ohio State University Press. Columbus, Ohio. 488 pp.
- Stobbar R & J Shaw (1964) Salt and water balance: excretion. En: *The Physiology of Insects*. Rockstein E (Ed). Academic Press. New York, London. 189-235 pp.
- Tanada Y & H Kaya (1993) *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, Londres, New York. 666 pp.
- Tovar M (2001) Estudio por microscopía electrónica de los efectos causados en el mesenteron de las larvas de *Hylesia metabus* Cramer, 1775 (Lepidoptera: Saturniidae) por la ingesta de *Bacillus* sp. Tesis. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 41 pp.
- Vásquez L (1990) Estudio bioecológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer en el oriente de Venezuela. *Saber* 3:14-20.
- Yiallourous M, Storch V & N Becker (1999) Impact of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on larvae of *Chironomus thummi thummi* and *Psectrocladius psilopterus* (Diptera: Chironomidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 74:39-47.
- Wang Z (1965) Knowledge on the control of the silkworm disease in ancient China. *Symposia of Scientific History (China)* 8:15-21.

Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) en el nororiente de Venezuela

Roxana Gajardo^{*1}, Juana Vitelli², Vidal Rodríguez-Lemoine² y Blas Dorta¹

¹Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental (IBE), Laboratorio de Procesos Fermentativos, Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas, Venezuela.

²Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental (IBE), Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCVM), Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas, Venezuela.

*roxana.gajardo@ciens.ucv.ve

Resumen

Como un aporte a la salud pública de la región nororiental de Venezuela, y en la búsqueda de agentes para el control biológico de *Hylesia metabus*, en el presente trabajo se planteó aislar selectivamente cepas de *Bacillus thuringiensis* que puedan ser usadas como potenciales biocontroladores de esta polilla en su fase larval. En este sentido, la metodología empleada favorece la selección efectiva de *B. thuringiensis* a partir de larvas muertas de *H. metabus* y de muestras de suelo. Se han obtenido 14 aislados autóctonos de *B. thuringiensis* y con ellos se ha creado un banco de cepas, que ha sido depositado en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCVM). Estos 14 aislados fueron caracterizados genéticamente, a través de PCR para determinar la presencia del gen *cry1*, cuyo rango de acción patogénica está dirigido a los lepidópteros. De ellos, sólo dos presentaron el gen *cry1* (CVCVM1813 y CVCVM1814). Asimismo, los patrones peptídicos de los 14 aislados fueron caracterizados por SDS-PAGE. La cepa CVCVM1812 fue la única que presentó una banda de 130 kDa, la cual coincide con la proteína perteneciente al grupo de proteínas Cry1 con actividad biocida contra lepidópteros.

Abstract

Isolation and Characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 Strains from Northeastern Venezuela

As a contribution to public health in the Northeastern region of Venezuela, we selectively isolated *Bacillus thuringiensis* strains that could be used as potential biocontrollers of *Hylesia metabus* larvae. The methodology used favours the selective selection of *B. thuringiensis* from dead *H. metabus* larvae and soil samples. A total of 14 autochthonous *B. thuringiensis* were isolated, with which a strain bank was created and deposited at the Centre for the Collection of Microorganisms in Venezuela (CVCVM). The 14 isolates were genetically characterized by PCR for the presence of the *cry1* gene, which is pathogenic for Lepidoptera. Of these, only two of the

Palabras clave

Bacillus thuringiensis, genes *cry*, patrón de proteínas, control biológico, identificación molecular

Key words

Bacillus thuringiensis, *cry* genes, protein profile, biological control, molecular identification.

stains showed the *cry1* gene (CVCM1813 y CVCM1814). The 14 isolates were also subjected to SDS-PAGE analyses to determine their peptide patterns. The only strain to show the 130 kDa band, which coincides with the protein belonging to the group of Cry1 proteins with insecticidal activity against Lepidoptera was CVCM1812.

PRESENTACIÓN

Las bacterias patógenas de insectos que se han reportado pertenecen a las familias Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae y Micrococcaceae (Tanada & Kaya, 1993). Más de 90 especies de bacterias se han aislado de insectos, plantas y suelo, pero sólo unas pocas se han estudiado intensivamente (Nicholls 2008). Los daños producidos sobre el insecto blanco se conocen generalmente como bacteriosis, del tipo bacteriemia (septicemia causada por la presencia de bacterias en la hemolinfa) o toxemia (condición provocada por toxinas bacterianas). Tomando en cuenta estas propiedades patógenas se han desarrollado los insecticidas microbianos. El primer bioinsecticida comercial que se formuló en EE. UU., en 1948, con base en *Bacillus popilliae* Dutky 1940, fue rápidamente eclipsado por la comercialización de otros productos que contenía *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 (*Bt*), a partir de 1961 (Siegel 2000). Hoy en día, la mayoría de los insecticidas microbianos utilizan como ingrediente activo a bacterias formadoras de esporas o a las toxinas bacteriales producidas por éstas. Con la excepción de *Serratia entomophila* Grimont *et al.* 1988, utilizada para controlar *Costelytra zealandica* White 1846, una plaga de los pastos en Nueva Zelanda, la mayoría de las bacterias que se usan y que están en desarrollo para ser empleadas como agentes de control microbiano pertenecen a la familia Bacillaceae, del género *Bacillus*, entre las que destacan *B. larvae* White 1906, *B. sphaericus* Neide 1904, *B. popilliae* y, principalmente, *Bt* (Siegel 2000).

B. thuringiensis es una bacteria esporogénica, Gram positiva y aerobia, perteneciente al grupo *Bacillus cereus*, que incluye a siete especies cercanamente relacionadas, a saber: *B. anthracis* Cohn 1872, *B. cereus* Chester 1898, *B. mycoides* Gersbach 1922, *B. pseudomycoides* Nakamura 1998, *B. weihenstephanensis* Lechner *et al.* 1998 y *B. medusa* Delaporte 1969, las cuales son identificadas y discriminadas con base en el análisis de características mor-

fológicas, bioquímicas e inmunológicas (Bavykin *et al.* 2004). Sin embargo, la distinción entre estas especies es muy difícil y existen informes contradictorios en cuanto a la posibilidad de distinguir *Bt* de *B. cereus*. *Bt* se diferencia de *B. cereus* por formar inclusiones proteicas cristalinas, de tamaño similar al de la espora durante la fase de esporulación (Henderson *et al.* 1995), que le confieren la actividad insecticida. Otra diferencia entre estas dos especies de *Bacillus* radica en la patogenicidad de las mismas, siendo *B. cereus* patógena de humanos al producir envenenamiento por su presencia en alimentos, mientras que *Bt* presenta patogenicidad sobre los estadios larvales de algunos insectos pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera, y por ello es la bacteria más usada dentro de las alternativas de control biológico, debido a que no afecta a mamíferos, aves o plantas (Burgess 1982).

Esta bacteria entomopatógena ha sido aislada, como ya se mencionó, a partir de muestras de agua y suelo, y también se ha podido aislar de productos almacenados, insectos muertos y hojas (Hansen *et al.* 1998; Kaelin & Gadani 2000; Porcar & Caballero 2000). Este aislamiento es posible siempre que se cuente con un medio selectivo apropiado (Travers *et al.* 1987).

Existen más de 50.000 cepas de *Bt* identificadas y la búsqueda de nuevas cepas y nuevas toxinas de *Bt* son llevadas a cabo constantemente por laboratorios en todo el mundo. Estas subespecies han sido diferenciadas por varios métodos, entre ellos: pruebas bioquímicas, serotipificación H (antígeno flagelar), serología del cristal, morfología del cristal, perfil proteico, mapeo peptídico, sondas de ADN y actividad insecticida (Ananda *et al.* 1996). El sistema de nomenclatura de *Bt* en vigor se basa en la identidad de las secuencias de aminoácidos de las δ -endotoxinas deducidas a partir de las secuencias de los genes. Este sistema agrupa, actualmente, las δ -endotoxinas en 32 clases o grupos (Cry1 a Cry32) y diferentes subgrupos, además de dos clases de toxinas Cyt (Crickmore *et al.* 1998).

Un análisis de las δ -endotoxinas que componen los cristales de las cepas de *Bt* es realizado a través de electroforesis de proteínas en geles de poli(acrilamida)-Sodio Dodecilo Sulfato (SDS-PAGE). Este análisis permite conocer el número y masa molecular de las δ -endotoxinas producidas, indicando el grupo Cry al que pertenecen o demostrando la existencia de nuevas toxinas aún no descritas.

El cristal, también llamado inclusión parasporal, cuerpo parasporal, inclusión cristalina, endotoxina cristalina o cristaloides, está compuesto de protoxinas o δ -endotoxinas. Para que las protoxinas sean activadas, el insecto susceptible debe ingerirlas. El cristal es insoluble en agua o en solventes orgánicos, pero soluble en soluciones alcalinas, como las del intestino medio de los insectos sensibles con pH 10 a 12 (Ananda *et al.* 1996). Luego de la solubilización, las protoxinas deben ser procesadas por las proteasas del intestino medio para activar las toxinas. Así, los fragmentos tóxicos se unen a receptores específicos que se encuentran sobre la membrana plasmática, donde la adhesión de la toxina crea canales iónicos o poros. Cabe destacar que los sitios de recepción difieren entre las endotoxinas y esto puede explicar las variaciones en la especificidad de insectos sensibles a las diferentes subespecies de *Bt*. La formación de poros produce un desequilibrio osmótico en las células intestinales, que resulta en el intercambio de iones y de agua, y, con ello, la lisis celular (Tanada & Kaya 1993). Una vez eliminada la barrera entre el intestino y el hemocele se produce una disminución del pH del primero y un incremento del pH en el segundo, lo cual conlleva a la germinación de las esporas y multiplicación de las células vegetativas de *Bt* en la hemolinfa del insecto. Entre los síntomas presentados por las larvas susceptibles se encuentran: cese de la ingesta de alimentos, la parálisis del intestino y partes bucales, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte.

Las proteínas Cry son codificadas por los genes *cry*. Típicamente se reconocen cuatro genes *cry*: los genes *cry1* que codifican toxinas específicas para controlar lepidópteros; los genes *cry2* específicos para lepidópteros y dípteros, los genes *cry3* determinados para coleópteros y los genes *cry4* efectivos sobre dípteros. Sin embargo, recientes descubrimientos han dilucidado toxinas activas sobre nemátodos y sobre otros órdenes de insectos, ampliando significativamente el número de genes que codifican las proteínas Cry (Crickmore *et al.* 1998). Haciendo el análisis de cepas cristalíferas y acristalíferas se pudo determinar que la presencia de algunos plásmidos estaba relacionada directamente con la capacidad de la cepa de formar inclusiones parasporales,

lo que llevó a intuir que los genes que codifican las proteínas Cry se encontraban en moléculas de ADN extracromosómico (González & Carlton 1980; González *et al.* 1981). La marcada diversidad de cepas de *Bt* y sus toxinas es debida al menos en parte al alto grado de plasticidad genética de esta bacteria, pues muchos plásmidos con genes *cry* parecen conjugarse (González *et al.* 1981).

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) ha sido usada para la identificación y caracterización de cepas de *Bt*, ya que permite determinar la presencia de genes conocidos, combinaciones de genes y predicción de actividad insecticida. Esta técnica ha demostrado ser adecuada para la identificación de genes *cry* en cepas de *Bt*, principalmente en colecciones, pues permite una caracterización rápida y precisa, que requiere poco ADN para su análisis y permite el procesamiento de un gran número de muestras en relativo poco tiempo. Para la localización de genes *cry* en ADN plasmídico de los aislados de *Bt* se usan oligonucleótidos o iniciadores generales, diseñados a partir de regiones altamente conservadas de una determinada clase de gen *cry* o los oligonucleótidos específicos, seleccionados a partir de regiones altamente variable (Cerón *et al.* 1994; Cerón *et al.* 1995; Bravo *et al.* 1998). El tamaño de los fragmentos amplificados indica la presencia de genes de determinadas clases o subclases de genes *cry*.

Como un aporte para la salud pública de la región nororiental de Venezuela, en el presente trabajo se planteó aislar selectivamente cepas de *Bt* para la formulación de un producto que sea efectivo en el control de *H. metabus*. Para ello, se aislaron cepas bacterianas autóctonas a partir de muestras de suelo y de larvas muertas encontradas en zonas donde no había sido asperjado el insecticida comercial DiPel®8L a base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Una vez obtenidos los aislados se realizó la caracterización genética y molecular de los mismos, constatando de esta forma la especie y la variedad, pues las cepas bacterianas que se requieren deben ser tóxicas para lepidópteros. Ello contempló determinar el patrón de proteínas, a través de geles de poli(acrilamida), y la presencia de genes *cry* que codifican la proteína Cry causante de la muerte de los insectos sensibles.

Se proyecta diseñar un medio de cultivo para la masificación de las cepas de interés que surjan de este estudio, a través de la utilización de subproductos agroindustriales de fácil adquisición y de bajos costos que permitan un alto conteo de células viables y de esporas y, recuperación de proteínas Cry en las cepas seleccionadas.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Materiales

Cepas de *Bacillus thuringiensis* de referencia

B. thuringiensis var. *kurstaki* (*Btk*) obtenido a partir de DiPel®8L.

B. thuringiensis var. *israelensis* (*Bti*) obtenida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, estado Lara.

B. cereus obtenido en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos con la denominación CVCM-583.

Cepas aisladas a partir de larvas muertas de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) y de muestras de suelo fueron recolectadas en distintas localidades del estado Sucre (Tabla 1).

Tabla 1. Ubicación geográfica por entidad municipal de los sitios de recolecta en el estado Sucre y Delta Amacuro, Venezuela.

Municipio	Localidad	Coordenadas	
		Latitud N	Longitud O
Mariño	Río Grande	10° 38' 13,0"	62° 02' 47,7"
	Irapa	10° 33' 29,6"	62° 44' 52,2"
Pedernales	Pedernales	09° 48' 12,0"	62° 10' 33,4"
	Caño de Ajíes	10° 27' 44,5"	63° 03' 29,4"
	Morichal	10° 22' 32,2"	62° 53' 18,6"
Benítez	Guanoco	10° 07' 02,4"	62° 57' 28,7"
	Guaraunos	10° 32' 36,3"	62° 50' 43,4"
	La Tigana	10° 19' 07,0"	62° 56' 42,0"

Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias

Leche peptonizada: Este medio sirvió para la obtención del complejo espora-cristal de cepas de *Bt* (Ibarra & Federici 1986), el cual contenía en g/l: 10,0 dextrosa; 10,0 bactopectona; 2,0 extracto de levadura; 0,3 MgSO₄·7H₂O; 0,02 FeSO₄·7H₂O; 0,02 ZnSO₄·7H₂O; 0,02 MnSO₄·4H₂O. El pH se ajustó a 7,5 y se esterilizó en autoclave a 120 °C, 103,4 kPa, durante 15 min.

Medio Luria-Bertani (Caldo LB): Este medio se usó para el crecimiento de *Bt* proveniente de los aislados en choque térmico. Su contenido en g/l: 10,0 bacto tripton; 5,0 extracto de levadura; 5,0 NaCl. Se esterilizó en autoclave a 120 °C, 103,4 kPa, durante 15 min.

Preparación de Agar LB: Por litro de caldo LB se agregaron 15 g de agar.

LB-Estreptomicina (50 mg/l): Medio para la selección de *B. sphaericus* (Monnerat *et al.* 2001). La solución madre de Estreptomicina se preparó a 10 mg/ml a partir de un formulado comercial. Esta solución debió ser pasada a través de filtros MFS 25 cuyo poro es de 0,22 nm de diámetro. Se tomaron 0,5 ml de la solución madre y se añadieron a 100 ml de agar LB. El antibiótico se añadió después de esterilizar el agar, cuando estuvo tibio y dentro de una cámara de flujo laminar Marca Nuair Class II Tipo A/B3, modelo UN-425-300.

LB-Penicilina (100 mg/l): Medio para la selección de *Bt* o *B. cereus* (Silva-Werneck & Monnerat 2001). La solución madre de penicilina se preparó a 5 mg/ml a partir de un formulado comercial. Se tomaron 2 ml de la solución madre y se añadieron a 100 ml de agar LB. El antibiótico se añadió después de esterilizar el agar, cuando estuvo tibio y dentro de una cámara de flujo laminar marca Nuair Class II Tipo A/B3, modelo UN-425-300.

Agar-sangre: Medio para detectar la presencia de hemolisina, exotoxina producida por *Bt* en fase exponencial de crecimiento (hemolisina I y II que producen hemólisis β o hemólisis total). Para preparar un litro de agar se agregaron 10 ml de sangre de cordero obtenida en el Instituto Nacional de Higiene (INH) y 42,5 g de medio base Columbia. El medio se esterilizó en autoclave durante 15 min, a 121 °C y 103,4 kPa de presión.

Agar nutritivo: Este medio sirvió para la preservación de las cepas bacterianas en punciones. La preparación se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor. La marca usada fue Difco™.

Geles y búferes para electroforesis en poli(acrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Composición de los geles de la electroforesis SDS-PAGE: La mayoría de las electroforesis analíticas de proteínas son llevadas a cabo en geles de poli(acrilamida en condiciones que las disocian en sus subunidades peptídicas individuales y que minimicen la agrega-

ción de éstas. Para ello, se usa el detergente amoniacal dodecil sulfato de sodio (SDS) que en combinación con un agente reductor y calor disocian las proteínas antes de que éstas sean cargadas en el gel. El polipéptido desnaturalizado se une al SDS y queda cargado negativamente. Este conjunto es proporcional al peso molecular del péptido e independiente de su secuencia, por lo tanto, dicho complejo migra a través del gel de poli-acrilamida en concordancia con el tamaño de la secuencia aminoacídica. La composición del gel se muestra en la Tabla 2.

Búfer de la cámara Tris-Glicina: Con esta solución amortiguadora de corrida que contenía Tris base 25 mM; glicina 250 mM (pH 8,3) y SDS 0,1 %, se llenó la cámara electroforética.

Búfer de desnaturalización de proteínas (amortiguador de carga 2X): Este búfer es añadido en la muestra, antes de someterla a hervor a 100 °C para desnaturalizar las proteínas presentes. La solución amortiguadora contenía Tris HCl 25 mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 1,28 M; azul de bromofenol 2,89 mM; SDS 0,138 M y Glicerol 2,17 M.

Solución para la tinción de proteínas: El azul brillante de Coomassie es un colorante que forma complejos fuertes no covalentes con las proteínas y cuya unión es proporcional a la cantidad de la secuencia aminoacídica. Para llevar a cabo la tinción, el gel se sumergió por un periodo de 30 min a 3 h en una solución compuesta por azul de Coomassie 0,1 % (en solución de etanol 45 % y ácido acético al 9 %).

Solución para la destinción de proteínas: Para desteñir el gel se utilizó una solución que contenía etanol al 5 % y ácido acético al 7,5 %. El gel se sumergió en dicha solución por un periodo de 4 a 8 h, sobre una base giratoria.

Métodos

Aislamiento de cepas bacterianas

A partir de muestras de suelo

Se procesaron muestras de suelo provenientes de varias localidades de la península de Paria en el estado Sucre: caño Guaraunos, caño Guanoco, río Grande y La Tigana. Cabe destacar que estos sectores no habían

Tabla 2. Composición del gel de separación 10 % y del gel de concentración 5 %.

Compuesto	Gel de separación 10 %	Gel de concentración 5 %
Agua destilada estéril	2,21 ml	3,20 ml
Búfer del gel (Tris 3 M; SDS 0,3 %; pH 8,45)	3,3 ml	1,24 ml
Glicerol 100 %	1 ml	---
Solución de poli-acrilamida 30 %	3,3 ml	800 μ l
N,N,N',N' Tetrametil etilen diamina (TEMED)	10 μ l	5 μ l
Persulfato de amonio 10 %	100 μ l	50 μ l

sido asperjados con productos basados en *Bt*. Las muestras fueron recolectadas en frascos plásticos estériles de acuerdo con el protocolo descrito por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization 1985).

En el laboratorio, se tomó 1 g de cada muestra y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de agua destilada estéril. Cada muestra se homogeneizó mediante agitación en vórtex durante 1 min. Luego, se colocó 1 ml de la muestra en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se sometió a pasteurización en un baño a 80 °C durante 10 min, seguido de 5 min de enfriamiento en hielo. De la suspensión se extrajeron alícuotas de 10 y 3 μ l, las cuales fueron aforadas a 200 μ l. De estas diluciones se tomaron 0,1 ml, se sembraron en placas con agar LB y se incubaron durante 24 h en una estufa a 30 °C, lo que permitió el crecimiento de colonias aisladas (Carmona 2002).

A partir de larvas muertas

Se tomaron larvas muertas de *H. metabus* recolectadas en la región de estudio. Las larvas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3 % y enjuagadas repetidas veces con agua destilada estéril. Las muestras fueron conservadas a -20 °C, hasta el momento de su estudio.

De las larvas desinfectadas se tomó una muestra del interior del cuerpo antes de macerar, para sembrarlas sobre placas con agar LB. Luego, las larvas desinfectadas se colocaron, a partes iguales, en dos homogeneizadores estériles y se procedió al macerado de las mismas. Una alícuota del macerado proveniente del homogeneizador 1 se sembró directamente sobre una placa de agar LB, mientras que el macerado del homogeneizador 2 fue sometido a choque térmico que consistía en 10 min de calentamiento en un baño a temperatura de 80 °C, seguido de 5 min de enfriamiento en hielo. Luego, una alícuota de la muestra pasteurizada fue sembrada sobre placas con agar LB.

Todas las placas fueron incubadas por 24 h a 30 °C para someterlas a observación y sembrar las colonias seleccionadas en medios de cultivos selectivos.

Medios de cultivos selectivos

Se seleccionaron las colonias individuales aisladas, tanto de muestras de suelo como de larvas muertas que poseían el morfotipo de *Bt*, es decir, aquellas colonias blancas, grumosas y con bordes irregulares. Luego, las cepas se repicaron sobre placas con agar LB-penicilina, agar LB-estreptomicina y agar-sangre, dado que *Bt* se caracteriza por mostrar el fenotipo hemólisis positiva, penicilina resistente y estreptomicina sensible (Hem⁺ Pen^R, Strp^S). Este tipo de pruebas bioquímicas permitió una mejor selección de las cepas después de la selección con choque térmico.

Observación de esporulación y producción de cristales en microscopio óptico

Las colonias seleccionadas, después de incubarlas durante 48 h a 30 °C, se sometieron a observación en microscopio de contraste de fases marca Nikon, modelo 116437, con aumento de 1000X. Para ello, la colonia aislada se tomó con un asa de platino y se colocó sobre un portaobjeto con una gota de glicerol 100 %; ello para evitar la movilidad de las células. Las colonias típicas de *Bt* presentan esporangios alargados donde los cristales pueden ser visualizados como un pequeño punto junto a la espora.

Mantenimiento de las cepas bacterianas

Punción

Las cepas bacterianas aisladas fueron conservadas en viales de polipropileno con medio agar nutritivo. Para ello, se tomó con un asa de platino de las cepas purificadas que habían pasado por las pruebas de medios selectivos y se realizaron punciones en el agar nutritivo contenido en el vial. Los tubos fueron sellados con parafina para evitar contaminaciones. Las cepas fueron depositadas en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos de la Universidad Central de Venezuela (CVCM-UCV).

Liofilización

Las cepas bacterianas puras fueron sembradas sobre placas de agar nutritivo. Al transcurrir 72 h de la inocula-

ción, se procedió a colocar una tira de papel de filtro estéril (3 cm x 3 mm) sobre el cultivo autolisado. Luego de su impregnación completa durante unos 15 min se procedió a colocarlo dentro de un microtubo de plástico estéril, previamente sellado en un extremo y con algodón en el otro. Luego, todos los microtubos se depositaron en frascos de liofilización enfriados a -50 °C. Ésta se llevó a cabo durante 24 h en un liofilizador LABCONCO modelo Freeze Dry System/Freezone 4.5. Al concluir, los microtubos se sellaron en el otro extremo, para su conservación.

Identificación de los genes *cry*

El método que se usó para el análisis de la presencia de los genes que codifican para la síntesis de las toxinas Cry de *Bt* fue la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrito por Bravo *et al.* (1998).

Preparación de la muestra

El ADN total fue extraído de cada uno de los aislados. Para ello, las cepas de *Bt* se sembraron sobre agar nutritivo durante 16 h a 30 °C. Se tomaron células con un asa de platino a partir de una colonia aislada, las cuales fueron resuspendidas en un tubo Eppendorf que contenía 100 µl de agua miliQ estéril. El tubo con la muestra fue congelado a -70 °C por 1 h e inmediatamente fue transferido a un baño en ebullición por 10 min con el propósito de lisar las células. Seguidamente, la muestra se centrifugó a 10.000 rpm por 10 s y se recuperó el ADN presente en el sobrenadante para llevar a cabo las reacciones de PCR.

Condiciones de la PCR

La PCR fue realizada en un termociclador Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2400. La mezcla de reacción, con un volumen final de 25 µl, contenía 2,5 µl de cada par de oligonucleótidos (0,5 µM), 12,5 µl de polimerasa Master mix (concentración final: 2,5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0,2 mM de cada dNTP) y 7,5 µl de ADN templado aforado con H₂O libre de ADNasa estéril.

Para la identificación de los genes *cry1* en los aislados, se usaron un par de iniciadores generales Gral-*cry1*, descritos por Bravo *et al.* (1998) en las siguientes condiciones:

Un ciclo de desnaturalización de 1 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos programados (cada uno de: 95 °C por

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores para la determinación de los genes *cry1* en la reacción de PCR, según Bravo *et al.* 1998.

Genes a determinar	Nombre del iniciador	Secuencias
<i>cry1</i>	Gral- <i>cry1</i> (f)	5'-CTGGATTTACAGGTGGGGATAT-3'
	Gral- <i>cry1</i> (r)	5'-TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT-3'

1 min para el segundo paso de desnaturalización, 53 °C por 1 min para el acoplamiento de los iniciadores y un ciclo de extensión de 1 min a 72 °C) y un paso extra de extensión a 72 °C durante 1 min. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 3.

Preparación del gel

Para el análisis de los fragmentos de PCR se utilizó una cámara de electroforesis horizontal con gel de agarosa sumergido y preparado a una concentración de 2 % en amortiguador TAE.

En cada uno de los pozos se depositaron 15 µl de producto PCR con 3 µl de búfer de carga y se corrieron a 100 V durante 35 min. También se cargaron en uno de los bolsillos, 3 µl de marcador de peso molecular de 1 Kb, Marca Gibco BRL®, N° de catálogo 10787-018. Finalizado el tiempo de corrida, el gel fue teñido con bromuro de etidio 1 % durante 10 min y decolorado en H₂O destilada durante 20 min. El producto de PCR fue visualizado en un transiluminador BIO-RAD, bajo luz UV en gel DOC 1000 y programa Multi-Analyst versión 1.1. El tamaño de los productos de PCR que se obtienen es de 557 pb.

Patrón de proteínas

Cada una de las cepas nativas fue comparada con las cepas de referencia por medio de su patrón de proteína. El procedimiento usado fue el descrito por Laemmli (1970), para lo cual se procedió en primer lugar a la obtención del complejo espora-cristal.

Obtención del complejo espora-cristal

La metodología seguida fue la reportada por Lecadet *et al.* (1992). Los aislados fueron incubados en un baño con agitación a 250 rpm a 30 °C durante 24 h. Este preinóculo sirvió para inocular fiolas que contenían 250 ml de leche peptonizada, que a su vez fueron incubadas durante 72 h a 30 °C con agitación a 250 rpm hasta la au-

tólisis del cultivo. Las cepas autolisadas fueron transvasadas a botellas estériles de polipropileno de boca ancha para ser centrifugadas durante 10 min a 12.000 rpm, en un rotor GSA 5,75 en centrífuga Sorvall®, modelo RC-5B. Luego, el *pellet* se resuspendió en 150 ml de agua destilada estéril fría y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. Este lavado se repitió tres veces consecutivas. Luego, se realizó un último lavado con una solución de NaCl 1,5 M, estéril y fría, con la finalidad de disminuir las posibles exotoxinas excretadas, eliminar los desechos celulares y evitar la degradación de las proteínas del cristal insecticida. Finalmente, el precipitado obtenido fue liofilizado y congelado para su uso posterior.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas que componen el cristal de cada una de las cepas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Esta técnica permite separar las proteínas de acuerdo a su tamaño. Estas moléculas de proteínas constituyen, parcial o totalmente, el cuerpo parasporal. Se usaron como patrones las cepas de referencia *Btk* de DiPel®8L y *Bti*. En la cepa *Btk* de DiPel®8L se distinguen claramente una banda de aproximadamente 130 kDa que identifica la proteína con actividad insecticida contra especies del orden Lepidoptera y que pertenece al grupo de proteínas Cry1 de *Bt* (Schnepf & Whiteley 1981; Crickmore *et al.* 1998) y otra de 65 kDa que está asociada a un cristal cúbico incrustado al cristal bipiramidal (Höfte & Whiteley 1989). En el caso de la cepa *Bti*, se identifican tres bandas de 130 kDa, 70 kDa y 30 kDa, las cuales son denominadas proteínas Cry4, Cry11 y Cyt, respectivamente.

Para llevar a cabo la electroforesis se ensambló una minicámara BIO-RAD modelo Mini-Protean® II Cell, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, procediendo de la siguiente manera para el vaciado del gel de SDS-PAGE. Se mezclaron los componentes del gel de separación, dejando el TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenediamina), compuesto que acelera la polimerización de la acrilamida debido a que cataliza la formación de radicales libres a partir del persulfato de amonio hasta el final, ya que la polimerización se inicia tan pronto éste es añadido. A continuación se mezcló y agitó rápidamente, vaciándolo en el espacio entre las placas de vidrio, dejando espacio suficiente para el gel de concentración (la longitud de los dientes del

peine de teflón, más 1 cm). Usando una pipeta Pasteur, se cubrió el gel de separación con SDS 1 % (en agua destilada) y se colocó en posición vertical, a temperatura ambiente.

Después de completar la polimerización (30 min), se lavó la parte superior del gel varias veces con agua desionizada para remover la acrilamida no polimerizada. Se eliminó la mayor cantidad posible de agua por medio de papel absorbente.

Enseguida se preparó el gel de concentración, dejando el TEMED al final, por las razones antes descritas. Se mezcló y vació rápidamente en la superficie del gel de separación, insertando, inmediatamente y con mucho cuidado, el peine de teflón limpio en el gel de concentración, evitando la formación de burbujas de aire. El gel se dejó en posición vertical a temperatura ambiente por 30 min. Mientras el gel se polimerizaba, se prepararon las muestras y el marcador de peso molecular, calentando a 100 °C por 5 min en búfer de desnaturalización para proteínas.

La preparación de la muestra para correr en los gels de poliacrilamida partió de cultivos de *Bt* de 72 h o de liofilizado del complejo espора- cristal. El liofilizado se pesó para preparar una suspensión de 0,5 mg/ml de H₂O destilada estéril. En caso de partir de un cultivo líquido, la suspensión se preparó tomando igual relación de cultivo y H₂O destilada estéril (1:1). Luego, la muestra se mezcló con el búfer de desnaturalización de proteínas, en una relación 1:1, en un Eppendorf estéril y dentro de una campana de extracción. La mezcla se agitó y luego se llevó a un baño en ebullición por 10 min para promover su

desnaturalización. Para precipitar las esporas, se colocó en una microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415C, durante 1 min a 10.000 rpm. La muestra se conservó a 4 °C hasta su uso. Cada vez que se corrió un gel, la muestra se llevó a hervor durante 5 min y luego centrifugación durante 1 min a 10.000 rpm.

Una vez completada la polimerización, se removió el peine de teflón cuidadosamente y se enjuagó con agua desionizada para eliminar los residuos de acrilamida no polimerizada. El gel se insertó en la cámara de electroforesis, añadiendo el búfer de electroforesis a las cámaras interna y externa, cuidando que no se formaran burbujas de aire entre las placas de vidrio, en el fondo del gel.

Se colocaron de 5 a 15 µl de muestra en el fondo de cada celda utilizando una micropipeta, donde a una de las celdas se le colocó el marcador de proteínas, marca Gibco BRL BenchMark, N° de catálogo 10748-010. Se procedió entonces a conectar el aparato de electroforesis a una fuente de poder. Se aplicó un voltaje de 100 V por 2 h (aproximadamente el tiempo que tarda el azul de bromofenol en llegar al fondo del gel de separación). Al finalizar la electroforesis, el gel se removió de las placas de vidrio rociándolo con agua y luego se colocó en una cápsula de Petri grande. El gel se marcó para reconocer la orientación, haciendo un corte en una de sus esquinas. Posteriormente, se cubrió con la solución de tinción de proteínas, permitiendo un tiempo de tinción de 3 h, luego el gel se destiñó cubriéndolo con solución de distinción. Una vez desteñido el gel se procedió a registrar la imagen a través de un escáner HP 1300.

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas bacterianas de *Bacillus thuringiensis* a partir de muestras de suelo y larvas muertas de *Hylesia metabus*

Aislamiento selectivo

Las muestras de suelo y de larvas muertas de *H. metabus* fueron procesadas inicialmente con choque térmico, para discriminar entre microorganismos esporulados y no esporulados (Figura 1), siguiendo el protocolo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization 1985). Como era de esperarse, en las muestras sin pasteurizar se obtuvo una amplia variedad de microorganismos y las colonias ob-

servadas pudieron provenir no sólo de esporas, sino también de células vegetativas (Figura 1A). Contrariamente, en las muestras provenientes del mismo macerado o de la misma suspensión de suelo, pero sometido a choque térmico, las colonias observadas sólo derivan de esporas (Figura 1B), pues el tratamiento por calor elimina las células vegetativas, pero no daña a estas estructuras.

Además, se llevaron a cabo las identificaciones iniciales de los aislados, hasta nivel de especie, a través del crecimiento diferencial en medios con penicilina y estreptomycinina. Aquellos aislados capaces de crecer en medio suplementado con penicilina fueron identificados como *Bt* o *B. cereus* (Silva-Werneck & Monnerat 2001) y los aislados que crecieron en placas con estreptomycinina fueron

identificados como *B. sphaericus* (Monnerat *et al.* 2001).

Ambos métodos tienen la ventaja de disminuir los costos en la investigación, sobre todo si se desea realizar una búsqueda de cepas autóctonas de *Bt* captadas en muestras provenientes de muchas regiones, como es el caso del presente estudio.

Una vez llevada a cabo la selección de las cepas, basándose en su fenotipo, se procedió a identificar la presencia del cuerpo parasporal de *Bt*, en cultivos en fase estacionaria (Porcar & Caballero 2000). La observación al microscopio de contraste de fases del cristal refringente durante la fase de esporulación permite la diferenciación de *Bt* de otras especies del complejo *Bacillus* (Porcar & Juárez-Pérez 2004). Es por ello que las muestras cultivadas durante 72 h fueron comparadas con un cultivo de *B. cereus*, usado como control negativo para la presencia del cristal. En la Figura 2 se pueden observar que las células de *Bt* presentan las esporas ovales (también refringentes), en posición subterminal y sin deformar el esporangio, a diferencia de lo que ocurre con *B. sphaericus* (otra bacteria entomopatógena usada para el control de dípteros) cuyas esporas distienden el esporangio dándole forma de raqueta.

Así se realizaron los aislamientos selectivos de cepas de *Bt* a partir de muestras de suelo y larvas muertas de *H. metabus*. Después de ser examinadas en un microscopio de contraste de fases, las muestras se caracterizaron mediante el sistema automatizado ATBplus. Los resultados sobre la identificación de *Bt* se presentan en forma resumida en la Tabla 4. Como resultado de la aplicación del método selectivo para *Bt*, se logró una eficiencia del 85 % en la recuperación de *Bt* entre los aislados del género *Bacillus* presentes en las muestras.

Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* de muestras provenientes de suelos

Al analizar las colonias provenientes de muestras de suelos, sólo el 1,3 % mostraron el fenotipo Hem⁺ Pen^R Strep^S característico de *Bt*, mientras que en colonias provenientes de larvas muertas la proporción de aislados con este fenotipo fue considerablemente superior (51,8 %). La Tabla 5 resume el análisis de cada una de las cepas caracterizadas como posible *Bt*.

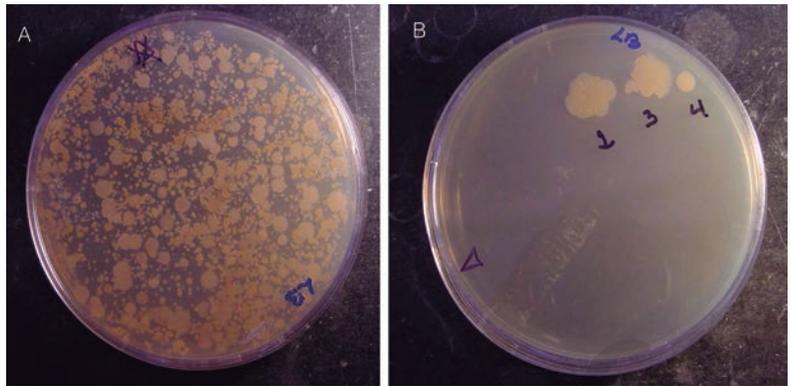


Figura 1. Macerado de larvas muertas de *Hylesia metabus* sembradas en placas de agar LB. A) sin choque térmico (*). B) con choque térmico (Δ). En el panel B se pueden observar a las colonias 1 y 3, características de *Bt*. La colonia 4 pertenece a una especie diferente de *Bt*.

Una colonia aislada de *Bt*, en cápsula de Petri, muestra una morfología circular, de color crema, con aspecto harinoso y textura parecida a la cera (Porcar & Juárez-Pérez 2004). La identificación de esas colonias, mediante el sistema ATBplus, dio la probabilidad de *Bt* en un 60 % para las muestras de suelo y en 91,7 % para las provenientes de larvas muertas. En ambos casos fueron observados los cristales, siendo más alta su presencia (100 %) en aislados provenientes de larvas.

De las 1251 colonias aisladas de muestras de suelo, empleando una combinación de métodos fenotípicos, un total de 382 cepas presentaban las características mencionadas. De este universo, sólo cinco (1,3 %) mostraron el fenotipo característico (Hem⁺ Pen^R, Strep^S) (Tabla 5). En dos casos fue posible apreciar la presencia de cristales parasporales. Estos resultados indican una baja



Figura 2. Cultivo de una cepa nativa de *Bt* (CVCM1813) en fase estacionaria de crecimiento, visto en microscopio de contraste de fases 1000X.

Tabla 4. Selección de cepas con posibilidad de *Bt* considerando el fenotipo Hem⁺, Pen^R, Strep^S y la identificación por el método semiautomatizado ATB*plus*.

N° CVCM (Designación equivalente)	Procedencia	Fenotipo (Hem ⁺ Strep ^S Pen ^R)	Cristal	Identificación ATB <i>plus</i>			Taxón elegido
				<i>B. cereus</i> / Posibilidad de <i>Bt</i> (%)	<i>B. mycoide</i> (%)	Otros	
CVCM 1816 (HD-73)	Laboratorio de biología molecular	+	+				
CVCM 1817 (Bti)	Laboratorio de biología molecular	+	+				
CVCM 1818 (HD-1)	Laboratorio de biología molecular	+	+				
CVCM 1819 (DIPel® granulado)	Laboratorio de biología molecular	+	+				
CVCM 1734 (BT 44)	Laboratorio de biología molecular	+	+	99,6	0,3		
CVCM 1735 (BT 204)	Laboratorio de biología molecular	+	+	99,5	0,5		
CVCM 1812 (F1)	Larvas muertas Pedernales	+	+	97,9	2		<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1813 (F7)	Larvas muertas Caño Guanoco	+	+	70,5	29,4	0,1 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1814 (F13)	Larvas muertas Morichal	+	+	61,6	38,3	0,1 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1815 (F19)	Larvas muertas Caño Ajíes	+	+	99,9	0,1		<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1831 (4c2)	Larvas muertas Irapa	+	+	13,7	82,4	1,8 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1832 (5b2)	Larvas muertas ElPaujil	+	+	59,6	40,4	0,1 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1833 (4a2)	Larvas muertas Irapa	+	+	80,3	17,9	1,7 <i>B. anthracis</i> 0,1 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1834 (4a3)	Larvas muertas Irapa	+	+		95	2,5 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1729 (M1 act 12)	Suelo Guaraunos	+	-	55,7	44,3	0,1 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1730 (M1 act 45)	Suelo Guaraunos	+	-			<i>B. stearothermophilus</i> <i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus</i> sp
CVCM 1731 (M1 10 ml 5)	Suelo Guaraunos	+	+	84,3	15,7		<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1732 (M2 LB 3)	Suelo Guanoco	+	-			68,3 <i>B. amuloliquefaciens</i> 24,9 <i>B. subtilis</i> 6,8 <i>B. licheniformis</i> 0,1 <i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus</i> sp
CVCM1733 (M3 10 ml 42)	Suelo Guanoco	+	+	<i>B. cereus</i> posibilidad de <i>B. thuringiensis</i>			<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1829 (RG23a)	Suelo Río Grande, estado Sucre	-	-			68,1 <i>Brevibacillus brevis</i> 31,9 <i>B. sphaericus</i> 0,1 <i>B. megaterium</i>	<i>Brevibacillus</i> <i>brevis</i>
CVCM 1830 (RG23b)	Suelo Río Grande, estado Sucre	+	-	63,6	29,4	3,5 <i>Brevibacillus brevis</i>	<i>B. cereus</i>
(RG5)	Suelo Río Grande, estado Sucre	+	-	51	48,8	0,1 <i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. mycoides</i>
(RG7)	Suelo Río Grande, estado Sucre	+	-	92,5	4,6	2,7 <i>B. anthracis</i> 0,1 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. mycoides</i>
(RG9)	Suelo Río Grande, estado Sucre	+	-	89,3	10,7	0,1 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. mycoides</i>
(RG10)	Suelo Río Grande, estado Sucre	+	-	89,1	10,9	0,1 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. mycoides</i>
(RG12b)	Suelo Río Grande, estado Sucre	+	-	92,1	7,8	0,1 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. mycoides</i>
CVCM 1836 (T3)	Suelo La Tigana, estado Sucre	+	-	7,4	91,9	0,6 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>Bacillus</i> sp.

Continúa

Tabla 4. (continuación) Selección de cepas con posibilidad de *Bt* considerando el fenotipo Hem⁺, Pen^R, Strep^S y la identificación por el método semiautomatizado ATBplus.

N° CVCM (Designación equivalente)	Procedencia	Fenotipo (Hem ⁺ Strep ^S Pen ^R)	Cristal	Identificación ATBplus			Taxón elegido
				<i>B. cereus</i> / Posibilidad de <i>Bt</i> (%)	<i>B. mycoide</i> (%)	Otros	
CVCM 1865 (T4)	Suelo La Tigana, estado Sucre	+	-	98,8	1,1		<i>B. cereus</i>
(T5)	Suelo La Tigana, estado Sucre	+	-	92,8	7,2	0,1 <i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>
(T6)	Suelo La Tigana, estado Sucre	-	+	99,9	0,1		<i>B. cereus</i>
CVCM 1835 (4b1)	Larvas muertas Irapa	+	+	62,8	36,9	0,2 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
(5b1b)	Larvas muertas El Paujil	+	+	62,8	36,9	0,2 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
(1b1b)	Larvas muertas El Paujil	+	+	62,8	36,9	0,2 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
CVCM 1861 (1c1b)	Larvas muertas El Paujil	+	+	76,4	23,1	0,5 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
(4c1)	Larvas muertas Irapa	+	-	17,9	80,3	1,7 <i>B. anthracis</i> 0,1 <i>B. stearofermophilus</i>	<i>B. mycoides</i>
CVCM 1863 (3c1)	Larvas muertas El Paujil	+	-	23,6	50,8	25,4 <i>B. anthracis</i> 0,1 <i>B. stearofermophilus</i>	<i>B. mycoides</i>
(3c2)	Larvas muertas El Paujil	+	-	17,9	80,3	1,7 <i>B. anthracis</i> 0,1 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. mycoides</i>
(4a4)	Larvas muertas Irapa	+	-	17,9	80,3	1,7 <i>B. anthracis</i> 0,1 <i>Brevibacillus laterosporus</i>	<i>B. mycoides</i>
CVCM 1860 (4b2)	Larvas muertas Irapa	+	-	22,2	75,7	1,9 <i>B. anthracis</i>	<i>B. mycoides</i>
CVCM 1862 (4a1)	Larvas muertas Irapa	+	+	86,7	7,7	2,8 <i>B. anthracis</i>	<i>B. thuringiensis</i>

incidencia de *Bt* en el área de muestreo. La mayoría de los estudios realizados en la búsqueda de cepas de *Bt* indican que esta bacteria se puede obtener en el 50-100 % de los casos (Martin & Travers 1989; Chilcott & Wigley 1993; Hossain *et al.* 1997; Bravo *et al.* 1998). Sin embargo, Martin & Travers (1989) señalan que la abundancia va a depender de la zona que está en estudio. En ese trabajo, los autores revelan que es más frecuente aislar *Bt* en zonas de sabana, desiertos y cultivos agrícolas, que en zonas como cuevas subterráneas y playas, donde la presencia de aislamientos es menor y no supera al 29 % de muestras con al menos una cepa de *Bt*. A esta conclusión llegaron después de analizar una gran cantidad de muestras de suelo, provenientes de 30 países. Por otro lado, Chak *et al.* (1994) trabajaron en suelos de Taiwán con la finalidad de establecer una colección de cepas de *Bt* nativas y encontraron que el 93 % de los aislados provenían

Tabla 5. Resumen de las muestras procesadas de suelo y larvas muertas de *H. metabus*.

Muestras	N° colonias obtenidas (procesadas)	N° de colonias con fenotipo Hem ⁺ Pen ^R Str ^S (% del total de colonias procesadas)	N° colonias procesadas en ATBplus (con posibilidad de <i>Bt</i>)	N° de colonias con cristal	Cristales (%)
Suelo	1251 (382)	5 (1,3 %)	5 (3)	2	66,7
Larvas	56 (56)	29 (51,8 %)	12 (11)	11	100

de zonas de alta montaña, sugiriendo que algún factor ambiental favorece su presencia allí, en comparación con las zonas bajas. En un estudio realizado por West *et al.* (1985), los autores compararon el crecimiento de *Bt* y *B. cereus* en diferentes condiciones de pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes. Estos autores concluyeron que la densidad poblacional de *Bt* no aumentó, sino todo lo contrario, disminuyó hasta un 60 % con respecto a la población inoculada, mientras que la densidad de *B. cereus* incrementó de 10 a 100 veces en todas las condiciones evaluadas. Estos resultados sugieren que *Bt* es un microorganismo ineficiente al competir por nutrientes con otras bacterias, especialmente en el suelo.

Tabla 6. Aislados autóctonos de *Bt* incorporados al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM).

Código CVCM	Tipo de muestra	Procedencia
CVCM 1812	LM	Pedernales
CVCM 1813	"	Caño Guanoco
CVCM 1814	"	Morichal
CVCM 1815	"	Caño Ajjes
CVCM 1831	"	Irapa
CVCM1832	"	El Paujil
CVCM 1833	"	Irapa
CVCM 1834	"	Irapa
CVCM 1860	"	Irapa
CVCM 1861	"	El Paujil
CVCM 1862	"	Irapa
CVCM 1863	"	El Paujil
CVCM 1864	S	Río Grande
CVCM 1733	"	Guaraunos

LM: muestra de larva muerta; S: muestra de suelo.

De acuerdo con los resultados y los antecedentes, pareciera que la distribución de *Bt* en el ambiente está determinada por factores como la humedad, presencia de materia orgánica, temperatura, estructura y pH del suelo, además de la disponibilidad de macro y micronutrientes en el mismo, e inclusive por la presencia y distribución de insectos en las zonas de muestreo, como lo indica Bravo *et al.* (1998) al correlacionar la presencia de variedades de *Bt* con los insectos predominantes en diferentes zonas de México, en donde se recolectaron muestras de suelo para el establecimiento de un cepario.

Aislamiento de *Bacillus thuringiensis* a partir de larvas muertas de *Hylesia metabus*

En el caso de los aislados obtenidos de larvas muertas, fueron aisladas y estudiadas 56 colonias, de las cuales 29 (51,7 %) mostraron el fenotipo Hem⁺, Pen^R, Strp^S, una proporción considerablemente superior que la de las muestras de suelo (Tabla 5). El análisis de la presencia de cristales parasporales se realizó en 11 de estos aislados, observándose en todos los casos. Estos resultados indican que *Bt* es más eficiente colonizando insectos que suelos. Algunos de los argumentos que pudieran sustentar estos resultados tienen relación con que *Bt* posee la capacidad de producir otras proteínas, además de la δ -endotoxina, que apoyan la patogenicidad de la bacteria en fase vegetativa mientras surge la colonización del hospedero, entre ellas, la α - y la β -exotoxina, fosfolipasas, quitinasas y proteasas (Tanada & Kaya 1993). Por otro

lado, se sabe que *Bt* produce antibióticos, los cuales posiblemente le confieran una ventaja a la bacteria al competir por recursos en el cuerpo del insecto hospedero con otros microorganismos. Además, Wilson & Benoit (1993) indican que el pH alcalino, el cual es típico del intestino medio de los insectos, contribuye a la germinación de las esporas de *Bt*. De acuerdo a esto, pareciera que la selección natural favorece la estrecha relación entre *Bt* y sus hospederos, y de esta manera, su persistencia en el ambiente (Uribe 2004).

De acuerdo con los procedimientos realizados, la identificación de *Bt* por el sistema ATB^{plus} coincidió en un 95 % con la observación de cristales parasporales.

Conservación ex situ de los aislados obtenidos en campo

Por otro lado y como parte de los objetivos propuestos se procedió a construir un banco de cepas de *Bt* y otros géneros identificados entre los aislados procesados, como agentes con potencial actividad para el control biológico de *H. metabus*, y de otros insectos plaga. Los cultivos seleccionados de estos microorganismos, representativos del ecosistema natural de *H. metabus* se encuentran catalogados y preservados ex situ en forma de liofilizados.

Hasta la fecha se han incorporado a la colección 14 aislados autóctonos de *Bt* obtenidos a partir de larvas muertas (LM) y de suelos (S) de diferentes zonas de la región nororiental del estado Sucre, no tratadas con DiPel[®]8L u otros productos empleados para el control de *H. metabus* (Tabla 6). Además, durante este período, se han obtenido los liofilizados de estas cepas autóctonas de *Bt* y de DiPel[®]8L, poniendo especial énfasis en este último pues es usado como control en los bioensayos de patogenicidad y virulencia.

Dichos cultivos puros están almacenados y disponibles para estudios posteriores en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, República Bolivariana de Venezuela.

Identificación de los genes *cry*

Las muestras presentadas en la Tabla 6, pertenecientes a la colección de cepas autóctonas, fueron analizadas para determinar la presencia de los genes *cry1* que

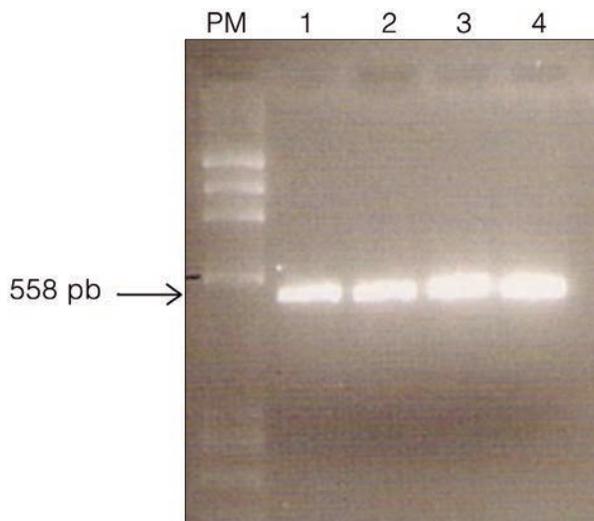


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en la identificación de genes *cry1* presentes en cepa control *Btk* DiPel®8L, obtenidos a diferentes concentraciones de iniciadores *gral-cry1*. Carril 1 y 2: 1 µl de iniciadores. Carril 3 y 4: 2,5 µl de iniciadores. PM: Marcador de Peso Molecular.

codifican las toxinas Cry1 de las cepas de *Bt*, tóxicas para lepidópteros. Para ello se siguió la metodología propuesta por Bravo *et al.* (1998).

Para realizar la estandarización y los ajustes a la metodología se utilizaron los liofilizados de DiPel®8L que están constituidos por el complejo espora-cristal proveniente de la cepa *Btk*, la cual con seguridad cuenta con la presencia del gen *cry1*. Como control positivo se usaron los iniciadores universales U1 y U2, utilizados para la amplificación de genes 16S rDNA, diseñados por Lu *et al.* (2000) sobre la cepa de *Escherichia coli* J-62; como control negativo se usó agua miliQ estéril.

La amplificación de los genes *cry1* se realizó usando la mezcla PCR Master Mix PROMEGA (Taq DNA Polimerasa, dNTP, MgCl₂ y búfer de reacción). En la Figura 3 se muestran los productos de PCR cuando se usaron diferentes concentraciones de iniciadores y el ADN proveniente de *Btk* de DiPel®8L. Todas las reacciones con el control DiPel®8L dieron resultados positivos.

Después de haber efectuado la estandarización con el control positivo (muestras de ADN obtenidas de *Btk* de DiPel®8L), las reacciones de PCR se llevaron a cabo con las 14 muestras incorporadas en la colección de aislados autóctonos de *Bt*, obtenidas a partir de larvas muertas y de muestras de suelos de diferentes regiones del estado Sucre, no tratadas con DiPel®8L. Los resultados con las cepas obtenidas de larvas muertas se muestran en la Figura 4. Las cepas CVCM1813 y

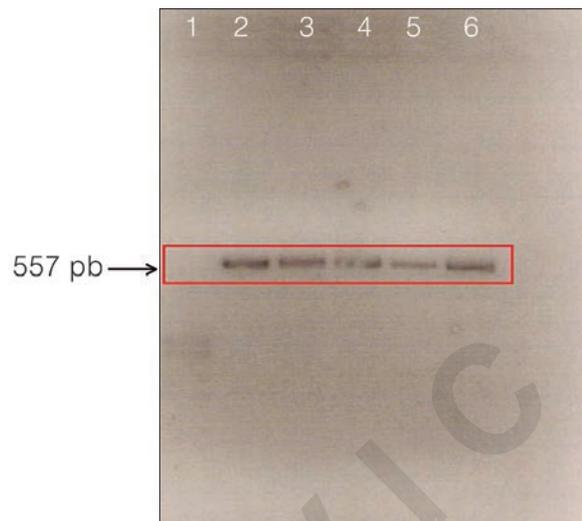


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en la identificación de genes *cry1* presentes en las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* obtenidos a diferentes concentraciones de iniciadores *gral-cry1*. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: CVCM 1813 (1 µl de iniciadores), carril 3: CVCM 1813 (2,5 µl de iniciadores), carril 4: CVCM 1814 (1 µl de iniciadores), carril 5: CVCM 1814 (2,5 µl de iniciadores), carril 6: Control DiPel®8L (1 µl de iniciadores).

CVCM1814 presentaron el gen *cry1*, dando fragmentos de tamaño esperado de 558 pb (Bravo *et al.* 1998) al igual que la cepa control proveniente de DiPel®8L. Estos resultados coinciden con los reportados por Vitelli *et al.* (2010) cuando hacen el análisis de estas mismas cepas a través de ribotipificación automatizada.

Tal como se presenta en la Figura 4, un número significativo de muestras no reaccionaron con los iniciadores generales usados para identificar los genes *cry1*. En todas las cepas almacenadas en el CVCM se pudo observar la presencia del cuerpo parasporal a través de microscopía de contraste de fases. Sin embargo, no se pudo observar la forma que poseía dicha inclusión, pues las células no habían lisado y, por lo tanto, el cristal se encontraba en el esporangio a las 72 h. Es posible que el cristal producido por estas cepas esté conformado por otras proteínas, entre ellas Cry2, Cry3 o Cry4. Se pretende hacer el estudio con iniciadores específicos diferentes que identifiquen a los genes codificantes de estas proteínas Cry.

Patrón de proteínas

El patrón de proteínas del cristal parasporal es uno de los parámetros más utilizados para una adecuada caracterización de cepas de *Bt*. En la Figura 5 se

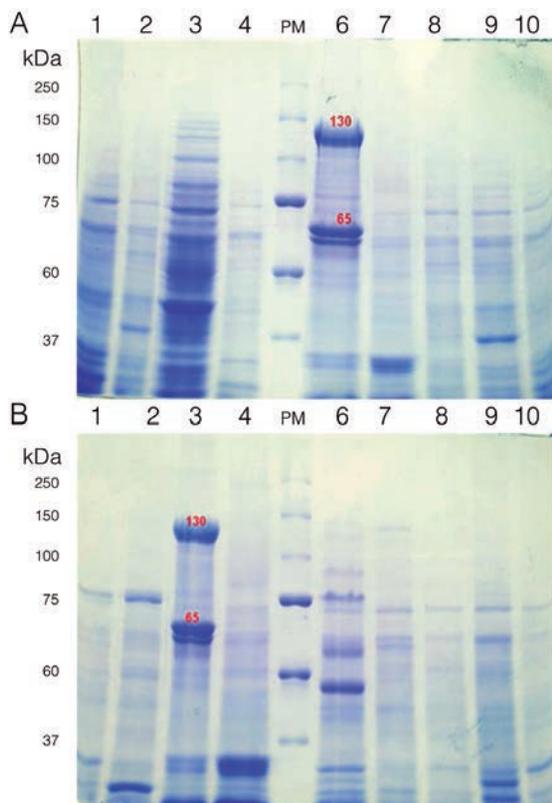


Figura 5. SDS-PAGE 10 % del complejo espora-cristal de las cepas autóctonas de *Bt*. A) carril 1, CVCM1833; carril 2, CVCM1834; carril 3, CVCM1864; carril 4, CVCM1863; carril 5, PM (marcador de peso molecular); carril 6, control positivo DiPel®8L; carril 7, control positivo *Bti*; carril 8, CVCM1862; carril 9, CVCM1861; carril 10, CVCM1860. B) carril 1, CVCM1813; carril 2, CVCM1814; carril 3, control positivo DiPel®8L; carril 4, control positivo *Bti*; carril 5, PM (marcador de peso molecular); carril 6, CVCM1733; carril 7, CVCM1812; carril 8, CVCM1815; carril 9, CVCM1831; carril 10, CVCM1832.

muestran los patrones de proteínas de las cepas incorporadas al CVCM.

La cepa CVCM 1812 es la única muestra en donde se distingue tenuemente en el gel de poliacrilamida una banda de aproximadamente 130 kDa (Figura 5, B-7), la cual coincide con la banda típica del control positivo DiPel®8L.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados presentados permiten concluir que la metodología empleada permite la selección efectiva de *Bt* a partir de larvas muertas. A pesar de la baja proporción de aislados de *Bt* que se encontró en las muestras de suelos, el método resultó igualmente efectivo.

Se han almacenado 14 aislados autóctonos de *Bt* en un banco de cepas. Estos aislados han sido

Esta proteína pertenece al grupo de proteínas Cry1 de *Bt* con actividad insecticida contra lepidópteros (Crickmore *et al.* 1998). Además de la banda de 130 kDa, la cepa control presenta otra banda importante a la altura de 65 kDa (Höfte & Whiteley 1989) que se asocia con un cristal cúbico que va adosado al bipiramidal (Figura 5, A-6 y B-3). Las proteínas que conforman este tipo de inclusión son denominadas Cry2 y se encuentran en el rango de 65- 71 kDa (Baum & Malvar, 1995). Esta banda está presente en varias de las muestras procesadas (Figura 5, A-1, A2, A3 y B-7, B-8, B-9), pero no se puede asegurar que dicha banda coincida con esta proteína, porque no se observó la forma del cristal para cada una de las cepas analizadas.

La abundancia de proteínas seguramente se debe a que la corrida se hizo a partir del complejo espora-cristal. Según Carmona e Ibarra (1999), las proteínas de bajo peso molecular podrían estar asociadas a proteínas de la cubierta de las esporas, porque el patrón de bandas es similar al que presentan cepas de *Bt* acristalíferas. Además, sugieren que las bandas presentes por debajo de 130 kDa podrían ser producto de la degradación de una proteína mayor.

Es importante señalar que las cepas CVCM1813 y CVCM1814, a pesar de dar positivas en la reacción de PCR para la identificación de los genes *cry1*, no mostraron la banda de 130 kDa que identifica al producto de dichos genes. Las cepas con actividad tóxica frente al orden Lepidoptera se caracterizan por la presencia de un cristal bipiramidal, el cual está constituido por proteínas de peso molecular de 125 a 140 kDa. En el caso de la cepa *Btk*, utilizada en la formulación de DiPel®8L, el cristal está conformado por proteínas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac, de pesos 133,2; 131,0 y 133,3 kDa, respectivamente (Whiteley & Schnepf 1986). En este sentido, se puede mencionar que la técnica de PCR no distingue entre genes silentes y genes expresados, y ésta puede ser una de las razones por la cual no se observa la proteína en el análisis SDS-PAGE.

caracterizados genéticamente; de ellos, dos cepas (CVCM1813 y CVCM1814) presentaron al gen *cry1*, el cual tiene propiedades tóxicas para algunos lepidópteros.

En la evaluación del patrón de proteínas, la cepa CVCM1812 fue la única que presentó una banda de 130 kDa, la cual coincidió con la proteína perteneciente al

grupo de proteínas Cry1, con actividad insecticida contra lepidópteros.

Se considera importante realizar bioensayos para evaluar la actividad entomopatógena de los 14 aislados con *Bt* frente las larvas de *H. metabus*. Sin embargo, como consecuencia de la súbita reducción de las poblaciones de *H. metabus* en la región nororiental del país ha sido prácticamente imposible recolectar larvas para tal fin. Se pretende hacer las evaluaciones de las cepas autóctonas al momento de presentarse nuevos brotes de esa polilla.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Dr. Artiom Carmona, Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Centroccidental «Lisandro Alvarado», Barquisimeto, estado Lara, por facilitar las cepas usadas como controles en este estudio. Al personal del Laboratorio de Procesos Fermentativos, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, por su incondicional dedicación.

BIBLIOGRAFÍA

- Ananda P, Sharma R & V Malik (1996) The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Advances in Applied Microbiology* 42:1-43.
- Baum J & T Malvar (1995) Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology* 18:1-12.
- Bavykin S, Lysov Y, Zakhariyev V, Kelly J, Jackman J, Stahl D & A Cherni (2004) Use of 16S rRNA, 23S rRNA and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology* 42:3711-3730.
- Bravo A, Sarabia S, López L, Ontiveros H, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos F, Peña G, Núñez-Valdez M-E, Soberón M & R Quintero (1998) Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4965-4972.
- Burges H (1982) Control of insects by bacteria. *Parasitology* 84:79-117.
- Carmona A (2002) Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioagro* 14:3-10.
- Carmona A & J Ibarra (1999) Expression and crystallization of a Cry3Aa-Cry1Ac chimerical protein of *Bacillus thuringiensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:455-463.
- Cerón J, Covarrubias L, Quintero R, Ortiz A, Ortiz M, Aranda E, Lina & A Bravo (1994) PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:353-356.
- Cerón J, Ortiz A, Quintero A, Güereca L & A Bravo (1995) Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3826-3831.
- Crickmore N, Zeigler D, Feitelson J, E Schnepf E VJ, Lereclus D, Baum J & D Dean (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62:807-813.
- Chak K, Chao D, Tseng M, Kao S, Tuan S & T Feng (1994) Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2415-2420.
- Chilcott C & P Wigley (1993) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:244-247.
- González JJ & B Carlton (1980) Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 92-98.
- González JJ, Dulmage H & B Carlton (1981) Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 5:351-365.
- Hansen B, Damgaard P, Eilenberg J & J Pedersen (1998) Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:106-114.
- Henderson A, Dongzheng Y & P Turnbull (1995) Differentiation of *Bacillus anthracis* and other 'Bacillus cereus group' bacteria using IS231-derived sequences. *FEMS Microbiology Letters* 128:113-118.
- Höfte H & H Whiteley (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53:242-255.
- Hossain M, Ahmed S & S Hoque (1997) Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. *Journal of Invertebrate Pathology* 70:221-225.
- Ibarra J & B Federici (1986) Parasporal bodies of *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* (PG-14) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* are similar in protein composition and toxicity. *FEMS Microbiology Letters* 34:79-84.
- Kaelin P & F Gadani (2000) Occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cured tobacco leaves. *Current Microbiology* 40:205-209.
- Laemmli U (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lecadet M, Chaufaux J, Ribier J & D Lereclus (1992) Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Applied and Environmental Microbiology* 58:840-849.
- Lu J, Perng C, Lee S & C Wan (2000) Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 38:2076-2080.
- Martin P & R Travers (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied Environmental Microbiology* 55:2437-2442.

- Monnerat R, Ferreira S, Silva-Werneck J & J Cabral (2001) Métodos de coleta, isolamento, caracterização e armazenamento de estirpes de *Bacillus sphaericus*. *Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica* 9. 4 pp.
- Nicholls C (2008) Enemigos naturales: bacterias. En: Nicholls C (Ed) *Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico*. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 112- 122. <http://books.google.co.ve/books?id=LPwcidQx3TkC&pg=PA51&dq=control+biologico+de+insectos:+bun+enfoque+agroecologico&cd=1#v=onepage&q&f=false>. Revisado el 14 de febrero de 2010.
- Porcar M & P Caballero (2000) Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *Journal of Applied Microbiology* 89:309-316.
- Porcar M & V Juárez-Pérez (2004) Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. En: Bravo A & Cerón J (Eds) *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. Editorial Buena Semilla. Bogotá, Colombia. 151-176 pp.
- Schnepf H & H Whiteley (1981) Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. USA* 78:2893-2897.
- Siegel J (2000) Bacteria. En: Lacey L & Kaya H (Eds) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers. 209-230 pp.
- Silva-Werneck J & R Monnerat (2001) Metodologías para la caracterización de aislados de *Bacillus thuringiensis*. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico*. 4 pp.
- Tanada Y & H Kaya (1993) *Insect Pathology*. Academic Press, Inc. San Diego, Londres, New York. 666 pp.
- Travers R, Martin P & C Reichelderfer (1987) Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 53:1263-1266.
- Uribe D (2004) Ecología y Distribución de *Bacillus thuringiensis*. En: Bravo A & Cerón J (Eds.) *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. Editorial Buena Semilla. Bogotá, Colombia. 101-122 pp.
- Vitelli-Flores J, Gajardo R, Lage L, Fajardo Y, Dorta B & V Rodríguez-Lemoine (2010) Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 30: 90-96.
- West A, Burges H, Dixon T & C Wyborn (1985) Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 17:657-665.
- Whiteley H & H Schnepf (1986) The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology* 40:549-576.
- Wilson G & T Benoit (1993) Alkaline pH activates *Bacillus thuringiensis* spores. *Journal of Invertebrate Pathology* 62:87-89.
- World Health Organization (1985) Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: United Nations Development Programme/World Health Organization. 24 pp.

Primer reporte de un hongo entomopatígeno sobre *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae)

Roxana Gajardo*¹, Domenico Pavone², Frances Osborn³
y Blas Dorta¹

¹Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental (IBE), Laboratorio de Procesos Fermentativos, Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas, Venezuela.

²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

³Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela.

*roxana.gajardo@ciens.ucv.ve

Resumen

Los hongos entomopatígenos son microorganismos que pueden causar importantes mortalidades en las poblaciones de insectos. Algunos de ellos han sido desarrollados como controladores biológicos de plagas. En diferentes localidades del golfo de Paria, estado Sucre, Venezuela, se observaron focos de infección de larvas y pupas de *Hylesia metabus*, momificadas por el micelio de un hongo de color blanquecino. Algunas de estas larvas se recolectaron en el caño Ajíes y se procedió a la aplicación de los postulados de Koch para la determinación del agente causal de la muerte de las larvas. Trozos de micelio blanco provenientes de las larvas muertas fueron inoculados en placas con medio ANDP suplementado con amoxicilina y ampicilina (1 mg/ml). Para la identificación del aislado, se procedió a la revisión de las características morfológicas y a la amplificación de los espaciadores transcritos internos del ADN ribosómico. Un grupo de larvas sanas del quinto instar de *H. metabus* fueron inoculadas con una suspensión de esporas (10^8 esporas/ml) del aislado obtenido. Al cabo de siete días, el aislado causó un 65 % de mortalidad en la población tratada, a diferencia del control, que no presentó mortalidad. Finalmente, se procedió al aislamiento de los hongos de las larvas utilizadas en los bioensayos. En los aislados obtenidos inicialmente y en los obtenidos de las larvas inoculadas, la caracterización morfológica y molecular indicó que se trata de una cepa de *Beauveria bassiana* Vuillemin, 1912 (Bálsamo) Vuillemin. Los resultados de la identificación y de los bioensayos sugieren que el agente causal de la mortalidad observada naturalmente es el hongo entomopatígeno *B. bassiana*, el cual podría ser utilizado como alternativa de control de *H. metabus* en un programa de manejo integrado.

Abstract

First Report of an Entomopathogenic Fungus on *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae)

Entomopathogenic fungi are microorganisms that can represent a substantial mortality factor in insect populations, and several species have been developed as biological pest controls. Focal points of infection were

Palabras clave Key words

Beauveria bassiana, control biológico, identificación molecular.
Beauveria bassiana, biological control, molecular identification.

observed at several localities in the Gulf of Paria, where *Hylesia metabus* larvae and pupae were found mummified by the mycelium of a white fungus. Mummified larvae were collected from caño Ajíes and processed according to Koch's postulates in order to determine the causal agent for the larval mortality observed. Pieces of the white mycelium taken from the dead larvae were inoculated into petri dishes with ANDP medium supplemented with amoxiciline and ampiciline (1mg/ml). The isolate was identified by the examination of morphological characteristics and the amplification of the internal transcribed spacers of the ribosomal DNA. A group of healthy *H. metabus* fifth instars was then inoculated with a suspension of spores (10^8 spores/ml) from the isolate. After seven days the isolate had caused a mortality of 65 % of the population, whereas no mortality was observed in the control larvae. Finally, the fungi from the dead larvae were re-isolated. The morphological and molecular characteristics of the isolates obtained both from field collected larvae and inoculated larvae allowed us to identify the fungus as *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. We suggest that this entomopathogenic fungus could be used as an alternative control strategy within an integrated management programme of *H. metabus*.

PRESENTACIÓN

A partir de finales del siglo XIX ha habido un especial uso de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, en el control de larvas del coleóptero *Anisoplia austriaca* (Herbst, 1783) Endrödi 1957 (Metschnikoff 1879), ha habido un especial interés en el desarrollo de la patología de insectos, teniendo como una de sus metas principales el control biológico de plagas. Desde entonces, una extensa variedad de hongos, bacterias, virus y nemátodos han sido identificados como entomopatógenos, constituyendo los hongos el grupo prominente, pues se conocen más de 700 especies pertenecientes a más de 90 géneros, como agentes causales de infección (Alves 1986).

A diferencia de las bacterias, virus y nemátodos, los cuales deben ser ingeridos por el insecto para que la infección ocurra, los hongos entomopatógenos invaden normalmente a través de la cutícula, por lo que su acción se extiende a los estadios de desarrollo que no se alimentan (huevos, pupas) y también en aquellos adultos que, por sus prácticas alimentarias (succionadores), son difíciles de controlar vía la ingestión del agente. La infección se inicia con la adhesión y germinación de las esporas o conidias sobre la cutícula del insecto; un

proceso que requiere en muchos casos la presencia de una fuente de carbono exógena. En algunas especies puede observarse la formación de apresorios en la parte apical del tubo germinal. Estos son estructuras adhesivas, a partir de las cuales se origina una hifa afilada que rompe la cutícula de una célula epidérmica del huésped por punción (Alves 1986). El efecto mecánico de esta estructura, combinado con la acción de enzimas, tales como proteasas, quitinasas, lipasas, elastasas, etc. facilita la penetración del tubo germinativo hasta la cavidad general del cuerpo, donde ocurre la invasión de los distintos órganos y tejidos. Esta fase de la infección va acompañada de la producción de toxinas y metabolitos de bajo peso molecular con actividad insecticida, los cuales, conjuntamente con el bloqueo mecánico del aparato digestivo, causado por el crecimiento vegetativo y otros daños físicos (acción histolítica), conducen a la muerte del insecto. Seguidamente las hifas comienzan a emerger por los espiráculos y regiones intersegmentales, para dar lugar a un abundante crecimiento y esporulación sobre la superficie del insecto. Las esporas así producidas pueden ser descargadas al ambiente e iniciar un nuevo ciclo de infección.

Los hongos entomopatógenos pueden sobrevivir saprofiticamente en el suelo por largos períodos y dispersarse desde los cadáveres que tienen el hongo sobre su cutícula (Alves 1986), pero además puede propagarse pasivamente por la acción de insectos parasitoides y depredadores (Bruck & Lewis 2002; Meyling & Eilenberg 2006b), o por el aire o por agua (Lecuona & Alves 1996). Estos agentes entomopatógenos también pueden estar presente de forma natural en la superficie de las plantas (Meyling & Eilenberg 2006a).

El uso eficiente de hongos entomopatógenos en el control de insectos plaga depende de su capacidad para generar epizootias, entendidas éstas como la diseminación epidémica del hongo sobre la población de la plaga a partir de los llamados focos de infección. Tanto en ecosistemas naturales como en agroecosistemas, estos focos están constituidos principalmente por insectos muertos debido a la acción del hongo, con una densa capa de micelio y esporas recubriendo sus cuerpos. Sin embargo, se pueden generar focos de infección a partir del desarrollo saprofito del hongo sobre el material vegetal en descomposición que se acumula en los suelos.

La generación de epizootias por hongos entomopatógenos, además de ser altamente dependiente de la densidad poblacional de la plaga y de la presencia de focos de infección, es condicionada por un conjunto de propiedades adicionales inherentes al hongo, como lo son: 1) la capacidad de las esporas para germinar sobre la cutícula del insecto, penetrar a su interior y llevar a cabo su desarrollo in vivo; 2) los mecanismos químicos defensivos de los insectos que impiden la germinación de las esporas y la emisión del apresorio; 3) la capacidad de las esporas para dispersarse dentro del ecosistema; 4) su estabilidad en el ambiente; es decir, resistencia a condiciones ambientales adversas como por ejemplo, una alta incidencia de radiación UV, cambios bruscos de temperatura y humedad relativa; y 5) la estabilidad frente a otros agentes de control, principalmente químicos.

A continuación se señalan los principales géneros de hongos utilizados como controladores efectivos de plagas de insectos (Tanada & Kaya 1993; Lecuona & Alves 1996; Berlioz 2002).

Beauveria: La especie cosmopolita más importante de este género es *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912. Ataca a diversas especies de insectos, principalmente de los órdenes Lepidoptera, Coleop-

tera y Hemiptera, pero también ocurre en Diptera, Isoptera e Hymenoptera. En Venezuela ha sido utilizada para controlar el picudo del algodón, *Anthonomus grandis* Boheman, 1843; la broca del tabaco, *Faustinus apicales* Faust, 1896; la broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867; el gorgojo del plátano, *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824; comejenes y bachacos, entre otros.

Metarhizium: La especie principal para el control de insectos plaga es *M. anisopliae*, la cual tiene un rango de hospederos casi tan amplia como *B. bassiana*. En Venezuela se ha utilizado mayormente para el control de *Aeneolamia varia* Fabricius 1787 (Hemiptera), en la caña de azúcar y otros hemípteros plagas de frutales.

Nomuraea: *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson 1974 ataca diferentes especies de lepidópteros, entre ellos las plagas noctuídas *Heliothis zea* (Boddie, 1850) (maíz), *H. virescens* Fabricius, 1777 (algodón) y *Trichoplusia ni* Hübner, 1803 (repollo) y al menos dos especies de coleópteros (*Hypera punctata* Fabricius, 1775 y *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824).

Paecilomyces: Varias especies de *Paecilomyces* han sido aisladas de insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Neuroptera, Hymenoptera, Thysanoptera y Homoptera. En Venezuela es utilizada principalmente para el control de las moscas blancas *Bemisia* spp., que son plagas del tabaco.

Lecanicillium = *Verticillium*: Las especies de hongos de este género parasitan especies de diversos órdenes de insectos e incluso ácaros. *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann 1898) Zare & W. Gams 2001, ha sido utilizada de manera comercial para controlar los insectos escama y áfidos (Homoptera).

En el golfo de Paria, en la región nororiental de Venezuela, se registran ciclos de proliferación de la polilla *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]), vulgarmente conocida como la «palometa peluda». La región está caracterizada por la predominancia del mangle rojo *Rhizophora mangle* L. y tiene una temperatura promedio anual entre 25 y 27 °C y humedad relativa entre 80 y 90 % (Delgado *et al.* 2000), las cuales son condiciones de humedad y temperatura propicias para el desarrollo de micosis por parte de hongos entomopatógenos sobre esta plaga. Así mismo, el comporta-

miento gregario de las larvas, las cuales se mantienen en íntimo contacto por períodos prolongados, facilita la diseminación de las esporas entre ellas, una vez iniciado un ciclo de infección, lo que puede contribuir a la generación de la epizootia.

Al respecto, se han registrado porcentajes de mortalidad natural en las poblaciones de *H. metabus*, causados por uno o más especies de hongos entomopatógenos. En enero de 2006, en el caño Ajíes, municipio Benítez, estado Sucre, se observó un 100 % de larvas y pupas momificadas ($n > 500$), como resultado de infección por un micelio de un hongo de color blanco (observación personal). Algunas de estas larvas y pupas se recolectaron con el fin de identificar al agente responsable de la infección. Además, en febrero de este mismo año, se registraron niveles de infección micótica de entre 22 y 100 %, en una población total de 850 individuos,

en diversas localidades de manglar en los municipios Benítez y Cajigal.

A raíz de lo anteriormente señalado y como un aporte a la salud pública de la región nororiental de Venezuela, donde *H. metabus* es responsable de gran cantidad de casos de dermatitis severa y afecciones respiratorias en sus pobladores, el Laboratorio de Procesos Fermentativos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, en el marco del Proyecto Reto *Hylesia metabus*, realizó el aislamiento selectivo y caracterización genético-molecular de hongos entomopatógenos, teniendo como meta su utilización como agentes de biocontrol de esta plaga.

En este capítulo se presenta la primera evidencia de un hongo patógeno de *H. metabus* y se discute sobre su posible participación en el control de esta polilla en condiciones naturales en ecosistemas de manglares de la península de Paria, estado Sucre, Venezuela.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Material biológico

A partir de larvas y pupas de *H. metabus* momificadas recolectadas en el caño Ajíes (CA1) (Lat. N 10° 27' 44,5"; Long. O 63° 03' 29,4") del golfo de Paria, estado Sucre, se procedió a la siembra de trozos de micelio y esporas en placas con medio agar nutritivo dextrosa papa (ANDP), suplementado con amoxicilina (1 mg/ml). Las placas fueron incubadas a 25 ± 2 °C en luz artificial continua durante siete días. Cada aislado fue procesado para obtener un cultivo monospórico del mismo. Suspensiones diluidas de cada uno fueron sembradas en agar agua, incubando las placas durante 24 horas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico a una magnificación de 20X, se seccionaron trozos de agar con una única spora germinada, la cual fue colocada en el centro de una placa de ANDP. Los aislados fueron depositados en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), con sede en el Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Caracterización de los aislados

Para la caracterización morfológica preliminar se realizaron montajes de los aislados en láminas portaobjetos para la observación al microscopio de estructuras caracte-

rísticas (conidióforos, células conidiogénicas, conidios, etc.). Para la identificación molecular se analizaron las secuencias de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) del ADN ribosómico (ADNr), utilizando el Programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.* 1990), disponible en línea (www.ncbi.com).

Extracción del ADN

A partir de placas con PDA con cultivos monospóricos de los aislados se obtuvo una muestra de micelio para la extracción de ADN geonómico, utilizando la metodología descrita por Aljanabi & Martínez (1997). El micelio fue homogeneizado en 400 μ l de búfer de extracción (Tris-HCl 10 mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20 mM; pH 8,0) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Seguidamente, fueron agregados 40 μ l de SDS al 20 % y 8 μ l de Proteinasa K a 20 mg/ μ l. Los tubos fueron incubados durante una hora a 60 °C, añadiéndose posteriormente 300 μ l de una solución 6 M de NaCl. Cada tubo fue agitado en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y luego centrifugado a 10000 rpm durante 20 minutos. Se transfirieron 700 μ l del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf, al que se le agregó posteriormente el mismo volumen de

isopropanol puro, agitándose suavemente por inversión e incubándose a -20 °C durante una hora. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm por 20 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con etanol al 70 %. El precipitado seco fue resuspendido en 50 µl agua ultrapura estéril y mantenido a -20 °C.

Amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr

A partir del ADN extraído se procedió a amplificar por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr. Para cada reacción de PCR se utilizó un volumen final de 25 µl de la mezcla de reacción, conteniendo: búfer T 5x 2,5 µl; MgCl₂ (25 mM) 1,5 µl, dNTP (10 mM) 1,5 µl; iniciador ITS1 (sentido): 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGT-3' (0,2 mM) 0,75 µl; iniciador ITS4 (antisentido): 5'-TCCTCGCTTATTGATATGC-3' (0,2 mM) 0,75 µl; 0,5 µl Taq DNA polimerasa (5U/µl) en 12,5 µl de agua ultrapura estéril. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Modelo Icyler®, BIORAD, bajo las siguientes condiciones: 94 °C durante 5 minutos; 45 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto. Finalmente se realizó una extensión a 72 °C durante 10 minutos. Las amplificaciones fueron verificadas en un gel de agarosa al 1 %. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el *kit* AxyPrep® PCR Clean-Up, Axygen Biosciences.

Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR purificados fueron enviados para su secuenciación a la Unidad de Estudios Ge-

néticos y Forenses (UEGF) del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Para la PCR de secuenciación se preparó una mezcla de 10 µl finales con 20 ng del templado y 10 pmol del iniciador ITS1. Posteriormente, se agregaron 4 µl de mezcla de reacción (BygDye® Terminator 3.1, Applied Biosystem) con solución búfer y una mezcla de ddNTPs y dNTPs, completándose el volumen con agua de grado biología molecular. Las muestras preparadas fueron sometidas a 25 ciclos de PCR (98 °C durante dos minutos; 55 °C durante un minuto y 60 °C durante cuatro minutos). Finalmente, el ADN purificado y disuelto en formamida fue procesado en un secuenciador automático modelo ABI 3130xl (Applied Biosystem).

Bioensayos

Con el propósito de evaluar la patogenicidad del aislado, se realizaron bioensayos con larvas sanas del quinto instar de *H. metabus* en condiciones de laboratorio, provenientes del golfo de Paria, estado Sucre. Se preparó una suspensión de esporas del hongo en Tween 80 al 0,1 % en agua destilada estéril. Con esta suspensión se inocularon discos de hojas de *Hura crepitans* L. (jaballo) de 7 cm², previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3 %. El volumen de suspensión utilizado para la inoculación fue de 100 µl con una concentración de 10⁸ esporas/ml. Cada disco fue colocado en un recipiente de plástico estéril de 30 ml de capacidad junto con una larva sana. Se utilizaron 25 larvas por tratamiento con tres réplicas. La evaluación de la mortalidad se realizó diariamente durante siete días. Tratamientos con agua y con solución de Tween al 0,1 % sin inóculo, ambos estériles, sirvieron como controles del experimento.

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el mes de enero de 2006, se detectó en la localidad del caño Ajíes, estado Sucre, Venezuela, la presencia de larvas muertas de *H. metabus*, probablemente debido a la acción de un hongo entomopatógeno. Las larvas recolectadas estaban recubiertas por un micelio blanquecino (Figura 1), el cual es típico en los estados de momificación de insectos por hongos entomopatógenos. Los aislados obtenidos a partir de estas larvas fueron sometidos a una caracterización morfológica y molecular.

La estructura compleja del bosque de mangle propicia un ambiente idóneo para el establecimiento de un proceso epizoótico por parte de agentes entomopatógenos (Medina & Barboza 2003). Este tipo de vegetación que se extiende desde el golfo de Paria, en el estado Sucre, hasta los estados Monagas y Delta Amacuro, en el oriente de Venezuela, constituye el hábitat natural de *H. metabus*. Las altas densidades poblacionales de *H. metabus* hacen que la colonización por parte de estos agentes se vea favore-



Figura 1. Larva de *Hylesia metabus* momificada por la presencia de un hongo.

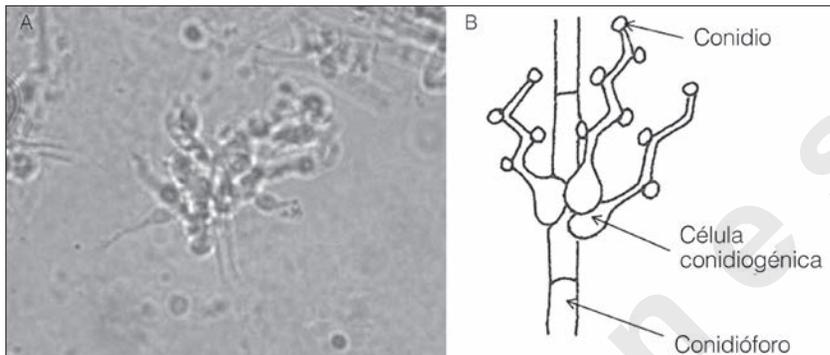


Figura 2. Estructura del hongo aislado. A) micrografía de microscopio de contraste de fases 20X. La caracterización morfológica del hongo aislado se realizó con la clave de Samson *et al.* (1988). B) Esquema de las estructuras del hongo *Beauveria bassiana* (Tomado de Alves, 1986). Las observaciones al microscopio evidenciaron células conidiogénicas usualmente agrupadas y sin color, siendo globosas en la base (en forma de botella) y denticuladas en el ápice o raquis.

```

TTGGTGACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTCAACTCCCTAACCCCTTCT
GTGAACCTACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCCCGGACGCGG
ACTGGACCAGCGGCCCGCCGGGACCTCAAACCTTGTATTCCAGCATCTT
CTGAATACGCCGCAAGGCAAACAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGAT
CTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGT
GAATTGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG
CCAGCATTCTGGCGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTCAACCTCGACCT
CCCCTGGGGGAGGTCGGCGTTGGGGACCGGCAGCACACCGCCGGCCCT
GAAATGGAGTGGCGGCCCTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGTAATACAGCT
CGCACCGGAACCCCGACGCGGCCACGCGTAAACACCCAACCTTCTGAAC
GTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGC
GGAGGA

```

Figura 3. Secuencia nucleotídica del producto de PCR de los espaciadores transcritos internos del ADNr de CA1.

cida ya que una agrupación de larvas puede estar compuesta de varias decenas de éstas. Así, el comportamiento gregario del estadio larval de *H. metabus* promueve el establecimiento epizoótico de agentes entomopatógenos.

El contacto físico entre las larvas favorece la transmisión directa y horizontal desde un hospedero enfermo hacia otro sano y susceptible. Durante la fase larval de su ciclo de vida, la de mayor duración, con una media de 60 días, *H. metabus* se alimenta de las hojas de mangle, donde el agente entomopatógeno podría estar asociado saprofiticamente, como se ha reportado para otras especies de plantas (Elliot *et al.* 2000; Wagner & Lewis 2000; Meyling & Eilenberg 2006a; Akello *et al.* 2007). El consumo de las hojas del manglar contaminado con el inóculo del agente entomopatógeno pudo haber sido el inicio de la actividad patogénica del microorganismo.

La caracterización morfológica del hongo aislado de las larvas de *H. metabus*, se realizó utilizando la clave de Samson *et al.* (1988), tomada de Humber (1997). Las observaciones al microscopio evidenciaron células conidiogénicas usualmente agrupadas y sin color, siendo éstas globosas en la base, en forma de botella, y denticuladas en el ápice o raquis (Figura 2). De esta forma, las observaciones de las características de la larva momificada de la colonia fúngica en placas de ANDP y de las estructuras microscópicas, indican que podría tratarse del hongo entomopatógeno *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales). Este es un hongo anamórfico, que forma una densa cobertura blanca sobre el exoesqueleto del hospedero (Tanada & Kaya 1993).

Además, los resultados del análisis de las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr, confirmaron la identificación preliminar a partir de la secuencia nucleotídica (Figura 3). Al realizar la alineación de la secuencia obtenida con las depositadas en la base de datos, se encontró una coincidencia de bases del 99 % con secuencias de *B. bassiana*. Las regiones ITS son utilizadas para la identificación de hongos a nivel de especies (Tkacz & Lange 2004), debido al polimorfismo que presenta ya que estas regiones tienen mayor variabilidad que por ejemplo, las regiones 28S y 18S del ADNr (White *et al.* 1990).

El hecho de haber aislado un hongo entomopatógeno a partir de las larvas momificadas no es una confirmación de que este hongo haya sido el causante de

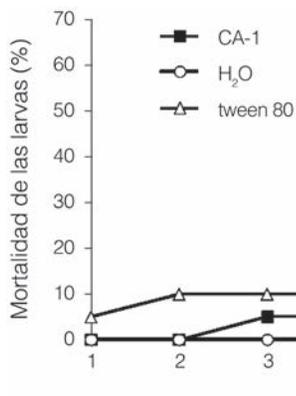


Figura 4. Mortalidad acumulada de larvas del 5º instar de *Hylesia metabus* tratadas con hojas de *Hura crepitans* en presencia de los hongos CA1 a una concentración de 10^8 esporas/ml. $n=20$ para cada ensayo (prueba de χ^2 , $p < 0,05$).

la mortalidad observada. Para corroborar esto, deben confirmarse los postulados de Koch. Habiéndose identificado el aislado fúngico obtenido a partir del material original, se deben reproducir los mismos síntomas de las larvas encontradas en la naturaleza e identificar de éstas al mismo agente causal inicial. Así, el aislado de *B. bassiana* (CA1) causó una mortalidad de 65 % en un período de siete días de bioensayo, valor significativamente mayor al encontrado en los tratamientos controles con agua y solución de Tween 80 (0,1 %) (prueba de χ^2 , $p <$

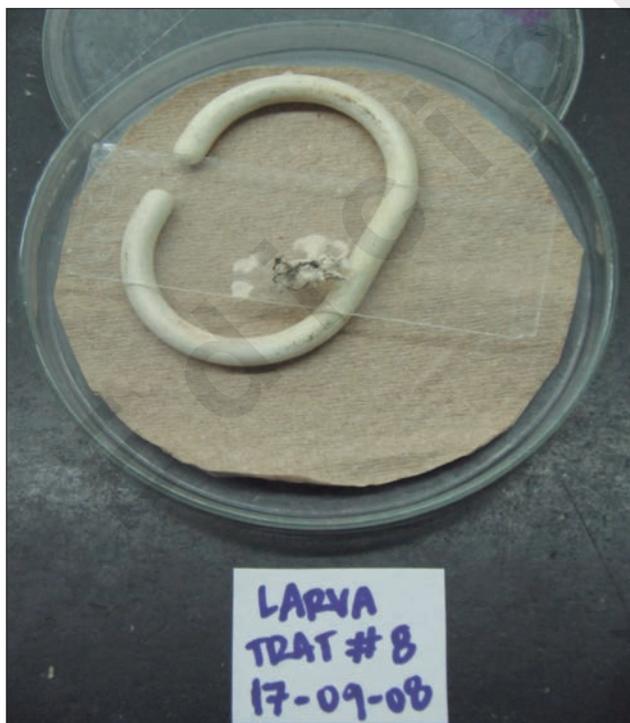


Figura 5. Larva de *Hylesia metabus* momificada luego de ser sometida a tratamiento con el hongo CA1.

0,05) (Figura 4). Las larvas muertas por el aislado CA1 en los bioensayos de laboratorio presentaron las mismas características que las encontradas en la zona de estudio (Figura 5). La caracterización tanto morfológica como molecular, evidenciaron que se trata del mismo aislado, lo que permite confirmar que *B. bassiana* es, en efecto, el hongo patógeno responsable de la mortalidad observada en las larvas y pupas de *H. metabus*.

B. bassiana es un hongo patógeno de muchas especies pertenecientes a distintos órdenes de insectos (Tanada & Kaya 1993). Esta característica ha hecho que el uso de *B. bassiana* en formulaciones comerciales sea considerado como una estrategia en el control de plagas. Por ejemplo: ensayos de campo en casas rurales en Argentina, infestados con el triatomino *Triatoma infestans* Klug 1834 (Hemiptera), vector de *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, arrojaron una mortalidad de 52,4 % de los mismos mediante trampas de atracción-infección cebadas con *B. bassiana* (Pedrini *et al.* 2009). En Venezuela, una formulación comercial de *B. bassiana* causó una mortalidad de 98,34 % del picudo de la batata, *Cylas formicarius elegantulus* Fabricius 1798 (Coleoptera), en condiciones de laboratorio (Alcalá de Marcano *et al.* 1999). Experimentos con diferentes cepas de *B. bassiana* causaron mortalidades de hasta 93 % en la broca del café (*H. hampei*, Coleoptera) en condiciones de laboratorio en Colombia (Cruz *et al.* 2006) y hasta 43 % en condiciones de campo en Chiapas, México (De la Rosa *et al.* 2000). En Trujillo, Venezuela, la aplicación de *B. bassiana* durante el proceso de fructificación del café contribuyó a mantener los niveles de infestación de la broca por debajo del 5 % (Montilla *et al.* 2006).

B. bassiana también puede ser utilizado en combinación con otros métodos de control biológico. La aplicación de *B. bassiana* junto con el nemátodo *Steinernema carpocapsae* Weiser 1955, produjo 100 % de mortalidad en la polilla *Indarbela dea* Swinhoe 1890, una plaga de litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) en Asia (Schulte *et al.* 2009). Cuando se utilizó en conjunto con *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* Berliner 1911, produjo mortalidades de hasta 52 % en la mosca doméstica en galpones avícolas (Mwamburi *et al.* 2009). Por otro lado, Cova *et al.* (2009) obtuvieron mortalidades de 100 % luego de tres semanas de nebulización en galpones avícolas en Trujillo, Venezuela, aplicando solamente este hongo. Sin embargo, cuando se utilizó *B. bassiana* en conjunto con el Neem a concentraciones mayores que 0,25 % para el control del áfido *Lipaphis erysimi* Kalténbach 1843, se

demonstró que el crecimiento de la colonia o la viabilidad de las esporas podrían estar negativamente afectados (De Araujo *et al.* 2009).

No obstante, como ya se ha mencionado, *B. bassiana* ataca especies de insectos de muchos órdenes, entre ellos algunos que podrían ser beneficiosos para el hombre. *B. bassiana* produjo un 100 % mortalidad en los estados inmaduros de la avispa *Phymastichus coffea* La Salle 1990, parasitoide de *H. hampei*, además causó una reducción de 22 % en la longevidad del adulto (Castillo *et al.* 2009). En condiciones de laboratorio, una formulación comercial de

B. bassiana causó una mortalidad de 92 % en obreras de la abeja *Bombus terrestris* Linnaeus 1758 (un polinizador importante), luego de 11 semanas a la máxima dosis recomendada en el campo por los fabricantes (MDRC), y 46 % de mortalidad a una dosis de 1/10 del MDRC luego del mismo período de tiempo (Mommaerts *et al.* 2009). Por lo tanto, el uso de *B. bassiana* como controlador biológico en ecosistemas naturales debe estar sujeto a una monitorización constante para poder estimar posibles efectos negativos sobre insectos no blancos, aun cuando sea autóctono del lugar donde se aplica.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia de un hongo entomopatógeno asociado a *Hylesia metabus*, identificado como *Beauveria bassiana*. Además, estos resultados demuestran la eficacia de este hongo entomopatógeno como factor de mortalidad para las larvas de *Hylesia metabus*. La identificación del agente causal de esta micosis representa el primer paso hacia una nueva forma de controlar esta importante plaga de salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- Akello J, Dubois T, Gold C, Coyne D, Nakavuma J & P Paru (2007) *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology* 96:34-42.
- Alcalá de Marcano D, Marcano J & M Morales (1999) Patogenicidad de *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* sobre adultos del picudo de la batata *Cylas formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae) *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 16:52-63.
- Aljanabi S & I Martínez (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692-4693.
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E & D Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Alves S (1986) Fungos Entomopatógenicos. En: Alves S (Ed.) *Controle Microbiano de Insectos*. Editora Manole. São Paulo, Brasil. 73-126 pp.
- Berlioz L (2002) *Aislamiento e identificación de microorganismos asociados a larvas de Hylesia metabus Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) y evaluación de su potencial entomopatógeno*. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 62 pp.
- Bruck D & L Lewis (2002) *Carpophilus freeman* (Coleoptera: Nitidulidae) as a vector of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 80:188-190.
- Castillo A, Gómez J, Infante F & F Vega (2009) Susceptibility of the parasitoid *Phymastichus coffea* La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) to *Beauveria bassiana* under laboratory conditions. *Neotropical Entomology* 38:665-670.
- Cova L, Scorza-Dagert J, García D, Cañizales L, Guédez C, Avendaño M & M Medina (2009) Efecto de *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii* en el control de moscas (*Musca domestica*) en condiciones de laboratorio y en galpones avícolas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 49:151-160.
- Cruz L, Gaitán A & C Góngora (2006) Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. *Applied Microbiology Biotechnology* 71:918-926.
- De Araujo J, Marques E & J V de Oliveira (2009) Potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates and neem oil to control the Aphid *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae). *Neotropical Entomology* 38:520-525.
- De la Rosa W, Alatorre R, Barrera J & C Toreillo (2000) Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *Journal of Economic Entomology* 93:1409-1414.
- Delgado L, Ramos S & E Gordon (2000) Modelo digital del terreno y procesamiento de imágenes digitales: herramientas para la detección de variables ambientales relacionadas con la Malaria en el estado Sucre, Venezuela. IX Simposio Latinoamericano de Percepción Remota, Memorias SELPER. Puerto Iguazú, Misiones. 848-856 pp.
- Elliot S, Sabelis M, Janssen A, L Van der Geest & J Franssen (2000) Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecology Letters* 3:228-235.
- Humber R (1997) Fungi: Identification. En: Lacey L (Ed) *Biological Techniques: Manual of Techniques in Insect Pathol-*

- ogy. (Biological Techniques Serie) Academic Press, Inc. San Diego. California. EE. UU. 153-185 pp.
- Lecuona R & S Alves (1996) Epizootiología. En: Lecuona R (Ed) *Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas*. Talleres Gráficos Mariano Mas. Buenos Aires, Argentina. 17-34 pp.
- Medina E & F Barboza (2003) Manglares del sistema del lago de Maracaibo: Caracterización fisiográfica y ecológica. *Ecotropicos* 16:75-82.
- Meyling N & J Eilenberg (2006a) Isolation and characterization of *Beauveria bassiana* isolates from phylloplanes of hedge-row vegetation. *Mycology Research* 110:188-195.
- Meyling N & J Eilenberg (2006b) Dispersal of *Beauveria bassiana* by the activity of nettle insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 93:121-126.
- Mommaerts V, Sterk G, Hoffmann L & G Smagghe (2009) A laboratory evaluation to determine the compatibility of microbiological control agents with the pollinator *Bombus terrestris*. *Pest Management Science* 65:949-955.
- Montilla R, Camacho B, Quintero A & G Cardozo (2006) Parasitismo por *Beauveria bassiana* sobre la broca del café, en el estado Trujillo, Venezuela. *Agronomía Tropical* 56:183-198.
- Mwamburi L, Laing M & R Miller (2009) Interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of house fly larvae and adults in poultry houses. *Poultry Science* 88:2307-2314.
- Pedrini N, Mijailovsky S, Girotti J, Stariolo R, Cardozo R, Gentile A & M Juárez (2009) Control of pyrethroid-resistant Chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3:e434.
- Samson RA, Evans HC & J-P Latgé (1988) *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag. Berlín, Nueva York. 187 pp.
- Schulte M, Martin K, Büchse A & J Sauerborn (2009) Entomopathogens (*Beauveria bassiana* and *Steinernema carpocapsae*) for biological control of bark-feeding moth *Indarbela dea* on field-infested litchi trees. *Pest Management Science* 65:105-112.
- Tanada Y & H Kaya (1993) *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, Londres, New York. 666 pp.
- Tkacz J & L Lange (2004) *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA. 474 pp.
- Wagner B & L Lewis (2000) Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Environmental Microbiology* 66:3468-3473.
- White T, Bruns T, Lee S & J Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M, Gelfand D, Shinsky J & White T (Eds) *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. New York, USA. 315-322 pp.

Primer reporte de un microsporidio parasítico en larvas de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae)

Frances Osborn

Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela.

fosborn2001@gmail.com

Resumen

Los microsporidios son protozoarios parasíticos que atacan distintos grupos de invertebrados y vertebrados, entre ellos los insectos. En el presente trabajo se reporta la presencia de un microsporidio en larvas de *Hylesia metabus*. Se recolectaron larvas del segundo estadio de este insecto en zonas de manglar en los alrededores de Yaguaraparo, estado Sucre, Venezuela. Las larvas se mantuvieron en recipientes plásticos de 15 x 30 cm, a razón de 50 larvas por recipiente y diariamente se alimentaron con hojas frescas de su planta hospedera, *Rhizophora mangle* L. Se anotaron las fechas de cambio de estadio de las larvas y la supervivencia de las mismas. De algunas larvas infectadas, se tomó un frotis del intestino y se montó con Bálsamo de Canadá para ser observado con un microscopio Zeiss. De otras larvas infectadas se extrajeron los intestinos medios, se cortaron en trozos de 1 mm y se prepararon para microscopía electrónica de transmisión. Las larvas infectadas, aunque siguieron alimentándose y aparentemente eran saludables, no cambiaron de estadio y eventualmente murieron. El microsporidio observado en los frotis e intestinos de las larvas tiene características similares a las del género *Orthosomella*: son un nucleares y aparecen en contacto directo con el citoplasma del hospedero, la espora es cilíndrica y el filamento polar es isofilar. Sin embargo, falta información sobre el tipo de esporogénesis en la especie nueva, lo que es un carácter diagnóstico para *Orthosomella*. Por lo tanto se propone que la especie sea designada como «cercana a» *Orthosomella* sp.

Abstract

First Report of a Parasitic Microsporidium in *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) Larvae (Lepidoptera: Saturniidae)

Microsporides are parasitic protozoans that attack many groups of invertebrates and vertebrates, including insects. In this study, a first report is made of a microsporidium from *Hylesia metabus* larvae. Second instars were collected from mangrove swamps close to the village of Yaguaraparo, Sucre State, Venezuela and maintained in plastic tubs 15 x 30 cm, with 50 larvae per tub. The larvae were fed daily with leaves from their host

Palabras clave Key words

Infección crónica, larvas, microsporidios, *Orthosomella*, Venezuela.
Chronic infection, larvae, Microsporidia, *Orthosomella*, Venezuela.

plant, *Rhizophora mangle* L. Moulting dates and survival were recorded daily. Smears of the intestines from infected larvae were taken, mounted on slides with Canada Balsam and observed with a Zeiss microscope. The middle intestines were extracted from other infected larvae, cut into 1 mm pieces and prepared for transmission electronic microscopy. Infected larvae, although they did not lose their appetite and were apparently healthy, did not moult and eventually died. The microsporidium observed in the smears and intestines of the larvae shares some characteristics with *Orthosomella*: they are uninuclear and in direct contact with the host cytoplasm, the spore is cylindrical and the polar filament is isofilar. Nevertheless, information about the type of sporogeny is lacking, which is diagnostic for *Orthosomella*. I therefore propose that the species be placed as “near” *Orthosomella* sp.

PRESENTACIÓN

Los microsporidios son protozoarios parasíticos que atacan diferentes grupos de insectos, además de otras especies de invertebrados y vertebrados. El primer caso de un microsporidio parasítico reportado fue *Nosema bombycis* (Kudo, 1916), aislado de larvas de *Bombyx mori* L., el gusano de seda (Nägeli 1857). Balbiani (1882) sugirió el nombre *Microsporidies* para ubicar a *N. bombycis*, el único microsporidio conocido para la época. En 1976, Sprague creó el phylum Microspora, el cual fue revisado y actualizado en 1992 (Sprague 1976; Sprague *et al.* 1992).

Los microsporidios tienen ciclos de vida que varían entre especies. Sin embargo, el ciclo de vida básico comprende una fase esporal infectiva. La espora normalmente entra al hospedero por el intestino, aun cuando se conoce la existencia de otras rutas de entrada. Una vez dentro del hospedero, el esporoplasma es liberado de la espora hacia una de las células del hospedero. En ésta, el esporoplasma comienza una fase de reproducción vegetativa (merogénesis) para producir células hijas (merozoitos), las cuales pueden repetir la merogénesis o entrar en otra fase, la esporogénesis, que resulta en la producción de las esporas (Vavra & Larsson 1999).

Los microsporidios generalmente causan enfermedades crónicas (actúan lentamente durante un periodo largo de tiempo). Los efectos externos pueden ser observados como cambios en el color, tamaño, forma o comportamiento comparados con individuos

sanos. Los microsporidios también afectan la longevidad (pueden alargar las fases larvales y reducir la fase de adulto) y la fertilidad y fecundidad del organismo (Becnel & Andreadis 1999). Los géneros de microsporidios reportados como parásitos de especies en el orden Lepidoptera son: *Cystosporogenes*, *Nosema*, *Orthosomella* y *Vairimorpha* (Undeen & Vávra 1997; Becnel & Andreadis 1999), de los cuales la especie *Nosema lymantriae* Weiser (1963) ha sido señalada como controlador biológico potencial de *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera), una plaga de los bosques de pinos en los Estados Unidos de América (Solter *et al.* 1997).

Por otro lado, el alargamiento del desarrollo de las larvas aumenta el tiempo disponible para que actúen otros controles biológicos. Por ejemplo, las larvas de *Lymantria dispar* (Lepidoptera) preinfectadas con el microsporidio *Nosema* sp. son más susceptibles a un patógeno viral que las larvas no infectadas (Bauer *et al.* 1998)

En el caso de *Hylesia metabus*, se han identificado diferentes especies de enemigos naturales, incluyendo depredadores como *Arilus cristatus* (Linnaeus, 1763), Hemiptera (Vásquez 1990, 1994); parasitoides (Hernández *et al.* 2009) y patógenos (Osborn *et al.* 2002; Gajardo *et al.* 2005a, b). En el presente capítulo se recopila la información sobre la presencia y los efectos de un microsporidio en larvas de *H. metabus*, el cual representa un control natural adicional que, a su vez, pudiera influir en la dinámica poblacional de esta importante plaga.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Se recolectaron larvas del segundo estadio de *H. metabus* en zonas de manglar, ubicadas en los alrededores de Yaguaraparo, municipio Cajigal, estado Sucre, Venezuela (Lat. N 10° 35'; Long. O 62° 43') y se trasladaron al Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA-UDO). Una vez allí, las larvas se colocaron en seis recipientes plásticos de 15 x 30 cm³, a razón de 50 larvas por recipiente, con hojas frescas de su planta hospedera *Rhizophora mangle* L. Cada día se revisaron los recipientes y se registró el número de larvas vivas, además se anotó la fecha de cambio de estadio (muda) de las mismas. Diariamente, se reemplazaron las hojas de *R. mangle* con hojas frescas y se removieron las larvas muertas.

De algunas larvas infectadas, se tomó un frotis del intestino sobre un portaobjeto y se dejó secar. Se montaron las muestras con Bálsamo de Canadá y se cubrieron con cubreobjetos limpios. Los microsporidios fueron observados con un microscopio Zeiss, modelo Axioscop.

Algunos intestinos de larvas infectadas se prepararon para ser examinados por medio de microscopía

electrónica de transmisión. Para ello, se extrajeron los intestinos medios, se cortaron en trozos de 1 mm y se sumergieron inmediatamente en prefijador fresco (glutaraldehído al 2,5 % y paraformaldehído al 1 %) en solución búfer fosfato, pH 7,2 y 260 mOsm/l. Después de tres lavados con solución búfer fosfato pH 7,2, se realizó una fijación posterior de los intestinos, en una solución de tetróxido de osmio (OsO₄) al 1 % en solución búfer fosfato durante 90 minutos, y luego los tejidos se lavaron en búfer fosfato tres veces. A continuación, se deshidrataron en una serie creciente de etanol (Stobbart & Shaw 1964; Crossley & Waterhouse 1969; Lu & Chow 1991). Posteriormente, las muestras fueron infiltradas con óxido de propileno, para luego ser incluidas en resina epóxica Polybed[®] 812, e incubadas a 60 °C por 48 horas. Se realizaron cortes ultrafinos, de 60-70 nm, con un ultramicrotomo Reichart-Jung, y se tiñeron con acetato de uranilo al 6 % por cinco minutos y citrato de plomo por tres minutos. Las observaciones y tomas fotográficas se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión, Hitachi H-600.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Según Vásquez (1990, 1994), las duraciones de los estadios larvales varían entre 7,7 y 9,3 días y se registraron siete instares. Sin embargo, en este estudio las duraciones promedio del quinto y sexto estadio de larvas infectadas fueron mucho mayores: 21 y 21,75 días respectivamente. Además, el séptimo estadio larval no se observó: las larvas se convertían en pupas después del sexto estadio.

En la Figura 1 se muestra la curva de supervivencia de las larvas y pupas de *H. metabus*. Se puede observar que la mayor tasa de mortalidad de las larvas ocurrió entre el quinto y el sexto estadio. Sin embargo, las larvas que sobrevivieron hasta el sexto estadio larval tenían una alta probabilidad de eclosionar como adultos.

La sintomatología observada en las larvas de *H. metabus* infectadas con los microsporidios es similar a la encontrada en otras especies de Lepidoptera

ra; es decir, un desarrollo prolongado de los estados inmaduros y una alta tasa de mortalidad (Becnel & Andreadis 1999). Los efectos de la infección en las larvas fueron más intensos en el quinto y sexto estadio, probablemente por el aumento progresivo en la abundancia de los microsporidios durante el desa-

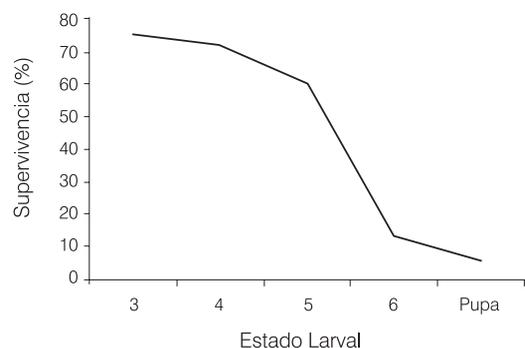


Figura 1. Curva de supervivencia de las larvas infectadas.



Figura 2. Preparaciones de los frotis en las que se muestran las esporas frescas.

rollo larval. Es interesante acotar que las larvas que sobrevivieron hasta la fase de pupa tenían una alta probabilidad de emerger como adultos y que el tiempo de pupación en las larvas infectadas fue similar a lo esperado para las larvas sanas de acuerdo a los resultados de Vásquez (1990, 1994).

En las preparaciones de los frotis, se pudo observar las esporas frescas de los microsporidios. Eran cilíndricas y midieron 3,9 a 4,7 μm de largo y 2,3 a 3,1 μm de ancho, $n = 50$ (Figura 2). A escala ultraestructural se pudo observar a los microsporidios

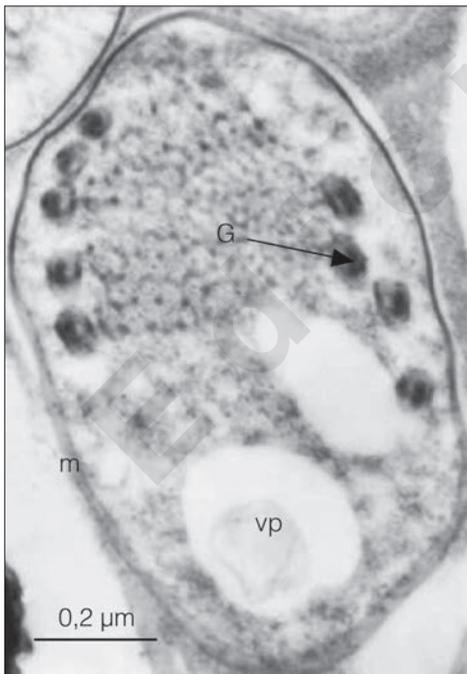


Figura 4. Detalle de un esporoblasto. m: membrana, G: aparato de Golgi, vp: vacuola posterior, flecha: anillo del tubo polar.

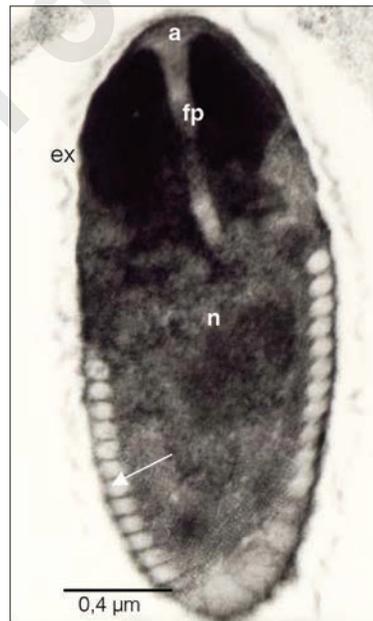


Figura 5. Detalle de una espora madura. ex: exospora, fp: filamento polar, a: disco de anclaje, n: núcleo, flecha: anillo del filamento polar.

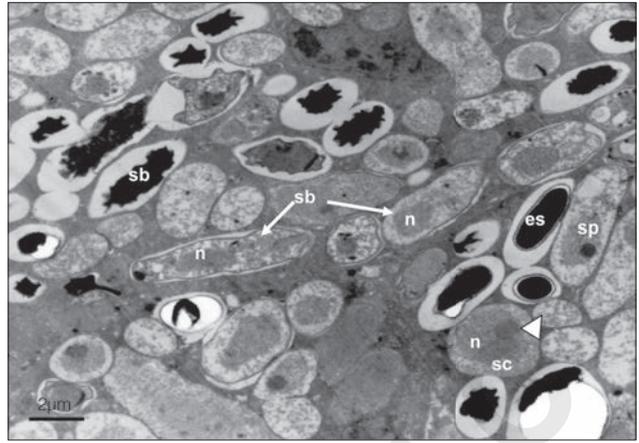


Figura 3. Vista general de las diferentes etapas de desarrollo del microsporidio, sc: esquizonte, n: núcleo, Δ : nucleolo, sp: esporonte, sb: esporoblasto, es: espora.

en diferentes etapas de desarrollo (esquizontes, esporontes y esporoblastos) (Figura 3), los cuales estaban en contacto directo con el citoplasma. Los esquizontes eran uninucleares con un nucleolo bien definido y un citoplasma denso. Los esporontes también presentaron un nucleolo pero el citoplasma presentaba menos densidad electrónica. Los esporoblastos tempranos se distinguían de los esquizontes y esporontes en que la membrana estaba separada del citoplasma del hospedero y no presentaban un nucleolo. Algunos de estos esporoblastos presentaron un filamento polar

de hasta cinco anillos, dentro del cual se pudo observar un aparato de Golgi (Figura 4). En uno de los esporoblastos se pudo observar un aparato de anclaje primordial, el cual afinca el filamento polar a la espora (Figura 3). Los esporoblastos maduros presentaban alta densidad electrónica, con un aspecto crenado (Figura 3). En la Figura 5 se muestra una espora madura, cuya membrana está compuesta de tres capas: una exospora ondulante de grosor variable, una endospora translúcida y una membrana. El disco de anclaje midió 0,18 μm en la base. La espora era uninuclear, con un filamento polar isofilar, de 12 anillos de 0,06 μm de diámetro. La vacuola posterior era pequeña e indistinta.

El microsporidio descrito aquí no se corresponde con los géneros de microsporidios parasíticos más comunes en Lepidoptera, *Nosema* Naegeli, 1857 y *Vairimorpha* Pilley, 1976, debido a que éstos tienen núcleos diplocarióticos en todas las etapas de desarrollo (Undeen & Vávra 1997; Canning *et al.* 1999). Sin embargo, tiene características similares a las del género *Orthosomella* (Canning, Wigley & Barker, 1991); estas son: un solo núcleo en los esquizontes, esporontes y esporas, una spora madura de forma cilíndrica, un filamento polar isofilar y el microsporidio en contacto directo con el citoplasma del hospedero (no tiene vesícula esporífera) e infecta a los tejidos del intestino (Canning *et al.* 1985). El género *Cystosporogenes* también comparte algunas de las características mencionadas, pero éste tiene como carácter diagnóstico la presencia de una vesícula esporífera, la cual no aparece en la especie aquí estudiada (Canning *et al.* 1985).

A pesar de que las características compartidas con el género *Orthosomella*, hay algunas dudas que llevan a que la ubicación de esta especie sea sólo tentativa. No hay información sobre el tipo de esporogénesis en la especie nueva, lo que es un carácter diagnósti-

co de este género, el cual desarrolla una esporogénesis polisporoblástica y monofiliforme; es decir, los esporontes se dividen varias veces en forma de una cadena para después desarrollarse en esporoblastos (Canning *et al.* 1985). Además, otros caracteres ultraestructurales, como por ejemplo la presencia de una membrana con alta densidad electrónica que cubre los esquizontes está presente en *O. operophtherae* (la especie tipo) (Canning *et al.* 1985), pero no en esta especie, aunque otros autores han sugerido que éste no debe considerarse un carácter diagnóstico (Andreadis *et al.* 1996).

En general, la taxonomía de los microsporidios parasíticos de los insectos es una disciplina todavía muy joven y hay pocos reportes sobre estos organismos, especialmente de los lepidópteros. Debido a ello, las descripciones de los géneros se basan en muy pocas especies, y están en continua revisión. Por lo tanto, se propone que la nueva especie sea colocada tentativamente como una especie cercana a *Orthosomella* sp. Sin embargo, debido a que éste es el primer reporte de un microsporidio de una especie de Lepidoptera en Venezuela y la primera descripción de un microsporidio en larvas de *H. metabus*, es probable que represente una nueva especie para la ciencia.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se reporta por primera vez la presencia de un microsporidio en las larvas de *H. metabus*, el cual pudiera tener un efecto sobre las poblaciones de esta plaga en conjunto con otros enemigos naturales. Es importante que cualquier programa de control no perturbe el equilibrio entre las poblaciones de *H. metabus* y este control natural. Se recomienda realizar los estudios necesarios para lograr una mejor identificación de este parásito y profundizar el conocimiento sobre los efectos que puede tener en todo el ciclo de vida de *H. metabus*.

AGRADECIMIENTOS

Al TSU Antonio Gómez y la Lic. Gilma Hernández por su ayuda técnica en la preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión. Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, proyecto

N° CI-5-1901-0957/00 y por el Fonacit a través del Fondo de Investigación Regional (FIR).

BIBLIOGRAFÍA

- Andreadis T, Maier C & C Lemmon (1996) *Orthosomella lambdinae* n. sp. (Microsporidia: Unikaryonidae) from the Spring Hemlock Looper, *Lambdina athasaria* (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 67:169-177.
- Balbani G (1882) Sur les microsporides ou sporogonies des articles. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 95:1168-1171.
- Bauer L, Miller D, Maddox J & M Mcmanus (1998) Interactions between a *Nosema* sp. (Microspora: Nosematidae) and Nuclear Polyhedrosis Virus Infecting the Gypsy Moth *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae). *Journal of Invertebrate Pathology* 74:147-153.
- Becnel J & T Andreadis (1999) Microsporidia in Insects. En: Wittner M & Weiss L (Eds) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press. Washington, USA. 447-501 pp.

- Canning E, Barker R, Nicholas J & A Page (1985) The ultrastructure of three microsporidia from winter moth, *Operophtera brumata* (L.), and the establishment of a new genus *Cysto sporogenes* n. g. for *Pleistophora operophterae* (Canning, 1960). *Systematic Parasitology* 7:213-225.
- Canning E, Curry A, Cheney S, Lafranchi-Tristem N & M Haque (1999) *Vairimorpha imperfecta* n. sp., a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Parasitology* 119:273-286.
- Crossley A & D Waterhouse (1969) The ultrastructure of the osmeterium and the nature of its secretion in *Papilio larvae* (Lepidoptera). *Tissue and Cell* 1:525-554.
- Gajardo R, Dorta B, Hernández J & F Osborn (2005a) Bacteria patógena sobre *Hylesia metabus*. XVIII Congreso Venezolano de Entomología. San Felipe, estado Yaracuy. 144 pp.
- Gajardo R, Dorta B, Hernández J & F Osborn (2005b) Hongo patógeno sobre *Hylesia metabus*. XVIII Congreso Venezolano de Entomología. San Felipe, estado Yaracuy. 145 pp.
- Hernández J, Osborn F, Herrera B, Liendo-Barandiarán C, Perozo J & D Velásquez (2009) Parasitoides larva-pupa de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región nororiental de Venezuela: un caso de control biológico natural. *Neotropical Entomology* 38:243-250.
- Lu C & Y Chow (1991) Fine structure of the larval osmeterium of *Papilio demoleus libanius* (Lepidoptera: Papilionidae). *Annals of the Entomological Society of America* 84:294-302.
- Nägeli K (1857) Über die neue Krankheit die Seidenraupe und verwandte Organismen. *Botanische Zeitung* 15:760-761.
- Osborn F, Berlioz L, Vitelli-Flores J, Monsalve W, Dorta B & V Lemoine (2002) Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) *Journal of Invertebrate Pathology* 80:7-12.
- Solter L, Maddox J & M McManus (1997) Host specificity of Microsporidia (Protista: Microspora) from European populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) to indigenous North American Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology* 69:135-150.
- Sprague V (1976) Classification and phylogeny of the Microsporidia. En: Bulla L & Cheng T (Eds.) *Comparative Pathobiology* Vol. 2. Plenum Press, New York, USA. 1-30 pp.
- Sprague V, Becnel J & E Hazard (1992) Taxonomy of phylum Microspora. *Critical Review in Microbiology* 18:285-395.
- Stobart R & J Shaw (1964) Salt and water balance: excretion. En: Rockstein E (Ed) *The Physiology of Insects*. Academic Press. New York, London. 189-235 pp.
- Undeen A & J Vávra (1997) Research methods for entomopathogenic Protozoa. En: Lacey L (Ed.) *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press. London, Sydney, New York. 117-151 pp.
- Vásquez L (1990) Estudio bioecológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer en el oriente de Venezuela. *Saber* 3:14-20.
- Vásquez L (1994) Estudio bioecológico y estrategias de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región oriental. Períodos 1985-1987 y 1991-1993. Informe del Consejo de Investigación. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 93 pp.
- Vavra J & J Larsson (1999) Structure of the Microsporidia. En: Wittner M & Weiss L (Eds) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press. Washington, USA. 7-84 pp.

Los parasitoides de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])

José V. Hernández E.*¹, Frances Osborn²,
Beatriz Herrera-Malaver¹, Carmen Virginia Liendo-Barandiaran¹,
Diony Velásquez¹ y Sandra Díaz²

¹Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edif. Física y Electrónica I, piso 1, Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

²Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

*jnandez@usb.ve

Resumen

Los parasitoides pueden ser importantes reguladores de las plagas en ecosistemas agrícolas y naturales. En la región nororiental de Venezuela, en dos localidades (Mapire y Pedernales) y durante seis ciclos, se registró el parasitismo natural sobre *Hylesia metabus* (Saturniidae). Además, se realizó un estudio preliminar sobre la elaboración de una dieta artificial para uno de los parasitoides encontrados, *Sarcodexia lambens* (Sarcophagidae). Para ello, se recolectaron larvas y pupas de *H. metabus* en el campo y se mantuvieron en el laboratorio hasta la eclosión de los adultos. También se recolectaron pupas de *S. lambens* y se mantuvieron hasta el apareamiento de los adultos y subsecuente larviposición. Se preparó una dieta basada en leche y levadura para la cría de *S. lambens* hasta la eclosión de los adultos de la F1. En Mapire, el parasitismo aumentó de 33,0 % a 91,1 % en tres ciclos consecutivos estudiados y los principales parasitoides fueron los Díptera: *Belvosia* spp. (Tachinidae) y *S. lambens* y diversas especies de Hymenoptera de las familias Ichneumonidae, Chalcidae, Perilampidae y Eulophidae. En Pedernales, en tres ciclos consecutivos el parasitismo disminuyó de 29,5 % a 16,1 %; el parasitoide más abundante fue *Belvosia* spp., aunque durante el tercer ciclo, la contribución de *Neotheronia* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) resultó significativa. De 25 larvas de la F1 de *S. lambens* obtenidas, 36 % emergieron como adultos. *Belvosia* spp. y *Sarcodexia lambens* son parasitoides promisorios para ser usados en programas de manejo integrado de *H. metabus*. Se deben optimizar las condiciones de cría de *S. lambens* para maximizar el porcentaje de supervivencia sobre la dieta ensayada.

Abstract

The Parasitoids of *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])

Parasitoids can be important regulators of pest populations both in agricultural and natural ecosystems. We report natural parasitism levels for *Hylesia metabus* (Saturniidae) during six life cycles in two localities (Mapire y Pedernales) in northeastern Venezuela. We also report on preliminary studies for the elaboration of an artificial diet for one of the parasitoids found, *Sarcodexia lambens* (Sarcophagidae). *H. metabus* larvae and pupae were collected in the field and maintained under laboratory conditions until eclosion. Also, *S. lambens* pupae were collected and maintained until adult mating and subsequent larviposition. A milk and yeast

Palabras clave Key words

Dieta artificial, Hymenoptera, Parasitismo, Sarcophagidae, Tachinidae.
Artificial diet, Hymenoptera, Parasitism, Sarcophagidae, Tachinidae.

based diet was prepared for rearing *S. lambens* larvae until the eclosion of the F1 adults. In Mapire, parasitism increased from 33.0 % to 91.1 % in the three cycles studied, with the dipterans *Belvosia* spp. (Tachinidae) and *S. lambens* as well as several hymenopteran species from the Ichneumonidae, Chalcidae, Perilampidae and Eulophidae being the most common. In Pedernales, parasitism decreased from 29.5 % to 16.1 % during the three cycles studied, with *Belvosia* spp. being the most abundant parasitoid, although in the third cycle parasitism by *Neotheronia* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) was also significant. Thirty six percent of adults emerged from the 25 *S. lambens* F1 larvae obtained. *Belvosia* spp. and *S. lambens* may have potential for use in integrated management programs of *H. metabus*. The rearing conditions for *S. lambens* should be improved in order to maximize the survival of these flies on the diet tested.

PRESENTACIÓN

El parasitoidismo es el fenómeno en el cual un organismo se alimenta de otro que se mantiene vivo y desarrolla sus actividades con relativa normalidad, hasta que finalmente muere. Este es realizado por los parasitoides, los cuales son insectos que en la fase adulta oviponen cerca, sobre o dentro de otras especies de insectos. Así, el parasitoidismo puede clasificarse entre la depredación y el parasitismo, lo cual implica una relación intermedia entre depredación y parasitismo. Al eclosionar, las larvas del parasitoides penetran y se desarrollan alimentándose del cuerpo del insecto hospedero, provocando la muerte del insecto parasitado. Se estima que el 25 % de las avispa (Hymenoptera) y moscas (Diptera) tienen este hábito. Los parasitoides suelen ser importantes agentes de control biológico, debido a que poseen la capacidad de regular las poblaciones de insectos plaga por debajo de un umbral de daño económico y, como son específicos, dependen de las poblaciones de la plaga para su propia supervivencia (Godfray 1994; Fernández-Arhex & Corley 2003).

Los parasitoides se diferencian de otros enemigos naturales de insectos plaga presentes en la naturaleza. Por ejemplo, los parasitoides se alimentan de un solo hospedero produciendo la muerte del mismo a corto, mediano o largo plazo, mientras que los depredadores pueden alimentarse de varios hospederos causando la muerte inmediata. El parasitoides, al igual que el parásito, se alimenta de un solo hospedero, pero no siempre causa la muerte pues necesita de un hospedero vivo para

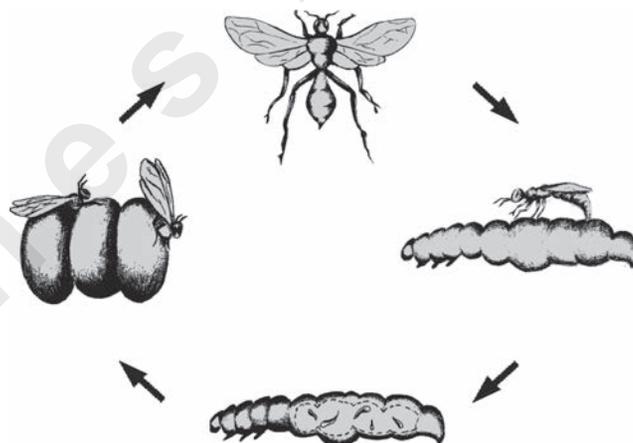


Figura 1. Ciclo de vida de parasitoides larva-larva (Fuente: Nicholls *et al.* 1999, modificado por Adriana Herrera).

la supervivencia, aunque, el parasitoides tarde o temprano, causa la muerte de su hospedero. El parasitoides adulto es un animal de vida libre, el cual puede ser herbívoro o depredador (Godfray 1994).

Los parasitoides dípteros e himenópteros son insectos holometábolos; es decir, presentan metamorfosis completa, y desarrollan cada una de las siguientes fases durante su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto. Tomando en cuenta esto, los parasitoides pueden actuar de diferentes maneras sobre el hospedero. La Figura 1, ilustra un ejemplo de cómo actúan los parasitoides larva-larva: primero, el parasitoides (una avispa) localiza el hospedero, que en este caso corres-

ponde a una larva de lepidóptero, por medio de atraentes de largo y corto alcance. Luego coloca uno o varios huevos sobre el hospedero o sobre las hojas de la planta de las que éste se alimenta. En este último caso, el hospedero ingiere los huevos del parasitoide al alimentarse. De estos huevos eclosionan una o varias larvas. La larva se alimenta sobre o dentro del hospedero, aumentando su tamaño, pudiendo desarrollarse entre cuatro y siete estadios, hasta emerger de la larva para transformarse en pupa dentro de ésta última, sobre la misma o retirada de ella (Nicholls *et al.* 1999).

También existen parasitoides larva-pupa que presentan un comportamiento y ciclo de vida similar a los parasitoides larva-larva con la diferencia de que las larvas del parasitoide pupan en el interior de la pupa del hospedero (Figura 2) (Nicholls *et al.* 1999). Otros

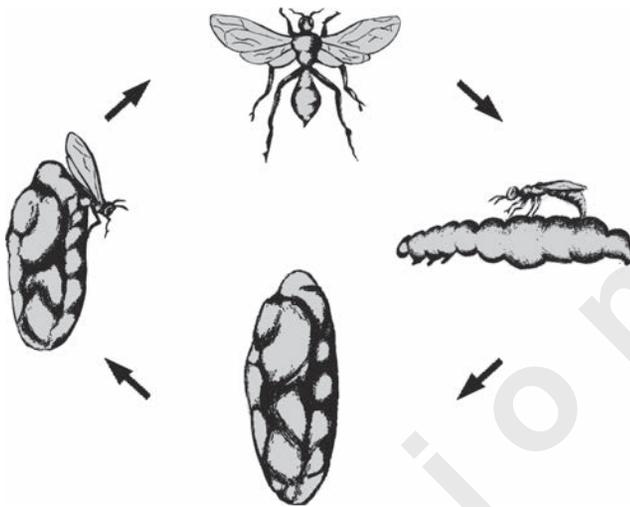


Figura 2. Ciclo de vida general de un parasitoide larva-pupa. (Fuente: Nicholls *et al.* 1999, modificado por Adriana Herrera).

tipos de parasitoides de común ocurrencia y con un comportamiento similar a los parasitoides larva-larva y larva-pupa son los de huevo-huevo, huevo-larva y pupa-pupa.

Frecuentemente, cuando se recolectan larvas de lepidópteros para el estudio en el laboratorio, es usual que en lugar de emerger el adulto de la larva que se recolectó, lo que se observa es un parasitoide larva-larva o larva-pupa, comúnmente moscas o avispas. Sin embargo, en el momento de recolectar, esto se desconoce, debido a que las larvas y pupas del parasitoide pueden estar ocultas en la larva y pupa de su respectivo hospedero.

Existen diferentes tipos de parasitoides, a saber:

Los parasitoides pueden ser ectoparasitoides si se alimentan y desarrollan en el exterior del hospedero y endoparasitoides si lo hacen en el interior.

Dependiendo del número de parasitoides que vivan en un hospedero el parasitoide puede ser solitario o gregario.

Los parasitoides pueden ser: primarios, cuando atacan a un hospedero fitófago; secundario, cuando atacan a un parasitoide primario.

Se usa el término superparasitoidismo si diferentes hembras de misma especie depositan sus huevos en un mismo hospedador y multiparasitoidismo si diferentes especies de hembras colocan sus huevos en un mismo hospedador.

Un hiperparasitoide es el organismo que parasita a otro parasitoide, también existe el hiperparasitoide facultativo, el cual puede actuar como parasitoide o hiperparasitoide dependiendo de sus necesidades. Pero también se encuentran los hiperparasitoides obligados, los cuales requieren de un parasitoide para desarrollarse.

También existen los parasitoides coinobiontes, en los cuales la larva del parasitoide mata al hospedero. En el caso de los idiobiontes, es el parasitoide el que mata al hospedero al momento de oviponer. Además, hay parasitoides primarios los cuales colocan los huevos directamente sobre el hospedero, o los secundarios o hiperparasitoides que coloca el huevo sobre un parasitoide que ya se encuentra previamente sobre el hospedero.

La mayoría de los parasitoides registrados pertenecen a los órdenes Hymenoptera y Diptera. En el primer orden la mayoría pertenece a las familias Ichneumonidae, Braconidae, Perilampidae, Trichogrammatidae, Eulophidae y Chalcididae; mientras que en el segundo pertenecen a las familias Tachinidae, Sarcophagidae y Phoridae. Varias especies de estos parasitoides son utilizadas en programas de manejo integrado de insectos plaga (MIP) o manejo holístico de insectos plaga (MHP), en los cuales se usa como una de las alternativas, el control biológico clásico. Esto consiste en la introducción de depredadores o parasitoides exóticos para controlar una plaga en una determinada área. El uso comercial de los parasitoides es común en muchos invernaderos, plantaciones y cultivos en Europa y EE. UU., donde los artrópodos más comúnmente vendidos son avispas parasíticas, entre ellas, los géneros *Ephidiun* sp., *Encarsia* sp., *Leptomastix* sp. y *Trichogramma* spp. (Gullan & Cranston 2000). Por ejemplo: para el control

Tabla 1. Himenópteros y dípteros parasitoides reproducidos masivamente y sus hospederos.

Orden	Familia	Hospederos
Hymenoptera	Braconidae	Áfidos, lepidópteros, coleópteros y dípteros
	Scelionidae	Huevos de chinches
	Trichogrammatidae	Huevos de lepidópteros, muy importantes en el control biológico inundativo
	Eulophidae	Son muy importantes en el control de larvas de minadores de hojas y barrenadores de madera
	Mymaridae	Huevos de Heteroptera, Homoptera, Coleoptera, Diptera y Saltatoria
	Encyrtidae	Escamas, cochinillas
Diptera	Aphelinidae	Escamas, cochinillas, moscas blancas y áfidos.
	Tachinidae	Larvas de lepidópteros
	Bombyliidae	Larvas de Scarabeidae (escarabajos)

(Fuente: Carballo, 2002).

de *Heliothis armigera* Hübner, 1808. (Noctuidae), el gusano del fruto del tomate, *Cotesia kazak* Telenga 1949, y *Microplitis croceipes* Cresson 1872, (Braconidae) fueron introducidos con éxito en Nueva Zelanda (Cameron *et al.* 2006). Por otra parte, *Semielacher petiolatus* Girault, 1915 (Eulophidae) fue introducida en Túnez para controlar *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae) (Braham *et al.* 2006). La avispa *Apoanagyrus lopezi* De Santis, 1964 (Encyrtidae) ha logrado establecerse en más de 25 países africanos donde mantiene bajo control la cochinilla de la yuca o mandioca *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero, 1977 (Homoptera: Pseudococcidae), una plaga importante de este cultivo (Neuenschwander *et al.* 1988). En Cuba, *Lixophaga diatraeae* Townsend, 1916 (Tachinidae) es empleada para combatir el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Lepidoptera: Pyralidae) (Aleman *et al.* 1998).

En Venezuela, los taladradores o barrenadores de la caña de azúcar, *Diatraea* spp. (Crambidae), son controlados por la mosca amazónica *Lydella minense* Townsend, 1927 (Tachinidae) y la avispa, *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Braconidae), las cuales han reducido los daños causados en más de 99 % (Linares & Salazar 2007). Las avispas parasitoides de huevos, *Telenomus remus* Nixon, 1937 y *Trichogramma* spp. también son utilizadas extensivamente para el control de lepidópteros plaga de muchos cultivos, incluyendo maíz (*T. remus*), hortalizas y papa (*Trichogramma* spp.), sorgo y algodón (ambas especies) (Van Lenteren & Bueno 2003). En la Tabla 1, se muestran algunas familias de parasitoides

que son reproducidos masivamente y comercializados para el control de plagas.

Por otro lado, en algunos ecosistemas naturales donde la intervención humana es mínima o nula, posiblemente los mecanismos naturales tienen un importante y muchas veces no medido impacto en la regulación de las poblaciones de organismos. Por ejemplo, en el caso de invertebrados de la clase Insecta en bosques naturales, Petrice *et al.* (2004) reportaron que el 15,5 % de las larvas de macrolepidópteros nativos estaban parasitados por especies de Hymenoptera

(6,6 %), Tachinidae (6,4 %) y otros (2,5 %). Sarvary *et al.* (2007) reportaron nueve especies de parasitoides para el pasador de las hojas, *Choristoneura rosaceana* Harris 1841, de las cuales el Tachinidae *Actia interrupta* Curran 1933, y los Hymenoptera *Oncophanes americanus* Weed 1887, (Braconidae) y *Exochus albifrons* Cresson, 1868 (Ichneumonidae) fueron los más abundantes.

En otros capítulos de este libro han sido documentadas las medidas de control de las poblaciones de *Hyleisia metabus* (Cramer, [1775]) en Venezuela, por ejemplo, las fumigaciones aéreas y terrestres con el larvicida biológico a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, uso de trampas de luz para la captura de adultos (Vásquez 1990). Sin embargo, aparte de los controles aplicados, *H. metabus*, en condiciones naturales, es atacada por un importante número de enemigos naturales, entre ellos los insectos parasitoides (Pieglar 1990).

En el caso de *H. metabus* para Venezuela, Vásquez (1990) reportó una reducción del 67,4 % en las poblaciones de esta polilla en el golfo de Paria, entre enero y marzo de 1985, por efecto de enemigos naturales. Posteriormente, Fornés & Hernández (2000) encontraron 15,1 % y 7,9 % de parasitismo sobre pupas recolectadas en el mismo golfo, durante los meses de julio a octubre de 1997 (periodo lluvioso) y enero a febrero de 1998 (periodo seco), respectivamente.

Ahora bien, para que una especie de parasitoide pueda ser utilizada en un programa de control biológico, es necesario conocer su biología y comportamiento; así como también establecer procedimientos para la cría masiva del parasitoide en condiciones de laboratorio, esto úl-

timo incluye el desarrollo de una dieta artificial. Este tipo de dieta ha sido utilizada a partir de los años cincuenta, en la cría de insectos en laboratorio, a fin de disponer de suficientes individuos que puedan ser utilizados en estudios fundamentales en áreas del conocimiento como la fisiología, ecología y genética. Además, de su uso en la producción de patógenos de insectos, estudio de feromonas y en programas de MIP y MHP. Existen dietas artificiales para más de 1300 especies de insectos parasitoides, entre ellas 279 para especies de Diptera, siendo la mayoría de importancia agrícola (Singh 1977). Algunas de las ventajas del uso de dietas artificiales son la uniformidad nutricional del medio de cultivo y la uniformidad biológica de la colonia (Parra 1994). Otra ventaja es la posibilidad de criar a los parasitoides sin el mantenimiento de una cría de su insecto hospedero.

En este capítulo se presentan resultados del registro del parasitismo natural (larva-pupa) de *H. metabus* y se analiza el impacto de los mismos sobre las poblaciones de esta plaga en dos zonas geográficas de la región nororiental de Venezuela. Además, se presentan resultados preliminares sobre la cría del parasitoide *Sarcodexia lambens* Wiedemann 1830 con una dieta artificial. El desarrollo de esta dieta permite el mantenimiento de colonias continuas de este sarcófago parasitoide y representaría un paso importante en la búsqueda de alternativas para el control de *H. metabus*, en el marco de estrategias de MIP o MHP de este insecto plaga de salud pública. En este sentido, los resultados se discuten en función del potencial de los parasitoides como alternativas de control para el manejo de este insecto plaga.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Registro de parasitoidismo de *Hylesia metabus* en Venezuela

Con el objeto de estudiar el impacto del parasitoidismo sobre la *H. metabus* en Venezuela, durante tres ciclos de vida consecutivos de esta polilla y en dos localidades, se recolectaron pupas en plantas de las especies de mangle descritas en el Capítulo I. La recolecta se realizó como se describe en Hernández *et al.* (2009), en las siguientes localidades: a) en el manglar adyacente a la población de Mapire, municipio Valdez, estado Sucre, Venezuela (Lat. N 10° 38' 42,6"; Long. O 62° 08' 59,2"), del 11 al 16 de diciembre de 2004; del 10 al 13 de marzo de 2005 y del 11 al 14 de julio de 2005 (Figura 3); b) en los caños ubicados cerca de la población de Pedernales, municipio Pedernales, estado Delta Amacuro, Venezuela (Lat. N 09° 48' 12,0"; Long. O 62° 10' 33,4"), del 12 al 16 de octubre de 2005; del 23 y 24 de enero de 2006 y el 6 y 7 de mayo de 2006 (Figura 3, Figura 4A, 4B).

Previo, al traslado al laboratorio, las pupas recolectadas se limpiaron, se retiró el capullo manualmente y se colocaron en envases de plástico de aproximadamente 1 L de capacidad, protegidos con

capas de algodón. Una vez en el laboratorio, las pupas se individualizaron en bolsas plásticas, transparentes y esterilizadas y se mantuvieron bajo fotoperiodo invertido de 12L:12O a una temperatura promedio de 27 °C y humedad relativa promedio de 65 %, hasta la emergencia de los adultos (Figura 5). Posteriormente, se registró el número y sexo de los adultos de *H. metabus* y la emergencia de los parasitoides en cada uno de los ciclos estudiados. Los parasitoides fueron separados por morfotipo, cuantificados, montados e identificados hasta la categoría de género y en algunos casos hasta especie. To-



Figura 3. Áreas de recolección de pupas de *Hylesia metabus*.



Figura 4. Áreas de recolecta de pupas de *Hylesia metabus* (A) y detalle de la misma (B).

dos los especímenes de los parasitoides identificados han sido depositados en la colección de insectos del Museo Británico de Historia Natural, Londres, Inglaterra y en el Museo de Ciencias Naturales de la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela.

Estudio preliminar para la cría masiva del parasitoide *Sarcodexia lambens*

En el estudio preliminar para el establecimiento de crías masivas con dietas artificiales se seleccionó a la especie de mosca *S. lambens* uno de los insectos más comúnmente encontrado como parasitoide de *H. metabus* en el estado Sucre. Este insecto pertenece a la familia Sarcophagidae, la cual está constituida por unas 2600 especies, distribuidas por todo el mundo con una multiplicidad de hábitos de vida: saprofíticos, necrófagos, coprófagos, depredadores, y parasitoides de otros insectos, entre otros. El rasgo más resaltante de esta familia es la larviparidad, es decir las hembras normalmente colocan larvas sobre el hospedero en lugar de huevos. No hay características externas distintivas de la familia, pero internamente las hembras presentan un útero con dos sacos, en los cuales los huevos son incubados hasta que las larvas se desarrollan. De 6 a más de 700 huevos pueden ser incubados a la vez, según la especie. La mayoría de las especies de este género presentan franjas de color negro o gris, frecuentemente con áreas doradas en la parte dorsal del tórax (Pape 1996).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, se recolectaron de masas de larvas de *Hylesia metabus* del V y VI estadio directamente de los troncos de los árboles de *R. mangle* donde descansan durante el día. Éstas se efectuaron en la zona de Pedernales en el estado Delta Amacuro (Lat. N 09° 58' 51,7"; Long. O 62° 14' 25,0"), durante las mismas fechas se recolectaron pupas de *H.*

metabus las cuales se usaron para estudiar el efecto del parasitoidismo sobre esta polilla. Las larvas se trasladaron al Laboratorio en cavas de anime donde fueron alimentadas con hojas de la misma planta hospedera y mantenidas en condiciones de 26-28 °C y 70-80 % de humedad relativa.

Las etapas seguidas para el desarrollo de una dieta artificial para *Sarcodexia lambens*, fueron: recolecta y mantenimiento de las pupas de *S. lambens*, mantenimiento y apareamiento de los adultos de *S. lambens*, obtención de los huevos de la primera generación (F1) de *S. lambens*,



Figura 5. Detalle de cuarto de mantenimiento de pupas de *Hylesia metabus*.

alimentación de las larvas de la F1, mantenimiento de las pupas y cría de los adultos de la F1.

Las pupas de *S. lambens* se obtuvieron diariamente de larvas muertas de *H. metabus*. Fueron medidas, pesadas y luego individualizadas en bolsas plásticas hasta la eclosión de los adultos, registrando la fecha de la misma. Los adultos obtenidos fueron liberados en cámaras de apareamiento, las cuales consistían de envases de 25 L de capacidad, sellados por arriba con doble tela de tul y abertura lateral conectada a un tirabuzón de tela que permitía introducir la mano para la liberación de los individuos y para realizar los cambios en las dietas (Figura 6A). En la base de cada cámara se colocaron placas de

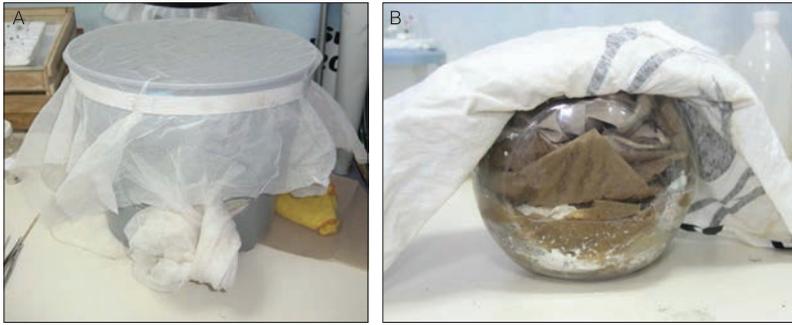


Figura 6. A: Cámara de apareamiento de los adultos de *Sarcophagia lambens* (Fuente: Frances Osborn). B: Envase con la dieta artificial y larvas de *S.lambens*. (Fuente: Frances Osborn).

Petri con los siguientes sustratos: para la alimentación de los adultos, algodón remojado en agua azucarada y algodón remojado en agua; para la larviposición, algodón remojado en leche, carne de res molida e hígado de res.

Se realizaron observaciones diarias hasta la formación de larvas; las mismas fueron cuidadosamente retiradas, anotándose el tipo de sustrato del cual fueron

colocaron en dicho envase las larvas en un disco de algodón y se cubrieron con papel seco hasta el tope del envase, tapando muy bien la boca con tela (Figura 6B). El envase se mantuvo entre 26-28 °C y 70-80 % de humedad relativa hasta la formación de pupas, las cuales fueron retiradas del medio para luego ser medidas, pesadas e individualizadas hasta la eclosión de los adultos de la generación F1.

extraídas; y luego, colocadas en un envase con la dieta artificial preparada como se describe a continuación: Se calentó 40 ml de leche pasteurizada hasta 40 °C, se agregó 2 g de levadura granulada y se mantuvo en agitación suave por media hora con ayuda de un agitador magnético, luego se dejó reposar de 3 a 4 horas y finalmente se agregó leche a temperatura ambiente hasta completar 200 ml. Se rellenó un envase de vidrio boca ancha con papel absorbente sin cloro, hasta más o menos la mitad y se humedeció con la mezcla de leche y levadura. Luego se

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parasitoides encontrados en muestras recolectadas en Mapipe

De las pupas de *H. metabus*, recolectadas en el mes de diciembre del año 2004, más de la mitad alcanzaron el estado adulto. En marzo del 2005 la emergencia disminuyó a un 36,4 % y en julio de este último año, solamente emergieron el 3,6 % de las pupas recolectadas. En relación al porcentaje de pupas parasitadas, se observó un aumento progresivo durante los tres ciclos estudiados, desde un 33,0 % en diciembre de 2004, hasta 91,1 % en julio de 2005. La mayoría de las pupas recolectadas en este ciclo estuvieron vacías, con evidencia de que los parasitoides ya habían emergido. El porcentaje de hembras (adultas) de *H. metabus* en estos tres ciclos fue: 34,5 %, 15,1 % y 22,7 %, respectivamente (Figura 7).

En el primer ciclo, *H. metabus* fue parasitada principalmente por moscas de las familias Sarcophagidae (*Sarcodexia lambens*) (62,8 %) y Tachinidae (*Belvosia* spp.) (33,0 %). Solamente se identificaron dos especies de avispa parasíticas: *Brachymeria subconica* Bouček 1992, y *Brachymeria nigra* Girault 1911, (Chalcididae), representando apenas un 3,8 % del total de parasitoides (Figura 8a, Tabla 2). Al inspeccionar los puparios de *H. metabus*, no se encontraron evidencias de la presencia de otros individuos, lo cual confirma que en este caso las especies de *Brachymeria* halladas están actuando como parasitoides primarios.

La diversidad de los parasitoides aumentó considerablemente (Figura 8B, Tabla 2) durante el segundo ciclo de vuelo evaluado. Las

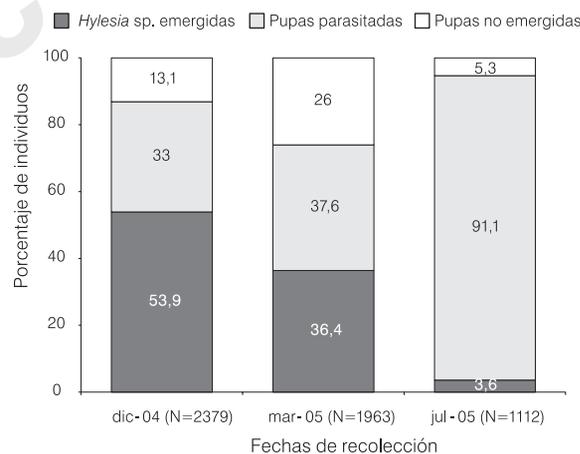


Figura 7. Comparación de la emergencia de las pupas de *Hylesia metabus* y parasitismo observado en individuos recolectados durante tres ciclos entre diciembre 2004 y julio 2005 en la población de Mapipe, estado Sucre, Venezuela. (Fuente: Hernández et al. 2009).

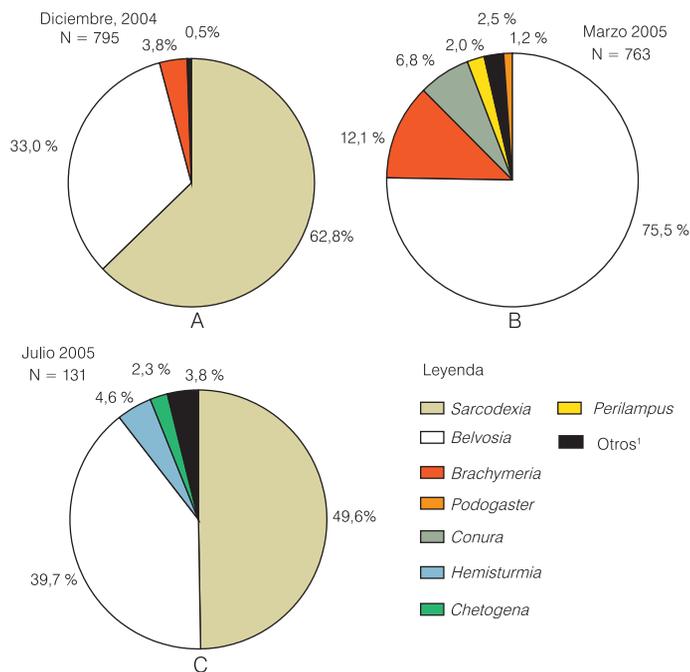


Figura 8. Proporciones relativas de los géneros de parasitoides de *Hylesia metabus* más abundantes en las localidades de Mapire, estado Sucre, durante los ciclos estudiados. ¹Géneros presentes cuyos porcentajes de aparición son bajos. Los grupos pertenecientes a esta categoría son variables de acuerdo al ciclo y localidad estudiada (Fuente: Hernández *et al.* 2009).

especies de parasitoides más abundantes corresponden a la familia Tachinidae, género *Belvosia* (75,5 %). Además, se identificaron 10 especies de Hymenoptera pertenecientes a las familias Ichneumonidae, Chalcididae, Perilampidae y Eulophidae, *B. nigra* fue la más abundante (12,1 %), seguido por *Conura* spp. (6,8 %). Los ejemplares correspondientes a las familias Ichneumonidae, Perilampidae y Eulophidae se encontraron en muy bajos porcentajes, 1,2 %; 2 % y 0,1 %, respectivamente (Figura 8b, Tabla 2).

A pesar que se registró un aumento vertiginoso en el porcentaje de pupas parasitadas (91,1 %) en el ciclo del mes de julio de 2005, no fue posible identificar en

su totalidad los parasitoides de este periodo, debido a que para el momento de la recolecta se encontraron sólo las pupas vacías con el orificio de salida del parasitoides. Sin embargo, de los parasitoides identificados 49,6 % fueron *S. lambens* y 39,7 % *Belvosia* spp. Por otra parte, en este ciclo solamente emergieron cuatro avispas de las siguientes especies: *Enicospilus* sp., *Neotheronia* sp. (Ichneumonidae), *B. subconica* (Chalcididae) y *Tetrastichus howardi* Olliff, 1893 (Eulophidae) (Figura 8c, Tabla 2).

Parasitoides encontrados en muestras recolectadas en Pedernales

En octubre del año 2005, aproximadamente la mitad de las pupas recolectadas sobrevivió hasta adulto, mientras que en los ciclos subsiguientes, enero y mayo de 2006, se observa una disminución del porcentaje de emergencia. El porcentaje de parasitismo disminuyó de 29,5 % en octubre 2005 a 18 % en enero de 2006. Por otra parte, el porcentaje de pupas no emergidas y de las cuales tampoco emergieron parasitoides aumentó de 17,4 % en octubre de 2005 a 43,3 % en mayo de 2006, lo que sugiere el posible ataque de un agente o enfermedad que en este caso se desconoce. Posiblemente, el número de pupas recolec-

Tabla 2. Lista de parasitoides de *Hylesia metabus* en Mapire, estado Sucre y Pedernales, estado Delta Amacuro, Venezuela.

Familia	Fecha	dic 2004		mar 05		jul 05		oct 05		ene 06		may 06	
		Mapire		Mapire		Mapire		Pedernales		Pedernales		Pedernales	
		Localidad/especie											
Chalcididae	<i>Brachymeria nigra</i> Fig. 11a	4	81	0	4	4	0	4	4	0	0	0	0
	<i>Brachymeria subconica</i> Fig. 11b	26	2	1	13	3	0	0	0	0	0	0	0
	Otros <i>Brachymeria</i> Fig. 11c	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Conura</i> spp. Fig. 11d,e	0	52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Otros Chalcididae	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Eulophidae	<i>Tetrastichus howardi</i> Fig. 11f	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ichneumonidae	<i>Enicospilus</i> sp. Fig. 11g	0	1	1	1	5	1	1	5	1	1	1	1
	<i>Neotheronia</i> sp. Fig. 11h	0	0	1	1	0	25	1	0	25	1	25	25
	<i>Podogaster</i> sp. Fig. 11i	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perilampidae	<i>Perilampus</i> sp. Fig. 11j	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sarcophagidae	<i>Sarcodexia lambens</i> Fig. 11k	499	0	65	2	13	0	2	13	0	0	0	0
Tachinidae	<i>Belvosia</i> spp. Fig. 11l,m	262	576	52	681	178	65	681	178	65	65	65	65
	<i>Chetogena scutellaris</i> Fig. 11n	1	0	3	4	0	1	4	0	1	1	1	1
	<i>Hemisturmia carcelioides</i> Fig. 11ñ	0	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Leschinaultia bicolor</i> Fig. 11o	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Otros Tachinidae	0	7	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Total de pupas de <i>Hylesia</i> parasitadas		795	763	131	706	206	92	706	206	92	92	92	92

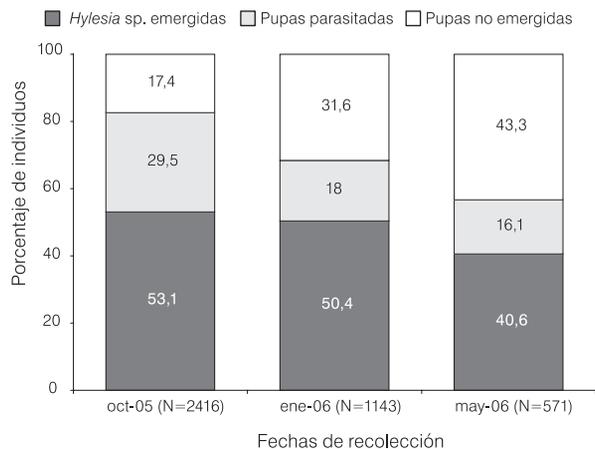


Figura 9. Comparación de la emergencia de las pupas de *Hylesia metabus* y parasitismo observado en individuos recolectados durante tres ciclos entre octubre 2005 y mayo 2006 en Punta Pescador, Pedernales, estado Delta Amacuro, Venezuela. (Fuente: Hernández *et al.*, 2009).

tadas disminuyó como producto de la reducción en la densidad de la población de *H. metabus* en las zonas visitadas (Figura 9). El porcentaje de hembras (adultas) en estos tres ciclos fue: 45,5 % en el primer ciclo, 35,7 % en el segundo y 45,5 % en el tercero. En el primer ciclo de esta localidad *H. metabus* estaba parasitada casi en su totalidad por *Belvosia* spp. (96,2 %) (Figura 10a, Tabla 2).

En el segundo ciclo, se observó un patrón parecido: 86,4 % de las pupas de *H. metabus* fueron parasitadas por las mismas especies de *Belvosia* spp., con contribuciones menores de *S. lambens* (6,3 %), *Brachymeria* spp. (3,4 %) y *Enicospilus* sp. (2,4 %), entre otros (Figura 10b, Tabla 2). Durante el tercer ciclo, mayo 2006, *Belvosia* spp. siguió siendo el parasitoide más abundante (70,7 %), y se incrementó en el parasitismo por *Neotheronia* sp. (27,1 %) (Figura 10c, Tabla 2). En la inspección de los puparios de *H. metabus* no se encontraron evidencias de la presencia de otros individuos, lo cual confirma que, al menos en este caso, *Neotheronia* sp. está actuando como un parasitoide primario.

Por cada pupa de *H. metabus* parasitada emergió un solo adulto del parasitoide en el caso de las familias Tachinidae, Perilampidae e Ichneumonidae; mientras que para las familias de Sarcophagidae y Chalcididae fue común encontrar entre 2-8 parasitoides adultos por pupa.

Los resultados expuestos en este trabajo evidencian como las poblaciones de *H. metabus* en la región nororiental de Venezuela son afectadas por el fenómeno del parasitoidismo causado por diversas especies

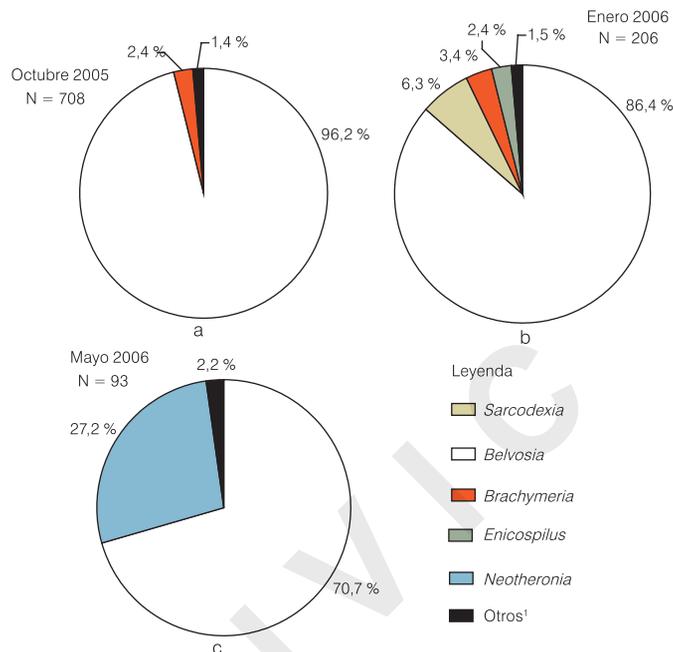


Figura 10. Proporciones relativas de los géneros de parasitoides de *Hylesia metabus* más abundantes en las localidades de Pedernales, estado Delta Amacuro durante los ciclos estudiados. ¹ Géneros presentes cuyos porcentajes de aparición son bajos. Los grupos pertenecientes a esta categoría son variables de acuerdo al ciclo y localidad estudiada. (Fuente: Hernández *et al.* 2009).

de los órdenes Diptera e Hymenoptera. Se reconoce que los Tachinidae son importantes parasitoides de Lepidoptera, así como de otros órdenes de insectos (Strazanac *et al.* 2001). En este estudio, las especies pertenecientes a esta familia de dípteros se caracterizan por ser parasitoides primarios y coinobiontes y todos los parasitoides identificados representan nuevos reportes de parasitismo sobre *H. metabus*, con la excepción de la mosca *Belvosia* spp. (Tachinidae) que ha sido previamente reportada por Vásquez (1990). Por otra parte, en la provincia de Guanacaste, Costa Rica se encontró *Belvosia bella* Giglio-Tos, 1893, en pupas de *H. lineata* Janzen, 1984. *Belvosia* sp. se ha registrado como parasitoide de *H. alinda*, *H. umbrata* e *Hylesia* spp. en México, Panamá y Ecuador respectivamente (Aldrich 1928; Arnaud 1978). También, *Belvosia leucopyga* Wulp, 1882, parasitoide de *Hylesia* sp. (probablemente, *nigricans*), fue reportada en Brasil, Venezuela y México (Aldrich 1928; Janzen 1984).

En este estudio, *Sarcodexia lambens* es otra de las especies importantes reportadas como parasitoides de *H. metabus*. Esta especie es un parasitoide facultativo y generalista, el cual está ampliamente distribuido en las Américas, desde el sur de los Estados Unidos hasta

Hymenoptera



Figura 11a. *Brachymeria nigra*



Figura 11b. *Brachymeria subconica*



Figura 11c. *Brachymeria* sp.



Figura 11d. *Conura* sp. 1



Figura 11e. *Conura* sp. 2



Figura 11f. *Tetrastichus howardi*



Figura 11g. *Enicospilus* sp.



Figura 11h. *Neotheronia* sp.



Figura 11i. *Podogaster* sp.



Figura 11j. *Perilampus* sp.

Argentina (Lopes & Leite 1989). Esta mosca ha sido encontrada parasitando varias especies de insectos (Coupland & Barker 2004), incluyendo Diptera: Muscidae (Marchiori *et al.* 2007) y Lepidoptera: Psychidae (Stephens 1962), también gasterópodos (Coupland & Barker 2004), aves (Emberizidae) (Fessl & Tebbich 2002), inclusive en humanos sufriendo de miasis (Fernandes *et al.* 2009). Además, esta especie coloniza material orgánico animal, como por ejemplo heces de humanos y heces

e hígado de bovinos (Rocha & Mendes 1996; Marchiori 2007; Marchiori *et al.* 2007). Esta generalización en hospederos y sustratos para su desarrollo facilita la cría sobre medios artificiales en el laboratorio (Coupland & Barker 2004). Estas características de este insecto, junto con la alta proporción de individuos de *H. metabus* parasitadas por la misma, hace atractiva a *S. lambens* como un potencial controlador de poblaciones de esta polilla urticante. Sin embargo, la posibilidad de que ataque a otras especies no objeto de medidas de control en estos ecosistemas, debe ser investigada antes que sea incorporada en un programa de manejo integrado u holístico de esta importante plaga de salud pública.

Además, este trabajo es el primer registro de las especies *Chetogena scutellaris* Wulp, 1890; *Leschenaultia bicolor* Macquart, 1846 y *Hemisturmia carcelioides* Townsend, 1927 (Diptera: Tachinidae) como parasitoides de *H. metabus*. De estas especies de moscas parasíti-

Diptera



Figura 11k. *Sarcodexia lambens*



Figura 11l. *Belvosia* sp. 1



Figura 11m. *Belvosia* sp. 2.



Figura 11n. *Chetogena scutellaris*



Figura 11ñ. *Hemisturmia carcelioides*



Figura 11o. *Leschinaultia bicolor*

cas, *C. scutellaris* es un parasitoide generalista, con una amplia lista de hospederos. La misma ha sido reportada como parasitoide de dos familias de Coleoptera (Cerambycidae y Coccinellidae) y 11 familias de Lepidoptera (Arctiidae, Citheroniidae, Ctenuchidae, Geometridae, Hesperiiidae, Noctuidae, Notodontidae, Sphingidae, Zygaenidae, Pieridae y Saturniidae) en los Estados Unidos, Costa Rica y Perú (Arnaud 1978). Además, *C. scutellaris* ha sido citada como un parasitoide efectivo en el control del gusano cachudo de la yuca, *Erinnyis ello* L. 1758, (Sphingidae) (Bellotti *et al.* 2002). Esta especie de parasitoide presenta un ciclo de vida de corta duración y es viable mantener crías masivas de ella en condiciones de laboratorio, es por ello que podría ser un posible agente de control biológico de *H. metabus*. Sin embargo, la baja proporción de esta especie como parasitoide de pupas de *H. metabus* comparada con *Belvosia* spp. y *S. lambens* sugiere que estas dos últimas especies sean los parasitoides que pudieran tener un mayor impacto en la regulación de las poblaciones de esta plaga.

En cuanto a los parasitoides del orden Hymenoptera, las especies observadas en en este estudio no han sido reportadas previamente para el género *Hylesia*. Sin embargo, géneros de Hymenoptera parasítica como *Enicospilus*, *Conura*, *Podogaster*, *Brachymeria* y *Tetrastichus*, parasitoides de *H. metabus*, han sido encontrados en di-

ferentes especies de la familia Saturniidae incluyendo al género *Hylesia* (Janzen 1984; Gauld 1988; Peigler 1994).

En relación al género *Perilampus* (Hymenoptera: Perilampidae), los mismos pueden ser parasitoides primarios o secundarios. Se conoce que *Perilampus hyalinus* Say 1828 es un hiperparasitoide de *Belvosia bifasciata* Fabricius 1775 y otros Tachinidae en Canadá, EE. UU., México, Puerto Rico, Perú. *Perilampus maurus* Walker 1852 es un posible hiperparasitoide de Tachinidae o Ichneumonidae, o parasitoide primario de su lepidóptero hospedero (Packard 1914).

En la localidad de Mapire, estado Sucre, los parasitoides predominantes del orden Diptera fueron las especies de moscas: *Belvosia* spp. y *S. lambens*, especialmente en los ciclos de diciembre de 2004 y julio de 2005, cuando los porcentajes de estas familias alcanzaron 95,8 % y 89,4 %, respectivamente. En el caso de Pedernales, estado Delta Amacuro, el parasitoide predominante fue *Belvosia* spp., con porcentajes de parasitismo que oscilaron entre 96,2 % y 70,7 %. Es importante resaltar que durante el ciclo de marzo de 2005 en Mapire, no se recolectaron individuos de *S. lambens* y para Pedernales la captura siempre fue muy baja. Esto podría haber sido por fluctuaciones en las densidades de las poblaciones de los parasitoides durante el año o debido a diferencias en la fecha de emergencia de los parasitoides relativas al momento de recolecta. Debe tomarse

en cuenta, que las larvas de los Sarcophagidae migran de su hospedero para pupar fuera del mismo, inmediatamente después que el hospedero ha pupado. Por lo tanto, si la recolecta se realiza en el momento que la mayoría de la población muestreada de *H. metabus* se encuentra en la fase de pupa, es posible que los Sarcophagidae estuvieran fuera de la pupa del hospedero. Además, la presencia de un elevado número de pupas vacías en el tercer ciclo de recolecta en Mapire, sugiere que los parasitoides ya habían emergido, dejando el pupario vacío.

En el mes de marzo de 2005 en Mapire, se registró mayor diversidad de parasitoides que durante los ciclos del mes de diciembre de 2004 y julio de 2005. Es posible que esto represente un patrón causado por las variaciones de las densidades de las poblaciones de larvas hospederas. Inicialmente la población de larvas de *H. metabus* se incrementa, lo cual produce un aumento de las poblaciones de parasitoides, lo que a su vez causa una disminución de las poblaciones de *H. metabus*. En este sentido, otros investigadores como Petrice *et al.* (2004) han encontrado fluctuaciones en el número de especies de parasitoides en larvas de macrolepidópteros en los bosques de Apalaches Centrales (oeste de Virginia, EUA), con mayor abundancia entre finales de mayo y principios de junio.

Por otro lado, en el caso de Pedernales, durante todos los ciclos estudiados se encontró que el parasitoide dominante es la mosca *Belvosia* spp. En esta región hay una menor diversidad de parasitoides que en Mapire, posiblemente debido a que el manglar en Mapire comprende un área aislada de aproximadamente una hectárea, rodeado por bosque tropical, mientras que en Pedernales el manglar es la vegetación dominante en un área de cientos de miles de hectáreas.

Es importante destacar, que en este estudio se refleja solamente las poblaciones de parasitoides larva-pupa que atacan a *H. metabus*. Es probable, entonces, que los parasitoides identificados aquí representen una porción de todos los parasitoides de esta polilla y, por supuesto de otros enemigos naturales, como por ejemplo los insectos depredadores y los microorganismos patógenos.

En el caso de Mapire, el porcentaje de machos emergidos fue mayor en el mes de marzo de 2005, seguido por julio de 2005 y, por último, diciembre de 2004; mientras que en Pedernales este porcentaje fue uniforme en los diferentes ciclos estudiados. En Mapire existe la posibilidad de que los insectos parasitoides atacaron más a las hembras que a los machos, produciendo así un sesgo a favor de los machos, lo cual pudiera haber sido un factor determinante

en la disminución abrupta de la población de *H. metabus* en esta localidad. Por otra parte, Fornés & Hernández (2000) han reportado una mayor mortalidad de pupas machos que de hembras debida a la acción de los parasitoides, durante dos períodos de vuelo consecutivos a partir de individuos recolectados en el golfo de Paria, en fase de pupa y mantenidos bajo condiciones de laboratorio. A su vez, Osborn *et al.* (2001) encontraron mayor emergencia de machos comparado con hembras (18,9 % de machos) a partir de un grupo de individuos recolectados en estado larval, en la misma zona y mantenidos en el laboratorio hasta la emergencia de los adultos. Estos hallazgos sugieren una variabilidad de la proporción macho: hembra, siendo los machos siempre los más abundantes.

Los estudios sobre el parasitismo de larvas de Lepidoptera en sistemas naturales han sido pocos (Petrice *et al.* 2004; Sarvary *et al.* 2007). En el presente estudio se registran por primera vez una serie de especies de parasitoides que representan un potencial en el manejo de la plaga *H. metabus* en condiciones naturales. Por todo lo antes expuesto y destacando el hecho de que *Belvosia* spp. y *S. lambens* son aparentemente los parasitoides más abundantes en las poblaciones de *H. metabus* en los estados Sucre y Delta Amacuro de Venezuela, es pertinente realizar estudios más profundos sobre el potencial de los mismos con vista a su posible uso como agentes de control en programas de manejo integrado u holístico de esta plaga. En este sentido, en el presente trabajo se realizó el estudio preliminar para la cría masiva de potenciales parasitoides en el control de poblaciones de *H. metabus*.

Estudio preliminar para la cría masiva del parasitoide *Sarcodexia lambens*

De las 65 pupas de Sarcophagidae recolectadas (generación 0) solamente emergieron 13 (20 %) adultos. Al ser transferidos los adultos a la cámara de apareamiento, a los cuatro días se observó la aparición de larvas (25) en la placa que contenía carne molida. Las larvas fueron transferidas a la dieta artificial y a los tres días empezaron a caminar por las paredes del envase, sus movimientos se tornaron más lentos y se oscureció la cutícula, hasta que finalmente a los 7-9 días puparon. Se contabilizaron un total de nueve pupas (36 %) las cuales pesaron entre 4-76 mg y midieron entre 0,4-0,8 cm y 16 larvas muertas (64 %). De todas las pupas emergieron adultos, es decir hubo un 100 % de supervivencia. La longevidad de éstos fue entre 14 y 16 días (F1) y comenzaron a morir a partir del séptimo día después de

su eclosión. Los resultados obtenidos en esta investigación coinciden con los reportados por Coppel *et al.* (1959), quienes reportan una longevidad de 5-8 días para el periodo larval, de 10-14 días para la fase de pupa de *Agria affinis* Fallén 1817 y *Sarcophaga aldrichi* Parker 1916 (Diptera: Sarcophagidae), parasitoides de *Choristoneura fumiferana* Clemens 1865 (Lepidoptera: Tortricidae) (Arthur & Coppel 1953).

La diversidad de alimentos naturales para insectos es extraordinariamente amplia e incluye plantas, granos, sangre, desechos y madera entre otros (Brues 1946). Las dietas artificiales sencillas contienen solamente hígado de cerdo (Coppel *et al.* 1959), mientras que las muy elaboradas son ricas en aminoácidos, colesterol, benzoato de sodio y sales minerales entre otros (Hegdekar 1970). En esta investigación, los adultos de *S. lambens* realizaron la larviposición

sobre carne molida, despreciando el hígado y la leche como los otros dos sustratos ofrecidos.

Con respecto al desarrollo de las larvas de la generación F1, Loureiro *et al.* (2005) compararon diferentes dietas artificiales para *Pattonella intermutans* Thomson 1869, (Diptera: Sarcophagidae), obteniendo como resultado que el sustrato a base de carne fue más eficiente que la dieta a base de cadáveres de animales, aún cuando las moscas de este género, en condiciones naturales, se desarrollan en estos últimos. Loureiro *et al.* (2005) obtuvo una supervivencia de las larvas de 99 %, que es mucho mayor a la obtenida en el presente trabajo (36 %). Sin embargo, la viabilidad de las pupas fue mayor a la obtenida por Loureiro *et al.* 2005 (86,5 %), comparado con 100 % reportada en la presente investigación.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El estudio de las poblaciones de *H. metabus* en los manglares de Mapire y Pedernales representa un ejemplo de control natural de esta polilla. Consideramos importante el estudio de la potencialidad de los parasitoides reportados, principalmente *Belvosia* spp. y *S. lambens* que se perfilan como opciones en las estrategias de control compatibles con el mantenimiento de la biodiversidad en las extensos manglares donde habita *H. metabus*. Además, es necesario continuar con la vigilancia de éstos y otros parasitoides de esta plaga para poder detectar patrones en la diversidad e impacto de estos enemigos naturales sobre las poblaciones de esta polilla. Finalmente se destaca que es posible criar las larvas de *S. lambens* con una dieta artificial. Sin embargo, aún es necesario optimizar las condiciones para establecer crías masivas de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Fernando Luis Cònsoli editor jefe de la revista *Neotropical Entomology* por su autorización para incluir como parte de la presente contribución, el manuscrito publicado en esta prestigiosa revista en el número 38, páginas 243-250, del año 2009.

BIBLIOGRAFÍA

Aleman J, Plana L, Vidal M, Llanes G & M Delgado (1998) Criterios para el control de la calidad en la cría masiva de *Lixophaga diatraea*. En: Hassan S (Ed.) *Egg Parasitoids. Proceeding*

Symposium Cali-Colombia 1998. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fuer Land- und Forstwirtschaft. Parey, Berlin. pp. 97-104.

Arnaud P (1978) A host-parasite catalog of North American Tachinidae (Diptera). *US Department Agriculture Miscellaneous Publication* 1319:1-860.

Arthur A & H Coppel (1953) Studies on dipterous parasites of the spruce budworm, ♀1 (Clemens) (Lepidoptera: Tortricidae). I. *Sarcophaga aldrichi* Parker (Diptera: Sarcophagidae). *Canadian Journal of Zoology* 31:374-391.

Bellotti A, Arias B & J Reyes (2002) Manejo de plagas de la yuca. En: Ospina B & Ceballos H (Eds.) *La yuca en el tercer milenio: sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Consorcio Latinoamericano para la Investigación y el Desarrollo de la Yuca, Proyecto IP-3 de Mejoramiento de Yuca. Publicación CIAT. 220-223 pp.

Braham M, Chermiti B, Souissi R & M Znaidi (2006) Establishment and dispersal of the parasitoids *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae) and *Semiolacher petiolatus* Girault (Hymenoptera: Eulophidae), introduced into Tunisia for the biological control of *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *International Journal of Pest Management* 52:353-363.

Brues C (1946) *Insect dietary. An Account of the Food Habits of Insects*. Cambridge. 466 pp.

Cameron P, Walker G, Herman T & AR Wallace 2006. Incidence of the introduced parasitoids *Cotesia kazak* and *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in tomatoes, sweet corn, and lucerne in New Zealand. *Biological Control* 39:375-384.

Carballo M (2002) Manejo de insectos mediante parasitoides. En: *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica) N° 66 pp. 118-122.

- Coppel H, House H & M Maw (1959) Studies on dipterous parasites of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem) (Lepidoptera: Tortricidae). VII. *Agria affinis* (Fall). (Diptera: Sarcophagidae). *Canadian Journal of Zoology* 37:817-830.
- Coupland J & G Barker (2004) Diptera as predators and parasitoids of terrestrial gastropods, with emphasis on Phoridae, Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae and Fanniidae. En: *Natural Enemies of Terrestrial Molluscs*. CAB International. Wallingford, UK. 85-159 pp.
- Fernandes L, Pimenta F & F Fernandes (2009) First report of human myiasis in Goiás State, Brazil: frequency of different types of myiasis, their various etiological agents, and associated factors. *Journal of Parasitology* 95:32-38.
- Fernández-Arhex V & J Corley (2003) Biología del parasitoide *Ibalia leucospoides* (Hymenoptera: Ibalidae), enemigo natural de *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). *Patagonia Forestal* 4:4-5.
- Fessl B & S Tebbich (2002) *Philornis downsi* – a recently discovered parasite on the Galápagos archipelago – a threat for Darwin's finches? *IBIS* 144:445-451.
- Fornés L & J Hernández (2000) Algunos aspectos de la biología de *H. metabus* (Cramer 1778) (Lepidoptera: Saturniidae). *Boletín de Entomología Venezolana* 15:127-145.
- Gauld I (1988) A survey of the Ophioninae (Hymenoptera: Ichneumonidae) of tropical Mesoamerica with special reference to the fauna of Costa Rica. *Bulletin of The Natural History Museum. Entomology* 57:1-309.
- Godfray H (1994) *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 488 pp.
- Gullan P & P Cranston (2000) *The insects: an outline of entomology*. Blackwell Science. Oxford, London. 470 pp.
- Hegdekar B (1970) Amino acid analogues as inhibitors of insect reproduction *Journal of Economic Entomology* 63:1950-1956.
- Hernández J, Osborn F, Herrera B, Liendo-Barandiaran C, Perozo J & D Velpasquez (2009) Parasitoides larva-pupa de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región nororiental de Venezuela: un caso de control biológico natural. *Neotropical Entomology* 38:243-250.
- Janzen D (1984) Natural history of *Hylesia lineata* (Saturniidae: Hemileucinae) in Santa Rosa National Park, Costa Rica. *Journal of Kansas Entomological Society* 57:490-514.
- Linares B & J Salazar (2007) *Taladradores o barrenadores de la caña de azúcar Diatraea* spp. *Fichas técnicas de organismos plaga. Plagas agrícolas de Venezuela: Artrópodos y Vertebrados* Sociedad Venezolana de Entomología. Caracas, Venezuela. Disponible en Internet: <http://www.plagas-agricolas.info.ve/fichas/ficha.php?hospedero=285&plaga=243>. pp.
- Lopes H & A Leite (1989) Morphology of the egg of *Sarcodexia lambens* (Diptera: Sarcophagidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84:497-500.
- Loureiro M, Oliveira V & J d'Almeida (2005) Desenvolvimento pós-embrionario de *Pattonella intermutans* (Thomson) (Diptera:Sarcophagidae) em diferentes dietas. *Revista Brasileira de Entomologia* 49:127-129.
- Marchiori C (2007) *Gnathopleura quadridentata* Wharton, 1986 (Hymenoptera; Braconidae; Alysiinae) and their hosts collected in different substrates in Caldas Novas. *Brazilian Journal of Biology* 67:101-103.
- Marchiori C, Leles A, Carvalhos & R Rodrigues (2007) Parasitoids of muscoids diptera collected at Alvorada slaughterhouse in Itumbiara, south of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia y Veterinária* 16:235-237.
- Neuenschwander P, Herren H, Harpaz I, Badulescu D & A Akingbohungebe (1988) Biological control of the cassava mealybug, *Phenacoccus manihoti*, by the exotic parasitoid *Epidinocarsis lopezi* in Africa. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science* 318:319-333.
- Nicholls C, Altieri I & J Sánchez (1999) *Manual práctico de control biológico para una agricultura sostenible*. Asociación Vida Sana y Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Barcelona, España. 86 pp.
- Osborn F (2001) First report of a microsporide from *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) larvae in Sucre state, Venezuela. Society for Invertebrate Pathology, 34th Annual Meeting. Noordwijkerhout, The Netherlands. 267 pp.
- Packard A (1914) Monograph of the bombycine moths of North America. Part III. *Memories of Naturalist Academic of Science* 12:1-516.
- Pape T (1996) Catalogue of Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera). *Memoirs of Entomology International* 8:1-558.
- Parra JRP (1994) *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*. Piracicaba, FEALQ. 192 pp.
- Peigler R (1994) Catalog of parasitoids of Saturniidae of the world. *Journal of Research on the Lepidoptera* 33:1-121.
- Petrice T, Strazanac J & L Butler (2004) A survey of Hymenoptera parasitoids of forest macrolepidoptera in the Central Appalachians. *Journal of Economic Entomology* 97:451-459.
- Rocha U & J Mendes (1996) Pupation of *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) associated with *Sarcodexia lambens* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Sarcophagidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91:299-300.
- Sarvary M, Nyrop J, Reissig H & K Gifford (2007) Potential for conservation biological control of the obliquebanded leafroller (OBLR) *Choristoneura rosaceana* (Harris) in orchard systems managed with reduced-risk insecticides. *Biological Control* 40:37-47.
- Singh P (1977) *Artificial Diets for Insects, Mites, and Spiders*. Plenum Publication Corp. New Zealand. 549 pp.
- Stephens C (1962) *Oiketicus kirbyi* (Lepidoptera: Psychidae) A pest of bananas in Costa Rica. *Journal of Economic Entomology* 55:381-386.
- Strazanac J, Plaugher C, Petrice T & L Butler (2001) New Tachinidae (Diptera) host records of Eastern North American forest canopy Lepidoptera: baseline data in a *Bacillus thuringiensis* variety Kurstaki nontarget study. *Journal of Economic Entomology* 94:1128-1134.
- Van Lenteren J & V Bueno (2003) Augmentative biological control of arthropods in Latin America. *Biocontrol* 48:123-139.
- Vásquez L (1990) Estudio bioecológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer en el oriente de Venezuela. *Saber* 3:14-20.

SECCIÓN IV
Gestión y control

Ediciones IVIC

Estrategias de monitorización y control (2004-2008) de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) en la península de Paria, estado Sucre, Venezuela

Melfran Herrera*¹, Gregorio Ramírez¹ y Frances Osborn²

¹Coordinación de Vigilancia Entomológica, Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias, Fundación para la Salud del estado Sucre (Fundasalud), Carúpano, estado Sucre, Venezuela.

²Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

*melfranh@gmail.com

Resumen

Para finales de 2004, las poblaciones de *Hylesia metabus* se encontraban fuera de control en la península de Paria, estado Sucre. Esto provocó una reorganización de la Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias de Fundasalud, estado Sucre, institución encargada del control de este lepidóptero en esta entidad, la cual permitió el establecimiento de tres áreas de trabajo en el campo, denominadas: Bloque I: municipios Benítez y Libertador; Bloque II, municipio Cajigal y Bloque III, municipios Mariño y Valdez. Por otro lado, se inició una monitorización basada en la georreferenciación de las poblaciones del insecto. Además, en noviembre del año 2005, se implantó como estrategia la reubicación de las trampas de luz, desde zonas pobladas hacia el manglar. Entre septiembre y noviembre de 2004, las poblaciones se incrementaron tanto que fue imposible contabilizarlas. En diciembre de 2004 comenzó el registro de las poblaciones del insecto en el municipio Benítez, el cual fue extendido a los demás municipios: Libertador, Cajigal, Mariño y Valdez en marzo de 2005. Las densidades poblacionales de *H. metabus* siguieron siendo altas hasta noviembre de 2005, cuando comenzaron a decaer, concentrándose básicamente al sur del municipio Benítez. La caída en las poblaciones se debió a las aspersiones con larvicidas a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* y la acción de los enemigos naturales. Además, la reubicación de las trampas de luz aparentemente concentró las poblaciones en los manglares, lejos de los centros poblados. La elaboración de una base de datos ha permitido reconocer algunos patrones en la distribución espacio-temporal de las poblaciones de *H. metabus* en el golfo de Paria e ilustrar la influencia de la ubicación de las trampas sobre ellas, lo cual ha facilitado la toma de decisiones para su manejo integrado.

Abstract

Control Strategies (2004-2008) on *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) Populations in the Peninsula of Paria, Sucre State, Venezuela

Towards the end of 2004 *Hylesia metabus* populations in the Paria Peninsula, Sucre State, were out of control. This resulted in the reorganization of the institution responsible for the control of this moth in

Palabras clave Key words

Control, monitorización, sistemas de información geográfica, trampas.
Control, monitoring, Geographic Information Systems, traps.

Sucre State. Three areas of action (blocks) were established: Block I: Benítez and Libertador Municipalities; Block II, Cajigal Municipality; and Block III, Mariño and Valdez Municipalities. Additionally, monitoring techniques based on the georeferentiation of the populations of this insect were started and in November 2005 the locations of several of the light traps were moved from populated areas to the mangroves. Between September and November 2004, *H. metabus* populations were so high that it was impossible to count them. In December 2004 records of the populations using the new system were started in Benítez and extended to Libertador, Cajigal, Mariño and Valdez by March, 2005. The population densities of *H. metabus* remained high until November 2005 when they began to decrease, and concentrate, in general, in the south of Benítez. The fall in the populations of this pest could be due to applications with larvicides based on *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and the action of natural enemies. Moreover, the relocation of the light traps has apparently concentrated the populations in the mangroves, far from populated areas. The generation of a data base has made possible the recognition of patterns in the spatial-temporal distribution of *H. metabus* populations in the Gulf of Paria as well as illustrating the influence of the location of the light traps on them, thus aiding the decision making process for an improved integrated control.

PRESENTACIÓN

El ente encargado del control de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) en el estado Sucre, Venezuela es el Servicio de Vigilancia Epidemiológica Ambiental, adscrito a la Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias (Gsace), de la Fundación para la Salud (Fundasalud), ente adscrito a la Gobernación del estado Sucre. Entre sus responsabilidades está el manejo integrado de esta plaga. Para ello, emplea un sistema de monitorización y control de las densidades poblacionales de este insecto, el cual comprende un registro de las fases inmaduras (huevos, larvas y pupas) y de los adultos, y un sistema integrado de control que comprende: la recolección directa de larvas y pupas, y el uso de una formulación comercial de la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911, var. *kurstaki* (*Btk*) para controlar las fases larvarias y trampas de luz para el control de la fase de adulto. Además, se emprenden actividades educativas para mantener a la comunidad informada de las diferentes estrategias que se deben emplear para minimizar los efectos de esta plaga sobre la salud humana.

Monitorización de las fases inmaduras y adulta de *H. metabus*

Éste proceso consiste en la búsqueda y ubicación constante de focos de las distintas fases inmaduras del lepidóptero, mediante recorridos constantes (terrestres y acuáticos) en la extensa área boscosa, tanto de manglares, los cuales son el hábitat preferido de *H. metabus*, como de los bosques aledaños, especialmente los bosques de galería ubicados en las márgenes de los ríos y quebradas que desembocan en el golfo de Paria, los cuales son usados como corredores para su dispersión y reproducción. Las larvas localizadas son identificadas y se determina el instar o estadio en que se encuentran. Además, se llevan a cabo recolecciones de pupas para determinar distribución de sexos y niveles de parasitismo, lo cual incluye la identificación de la especie del parasitoide y la abundancia relativa temporal y espacial de la polilla. Esta actividad también permite medir el efecto causado por las aspersiones con bacterias entomopatógenas (*Btk*) que se hayan realizado previamente. La búsqueda y recolección

de posturas se llevan a cabo inmediatamente después de culminado el período de vuelo de los adultos, especialmente en el área alrededor de las trampas de luz donde hay una alta probabilidad de localizarlas.

Las poblaciones de adultos son monitoreadas mediante el uso de trampas de luz, que son colocadas alrededor de las áreas infestadas, las cuales se determinan por inspecciones terrestres, marítimas y fluviales. También se realizan recorridos diurnos y nocturnos de las localidades cercanas para determinar la posible presencia de individuos de la especie en los postes del alumbrado público, principalmente. Esta estrategia permite determinar: densidad poblacional, relación entre ambos sexos, ubicación, determinación de la dispersión del insecto en la zona, migraciones, enemigos naturales, etc. Toda la información recopilada por el equipo de monitorización se coloca en una base de datos centralizada, la cual está disponible para todo el equipo que labora en el programa.

Control de las fases inmaduras y adulta de *H. metabus*

El control de las fases inmaduras se ejerce mediante varias estrategias: el retiro manual y posterior destrucción de las posturas, larvas y pupas directamente de las plantas hospederas o de superficies artificiales como paredes, postes o techos, en donde en algunos casos las hembras oviponen cuando ocurren explosiones poblacionales e invaden los pueblos y ciudades cercanas; la aplicación de agua jabonosa para la eliminación de masas de larvas, ubicadas por lo general en el extremo de las ramas (estadios tempranos) y en el tronco de las plantas hospederas (estadios tardíos); la aplicación focalizada de *Btk.* con pulverizadores o asperjadoras manuales, lo cual se implementa para eliminar masas larvales que no pueden ser alcanzadas manualmente, debido a la altura del hospedero o a lo accidentado del terreno. Esta última estrategia es la más empleada en los manglares de las márgenes de caños y en los árboles y arbustos de las riberas

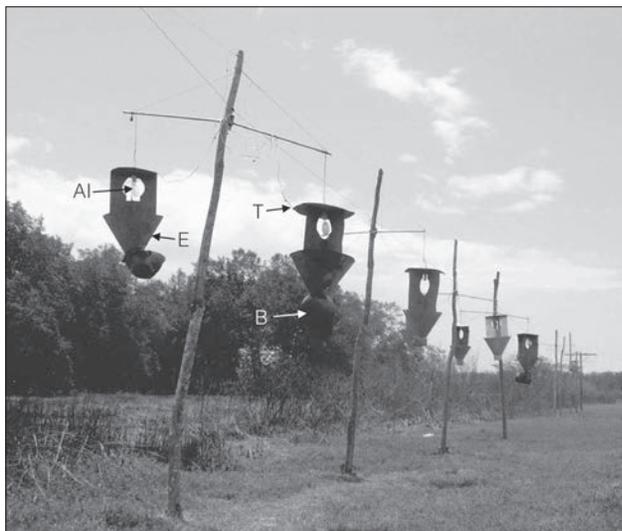


Figura 1. Trampas de luz utilizadas para la captura de *Hylesia metabus*. T = techo, AI = área de intercepción, E = embudo, B = bolsa plástica.

de ríos, en las áreas en donde se han localizado focos de infestación.

La aplicación aérea de *Btk.*, mediante aeronaves como helicópteros y avionetas, se realiza en caso de infestaciones mayores que abarquen una gran área, generalmente de manglares, que resulten inaccesibles para el personal de campo debido a la dificultad de desplazamiento dentro de este tipo de vegetación, ya sea por vía terrestre o acuática.

Esta estrategia sólo es efectiva si se toman en cuenta parámetros como: estadio promedio de las masas larvales por controlar, las cuales deben estar entre tercer y quinto instar ya que estos son más susceptibles al patógeno *Btk.*; y ubicación exacta del área infestada. Además, las aplicaciones deben realizarse a comienzos de la mañana y finales de la tarde, de manera de disminuir en gran medida las pérdidas de producto por evaporación o por el efecto de los vientos. También debe tomarse en cuenta el hecho de que las aeronaves deben volar lo más cerca posible de la vegetación y, en la medida de lo posible, en días en que no esté lloviendo, de manera que el producto se fije mejor a las hojas y no sea lavado por el agua.

Esta última estrategia sólo debe ser llevada a cabo luego de una preevaluación del producto por parte de la Coordinación de Vigilancia Entomológica y del Programa de Vigilancia y Control de *H. metabus* del estado Sucre. También es necesario realizar una evaluación en el campo «posterior a la aplicación» que permita determinar la efectividad de la medida.

En cuanto a los adultos, el control se ejerce básicamente a través de la estrategia de colocación de trampas de luz (Figura 1), ubicadas en los sitios de mayor infestación de *H. metabus*, según la información obtenida por el equipo de monitorización. Las trampas consisten en una estructura metálica que básicamente tiene tres partes: un techo, área de intercepción donde se ubica el bombillo (atractivo) y un embudo metálico, debajo del cual se coloca una bolsa plástica para la retención de los individuos y posterior recolección (Figura 1). Las mariposas, atraídas

por la luz del bombillo, vuelan hacia la trampa, chocan contra el área de interceptación y caen a través del embudo en la bolsa, la cual es posteriormente retirada. Las mariposas de *H. metabus* se contabilizan mediante el conteo directo o en el caso de altas densidades poblacionales y de manera alternativa, la bolsa es pesada y el número de individuos es estimado, asumiendo un peso de 0,325 g por individuo, lo cual ha sido calibrado. Luego de la contabilización de los individuos de *H. metabus* la bolsa es destruida. Estas trampas permiten monitorear las poblaciones, provocando también la interceptación de los insectos y la circunscripción de su oviposición alrededor de éstas, lo cual permite un mejor control en el siguiente ciclo. Anteriormente también se empleaba la aplicación directa de gasoil sobre los individuos que revoloteaban en las luces del alumbrado público de las localidades afectadas, método que fue descartado debido a la alta contaminación ambiental que causaba (observación personal). Además, el gasoil pudo tener un efecto directo en la salud de los operadores y pobladores de la región que se exponían a las aplicaciones del mismo, el cual, diseminado en el ambiente en altas concentraciones en forma de rocío, podía penetrar en la piel y producir reacciones alérgicas (observación personal).

Las estaciones de captura están compuestas por al menos ocho trampas de luz, a objeto de asegurar un estímulo suficientemente fuerte para atraer a las mariposas desde el interior del manglar o bosque. Las trampas de luz deben ser ubicadas estratégicamente en estaciones construidas en tierra firme o en palafitos a orillas de los caños, y alimentadas eléctricamente por generadores portátiles; también pueden ser conectadas directamente a la red eléctrica pública. Esta estrategia debe implementarse en cada período de vuelo por al menos 30 a 45 días continuos para asegurar su eficiencia. Para la determinación de ese periodo, se toma en consideración el o los picos de mayor densidad de capturas de adultos en el ciclo anterior y el rango de duración de ese mismo ciclo, de manera de tratar de capturar la mayor proporción posible de los adultos emergidos en el nuevo periodo de vuelo.

En los párrafos siguientes se presentan los resultados del impacto que han tenido las labores de monitorización y control sobre las poblaciones de adultos de *H. metabus* como plaga de importancia en la salud pública en el área de la península de Paria, estado Sucre, la cual a su vez se caracteriza que por ser una zona endémica de malaria, enfermedad transmitida por insectos vectores.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Las situaciones que se presentaron con las poblaciones de *Hylesia metabus* para finales de 2004 y comienzos de 2005, las cuales se encontraban fuera de control en todos los municipios que conforman la península de Paria, estado Sucre: Cajigal, Mariño, Benítez, Valdez y Arismendi, provocaron una reorganización del Programa de Control de *Hylesia metabus* en dicho estado, en relación al personal, recursos financieros, materiales y equipos, la cual fue influenciada y apoyada por las recomendaciones técnicas hechas por los investigadores participantes en el Proyecto Reto *Hylesia metabus*. Este cambio comprendió la conformación de tres áreas de trabajo en el campo denominadas bloques geográficos y de acción (Bloque I: municipios Benítez y Libertador; Bloque II, municipio Cajigal; y Bloque III, municipios Mariño y Valdez) (Figura 2), a los cuales se asignó un técnico de campo, obreros, vehículo, transporte acuático y materiales suficientes para que llevaran a cabo el control del insecto de una manera más eficiente.

A partir de ese momento se inició un monitorización basada en criterios científicos, empleando tecnología de punta que permitiese garantizar el éxito del programa. La ubicación de los estadios inmaduros y adultos de *H. metabus* fue registrada con coordenadas geográficas mediante un sistema satelital de posicionamiento global (GPS por sus siglas en inglés), los registros generados por estas evaluaciones de campo fue almacenada en una base de datos y utilizada para generar mapas y gráficos temáticos que permitió un mejor análisis de la distribución y tamaño poblacional del insecto, con el fin de facilitar la toma de decisiones más adecuadas al momento de implementar las distintas opciones de control.

Las poblaciones de adultos fueron monitoreadas mediante el uso de trampas de luz (Figura 1) que fueron colocadas alrededor de las áreas infestadas. La búsqueda y recolección de posturas se llevó a cabo inmediatamente después de culminado el ciclo de vuelo de los adultos,

especialmente en el área circunscrita alrededor de las trampas de luz donde se capturaban los adultos. Con esta información se obtuvo lo siguiente: 1) generación de mapas de la distribución de inmaduros y adultos de *H. metabus* en los municipios Benítez, Libertador, Cajigal, Mariño y Valdez y 2) comparación de las poblaciones de adultos de *H. metabus* entre los años 2004-2008.

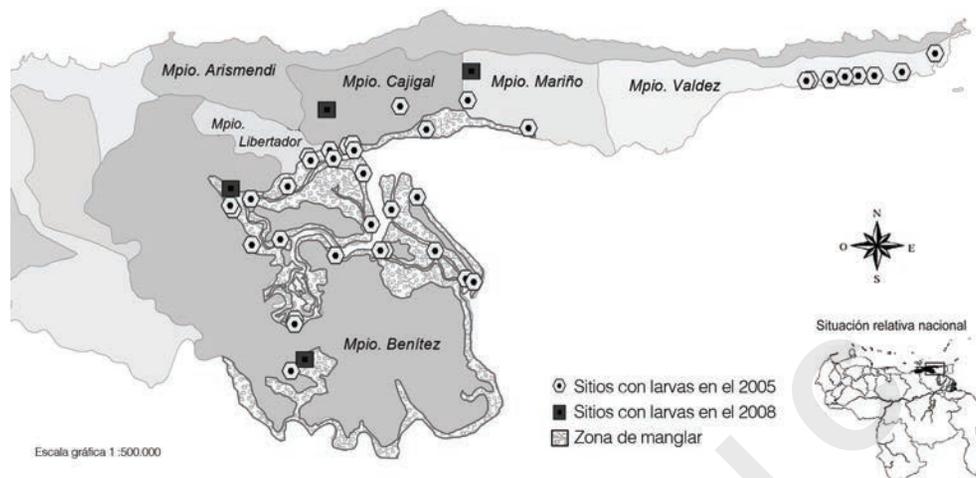


Figura 2. Ubicación de los sitios de recolección de las fases inmaduras de *Hylesia metabus* en los años 2005 y 2008.

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan las abundancias de adultos de *H. metabus*, estimadas a partir del peso de individuos capturados en las trampas de luz ubicadas en el golfo de Paria entre el año 2004 y el 2008. Para finales de 2004 y comienzos del 2005, las poblaciones se encontraban fuera de control; para diciembre de 2004 sólo se dispuso de los datos de captura de las trampas ubicadas en el municipio Benítez; para marzo y agosto

de 2005, la colocación de estaciones de captura de polillas mediante trampas de luz fueron mucho más extensivas y se cubrieron los municipios Benítez, Libertador, Cajigal, Mariño y Valdez (Figuras 2 y 3). Las poblaciones de *H. metabus* siguieron siendo altas hasta el período de vuelo de noviembre 2005, con capturas mayores en el municipio Benítez (islas Turuépano y Antica) y en trampas colocadas cerca de la localidad de Yaguaraparo. A partir de ese mes, y debido a que las poblaciones mayores de *H. metabus* se encontraron en las zonas de manglar (Figuras 2 y 3), se decidió trasladar las estaciones de trampas de luz del municipio Cajigal al municipio Benítez, con el fin de remover la fuente de luz de tierra firme al manglar, para así poder circunscribir las poblaciones en esta zona (Figura 4). En febrero de 2006 las poblaciones de *H. metabus* comenzaron a disminuir, encontrándose mayormente en trampas alrededor de la isla Turuépano (Mpio. Benítez), pero también con mayores densidades poblacionales en caño Aruca (Mpio. Cajigal).

Tabla 1. Número de adultos de *Hylesia metabus* capturados en las estaciones de trampas de luz en los municipios Benítez/Libertador, Cajigal y Mariño/Valdez durante los períodos de vuelo entre diciembre 2004 y diciembre 2008.

Fecha de captura	Número de Individuos		
	Benítez/Libertador	Cajigal	Mariño/Valdez
dic-04	216.462	0	0
mar-05	5.495	517	14.828
ago-05	452.114	365.871	203.335
nov-05	930.892	505.803	16.190
feb-06	688.092	1.034.738	111.911
jun-06	5.877	31	0
sep-06	2.585	31	0
dic-06	462	0	0
abr-07	63	0	0
sep-07	30	0	0
ene-08	12	0	0
abr-08	6	0	0
ago-08	6	0	0
dec-08	7	7	0

Entre abril y mayo de 2006, la Gsace, en conjunto con el Ministerio del Poder Popular para la Salud se programó una aspersión aérea con el larvicida DiPel® (a base de *Btk.*), producto que se había utilizado en años anteriores para controlar las poblaciones larvales de *H. metabus* con resultados variables. A partir de esta aspersión, las capturas de

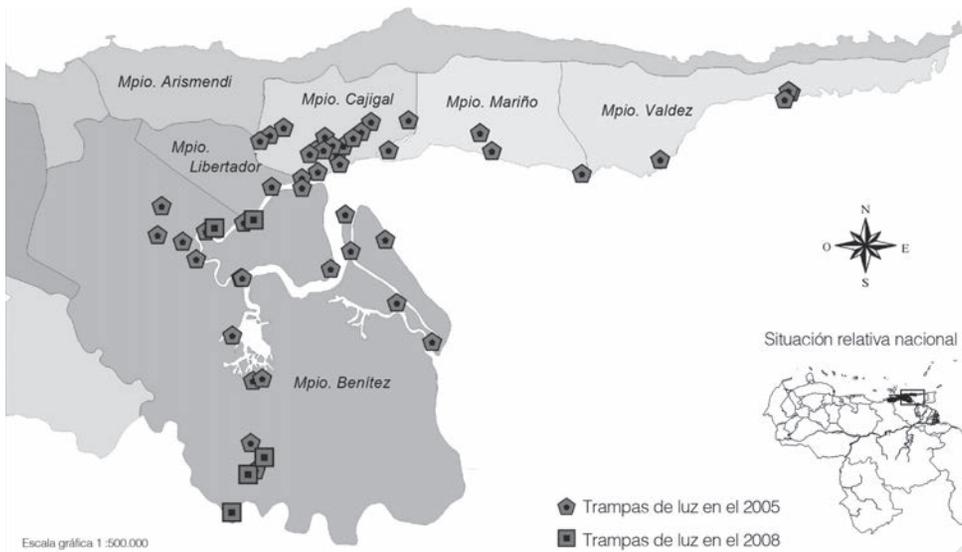


Figura 3. Ubicación de las trampas de luz que se capturaron individuos de *Hylesia metabus* en los años 2005 y 2008.

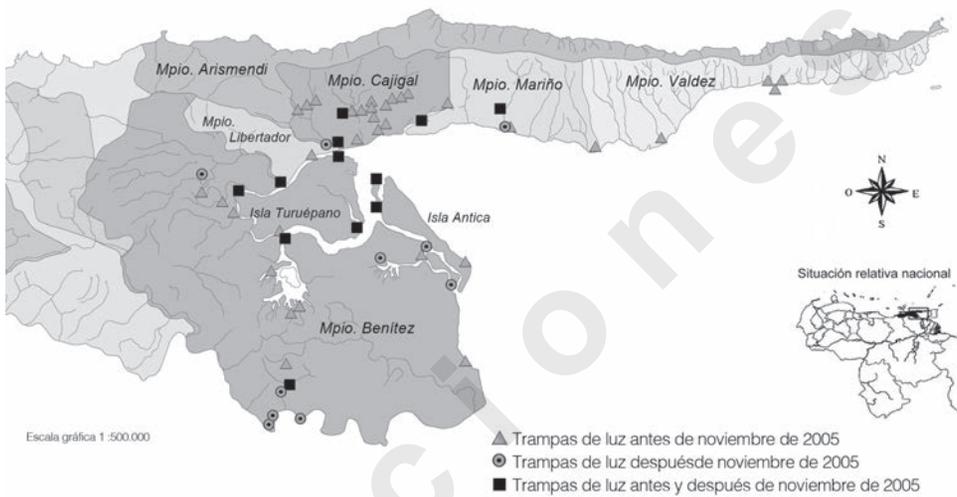


Figura 4. Ubicación geográfica y temporal de las trampas de luz empleadas en el control de *Hylesia metabus*.

H. metabus disminuyeron considerablemente y actualmente las poblaciones remanentes están concentradas mayormente en la zona de Guanoco (Mpio. Benítez), aun cuando ha habido reportes de larvas en zonas de tierra firme en los municipios Cajigal y Mariño (Figura 2) y de adultos en caño de Ajíes (Mpio. Benítez) (Figura 3).

Hasta el momento no existen suficientes datos para verificar si existe un ciclo regular en el aumento y disminución de las poblaciones de *H. metabus*. Sin embargo, éstas obviamente muestran fluctuaciones importantes entre años e incluso entre ciclos del mismo año.

Algunas de estas fluctuaciones poblacionales pueden deberse a diferencias en la intensidad del muestreo. Por ejemplo, no se colocaron estaciones de captura en los municipios Benítez, Libertador, Mariño o Valdez durante los períodos de vuelo de marzo y julio 2002, o en el municipio Cajigal en diciembre de 2004. Sin embargo, es obvio que la población ha disminuido drásticamente a partir de noviembre 2005. Esto pudiera deberse en parte a las aspersiones con *Btk.*, sin embargo, la existencia de enemigos naturales como por ejemplo, depredadores, parasitoides y microorganismos patógenos, tiene también un impacto importante sobre las poblaciones. En estudios realizados sobre el parasitismo en *H. metabus* se encontró que el porcentaje de pupas parasitadas varió entre 33 y 91 %, en Mpire, Mpio. Valdez, en el golfo de Paria (Hernández *et al.* 2009).

Por otro lado, es de resaltar que la ubicación de las trampas de luz a partir de noviembre de 2005, aparentemente ha tenido el efecto deseado: remover las poblaciones de tierra firme y concentrarlas en las zonas de manglar, lejos de los centros poblados. Esto ha resultado en un gran éxito, al permitir, prácticamente, erradicar esta plaga de las comunidades de estos municipios.

Se logró integrar el monitorización y el control de esta plaga entre diferentes instituciones como: la Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias (Sucre), el Ministerio del Poder Popular para la Salud, las alcaldías de los municipios afecta-

dos, la Armada Bolivariana, bomberos municipales, la policía y Guardia Nacional Bolivariana, la Fundación para el Mejoramiento de la Salud del municipio

Cajigal (Funmesaludca), los dispensarios de salud, además de otras organizaciones vecinales, profesionales y estudiantiles.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En conclusión, las poblaciones adultas de *H. metabus* se han visto reducidas, de millones de individuos capturados a comienzos de 2006 a solo 14 en el último período de vuelo (octubre-diciembre, 2008). La dispersión también se disminuyó de forma importante, pasándose de poblaciones extendidas por toda la región a focos concentrados en el municipio Benítez. Sin embargo, es necesario mantener una vigilancia constante para evitar un nuevo repunte de esta plaga. En este sentido, se propone realizar la creación de un programa formal o permanente de control, que sea capaz de actualizarse según las necesidades. Además, se sugiere facilitar la conducción por parte de los entes competentes de un monitorización continuo de la plaga en todas sus fases: huevos, larvas, pupas y adultos.

Se debe mantener abierta la posibilidad de emplear algún otro tipo de control biológico, especialmente autóctono, que demuestre ser efectivo, no produzca daños colaterales y sea sustentable su producción o adquisición. Se han realizado varios estudios durante los últimos 30 años que han permitido identificar una serie de controladores biológicos naturales de esta especie de polilla, entre los cuales destacan: bacterias y hongos entomopatógenos, e insectos parasitoides o depredadores (moscas de las familias Tachinidae y Sarcophagidae; avispas de las familias Braconidae y Chalcididae; y chinches de la familia Reduviidae).

En particular, la chinche *Arilus cristatus* L. 1758, es la única que ha sido evaluada en condiciones de laboratorio para verificar su potencial como depredador el cual ha resultado excelente, sin embargo, no se ha podido evaluar sistemáticamente en el campo (Vásquez 1990). Además, se han realizando investigaciones acerca de la comunicación química entre los machos y hembras adultas de esta especie, con el fin de implementar un sistema de captura basado en el uso de las feromonas (sustancias químicas u olores que utilizan los insectos para comunicarse intraespecíficamente). La feromona sería empleada como atrayente en lugar de la luz para capturar a individuos de *H. meta-*

bus. Este sistema tiene la ventaja que se puede utilizar para el monitorización y control de esta plaga en zonas remotas donde no hay alumbrado eléctrico público y además, es específica a *H. metabus* a diferencia de las trampas de luz que atraen una gran variedad de insectos nocturnos.

Funmesaludca ha sido una aliada permanente durante los dos últimos años, aportando personal y recursos financieros para la realización de un monitorización permanente y a lo largo de toda la región afectada, incluyendo parte del estado Monagas.

BIBLIOGRAFÍA

- Hernández J, Osborn F, Herrera B, Liendo-Barandiarán C, Perozo J & D Velásquez (2009) Parasitoides larva-pupa de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) en la región nororiental de Venezuela: un caso de control biológico natural. *Neotropical Entomology* 38:243-250.
- Vásquez N (1990) Estudio bioecológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer en el oriente de Venezuela. *Saber* 3:14-20.

Análisis espacio-temporal y mapa de riesgo de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) en el estado Sucre

Adriana Zorrilla^{*1}, Juan-Carlos Navarro^{*1}, Juan Martínez¹ y Frances Osborn²

¹Laboratorio de Biología de Vectores, Instituto de Zoología Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

²Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela.

*adrianazg8@yahoo.es juan.navarro@ciens.ucv.ve

Resumen

Los sistemas de información geográfica (SIG) son herramientas de vanguardia que facilitan el análisis de los datos espacio-temporales con el fin de resolver problemas complejos de planificación y gestión. En este capítulo se presentan los resultados de un estudio sobre la distribución espacio-temporal de poblaciones de *Hylesia metabus*, haciendo énfasis en la vegetación y niveles de precipitación entre diciembre de 2004 y agosto de 2006. Mediante el análisis de una imagen Landsat de 2003 del estado Sucre y un SIG, se integró información de carácter ambiental para realizar una clasificación no supervisada de la vegetación del área de estudio y se generaron mapas a escala 1:500000, sobre los cuales se integraron los datos de la distribución y abundancia de larvas y adultos de *H. metabus* recolectados durante el período señalado. El hábitat por excelencia asociado al desarrollo y cría de *H. metabus* fue el manglar. La captura de individuos adultos en áreas urbanas, herbazales, bosques y asociaciones herbazal con el bosque, está determinada principalmente por la cantidad de luz emitida por trampas y caseríos. Dentro de la zona del manglar, el área de mayor riesgo es la isla de Turuépano, municipio Benítez. Los primeros tres estadios larvales están negativamente asociados a altos niveles de precipitación. Un conocimiento más profundo del tipo de vegetación que sirve de hábitat a *H. metabus* y sus probables áreas de incidencia, aunada a la noción de cómo la precipitación afecta las diferentes fases del ciclo de vida, ayudará a planificar de manera más exitosa las estrategias de control de esta importante plaga.

Abstract

Spatial-Temporal Analysis and Risk Map for *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) in Sucre State

Geographic information systems (GIS) have been designed to facilitate the analysis of spatial-temporal data in order to resolve complex planning and management problems. The spatial-temporal distribution of *Hylesia metabus* populations was studied with respect to the vegetation and levels of

Palabras clave

Imagen satelital, precipitación, sistemas de información geográfica, vegetación.

Key words

Geographic Information Systems, precipitation, satellite image, vegetation.

precipitation between December 2004 and August 2006. Environmental information was obtained from a Landsat 2003 image of Sucre state and a GIS and a non-supervised classification of the vegetation of the study area was done, from which 1:500000 maps were generated. Larval and adult distribution and abundance data collected during the study period were then incorporated into the maps. The prevailing habitat for the development of *H. metabus* is the mangrove. The capture of adults in urban areas, grasslands, woodlands and woodland-grassland associations is mainly determined by the amount of light emitted by light traps and villages. Within the mangroves, the area of highest risk is Turuépano Island, Benítez municipality. The first three larval instars are negatively associated with high precipitation levels. A wider knowledge of the type of habitat preferred by *H. metabus* and the probable areas of incidence, together with an insight into how precipitation levels may affect the different phases of the life cycle, will help to improve the planification of successful strategies for the control of this important pest.

PRESENTACIÓN

En los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones con la finalidad de controlar y monitorear las poblaciones de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]). Sin embargo, según Clavijo (1993), para que el manejo de plagas sea realmente efectivo es indispensable generar informaciones que permitan sustentar sólidamente cualquier medida a tomar para su control, siendo una de las más importantes la determinación y caracterización del área de influencia de la especie en cuestión.

En la actualidad, existe una serie de carencias de información sobre la distribución de *H. metabus* en Venezuela, lo cual, sin duda alguna, obstaculiza los esfuerzos realizados para controlar efectivamente esta plaga. Esta escasez de información sobre el área de distribución impide evaluar los posibles cambios ambientales que podrían estar modulando la selección del hábitat por parte de esta especie. Para llenar estos vacíos de información, el Ministerio del Poder Popular para la Salud y otras instituciones del sector, se han visto en la necesidad de incrementar el uso de los Sistemas de Información Geográfica (SIG 2009) como herramienta para fortalecer las capacidades de análisis, gestión, monitorización y toma de decisiones en salud pública. Esto debido a que permiten la integración organizada de computadoras, programas de computación y datos geográficos diseñados para

capturar, almacenar, multiplicar, analizar y desplegar información geográficamente referenciada, con el fin de resolver problemas complejos de planificación y gestión (National Center for Geographic Information and Analysis 1990).

Las bases de datos de los SIG consisten en conjuntos de datos que se agrupan en capas. Cada superposición representa un determinado tipo de información geográfica. Por ejemplo, una cubierta puede incluir información sobre la vegetación de una región, otra sobre la precipitación de esa área, mientras que una tercera puede contener los datos sobre la distribución de una o más especies. Los SIG permiten combinar esas superposiciones en una sola imagen, mostrando cómo la vegetación, la precipitación y las especies están relacionadas entre sí; de este modo los investigadores pueden, por ejemplo, determinar cuáles especies son generalistas y cuales especialistas, a partir de esa imagen. Una base de datos de un SIG puede incluir un gran número de capas. Además, se pueden generar imágenes de un área en dos o tres dimensiones, representando elementos naturales como colinas o ríos, junto a elementos artificiales como carreteras y pueblos.

Uno de los primeros investigadores en utilizar el método geográfico para resolver un problema fue John Snow, quién realizó el mapeo de las localidades con ca-

sos de cólera durante una epidemia en Londres en 1854. Este estudio de la distribución de la epidemia llegó a la fuente de la enfermedad: una bomba de agua contaminada, al desconectar ésta la epidemia cesó (Benton-Short & Short 2008).

En las décadas de los cincuenta y sesenta se inició el desarrollo de métodos para combinar múltiples mapas a través de la superposición de capas, mediante un proceso manual. Luego, diferentes organizaciones en los Estados Unidos iniciaron la construcción de bases de datos de topografía y el uso de la tierra, a la par de que algunos investigadores comenzaron de escribir programas de computación para el análisis y mapeo digital de los datos. A principios de los años sesenta se produjo el primer SIG a escala nacional en Canadá. Fue denominado el Sistema de Información Geográfica para Canadá y se utilizó para hacer un inventario de los recursos de la tierra y desarrollar un programa de computación para cuantificar los usos existentes y potenciales de la misma. Luego, otras instituciones crearon sistemas parecidos (Bettinger *et al.* 2003). Sin embargo, los SIG no se utilizaron de forma generalizada hasta finales de la década de los setenta, cuando los avances tecnológicos junto con la reducción en los costos, hicieron que las computadoras fueran accesibles para todos. Actualmente, los Sistemas de Información Geográfica están siendo utilizados mundialmente para resolver diversos tipos de problemas en un creciente número de ámbitos.

Los SIG se utilizan a menudo en conjunto con imágenes satelitales, las cuales son representaciones visuales de la información capturada por un sensor colocado en un satélite artificial. Estos sensores recogen información reflejada por la superficie de la tierra que luego es procesada para extraer valiosa información sobre las características de la zona representada.

Las imágenes de satélite y los SIG constituyen herramientas de vanguardia que facilitan el análisis de los datos espaciotemporales, permitiendo, junto a los datos de campo, monitorizar la colonización de especies plaga y brindar información de suma importancia en el momento de tomar medidas de control que tengan el menor costo tanto en lo económico como lo ambiental.

En Venezuela se han llevado a cabo numerosos proyectos de importancia para la salud pública con la ayuda de imágenes satelitales y SIG. Entre ellos, Barrera *et al.* (1998), lograron integrar variables ambientales y datos epidemiológicos para determinar los factores de riesgo para la transmisión de malaria. Martínez (2000),

Martínez & Delgado (2000), Delgado *et al.* (2000b; 2001) determinaron elementos del paisaje asociados a la dinámica de la malaria en los estados Amazonas y Sucre. Barrera *et al.* (2000) realizaron una estratificación epidemiológica de los casos de dengue en el área metropolitana de Maracay, y posteriormente Barrera *et al.* (2001), realizaron un estudio para caracterizar los focos enzoóticos del virus de encefalitis equina venezolana en el occidente de Venezuela. Recientemente, Cabaniel *et al.* (2005) utilizaron datos climáticos provenientes de sensores remotos para determinar el impacto de los eventos de El Niño en la leishmaniasis cutánea en el estado Sucre. Por su parte Martínez (2008), determinó los niveles de riesgo epidemiológico para encefalitis equina venezolana en el estado Barinas mediante un análisis ponderado de factores, tomando en cuenta la presencia de reservorios, vectores, y las evidencias de circulación viral.

Debido a que en investigaciones anteriores se ha observado que las larvas de *H. metabus* se alimentan de distintos tipos de vegetación y que los adultos representan un problema de salud pública en los poblados y caseríos cercanos a los manglares, en este estudio se planteó determinar el área de mayor riesgo de distribución de esta especie, mediante la elaboración e incorporación de un mapa temático de ecosistemas en un Sistema de Información Geográfica (SIG) junto con la información exhaustiva de los patrones de abundancia recopilada en el área de estudio, lo que permitirá establecer una hipótesis del proceso de selección del hábitat por parte de *H. metabus* y su distribución espacial y temporal.

Además, se analiza la variación de densidad y abundancia de las poblaciones de *H. metabus* en el espacio y a través del tiempo, relacionándolas con factores abióticos que pueden afectar el desarrollo de la especie (precipitación e intervención humana) y el tipo de vegetación de la zona de estudio, utilizando como referencia imágenes provenientes del satélite Landsat TM procesadas con herramientas de información geográfica, para así poder estimar las áreas con mayor riesgo de presencia de la plaga.

Con toda esta información será posible predecir con mayor precisión su ubicación dentro del manglar; información necesaria para optimizar las aplicaciones de medidas de control en caso que se requieran y en el momento oportuno, y por ende realizar un control más focalizado lo cual redundaría en ahorros económicos para el Estado sin sacrificar la eficacia.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Área de estudio

El estado Sucre está localizado entre Lat. N 10° 02' 38" - 10° 45' 30"; Long. O 61° 31' 47" - 61° 50' 48", en la región nororiental de Venezuela (Figura 1). Dicha región administrativa se encuentra localizada en un área con una gran variedad de ecosistemas, según el mapa de vegetación de Huber & Alarcón (1988) cuya escala es 1:2000000. En el área de estudio predominan los manglares estuarinos (Delta Inferior y Planicie Cenagosa Costera), herbazales de pantano del Delta Inferior, bosques ombrófilos y palmares de pantano del Delta Inferior, y los bosques tropófilos altos, decídulos (apamateros) de la Planicie del Río San Juan.

El área de estudio está comprendida entre 0 y 800 m de altitud sobre el nivel del mar (msnm). Se caracteriza por un relieve de colinas bajas, medias y altas, una llanura fluvio-marina conformada por una serie de planicies de inundación, fundamentalmente los pantanos herbazales de Venturini, pantanos bajos de Guayana y pantanos bajos de Guaraúnos. Estas unidades de relieve presentan pendientes entre 0 y 40 %. Con estos elementos se pueden definir unidades de paisajes, distinguiéndose áreas planas o llanuras con pendientes entre 0-2 % y 2-6 %, y una altura promedio entre 0 y 200 msnm y sistemas de colinas con pendientes entre 10-20 % y alturas entre 100 y 600 msnm (Delgado *et al.* 2000a). La característica ambiental más resaltante de estas zonas son los humedales, áreas inundables estacionales o permanentes entre 0 y 100 msnm que resultan de la acumulación y retención de agua de lluvia y de drenaje superficial (Delgado *et al.* 2000b).

Datos de recolección de individuos

Los datos de la ubicación y abundancia de individuos adultos, posturas, larvas y pupas, utilizados para éste proyecto provienen de la Gerencia de Salud Ambiental y Control de Endemias (Gsace), Programa *Hylesia metabus*, adscrito a Fundasalud, estado Sucre. Tanto

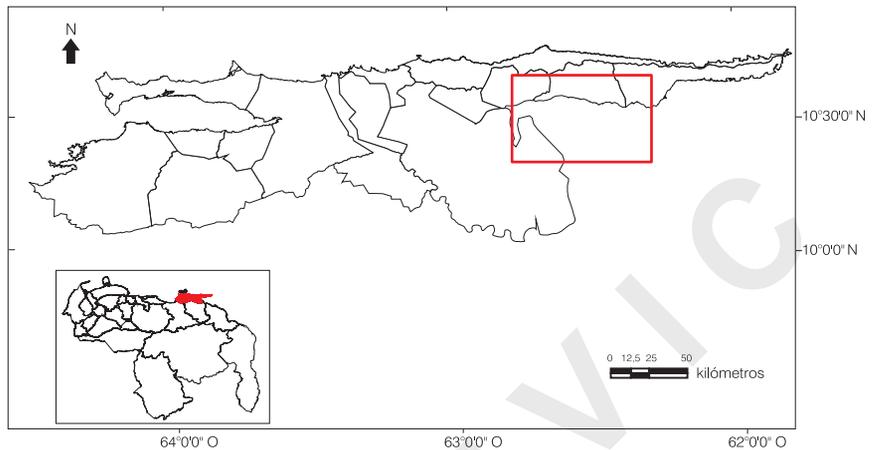


Figura 1. Ubicación de la región de mayor incidencia de lepidopterismo ocasionado por *Hylesia metabus* en Venezuela.

adultos como inmaduros se recolectaron en las estaciones establecidas por el personal de campo de la Gsace y los métodos están descritos en detalle en el capítulo de «Monitorización y Control de *H. metabus*». Para este estudio se utilizaron los datos de colecta correspondientes al período comprendido entre octubre de 2004 y junio de 2006.

Se contaba con un total de 2733 muestras en un total de 48 estaciones de captura de adultos y 339 muestras de inmaduros obtenidas de 115 puntos repartidos en el área de estudio. Se consideró cada muestra como el peso total de individuos adultos recolectados en cada estación por día y el número de larvas de los estadios 1 al 7 y pupas contabilizadas en cada estación por día.

Datos climáticos

Se escogió como estación de referencia la estación meteorológica del Aeropuerto de Güiria, debido a que posee el registro más completo de datos de precipitación de estaciones cercanas al área de estudio. Mediante el método de sustitución por el promedio (Guevara 2003), se estimaron los datos faltantes de 2006.

Con los datos de precipitación de los años 1980 hasta 2005 se elaboró el climograma de Güiria para observar el comportamiento de la precipitación en la zona (Figura 2). De igual manera y con los datos correspondientes al período comprendido entre 1970 y

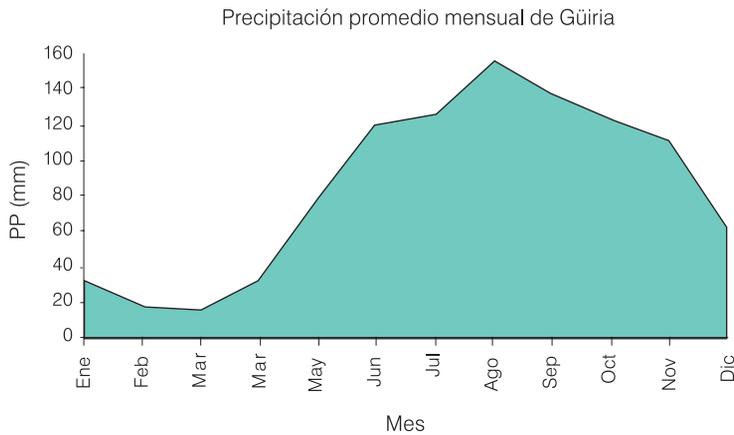


Figura 2. Precipitación promedio mensual de Güiria entre los años 1980 y 2005.

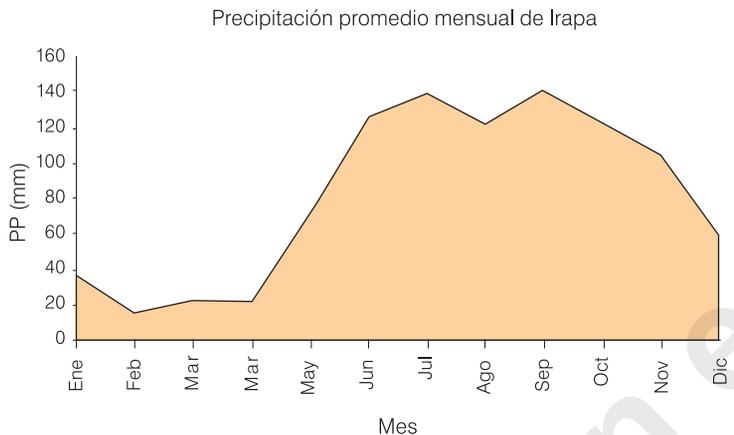


Figura 3. Precipitación promedio mensual de Irapa entre los años 1970 y 2000.

2000, se elaboró el climograma de la estación meteorológica de Irapa, la cual fue desmantelada en el año 2002 (Figura 3).

Imagen satelital

Una imagen satelital está compuesta por píxeles, los cuales están ordenados en filas y columnas. Cada píxel tiene su propio número digital, el cual almacena y representa la intensidad de energía o luz recibida que es reflejada o emitida en una determinada área de la superficie terrestre, en una posición de longitud de onda específica dentro del espectro electromagnético

Tabla 1. Parámetros de la imagen Landsat 7 ETM de 2003.

Satélite	LANDSAT 7	Ortorectificada	Sí
Sensor	ETM	Píxel multiespectral (m)	28,5
Fecha	2/11/2003	Píxel pancromático (m)	14,25
Datum	WGS84	Sistema coordinado	UTM20

(Chuvieco 1996). Para el presente estudio se utilizó una imagen derivada del sensor multiespectral Landsat7 con resolución espacial de 30 metros. Se seleccionó la imagen Landsat7 ETM de 2003 debidamente georreferenciada y con baja cantidad de nubes en el área de estudio (Tabla 1). Ésta imagen forma parte de la base de datos del Laboratorio de Biología de Vectores del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Para el tratamiento de la imagen y la realización de los mapas se utilizó el programa ArcGis™ 9.0 de ESRI®.

Clasificación de la vegetación

Para observar mejor las áreas delimitadas en la imagen se utilizó la combinación de bandas del sensor RGB 453 (bandas 4, 5, 3). Esta combinación resalta con gran detalle los límites entre el agua y la tierra, los diferentes tipos de vegetación, los cuales se muestran en diferentes tonos de coloración marrón, verde y naranja y resalta las diferencias de humedad en suelo y vegetación.

El primer paso de la clasificación de la imagen consistió en la determinación de las clases espectrales, este proceso se realizó de una forma no supervisada, en el cual no se establece ninguna clase *a priori*. Esta clasificación consiste en la combinación de píxeles individuales en clases espectrales, midiendo para ello los valores de reflectancia (Fernández & Herrero 2002). La clasificación se realizó mediante un análisis de conglomerados y se obtuvo las clases con sus marcas espectrales.

Para asignar los píxeles a las clases, puesto que se tenía la media y la desviación típica de cada una de las clases espectrales, se utilizó el modelo de distribución clasificador de máxima verosimilitud (o máxima probabilidad), que asume que los datos siguen una función de distribución normal para asignar la probabilidad de que un píxel cualquiera pertenezca a cada una de las clases. De este modo, el píxel se asigna a la clase a la cuales más probable que pertenezca, mediante la utilización del programa ArcGis™ 9.0.

A partir de la información generada con el análisis de la imagen satelital se elaboró un mapa temático de tipos de hábitat disponibles para *H.*

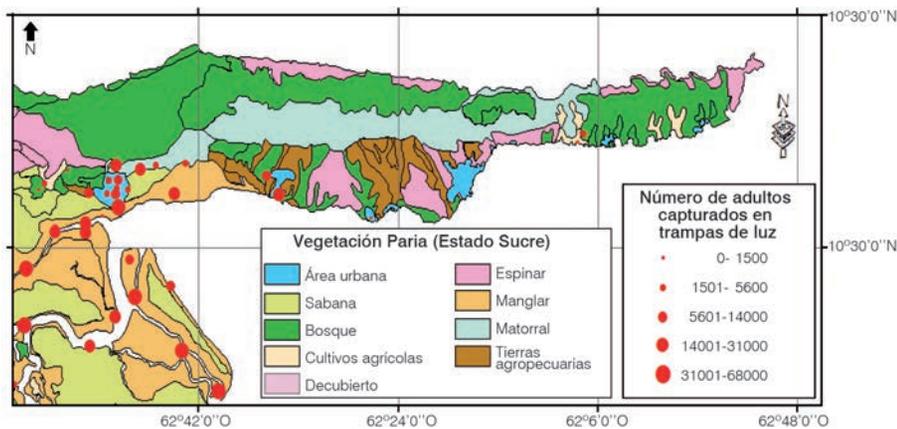


Figura 4. Tipos de hábitats disponibles y utilizados por los adultos de *Hylesia metabus*, entre octubre de 2004 y julio de 2006. Los valores de abundancia son expresados en intervalos de abundancia de adultos capturados en las distintas estaciones de captura.

Tabla 2. Peso asignado a los intervalos de abundancia y a los distintos tipos de hábitat donde se capturaron de adultos de *Hylesia metabus* entre diciembre 2004 y junio 2006.

Nº de Individuos	Peso asignado (%)	Tipo de hábitat	Peso asignado (%)
0-6200	5	Manglar	20
6201-12400	10	Área Urbana	15
12401-18600	15	Bosque	10
18601-24800	20	Herbazal	5
24801-31000	25		
31001-37200	30		
37201-43400	35		
43401-49600	40		
49601-55800	45		
55801-62000	50		

metabus dentro del área de estudio. Además, se calculó el área que ocupa cada tipo de hábitat presente, esta información sirvió para determinar la variabilidad en la distribución espacio temporal de *H. metabus* en el estado Sucre desde octubre de 2004 hasta septiembre de 2006.

Generación del mapa de riesgo

Para generar información digital de las zonas que sirven de hábitat a *H. metabus* se realizó una clasificación de una imagen satelital proveniente del sensor multiespectral Landsat 7 del año 2003. Con ésta clasificación se logró delimitar los principales hábitats explotados por *H. metabus*. Se hizo un análisis de agrupamiento a la imagen satelital según el número espectral asociado y se construyó un mapa de distri-

bución de la especie, en el cual, se pueden observar los distintos hábitats (manglares, áreas urbanas, bosques y herbazales) disponibles y la abundancia promedio de adultos capturados en cada estación de trampeo (Figura 4). Posteriormente se asignó una ponderación a cada tipo de hábitat de acuerdo con el número de individuos colectados en cada uno (Tabla 2).

Se calcularon los valores de riesgo asociados a cada localidad de muestreo de adultos basados en tres amenazas: el

tipo de hábitat en el cual se encontraba las estaciones de captura, el número total de meses en los cuales se recolectaron adultos de *H. metabus* (focos permanentes de infestación) y el número total de individuos recolectados por estación de captura. A cada variable considerada se le dio una ponderación, la cual indica la influencia de dicha variable en el valor de riesgo, posteriormente la combinación de todos los pesos asignados a cada localidad fue sumada y se obtuvo un valor de riesgo por estación de captura.

Considerando que los resultados obtenidos señalan que el tipo de hábitat es uno de los factores que determina el área de distribución de *H. metabus* se dio una ponderación distinta a cada uno de ellos (Tabla 2). Por otra parte, se tomó en cuenta el número de meses en los que se capturaron adultos en cada estación, obteniéndose que el mayor valor por estación fuera de 10 meses con recolecta de adultos y se asignó una ponderación igual al número de meses en los cuales hubo captura de individuos adultos, a lo largo del muestreo. La abundancia de adultos también fue considerada para la definición de las áreas de vulnerabilidad, debido a que probablemente una alta concentración de individuos en un área reducida puede contribuir a la dispersión hacia áreas cercanas. El peso que se asignó a cada intervalo de abundancia se describe en la Tabla 2.

Mediante la utilización de un análisis de interpolación espacial con los valores de abundancia de adultos recolectados durante el tiempo de estudio, se determinaron las áreas más vulnerables de ser invadidas por los adultos de *H. metabus* y la ubicación de los centros poblados dentro de estas áreas, con las cuales se generó el mapa de riesgo.

Análisis estadísticos

Para determinar si existe una asociación positiva de los adultos de *H. metabus* con el hábitat, se realizó un análisis de tablas de contingencia, en el cual se colocaron los datos de abundancia de insectos recolectados en cuatro hábitats distintos, dominantes en la zona de estudio (área urbana, herbazal abierto, bosque y manglar). Posteriormente, mediante una prueba de Ji-cuadrado se determinó si habían diferencias significativas en la cantidad de individuos recolectados en cada zona. También se calcularon y graficaron los residuos estandarizados de Pearson para evaluar la magnitud de las diferencias observadas entre los valores observados y esperados y determinar así la dirección de la posible selección del hábitat (Legendre & Legendre 2000).

Para determinar si hubo cambios en la distribución temporal de larvas y adultos se elaboraron tablas de contingencia de los diferentes estadios para definir las épocas de incidencia de cada uno. Se realizó una prueba de Ji-cuadrado para establecer diferencias significativas en la abundancia mensual de cada estadio para delimitar la época de mayor incidencia de cada nivel de desarrollo de *H. metabus*.

Con la finalidad de establecer la posible correlación negativa entre la abundancia de larvas y de adultos de *H. metabus* y la precipitación, se calculó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman y el coeficiente de correlación de Tau-b de Kendall. Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas SPSS® 12.0 para Windows y Statistica® 5.5 para Windows.

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS

Distribución espacial

Tipos de hábitat de *H. metabus*

El área de distribución de *H. metabus* es toda la costa suroeste del estado Sucre y la costa del estado Delta Amacuro, específicamente la zona del golfo de Paria, comprendida entre Lat. N 10° 06' - 10° 40'; Long. O 63° 10' - 62° 05' (Figura 1). La vegetación de esta zona es muy variable; sin embargo, las principales áreas en las cuales se capturaron larvas y adultos de *H. metabus* fueron: manglares, bosques semidecíduos, áreas urbanas y herbazales.

Distribución de los adultos y fases inmaduras de *H. metabus*

Una vez realizada la clasificación de la imagen y determinados los tipos de hábitats disponibles para *H. metabus*, se evaluó el patrón de distribución de la misma en los principales hábitats en los cuales se encontraba. En las Figuras 5 y 6 se presentan los datos de

abundancia promedio de adultos y estados inmaduros, respectivamente, capturados en el área de estudio durante todo el tiempo de muestreo y la imagen de satélite que se utilizó como base. Se puede observar que la distribución de las larvas de *H. metabus* coincide con las áreas que presentaron mayor cantidad de adultos, es decir, las zonas de manglar. Posteriormente, se sumaron los valores de abundancia de los adultos en los distintos hábitats y se procedió a calcular el promedio

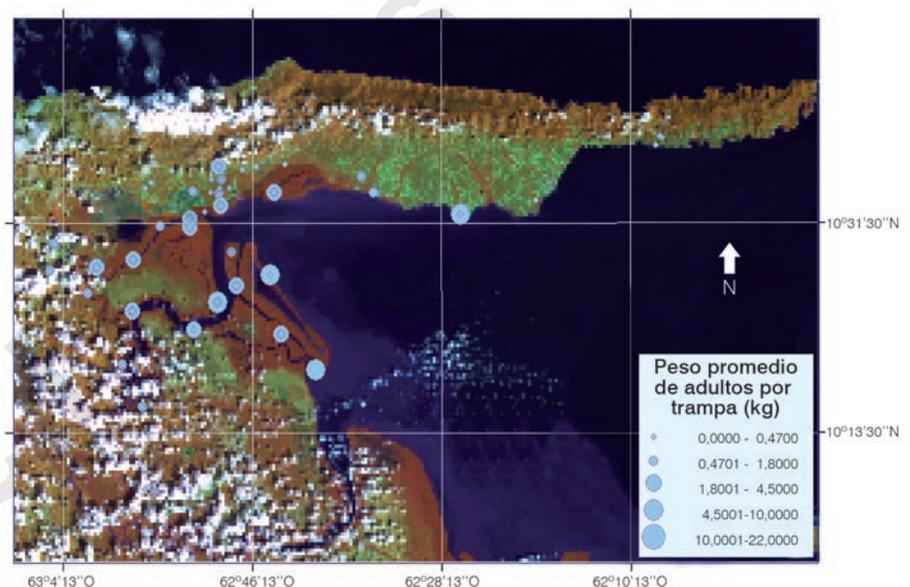


Figura 5. Abundancia de adultos de *Hylesia metabus* capturados en las estaciones de muestreo, entre octubre de 2004 y junio de 2006.

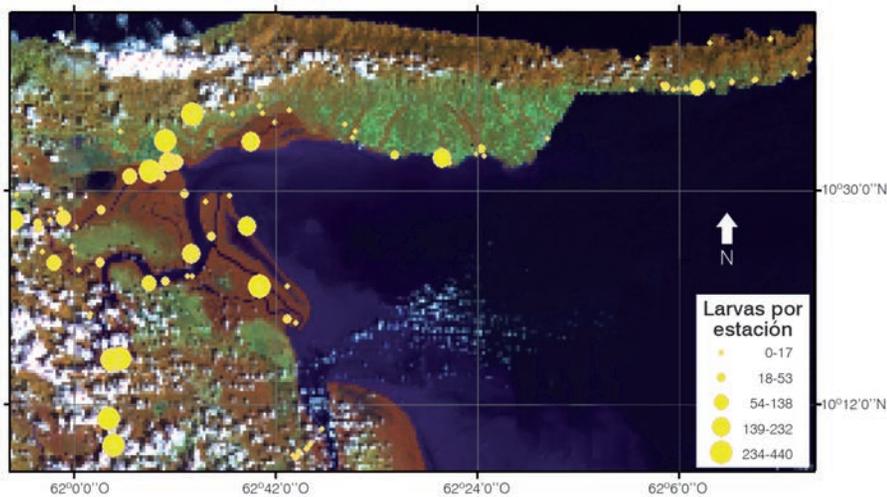


Figura 6. Abundancia de larvas de *Hylesia metabus* recolectadas en los sitios de muestreo entre octubre de 2004 y junio de 2006.

del número de individuos capturados en cada uno de ellos, entre el total de días de muestreo (Figura 7). La unidad muestral considerada para este análisis fue el peso promedio de adultos obtenido por día en todas las estaciones ubicadas en cada hábitat. Del bosque se obtuvo 46 muestras, 138 en el manglar, 21 en los herbazales, y 33 en el área urbana.

Luego, para determinar si las diferencias de abundancia entre hábitats eran producto del azar se realizó una prueba de Ji-cuadrado, la cual sugirió una distribución espacial no aleatoria ($\chi^2 = 507.682,408$, $gl = 3$, $p < 0,05$): la incidencia de adultos es mucho mayor en los manglares que en los bosques, herbazales y el área urbana.

Así mismo, podemos apoyar la hipótesis de que el patrón de distribución de *H. metabus* responde al tipo de vegetación y además está influenciado por la intervención humana (colocación de trampas de luz, crecimiento demográfico, aumento de la iluminación, la tala del manglar, etc.). Los adultos de *H. metabus* seleccionan el manglar como el sitio de oviposición en el cual las larvas pueden completar su ciclo de vida por la gran disponibilidad de alimentos. Si bien en los bosques, herbazales y áreas urbanas también se encuentra la especie, su abundancia fue bas-

tante baja en comparación con la estimada en el manglar. Sin embargo, por ser éstas zonas de contacto con los seres humanos (especialmente el área urbana), es aquí donde se hace mayor énfasis sobre sus repercusiones como plaga de la salud pública.

No obstante de lo arriba señalado, en condiciones de laboratorio se ha logrado criar larvas de *H. metabus* sobre plantas hospederas ajenas al hábitat del manglar (Cortez *et al.* 2001; Osborn *et al.* 2001). En estos trabajos se criaron larvas de *H. metabus* sobre diferentes plan-

tas, obteniendo pequeñas proporciones de supervivencia sobre *Hura crepitans* L. (5 %) (Osborn *et al.* 2001) y *Psidium guajava* L. (1 % y 3 %) (Osborn *et al.* 2001; Cortez 2003). Además, Cortez *et al.* (2001) lograron una sobrevivencia sustancial (81 %) para individuos alimentados con *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Es de notar que estas tres especies de plantas son comunes en Venezuela; por ejemplo *S. cumini* es sembrado ampliamente en ciudades como Maturín (estado Monagas), lo que aumenta el riesgo de infestación de esta plaga en zonas ajenas al mangle y pudiera, en el futuro, ser una potencial causa para un cambio en su distribución geográfica.

Considerando lo anterior, es pertinente señalar que las larvas de los satúrnidos son conocidas por su

capacidad de cambiar de una planta hospedera a otra. Un ejemplo de especial significancia es el de algunas especies de lepidópteros del género *Lonomia* (Saturniidae), las cuales son una importante plaga de la salud pública en Venezuela y Brasil (Díaz 2005). Un contacto leve con una larva de *Lonomia obliqua* Walker 1855, produce una hemorragia interna muy severa, que puede causar la muerte en muchos de los casos (Lorini 1993; Díaz 2005). La planta hospedera natural para esta especie en Brasil es *Platanus acerifolia*

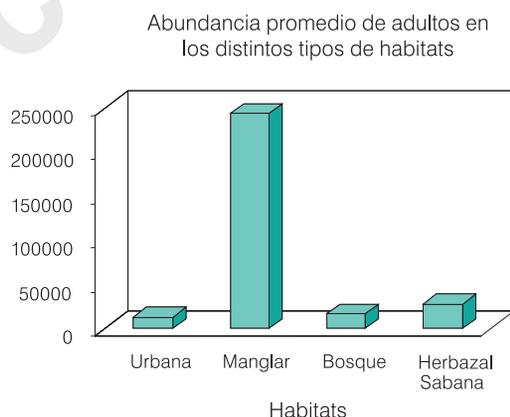


Figura 7. Número de individuos adultos capturados en los distintos tipos de hábitat entre octubre de 2004 y junio de 2006. Observe los valores de abundancia promedio del total de días de colecta tomadas en el área urbana (n= 33), manglar (n= 138), bosque (n= 46) y herbazal (n= 21).

(Ait.) Willd. (Platanaceae) (Lorini *et al.* 2007). Sin embargo, al talar los bosques para la siembra de plantaciones agrícolas, las larvas de *L. obliqua* y *Lonomia achelous* Cramer 1777, al no encontrar a sus plantas hospederas, se alimentan de los árboles frutales cultivados y en la época de la cosecha, el roce con las larvas provoca hemorragias severas y hasta fatalidades en trabajadores mientras cosechan los frutos (Díaz 2005).

Por otro lado, también es relevante señalar que en Venezuela, fuera de la zona de los manglares, las poblaciones de *H. metabus* han sido inestables, desapareciendo luego de una o dos generaciones (Herrera *et al.* 2007), aún cuando recientemente (2008) hubo reportes de las larvas de *H. metabus* en tierra firme en los municipios Cajigal y Mariño (ver páginas 163-169). Es posible que debido a las grandes extensiones de *R. mangle*, no exista una presión selectiva suficientemente fuerte para producir un cambio permanente en la preferencia alimentaria de *H. metabus* por otras plantas hospederas. Debemos considerar además, que pueden existir otros factores, como, la densidad relativa de depredadores y parásitos (Bernays & Graham 1988; Hernández *et al.* 2009) o diferencias en la temperatura y humedad relativa, que influyen en la supervivencia de las larvas de *H. metabus* y evitan que se establezcan poblaciones permanentes lejos de las zonas de manglar.

En resumen, todas las fases de *H. metabus* se encontraron asociadas al manglar, por lo que podemos asegurar que, a pesar de que los adultos e inmaduros de la especie se pudieron encontrar en otro tipo de hábitat, es en éste donde existen las mejores condiciones para completar su ciclo de vida. La captura de individuos adultos en áreas urbanas, herbazales, bosques y asociaciones del herbazal con el bosque, está determinada principalmente por la cantidad de luz emitida por las trampas de captura de la polilla y la de los caseríos.

Efectos de la precipitación sobre la abundancia de adultos e inmaduros de *H. metabus*

Aunque de antemano se conoce que las variaciones mensuales en la abundancia de adultos y larvas de

Abundancia de adultos capturadas en trampas de luz y niveles de precipitación

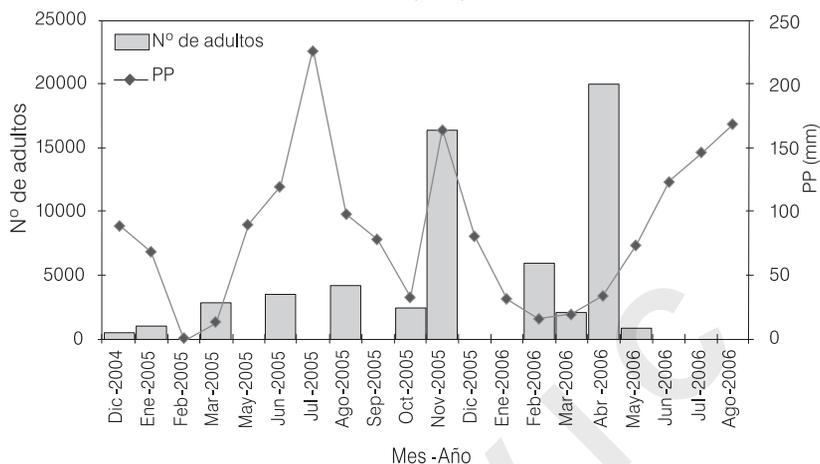


Figura 8. Abundancia total mensual de adultos de *H. metabus* capturados entre octubre de 2004 y junio de 2006 y precipitación mensual.

los diferentes estadios muestreados se deben principalmente al ciclo de vida de la especie, en este estudio se trató de determinar si la precipitación podía modificar la abundancia y densidad de las mismas. Para ello se evaluó el efecto de la precipitación promedio mensual registrada en las estaciones climatológicas en el aeropuerto de Güiria y en Irapa sobre la abundancia de individuos de *H. metabus* entre octubre de 2004 y junio de 2006 (Figura 8).

Los coeficientes de correlación de Spearman de los datos de abundancia de adultos y niveles de precipitación de las estaciones de Güiria y Irapa no fueron significativos ($r_s = -0,145$, $n = 20$, $p > 0,05$) y ($r_s = -0,176$, $n = 20$, $p > 0,05$), respectivamente. No se observó ninguna tendencia clara que indique una disminución de la abundancia cuando es mayor la precipitación (Figura 8). Es probable que la combinación de la misma con otros factores tales como, velocidad del viento y duración de los períodos de sequía, pudieran dar una mejor idea del comportamiento temporal de la especie. Por otra parte, los análisis de correlación de Spearman entre la abundancia total de larvas de todos los estadios y la precipitación registrada en Güiria ($r_s = -0,173$, $n = 18$, $p > 0,05$) e Irapa ($r_s = -0,184$, $n = 18$, $p > 0,05$) tampoco arrojaron valores significativos (Figura 9). Sin embargo, al analizar cada estadio larval por separado se reveló una asociación negativa significativa entre la abundancia de los primeros tres estadios y la precipitación (coeficiente de correlación Tau-b de Kendall, Tabla 3).

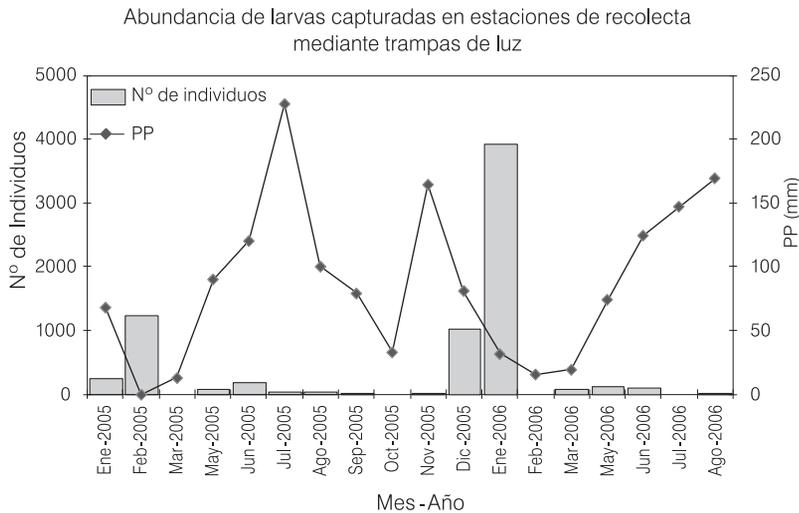


Figura 9.- Abundancia total de larvas de todos los estadios y la cantidad promedio de lluvia durante cada mes entre octubre de 2004 y agosto de 2006.

Tabla 3. Comparación entre precipitación promedio mensual (PPM) y estadios larvales mediante la Correlación de Tau-b de Kendall.

*La correlación es significativa $p = 0,05$.

	Estadio							PUPA
	1 ^{ER}	2 ^{DO}	3 ^{ER}	4 ^{TO}	5 ^{TO}	6 ^O	7 ^{MO}	
PP mensual	-0,4125*	-0,4755*	-0,5517*	-0,3075	-0,1351	-0,1528	0,0795	0,2173

Se ha estudiado el efecto de la precipitación sobre los estados inmaduros de diferentes especies de insectos. Paaijms *et al.* (2007) encontraron que la lluvia afectó significativamente la productividad de los criaderos de larvas del zancudo *Anopheles gambiae* Giles 1902, provocada por el impacto de las gotas de lluvia y la generación de corrientes intolerables para los mismos. Las lluvias afectaron negativamente la dinámica poblacional de la luciérnaga, *Luciola cruciata* Motschulsky 1854, posiblemente por causar una reducción en la emergencia del primer estadio larval y la actividad de forraje (Yuma 2007). La precipitación también puede afectar a las larvas de los lepidópteros jóvenes, ahogándolas o lavándolas de las hojas de sus plantas hospederas (Harcourt 1966; Sivapragasm *et al.* 1988; Caldas 1992; Zalucki *et al.* 2002).

Debido a lo anteriormente expuesto, podemos inferir que si se registran precipitaciones de altos

niveles y continuas durante las tres primeras fases del ciclo de vida de *H. metabus*, debería esperarse una menor incidencia de adultos al final del ciclo. Por tanto, las variaciones asociadas a altas abundancias y efectos nocivos o bajas abundancias y ausencia de problemas sanitarios por contacto, pudieran estar influenciadas por estos patrones de precipitación en diferentes años de la historia ecoepidemiológica de esta plaga.

Mapa de riesgo

El mapa de riesgo generado a partir de los datos de distribución y abundancia de *H. metabus* durante el período de estudio se muestra en la Figura 10. Se puede apreciar que el área de mayor riesgo se encuentra dentro de los manglares, en la isla de Turuépano, con zonas de riesgo menores en la boca del caño San Juan en el municipio Benítez, y algunas zonas aledañas al manglar, incluyendo el pueblo de Yaguaraparo en el municipio Cajigal. Sin embargo, la mayoría de los centros poblados están fuera del área de riesgo de las poblaciones de *H. metabus*.

En diciembre de 2004 se iniciaron las capturas constantes de adultos y larvas de *H. metabus*, enmarcadas

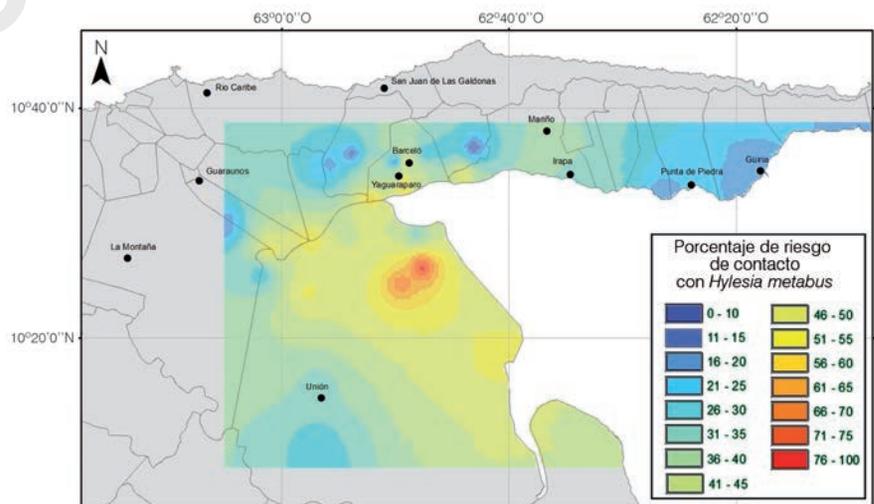


Figura 10. Mapa de porcentaje de riesgo de contacto con adultos de *Hylesia metabus*. Observe las áreas de mayor riesgo y la ubicación de los centros poblados del área del estudio.

en el Proyecto Reto *Hylesia metabus*. En ese año ocurrió un aumento brusco en la distribución de la plaga debido al paso del huracán Iván por las costas de Venezuela. Esto trajo como consecuencia una colonización de esta especie desde los manglares hacia zonas más pobladas. Los muestreos estaban, por lo tanto, dirigidas principalmente a hacer un seguimiento de la densidad de población en las áreas en las cuales había mayor cantidad de personas afectadas por esta plaga, lo que derivó en una carencia de información en otras áreas lejos de las zonas pobladas, donde no se realizó un seguimiento. Aunado a esto, la presencia de una alta concentración de estaciones de captura del insecto en los pueblos aledaños al manglar perjudicó a los habitantes de las áreas urbanas cercanas, por lo que posteriormente algunas trampas fueron reubicadas en otras áreas y algunas retiradas definitivamente.

Recientemente (2007-2009) ha habido una disminución considerable del número de individuos y ac-

tualmente la plaga se ha replegado hacia el municipio Benítez. Esto se debe principalmente a los labores de vigilancia y control efectuados por la Gsace, junto con los efectos de enemigos naturales tales como parasitoides, depredadores y patógenos. Por otra parte, los cambios en la distribución pueden ser consecuencia de la eliminación de algunas de las estaciones de captura para la colecta de adultos en los municipios Cajigal, Mariño y Valdez; por lo cual se debe considerar que existe una ausencia de información en aquellas zonas en las cuales no se realiza un muestreo continuo. Por esta razón, si bien la información recolectada durante los últimos tres años es sumamente útil para inferir cómo ciertas condiciones pueden afectar la distribución de la población de *H. metabus*, los datos obtenidos se encuentran altamente sesgados, por lo que podrían estar afectando los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Debido a que el manglar es el sitio en el cual se encuentra la mayor abundancia de adultos y larvas, las estrategias de control de *H. metabus* deben realizarse primero en esta zona. Sin embargo, para hacer un análisis más detallado de la situación geoespacial de *H. metabus* es necesario elaborar un diseño muestral que permita cubrir todos los hábitats disponibles de forma sistemática; de este modo los datos obtenidos podrían ser un mejor reflejo de la situación de la especie.

Aún cuando el principal factor que determina el área de distribución e influencia de *H. metabus* es el tipo de vegetación, la precipitación pudiera ser una variable que juega un papel importante en los tres primeros estadios larvales. Sin embargo, sería propicio hacer seguimientos específicos de poblaciones durante un período de tiempo mayor para corroborar esta información. Por lo tanto, sería conveniente evaluar la eficacia de las medidas de control ya emprendidas cuando el insecto se encuentre en esta fase de su ciclo de vida.

De no ser por la luz emitida en las zonas urbanas y las trampas de luz colocadas en sitios cercanos a los manglares, las larvas y adultos de *H. metabus* permanecerían en ellos. Por lo tanto, como medida de control y para evitar accidentes por contacto con los

seres humanos, es recomendable colocar las trampas de luz utilizadas para capturar adultos, en zonas con mangle como vegetación dominante y alejadas de los poblados, de esta manera los individuos inmaduros se concentrarían en áreas cercanas a las trampas o fuentes de luz.

El conocimiento del tipo de vegetación que sirve de hábitat a *H. metabus* y sus probables áreas de incidencia aunada a la noción de cómo la precipitación afecta las diferentes fases del ciclo de vida, ayudarán a planificar de manera más exitosa las estrategias de control que se vayan a emprender de ahora en adelante.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrera R, Grillet M, Rangel Y, Berti J & A Aché (1998) Temporal and spatial patterns of malaria reinfection in northeastern Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61:784-790.
- Barrera R, Delgado N, Jiménez M, Villalobos I & I Romero (2000) Estratificación de una ciudad hiperendémica en Dengue Hemorrágico. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 8:225-233.
- Barrera R, Torres N, Freier J, Navarro J, García C, Salas R, Vásquez C & S Weaver (2001) Characterization of enzootic foci of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in western Venezuela. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 1:219-230.

- Benton-Short L & A Short (2008) *Cities and Nature*. Routledge. New York. 281 pp.
- Bernays E & M Graham (1988) On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecology* 69:886-892.
- Bettinger P, Wing MG & M Wing (2003) *Geographic Information Systems: Applications in Forestry and Natural Resources Management*. McGraw-Hill. Nueva York. 240 pp.
- Cabaniel G, Rada L, Blanco J, Rodríguez A & J Escalera (2005) Impacto de los eventos de El Niño Southern Oscillation (ENSO) sobre la Leishmaniasis Cutánea en Sucre, Venezuela, a través del uso de información satelital, 1994-2003. *Revista Peruana de Medicina Experimental de Salud Pública* 22:32-38.
- Caldas A (1992) Mortality of *Anaea ryphea* (Lepidoptera: Nymphalidae) immatures in Panama. *Journal of Research on Lepidoptera* 31:195-204.
- Clavijo S (1993) *Fundamentos de manejo de plagas*. Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 205 pp.
- Cortez L (2003) Comparación de la sobrevivencia en larvas de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) al suministrarles una dieta de tres especies de hospederos alternos. I Jornadas de *Hylesia metabus*. Yaguaraparo, estado Sucre. 36 pp
- Cortez L, Malaver E, Bouquet O & T González (2001) Comparación de la sobrevivencia en larvas de *Hylesia metabus* Cramer al suministrarles una dieta de tres especies de hospederos alternos. XVII Congreso Venezolano de Entomología. Maturín, Venezuela. p 1.
- Chuvieco E (1996) *Fundamentos de la teledetección espacial*. Rialp. Madrid, España. 568 pp.
- Delgado L, Gamboa L & N León (2000a) Aspectos geográficos relacionados con un problema de salud pública: La Malaria en el estado Sucre. *Revista Terra (nueva etapa)*. Instituto Geográfico de Desarrollo Regional, UCV. XVI:80-93.
- Delgado L, Ramos & E Gordon (2000b) Modelo digital del terreno y procesamiento de imágenes digitales: herramientas para la detección de variables ambientales relacionadas con la Malaria en el estado Sucre, Venezuela. IX Simposio Latinoamericano de Percepción Remota, Memorias SELPER. Puerto Iguazú, Misiones. pp 848-856.
- Delgado L, Ramos S, Rodríguez R & L Liberal (2001) Modelo espacial de la probabilidad de riesgo malárico en el Edo. Sucre, Venezuela. *Revista de la Facultad de Ingeniería, Universidad Central de Venezuela* 16:15-26.
- Díaz J (2005) The evolving global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of caterpillar envenoming. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72:347-357.
- Fernández I & E Herrero (2002) *Análisis visual de imágenes obtenidas del sensor ETM+ Satélite Landsat* Departamento de Ingeniería Agrícola y Forestal, Universidad de Valladolid. España. Libro electrónico, 24 pp.
- Guevara J (2003) *Métodos de estimación y ajuste de datos climáticos*. Universidad Central de Venezuela - Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela. 130 pp.
- Harcourt D (1966) Major factors in survival of the immature stages of *Pieris rapae* (L). *Canadian Entomologist* 98:653-662.
- Hernández J, Osborn F, Herrera B, Liendo-Barandiarian C, Perozo J & D Velásquez (2009) Parasitoides larva-pupa de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturnidae) en la región nororiental de Venezuela: un caso de control biológico natural. *Neotropical Entomology* 38:243-250.
- Herrera M, Orborn F, Díaz L, Velásquez D, Díaz S, Ramírez G & L González (2007) El monitoreo de las poblaciones de *Hylesia metabus* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) en el estado Sucre: base fundamental de su control. XX Congreso Venezolano de Entomología. San Cristóbal, Venezuela. 1 pp.
- Huber O & C Alarcón (1988) Mapa de Vegetación de Venezuela. MARNR-BIOMA-The Nature Conservancy. Caracas, Venezuela.
- Legendre P & L Legendre (2000) *Numerical Ecology*. Elsevier Sciences BV. Amsterdam, Holanda. 853 pp.
- Lorini I (1993) *Taturana: a lagarta que mata*. EMBRAPA-CNPT. 6 pp.
- Lorini L, Zarbin P & C Tudesco (2007) Biology of laboratory-reared *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *Florida Entomologist* 90:770-771.
- Martínez G (2000) *Estudio de la dinámica de la transmisión de la malaria en el estado Amazonas*. Trabajo especial para obtener el título de Magister Scientiarum. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 120 pp.
- Martínez G & L Delgado (2000) Estudio de la dinámica de la transmisión de malaria en el estado Amazonas mediante el uso de sistemas de información geográfica. IX Simposio Latinoamericano de Percepción Remota, Memorias SELPER. Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. 742-750 pp.
- Martínez J (2008) *Estudio en geografía de la salud: encefalitis equina venezolana, sector El Gavilán, estado Barinas*. Trabajo especial para obtener el título de Licenciado, Escuela de Geografía. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 150 pp.
- National Center for Geographic Information and Analysis. 1990. En. <http://www.ncgia.ucsb.edu>. [Consulta: 30/05/2009].
- Osborn F, Motabán L & J Gutiérrez (2001) Crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) alimentadas con cuatro diferentes plantas hospederas. *Saber* 31:14-22.
- Paaijmans K, Wandago M, Githeko A & W Takken (2007) Unexpected high losses of *Anopheles gambiae* larvae due to rainfall. Disponible en: <http://www.plosone.org>, 25-07-2010.
- SIG (2009) Sistema de Información Geográfica. Enciclopedia Microsoft® Encarta® 1997-2009 Microsoft Corporation.
- Sivapragasm A, Ito Y & T Saito (1988) Population fluctuation of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) on cabbage in *Bacillus thuringiensis* sprayed and non sprayed plots and factors affecting within-generation survival of immatures. *Research on Population Ecology* 30:329-342.
- Yuma M (2007) Effect of rainfall on the long-term population dynamics of the aquatic firefly *Luciola cruciata*. *Entomological Science* 10:237-244.
- Zalucki M, Clarke A & S Malcolm (2002) Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 47:361-393.

Evaluación de la eficacia del larvicida biológico DiPel® como controlador de larvas de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775])

Frances Osborn¹, José V. Hernández E.², Sandra Díaz¹,
Diony Velásquez³, Melfran Herrera^{*3}, Tivardys Guzmán¹
y Finordys Muñoz¹

¹Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela.

²Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edif. Física y Electrónica I, Piso 1, Dpto. de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Apdo. 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

³Coordinación de Vigilancia Entomológica, Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias, Fundación para la Salud del estado Sucre (Fundasalud), Carúpano, estado Sucre, Venezuela.

*melfranh@gmail.com

Resumen

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* (*Btk*) es ampliamente utilizado para el control de lepidópteros plaga. Con el fin de evaluar la eficacia de una formulación comercial de *Btk* en larvas de *Hylesia metabus*, se realizaron experimentos de laboratorio y de campo. Para los ensayos de laboratorio se prepararon concentraciones seriadas de *Btk*, luego se sumergieron discos de hoja de una planta hospedera (*Rhizophora mangle*) en cada una de las concentraciones, y se suministraron a larvas del 3.º, 4.º y 5.º estadios, individualizadas en recipientes plásticos. La mortalidad se registró diariamente. Para los bioensayos de campo se evaluaron cuatro concentraciones de la misma formulación sobre larvas del 3.º estadio de *H. metabus*. La bacteria fue aplicada sobre árboles de *Rhizophora mangle* o *Laguncularia racemosa* en un diseño de bloques al azar, y luego se colocaron 100 larvas de *H. metabus* en cada árbol tratado. La mortalidad de las larvas fue registrada a las 24 y 96 horas. Hubo una variación considerable en la susceptibilidad de las larvas al DiPel® entre los ensayos de laboratorio. También se observó que en todos los experimentos realizados hubo una tendencia de las larvas del 3.º estadio a rechazar las hojas infectadas con DiPel® especialmente cuando se evaluó a altas concentraciones mayores. Las mortalidades aumentaron en el tiempo, siendo mayores entre los cinco y seis días posteriores a la aplicación en el laboratorio y cuatro días en el campo. Debido a las diferencias en la susceptibilidad de las larvas de *H. metabus* a este producto, se recomienda realizar este tipo de ensayos antes de cada aplicación con el fin de asegurar un control eficaz sin malgastar recursos económicos y el producto.

Abstract

Assessment of the Efficiency of the Biological Larvicide DiPel® in the Control of *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) Larvae

Bacillus thuringiensis var. *kurstaki* (*Btk*) is widely used for the control of lepidopteran pests. Laboratory and field experiments were done to test the efficiency of a com-

Palabras clave Key words

Bacillus thuringiensis, control, ensayos de laboratorio y campo.
Bacillus thuringiensis, control, laboratory and field bioassays.

mercial formulation of *Btk* against *Hylesia metabus* larvae. For the laboratory experiments, serial concentrations of *Btk* were prepared, leaf discs cut from one of the host plants were then submerged in each of the concentrations and tested against third, fourth and fifth instars, individualized in plastic pots. Mortality was measured daily. For the field tests, four concentrations of the same *Btk* formulation were tested against third instar *H. metabus* larvae. The bacteria was applied to *Rhizophora mangle* or *Laguncularia racemosa* trees using a random block design, then 100 *H. metabus* larvae were placed in each treated tree. Mortality was measured at 24 and 96 hours. There was considerable variation in the susceptibility of the larvae to DiPel® among the laboratory experiments. Nevertheless, there was a tendency for the third larvae instar to reject the discs infected with DiPel®, in all the experiments done, especially at higher concentrations. Mortality increased over time with the highest rates observed between 5 and 6 days post-application (laboratory) and 4 days (field). Because of the differences in the susceptibility of the *H. metabus* larvae to this product, we recommend that this type of experiments be done before each application, in order to ensure efficient control without unnecessary wastage and expense.

PRESENTACIÓN

Las bacterias son importantes patógenos de los insectos y algunos han sido desarrollados como controladores de plagas agrícolas y de salud pública. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), Berliner 1911 es una bacteria aeróbica, gram positiva que se encuentra de forma natural en el suelo y sobre las plantas. Fue aislada por primera vez en Japón por Ishiwata (1901) mientras estaba investigando la causa de la mortalidad de grandes poblaciones del gusano de la seda, *Bombyx mori* L. 1758. Este autor lo nombró como *Bacillus sotto*; sin embargo, este nombre no pudo ser utilizado debido a que no era un nombre binomial válido (Steinhaus 1961). Más adelante, Berliner (1915) volvió a aislar esta misma especie de larvas enfermas de la polilla mediterránea, *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879, y la renombró *Bacillus thuringiensis*, por el pueblo alemán Thuringia donde había recolectado la polilla, nombre por el cual se conoce hoy en día (Tanada & Kaya 1993).

A partir del año 1920 se empezaron a realizar ensayos de campo para evaluar la eficacia de *Bt* en el control del barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis* Hübner, 1796, (Lord 2005) y en 1938 se elaboró el primer preparado comercial (Sporeine®) en Francia (Aronson *et al.* 1986). Desde entonces, *Bt* ha sido utilizado extensivamente para el control de

lepidópteros, dípteros y coleópteros plaga (Feitelson 1993; Tanada & Kaya 1993; Rosas-García 2008). Hasta la presente fecha se han reportado 96 subespecies de *Bt*, de las cuales las más utilizadas para la elaboración de formulaciones contra insectos plaga son: *B. thuringiensis* var. *israelensis*, utilizada para el control de los zancudos (Diptera: Culicidae) y los jejenes (Diptera: Simuliidae); *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, que infecta a los escarabajos (Coleoptera) y *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que ataca a ciertas especies de larvas de polillas (Lepidoptera) (Rosas-García 2008).

El serotipo *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) fue aislado en 1962 por Edouard Kurstak de la polilla mediterránea en Bures-sur-Yvette, Francia, y el primer producto comercial, DiPel® fue introducido por Laboratorios Abbott en 1970. Desde entonces ha sido utilizado para el control de las larvas de una amplia variedad de especies de lepidópteros plaga de cultivos y plantaciones forestales, entre ellos, *Colias* spp. en alfalfa, *Pieris* spp. y *Trichoplusia* spp. en crucíferas, *Manduca* sp. en tomate y tabaco, *Heliothis* spp. en algodón y tomate y *Platynota* sp. y *Argyrotania* sp. en vid. Aplicaciones en el laboratorio del DiPel®32PM a una concentración de 5g/100 ml de agua produjo mortalidades entre 85 y 100 % en

la polilla de la cera de abejas *Galleria mellonella* L. 1758, (Pyralidae) (Brighenti *et al.* 2005). El DiPel® produjo una mortalidad de 70 % cuando fue usado en dosis de 2-3 kg/ha contra el gusano canasta, *Oiketicus kirbyi* Guilding, 1827, un insecto polífago que ataca a diferentes cultivos en Costa Rica (Mexzón *et al.* 2003).

En los Estados Unidos y Canadá, diferentes formulaciones de *Btk* se usan comúnmente para el control de diferentes consumidores de hojas de las coníferas, entre ellos el gusano de las yemas del abeto (*Choristoneura fumiferana* Clemens, 1865) y la polilla gitana de las coníferas (*Lymantria dispar* L. 1758). En 1985, *Btk* fue utilizado en 81 % de los programas de aplicación de insecticida para controlar *C. fumiferana*, causando el colapso de las poblaciones de esta plaga. Entre 1990 y 1998 se aplicó *Btk* en casi 1,8 millones de hectáreas de bosques deciduos y coníferas para el control de varios defoliadores. Actualmente es el segundo producto más utilizado luego del difluobenzuron para las plagas forestales (Frankenhuyzen *et al.* 2000).

A pesar que es conocida la eficacia de *Btk* como controlador biológico de diversas especies plaga, la susceptibilidad de los diferentes estadios larvales a este insecticida puede variar. Ramos *et al.* (2004) encontraron que los primeros estadios larvales de *Diatraea saccharalis* F. 1794 (Homoptera: Cercopidae), una importante plaga de la caña de azúcar, fueron más susceptibles a cepas nativas de *Btk* que los estadios más tardíos. Barreiro & Santiago-Álvarez (1985), al evaluar el efecto sobre larvas de *Ocnogyna baetica* Ramb. 1907 (Lepidoptera: Arctiidae) de una formulación de DiPel® en condiciones de laborato-

rio, reportaron un CL_{50} de 89,3 ppm para larvas del y 3.º estadio, el cual aumentó a un CL_{50} de 5.390 ppm en larvas del 4.º y 5.º estadio. Por otro lado, Peacock *et al.* (1998) evaluaron el efecto insecticida del DiPel®8AF en 14 especies de Lepidoptera de diferentes edades en condiciones de laboratorio. De ellas, todas las tres especies del 1.º o el 2.º estadio evaluadas, mostraron un 100 % de mortalidad, mientras que las larvas de estadios más tardíos presentaron mortalidades muy variables con ocho especies mostrando mortalidades entre 0 y 50 % y solamente tres especies sufriendo mortalidades mayores de 50 %.

Hylesia metabus anteriormente presentaba un ciclo de vida sincronizado (una sola fase del insecto está presente en un momento dado), y variaba entre 100 y 105 días. Dentro de este ciclo, la fase larval comprende siete estadios, de siete a ocho días cada uno (Vásquez 1990; Benaim-Pinto 1991). Sin embargo, hoy en día los ciclos no son sincronizados, lo cual dificulta las medidas de control. La formulación comercial de *Btk*, DiPel®8L, es utilizada principalmente para controlar las poblaciones larvales de esta especie. Este producto normalmente se aplica cuando *H. metabus* se encuentra en los primeros tres estadios larvales. Sin embargo, no existe información sobre las posibles diferencias en la susceptibilidad de las larvas de diferentes edades frente a este producto.

En este capítulo se compilan los resultados de diversos trabajos realizados para verificar la eficacia del DiPel® como controlador de las larvas de *H. metabus* en diferentes estadios, tanto en condiciones de laboratorio como de campo.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Ensayos de laboratorio

Recolección de larvas

Las larvas se recolectaron de los manglares de diferentes localidades en los municipios Benítez, Libertador y Cajigal del estado Sucre, entre septiembre y diciembre, 2004 (Osborn *et al.* 2005a), abril 2005 (Osborn *et al.* 2005b) y abril 2006 y abril 2007 (Guzmán 2008; Muñoz 2009). Se realizaron recolectas de larvas del 2.º, 3.º y 4.º estadio. Las larvas del 2.º estadio se utilizaron para

los experimentos del 3.º estadio, las del 3.º estadio se utilizaron para los experimentos del 4.º estadio y las del 4.º estadio se utilizaron para el experimento del 5.º estadio. Se recolectaron grupos de larvas para asegurar una suficiente cantidad de material biológico de la misma edad, en el momento de iniciar los experimentos.

Luego de la recolección, las larvas se mantuvieron en cavas de anime con hojas frescas de la planta hospedera *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo) o *La-*

guncularia racemosa L. (mangle blanco). Las cavas se colocaron en una habitación mantenida a 26-28 °C y 70-80 % de humedad relativa.

Diseño experimental

Los experimentos se realizaron según la metodología descrita por Osborn *et al.* (2005ab), Guzmán (2008) y Muñoz (2009). Para los mismos se utilizó un mínimo de 25 recipientes plásticos (200 ml de capacidad) como réplicas para cada tratamiento y el mismo número de recipientes controles. Posteriormente, se prepararon soluciones de DiPel®8L a diferentes concentraciones en agua mineral (Tabla 1). Se cortaron discos de hojas de *Rhizophora mangle* (Osborn *et al.* 2005ab) o *Laguncularia racemosa* (Guzmán 2008; Muñoz 2009) de 1 cm de diámetro y se sumergieron en las soluciones preparadas. En el caso de los tratamientos se colocó un disco impregnado con DiPel® en cada recipiente plástico antes descrito. En los experimentos control, los discos de hojas se impregnaron sólo con agua mineral. (Osborn *et al.* 2005ab; Guzmán 2008). Por otra parte, con el objeto de evaluar la preferencia alimentaria de las larvas de *Hylesia metabus* se realizó un experimento colocando simultáneamente en los envases plásticos dos discos: uno impregnado con DiPel® 3,5 y el otro con agua (Muñoz 2009).

Inmediatamente después, las larvas se colocaron individualmente en los recipientes plásticos con la ayuda de dos pinceles suaves. Posteriormente, se registró la mortalidad diaria de las larvas a la misma hora durante un periodo de cinco días. Después de las primeras 24 horas se removieron los discos de hoja y las larvas se alimentaron diariamente con hojas limpias y frescas de *R. mangle* o *L. racemosa* hasta el 5.º día.

En el caso de que las mortalidades de los controles estuviesen comprendidas entre 5 y 20 %, las mismas fueron corregidas mediante la fórmula de Abbott (1925), la cual permite corregir las mortalidades por la que ocurre en los experimentos control. Si las mortalidades de los controles eran mayores que el 20 %, el experimento se descartaba debido a que según Abbot (1925), se presentan dudas razonables del agente causal de la mortalidad.

Los resultados se registraron anotando el porcentaje de mortalidad a los cinco días para cada tratamiento y en cada estadio larval (Osborn *et al.* 2005ab; Guzmán 2008; Muñoz 2009).

Ensayos de campo

Recolección de las larvas

Las larvas de *H. metabus* fueron recolectadas en las localidades de El Tococo Lat. N 10° 26' 18,7"; Long. O 64° 47' 41,2" y el puerto de Yaguaraparo Lat. N 10° 32' 43,2"; Long. O 62° 49' 05,7", municipio Cajigal, estado Sucre, Venezuela, entre el 02 y el 12 de abril, 2006. Todos los individuos muestreados pertenecían al tercer estadio larval (Velásquez & Osborn 2006).

Diseño experimental

Los ensayos se realizaron en el puerto de Yaguaraparo, municipio Cajigal estado Sucre Lat. N 10° 35' 52,2"; Long. O 62° 46' 17,0". Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar con tres repeticiones, en cada bloque se colocaron 4 tratamientos y el respectivo control. Los tratamientos correspondían a cuatro concentraciones del insecticida biológico disueltas en agua, las cuales se prepararon directamente en el lugar seleccionado para el montaje de los ensayos, a saber: T1= 500 cm³/ha, T2= 700 cm³/ha, T3= 1000 cm³/ha, T4= 1400 cm³/ha de DiPel®8L, más el control, agua (Velásquez & Osborn 2006).

Las unidades experimentales estuvieron constituidas por árboles de *R. mangle* o *L. racemosa* de aproximadamente dos a tres metros de altura, los cuales fueron distribuidos al azar para cada una de las concentraciones de DiPel®8L por evaluar en cada bloque correspondiente. Previo al montaje del ensayo se acondicionaron los árboles, limpiando los alrededores y eliminando algunos de ellos para evitar que las larvas se escaparan por el solapamiento de las ramas. Cada árbol fue identificado con una etiqueta, en la cual se anotó el tratamiento utilizado y número de la réplica. Además, en el tallo principal se colocó una cinta plástica para evitar que las larvas bajaran hasta el suelo. Los árboles de *R. mangle* o *L. racemosa* fueron asperjados con las concentraciones preparadas con la ayuda de un motopulverizador portátil, colocando luego 100 larvas de *H. metabus* por árbol, incluido el control. Esta misma labor se repitió en los cuatro bloques por evaluar, ejecutándose una sola aplicación del producto. Se realizaron observaciones a las 24 y 96 h después de la aplicación del DiPel®8L y se registró el número de larvas vivas en cada uno de los tratamientos (Velásquez & Osborn 2006).

DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de laboratorio

En la Tabla 1 se muestran las mortalidades de las larvas del 3.^{er}, 4.^o y 5.^o estadio de *H. metabus*, respectivamente. Se puede apreciar que los resultados son muy variables entre experimentos y las larvas muestran diferentes susceptibilidades al mismo producto. Por ejemplo, Osborn *et al.* (2005a) encontraron que las larvas de 4.^o estadio fueron más susceptibles al DiPel® y las larvas del 5.^o estadio más resistentes, mientras que Guzmán (2008) reportó que las larvas del 4.^o estadio eran las más resistentes y las larvas del 5.^o estadio más susceptibles a este mismo producto. Osborn *et al.* (2005b) reportaron una mortalidad en larvas del quinto estadio de 96 % cuando evaluaron el DiPel®8L 3,5 a una concentración de sólo 10 ppm, mientras que Osborn *et al.* (2005a) consiguieron solamente 30 % de mortalidad al evaluar una concentración de 25 ppm de ese mismo producto y Guzmán (2008), por su parte, reportó 88 % de mortalidad cuando evaluó una concentración de 16 ppm. Por otra

parte, las mortalidades causadas a las larvas usando 256 ppm del producto eran, en términos generales, similares a las causadas por concentraciones del producto de 1024 ppm.

En todos los experimentos realizados hubo una tendencia de las larvas del 3.^{er} estadio a rechazar las hojas infectadas (Osborn *et al.* 2005b; Guzmán 2008). El rechazo de los estadios tempranos de larvas de Lepidoptera a discos infectados con *Btk* ha sido señalado por otros autores (McGuire *et al.* 1997) y se debe probablemente a los efectos antialimentarios de *Bt*, las cuales inhiben la ingestión, lo que también puede producir una variación en la cantidad de hoja consumida y por ende la cantidad de producto consumido.

Por otro lado, Muñoz (2009) encontró que hubo una leve disminución en la susceptibilidad de las larvas, en general, cuando fueron presentadas con dos discos de hojas, uno infectado con el DiPel® y uno sin infectar. Además, este autor reportó que las larvas del 5.^o estadio de *H. metabus* preferían consumir los discos de hojas

Tabla 1. Mortalidad de larvas de tercero a quinto instar de *Hylesia metabus*, sometidas a diferentes presentaciones comerciales de Btk. Las mortalidades fueron anotadas a los seis días, a menos que se indique lo contrario.

Producto comercial	Concentración (ppm)	Número de réplicas	% Mortalidad por estadio			Observaciones	Referencia
			3. ^{er}	4. ^o	5. ^o		
DiPel®8L D23,7	25	50	50	84	55	Pocas larvas del 3. ^{er} estadio comieron la hoja infectada con DiPel®	Osborn <i>et al.</i> 2005a
	125	50	40	80	80		
	625	50	92	96	84		
DiPel® 3,5	25	50	80	92	30		Osborn <i>et al.</i> 2005a
	125	50	90	96	36		
	625	50	90	94	76		
DiPel® 3,5	1	25			44	La mortalidad final fue registrada a los cuatro días	Osborn <i>et al.</i> 2005b
	10	25			96		
	100	25			100		
DiPel® 3,5	4	25	19	3	56		Guzmán 2008
	16	25	40	20	78		
	64	25	53	17	70		
	256	25	55	32	94		
	1024	25	72	48	100		
DiPel® 3,5	4	25	6	5	40	Las larvas se seleccionaron entre un disco de hoja impregnado con el DiPel® y un disco impregnado con agua	Muñoz 2009
	16	25	22	8	58		
	64	25	33	37	50		
	256	25	52	13	84		
	1024	25	73	32	92		

sanas. Finalmente, no hubo diferencias en la eficacia de los productos comerciales DiPel®8L D23,7 y el DiPel® 3,5 como controladores biológicos de esta plaga.

En general, se supone que las larvas de los primeros estadios son las más susceptibles a los larvicidas (Burgos 2000; Ramos *et al.* 2004). Sin embargo, en algunos de los experimentos se determinó que las larvas del 5.^o estadio son las más susceptibles (Guzmán 2008; Muñoz 2009). En este trabajo es posible que las larvas del 5.^o estadio traídas del campo ya hubiesen sido infectadas por algún

patógeno autóctono de la zona. Es de hacer notar que hubo entre un 5 y 20 % de mortalidad en los controles reportados por estos dos autores, mientras que la mortalidad de los controles en los experimentos con el 3.^{er} y 4.^o estadio fue menos del 5 % (Guzmán 2008; Muñoz 2009).

Por otro lado, estudios de la ultraestructura del intestino medio de larvas de *H. metabus* infectadas con una bacteria patógena, realizados por Tovar (2001), revelaron que larvas del 3.^{er} estadio de *H. metabus* sufrieron menos daños que las larvas del 5.^o estadio. Además, Motaban *et al.* (2000) encontraron que las larvas del 3.^{er} estadio tuvieron niveles más altos de lisozima (una enzima con propiedades antimicrobianas) que las larvas del 5.^o estadio, al ser infectadas con la misma bacteria, lo que también podría influir en la resistencia de las mismas a una infección bacteriana.

Además de lo mencionado arriba, las diferencias en la susceptibilidad de las larvas al DiPel[®] pudieron ser debidas a diferencias en las condiciones en las cuales fueron mantenidas, por ejemplo, temperatura, humedad relativa, dieta y la formulación del producto (Staal 1975; Mulla & Darwazeh 1979; Ross *et al.* 1994; Lawler *et al.* 1999). Sin embargo, se utilizó esencialmente la misma metodología para todos los experimentos y las larvas fueron criadas en las mismas condiciones. Es posible que las diferencias en la susceptibilidad se debieran a diferencias interpoblacionales de las larvas (los experimentos se realizaron con larvas recolectadas del campo) y también a diferencias en la edad del producto, que pudiera haber afectado su calidad (Borges 2000).

Finalmente, es importante acotar que para los experimentos se utilizaron diferentes lotes del DiPel[®], lo que podría haber sido una de las causas de la variabilidad observada en los resultados. Factores como el tiempo de traslado del DiPel[®] de su país de origen a Venezuela, el cual puede ser considerable, y las condiciones de almacenamiento no controladas (temperatura y humedad relativa) pueden afectar la eficacia del producto. Por lo tanto, lotes de DiPel[®] con diferentes tiempos de traslado y condiciones de almacenamiento inadecuadas pueden haber sido la causa de las diferencias observadas en los resultados de las evaluaciones. Con respecto al tiempo necesario para matar las larvas, los datos también son variables; sin embargo, en general, hubo poca diferencia entre las mortalidades al quinto y sexto día (Osborn *et al.* 2005a; Osborn *et al.* 2005b; Guzmán 2008; Muñoz 2009).

Tabla 2. Promedio (\bar{X}) y error estándar (EE) de la mortalidad de las larvas de *Hylesia metabus* a los 24 y 96 horas luego a la exposición a diferentes concentraciones de DiPel[®]8L.

Mortalidad %	Concentración (cc/ha)									
	0		500		700		1000		1400	
	\bar{X}	EE	\bar{X}	EE	\bar{X}	EE	\bar{X}	EE	\bar{X}	EE
24 horas	0	0	17,5	4	19,3	3,7	28,5	3,1	20	8,0
96 horas	2,25	0,83	63,1	2,8	71,3	1,11	64,7	2,1	62,7	5,0

Ensayos de campo

Los resultados se muestran en la Tabla 2 y la Figura 1. El porcentaje de mortalidad de las larvas fue significativamente mayor a las 96 h respecto a las 24 h. También hubo una mortalidad significativamente mayor en los tratamientos comparado con los tratamientos control en los lapsos evaluados (prueba de Anova; $p < 0,05$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la mortalidad de las larvas entre tratamientos (Tabla 2, Figura 1) (Velásquez & Osborn 2006).

El error estándar fue mayor a las 24 h que a las 96 h, reflejando una mayor dispersión de los datos entre los cuatro bloques en ese primer conteo (Tabla 2, Figura 1). A las 24 h el resultado más uniforme se obtuvo a la concentración de 1000 cc/ha, con un error estándar de 3,1 %, y a las 96 h a una concentración de 700 cc/

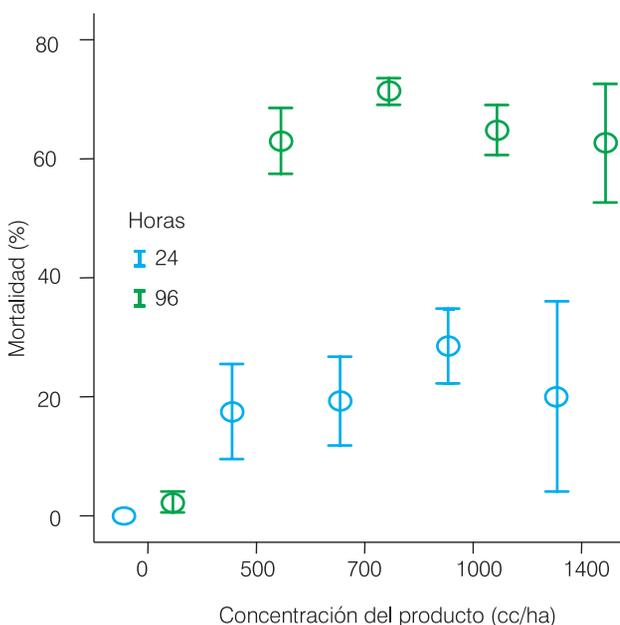


Figura 1. Porcentaje promedio y error estándar de la mortalidad de las larvas de *Hylesia metabus* a las 24 y 96 h luego de la exposición a diferentes concentraciones de DiPel[®]8L.

ha con un error estándar de 1,11 %. En cambio, los porcentajes de mortalidad más dispersos se obtuvieron para la concentración de 1400 cc/ha, con errores estándar de 8,0 y 5,0 % a las 24 y 96 h luego de la exposición, respectivamente. Esto podría deberse a que las larvas aparentemente rechazaron las hojas impregnadas con el insecticida biológico DiPel®8L a esa concentración.

La potencia del DiPel®8L, utilizado en este experimento equivale a 12,7 BIU (billones de unidades internacionales) (Frankenhuyzen *et al.* 2000) y fue aplicada a 700 cc/ha, lo que equivale a 8,9 BIU/ha. Sin embargo, para el control de otras plagas forestales, como por ejemplo, el gusano de las yemas del abeto (*Choristoneura fumiferana*) en Canadá, las dosis recomendadas son 2,4 l/ha (30BIU) y para el control de la

polilla gitana de las coníferos (*Lymantria dispar*), las dosis recomendadas son entre 2,4 a 3,9 l/ha de producto (30-50 BIU/ha) en Canadá y por lo menos 4,7 l/ha (60 BIU/ha) en EE. UU. (Frankenhuyzen *et al.* 2000). Por ello se puede apreciar que la cantidad de producto necesario para controlar *H. metabus* es mucho menor que en estas otras dos plagas. Por supuesto, existen muchos otros factores que son determinantes para la eficacia de las aplicaciones de *Btk*. Entre ellos podemos mencionar: 1) la dilución del producto y el volumen de aplicación; 2) el momento de la aplicación (el producto debe ser aplicado al final de la tarde, con el fin de evitar la radiación solar, la cual destruye la bacteria) y 3) las condiciones climáticas (las lluvias fuertes lavan el producto de las hojas del mangle, reduciendo así sustancialmente la eficacia).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se observó una variación considerable en la susceptibilidad de las larvas de *Hylesia metabus* al DiPel® en los experimentos realizados en el laboratorio. Sin embargo, las mortalidades causadas a las larvas a la concentración de 256 ppm del producto fueron, en general, similares a las causadas por concentraciones del producto de 1024 ppm. En el campo, el efecto letal del DiPel®8L no aumentó al incrementar la concentración de 500 a 1400 cc/ha.

Con respecto al tiempo entre el momento de aplicación del producto y la mortalidad de las larvas, en los ensayos realizados en el campo existe un aumento significativo de las mortalidades a las 96 h (4 días) y se aprecian mortalidades más uniformes comparadas con las observadas a las 24 h. Los datos del laboratorio son mucho más variables. Sin embargo, en general hubo poca diferencia entre las mortalidades al quinto y sexto día (120 y 144 h, respectivamente) luego de la aplicación del producto. Por lo tanto, se recomienda evaluar la mortalidad producida por el DiPel®8L entre el 5.º y 6.º día.

Debido a las variaciones en la susceptibilidad de las larvas de *H. metabus* al insecticida biológico DiPel®8L, se recomienda que se realicen experimentos de laboratorio y campo previos a las aspersiones con este producto para poder estimar la dosis necesaria para asegurar un control razonable sin malgastar recursos económicos en aplicaciones y en el producto.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott W (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- Aronson A, Beckman W & P Dunn (1986) *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiology Review* 50:1-24.
- Barreiro J & C Santiago-Álvarez (1985) Estudio en laboratorio de la sensibilidad de *Ocnogyna baetica* (Lepidoptera: Arctiidae) a *Bacillus thuringiensis*. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas* 11:173-177.
- Benaim C, Pernía B & R Rojas (1991) Dermatitis caused by moths of *Hylesia* genus (Lepidoptera: Saturniidae) in Northeastern States of Venezuela. I. Bioecology of *H. metabus* Cramer. Clinical features of lepidopterism determined by this species. *American Journal Contact Dermatitis* 2:213- 221.
- Berliner E (1915) Ueber die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuehniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 2: 29-56.
- Brightenti D, Carvalho C, Carvalho G & C Brightenti C (2005) Efficiency of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) for control of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). *Ciência e Agrotecnologia*. [online] 29:60-68.
- Burges H (2000) Techniques for testing microbials of arthropod pests in greenhouses. En: Lacey L & Kaya H (Eds) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, Londres. 505-526 pp.

- Feitelson J (1993) The *Bacillus thuringiensis* Family Tree. En: Kim L (Ed) *Advanced Engineered Pesticides*. CRC Publishing. New York, USA. pp 63-72.
- Frankenhuyzen R, Reardon R & N Dubois (2000) Forest Defoliators. En: Lacey L & Kaya H (Eds.) *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, Londres. pp 527-556.
- Guzmán T (2008) *Evaluación de la efectividad del larvicida DiPel®8L, a base de Bacillus thuringiensis var. kurstaki sobre las larvas de tercer, cuarto y quinto estadio de Hylesia metabus Cramer (Lepidoptera: Saturniidae)*. Tesis. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 34 pp.
- Ishiwata S (1901) One of a kind of several flasherve (sotto disease). *Dainiham Sambshi Kaiho* 9: 1-15.
- Lawler S, Jensen T, Dritz D & G Wichterman (1999) Field efficacy and nontarget effects of the mosquito larvicides temephos, methoprene, and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Florida mangrove swamps. *Journal of American Mosquito Control Association* 15:446-452.
- Lord J (2005) From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology* 89:19-29.
- McGuire M, Galan-Wong L & P Tamez-Guerra (1997) Bacteria: Bioassay of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran larvae. En: Lacey L & Kaya H (Eds.) *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, Londres, Nueva York. pp. 91-99.
- Mexzón R, Chinchilla C & R Rodríguez (2003) El gusano canasta, *Oiketicus kirbyi* Lands Guilding (Lepidoptera: Psychidae), plaga de la palma aceitera. *ASD Oil Palm Papers* 25:17-28.
- Motaban L, Osborn F & O Nussetti (2000) Actividad lisozímica y fagocítica en larvas de *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) sanas e infectadas con una bacteria patógena. *Acta Científica Venezolana* 51:147.
- Mulla M & H Darwazeh (1979) New insect growth regulators against flood and stagnant water mosquitoes-effects on nontarget organisms. *Mosquito News* 39:746-755.
- Muñoz F (2009) Efectos de selección entre hojas sanas e infectadas con una larvicida a base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* y su eficacia como controlador biológico de las larvas de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae). Tesis. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 36 pp.
- Osborn F, Hernández J, Velásquez D, Velásquez Y & A Sapene (2005a) Efectividad de dos formulaciones del larvicida DiPel®8L sobre larvas de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae). XVIII Congreso Venezolano de Entomología. San Felipe, Venezuela. 118 pp.
- Osborn F, Salazar A & D Velásquez (2005b) Comparación de la efectividad de DiPel®8L, Vectobac 12AS® y Griselesf® contra larvas de quinto instar de *Hylesia metabus*. En: Osborn F (Ed.) *III Informe Proyecto Reto Hylesia metabus*. Venezuela. 4 pp.
- Peacock J, Schweitzer D, Carter J & N Dubois (1998) Laboratory assessment of the effects of *Bacillus thuringiensis* on native Lepidoptera. *Environmental Entomology* 27:450-457.
- Ramos F, Carmona A, Béres M & N Méndez (2004) Evaluación de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* tóxicos a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bioagro* 16:183-188.
- Rosas-García N (2008) Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10:49-63.
- Ross D, Judy D, Jacobson B & R Howell (1994) Methoprene concentrations in freshwater microcosms treated with sustained-release Altosid® formulations. *Journal of American Mosquito Control Association* 10:202-210.
- Staal G (1975) Insect growth regulators with juvenile hormone activity. *Annual Review Entomology* 20:417-458.
- Steinhaus E (1961) On the correct author of *Bacillus sotto*. *Journal of Insect Pathology*. 3:97-100.
- Tanada Y & H Kaya (1993) *Insect Pathology*. Academic Press. San Diego, London, New York. 666 pp.
- Tovar M (2001) Estudio por microscopía electrónica de los efectos causados en el mesenteron de las larvas de *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae) por la ingesta de *Bacillus* sp. Tesis. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 41 pp.
- Vásquez L (1990) Estudio bioecológico y tácticas de control de la palometa *Hylesia metabus* Cramer en el oriente de Venezuela. *Saber* 3:14-20.
- Vásquez D & F Osborn (2006) Efectividad de DiPel®8L, en larvas del tercer instar de *Hylesia metabus* en condiciones de campo. En: Osborn F (Ed.) *V Informe Proyecto Reto Hylesia metabus*. Venezuela. 4 pp.

Elucidación parcial de los componentes de la feromona sexual de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae)

Beatriz Herrera-Malaver¹, Carmen V. Liendo-Barandiaran¹, Ignacio Buscema¹, Diony Velásquez¹, Neudo Urdaneta² y José V. Hernández E.*¹

¹Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edif. Física y Electrónica I, piso 1, Departamento de Biología de Organismos, Universidad Simón Bolívar, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

²Laboratorio de Síntesis Orgánica 210, Edif. Química y Procesos, Piso 2, Universidad Simón Bolívar, Valle Sartenejas, Baruta, Apartado postal N° 89000, estado Miranda, Caracas, Venezuela.

*jnandez@usb.ve

Resumen

En el presente trabajo se describe parcialmente la feromona sexual de *Hylesia metabus*, especie urticante presente en el nororiente de Venezuela. Mediante el análisis de extractos de los últimos segmentos abdominales de hembras y machos de esta polilla, utilizando Cromatografía de Gases (CG) acoplada a detector de ionización a la llama (FID) y Espectrometría de Masas (EM), se observaron señales cromatográficas exclusivas de hembras. La identificación de estas señales se realizó por comparación de sus espectros de masas e índices de retención (IR) con los compuestos sintéticos. Se determinó que 1-eicosanol y 1-octadecanol estaban presentes en los extractos de hembras provenientes de las recolectas en los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro. Estos compuestos mostraron actividad electroantenográfica en machos, pero no en hembras. Por tal motivo se proponen como posibles componentes de la feromona sexual de esta polilla. Sin embargo, ha sido imposible la realización de experimentos de comportamiento en túnel de viento y ensayos de campo que verifiquen la actividad etológica de los compuestos candidatos a feromona debido a las fluctuaciones de las poblaciones de este insecto.

Abstract

Partial Elucidation of the Components of *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (Lepidoptera: Saturniidae) Sex Pheromone

Hylesia metabus is an urticating moth from northeastern Venezuela. Partial elucidation of the sex pheromone of this species is described. Male and female abdominal tips analyses by using gas chromatography (CG-FID) and CG-mass spectrometry (EM) shows exclusive female chromatographic peaks. These peaks were then identified by the analysis of mass spectra and comparing the retention indices (RI) with synthetic compounds. We found that 1-eicosanol and 1-octadecanol were present in female abdominal tip extracts. The biological material were collected in Sucre, Monagas

Palabras clave Key words

Electroantenografía, feromona sexual, *Hylesia metabus*, Saturniidae.
Electroanthennography, *Hylesia metabus*, Saturniidae, sex pheromone.

and Delta Amacuro State, in January and February 2006, respectively. These compounds showed electroantennographic (EAG) activity in males but not in females. This suggests that these components may be the possible sex pheromone of *H. metabus*. It has been impossible to us to perform wind tunnel and field bioassays to test the behavioral activity of the identified compounds, due to the fluctuations of *H. metabus* populations in Venezuela.

PRESENTACIÓN

La comunicación puede ser entendida como el proceso mediante el cual un organismo emisor genera una señal a través de un medio y la misma es recibida por un receptor que emite una respuesta. La comunicación es entonces la interacción entre tres componentes básicos: el emisor de una señal, el medio a través del cual ésta es transmitida y el receptor de la misma (Shorey 1973; Howse 1990). Por supuesto, la calidad de la comunicación, es decir, de la emisión de la señal y su recepción, dependerá tanto de aquello heredado por los actores del proceso como del medio. Esta señal puede ser disminuida, distorsionada o modificada.

Dependiendo de las características biológicas y comportamiento de las especies, la comunicación entre el emisor y el receptor puede: favorecer al emisor y al receptor a la vez o sólo a uno de ellos, o incluso favorecer a un tercer receptor. Por ejemplo, en ciertas circunstancias una señal de alarma puede alertar a otros individuos para su beneficio y aumentar la protección sobre el emisor de la señal. En otros casos, la señal producida por la hembra de un insecto para atraer a los machos con la finalidad de aparearse, también puede ser percibida y utilizada por depredadores o parásitos especializados para su propio beneficio (Howse 1990).

Ahora bien, los organismos se mantienen en una comunicación interna y externa permanente, monitoreando constantemente el medio que los rodea y sus condiciones fisiológicas mediante células, tejidos u órganos especializados. Las interacciones con el entorno traen como consecuencia que los organismos desarrollen o desplieguen respuestas de comportamiento ante los estímulos recibidos (señales), para que puedan satisfacer necesidades fundamentales como la alimentación, reproducción, evasión de enemigos naturales, etc. Los estímulos pueden ser de diferente naturaleza, por ejem-

plo, un sonido, el contacto directo, la luz, la liberación de sustancias. Así, las formas de comunicación pueden ser auditivas, táctiles, visuales y químicas. En el caso de la comunicación química, a las sustancias involucradas en las interacciones entre organismos generalmente se les conoce como semioquímicos, y la ciencia que estudia la estructura, función, origen, y significado de estos compuestos naturales es la Ecología Química.

Los semioquímicos se clasifican en aleloquímicos y feromonas. Los aleloquímicos están involucrados en la comunicación de individuos de diferentes especies (acción interespecífica) y se subdividen en kairomonas (sustancias que benefician al receptor), alomonas (las que favorecen al emisor), sinomonas (el receptor y el emisor se benefician) y las anemomonas que son olores emitidos por la materia orgánica muerta y originan respuestas fisiológicas y etológicas en los individuos receptores. Las feromonas median la comunicación entre individuos de la misma especie, es decir, son de acción intraespecífica, pudiendo beneficiar al individuo emisor, receptor o a ambos. Las feromonas sexuales constituyen un ejemplo en el que se benefician el receptor y el emisor, ya que son emitidas por un determinado sexo, y recibidas por el sexo opuesto, con la finalidad de garantizar el apareamiento de los individuos.

Las feromonas son específicas para una especie, son sustancias no tóxicas, no dejan residuos en el ambiente y su uso en el campo no afecta directamente a los depredadores naturales de la plaga u otros insectos; es por ello que el uso de feromonas encaja muy bien en la idea del Manejo Integrado de Plagas (MIP). El MIP implica la selección, integración y aplicación en forma armónica, tomando en cuenta las consideraciones de tipo económico, ecológico y social, de todos aquellos métodos apropiados para enfrentar una situación de-

terminada, con el objeto final de reducir las poblaciones de insectos plaga a niveles por debajo de aquellos que producirían daño económico (Katsoyannos *et al.* 1992; Clavijo 1993). Entonces, las feromonas pueden ser utilizadas de diferentes maneras: monitorización o control, dependiendo del objetivo que se persiga con su aplicación. Pero en ambos casos, es fundamental la identificación correcta de los componentes de la feromona y sus proporciones.

Superficialmente, podría pensarse que las técnicas utilizadas para el aislamiento e identificación de feromonas y aleloquímicos, son las empleadas en general en todas las ramas de la química de los productos naturales. Sin embargo, existen modificaciones en los métodos desarrollados en la ecología química que han permitido obtener el máximo de información posible del semioquímico con unos pocos microgramos del material, como por ejemplo, estructura, estereoisomería, proporción, actividad biológica, etc.

Las feromonas probablemente sean los semioquímicos más estudiados, en especial aquellas producidas por especies de insectos de interés económico, por ejemplo, lepidópteros pertenecientes a las familias: Tortricidae, Pyralidae, Gelechiidae, Sesiidae y algunas subfamilias Noctuides. En comparación con otras familias de Lepidoptera, existen pocos estudios de identificación de feromonas sexuales en Saturniidae, solamente se conocen las feromonas sexuales de *Nudaurelia cytherea* (Fabr) (Henderson *et al.* 1973), *Antheraea polyphemus* (Cramer 1776) (Kochansky *et al.* 1975), *Antheraea pernyi* (Guérin-Méneville, 1855) y *Samia cynthia ricini* (Donovan) (Bestmann *et al.* 1989), *Lonomia obliqua* (Walker 1885) (Zarbin *et al.* 2007) y algunas especies de los géneros *Hemileuca* y *Saturnia* (McElfresh & Millar 1999abc; McElfresh *et al.* 2001abc). En el caso del género *Hylesia* no existen estudios sobre feromonas, con la excepción del trabajo de Fornés & Hernández (2000), en el cual sugieren la existencia de una feromona sexual emitida por la hembra de *Hylesia metabus* (Cramer, [1775]) (ver páginas 15-24).

La identificación y síntesis de los componentes de la feromona de *H. metabus*, puede permitir su uso en un sistema de monitorización, en el cual se coloquen trampas cebadas con feromona en áreas remotas para determinar la presencia del insecto. Las mismas también pueden ser usadas en el control de *H. metabus*, mediante la colocación masiva, que consiste en ubicar trampas con una alta densidad en las zonas afectadas por esta

plaga, y así capturar individuos adultos suficientes, para ir reduciendo las poblaciones de la misma. Otra técnica de control es por interrupción del apareamiento; en este método se satura con la feromona sexual el área infestada, lo cual evita el encuentro y apareamiento entre individuos de la especie plaga, bien sea por confusión del sexo receptor, habituación a la señal química y camuflaje del olor natural (Knight & Turner 1999). Ahora bien, para el uso de feromonas en el control de insectos plaga se requiere previamente aplicar técnicas de aislamiento e identificación de compuestos orgánicos volátiles.

Aislamiento de la feromona

Microextracción con solvente. Esta técnica comprende la maceración total o parcial del insecto con un solvente orgánico adecuado, seguido por la filtración y concentración del extracto obtenido. Se aprovecha la capacidad que poseen los componentes de las feromonas para disolverse en solventes apolares como *n*-pentano o *n*-hexano, o bien, en solventes más polares como el diclorometano. Entre los factores que deben ser tomados en cuenta a la hora de efectuar una extracción adecuada se encuentran: la volatilidad, polaridad, volumen, pureza del solvente, el tiempo de extracción y número de individuos a utilizar. Generalmente, con este método se requieren de 10 - 40 insectos por microextracto; y para evitar la contaminación es esencial el uso de solventes de alta pureza (grado HPLC) (Howse *et al.* 1998).

En la mayoría de los lepidópteros se conoce la ubicación de la glándula productora de la feromona. Es por ello que en trabajos de identificación de feromonas donde se aplica la microextracción con solvente, se han aislado los componentes a partir de segmentos del cuerpo donde ha sido localizada la glándula secretora, o incluso en algunos casos sólo la glándula. Dado que en algunas especies las feromonas son sintetizadas y emitidas de manera inmediata en respuesta a un determinado estímulo (síntesis de *novo*) y la glándula secretora no posee reservorio, es necesario preparar los extractos de forma sincronizada con el momento de la biosíntesis, el cual a veces coincide con el comportamiento de llamado del individuo emisor.

Análisis de muestras sólidas. Para el análisis de muestras sólidas se emplea el inyector Keele, ajustable al puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Está constituido por un tubo de acero inoxidable de 11cm de

longitud donde presenta pequeños orificios en las paredes o un agujero alargado en uno de sus lados de 12 mm aproximadamente. El émbolo es de acero inoxidable y se introduce perfectamente en el interior del tubo. Estas dos partes son ajustadas entre sí mediante un *septum* de goma y una tuerca. Este sistema es unido a su vez al puerto de inyección del cromatógrafo por un *septum* de goma y una tuerca que cierra la entrada del inyector (Figura 1).

La muestra es introducida dentro de un tubo capilar de vidrio suave (1,2 mm x 30 mm de longitud). Ambos extremos del tubo son sellados rápidamente a la llama, el capilar con la muestra, se introduce en el inyector Keele, el cual debe estar adaptado previamente al puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Luego, se espera hasta que se establezca la presión del gas de arrastre, lo cual permite además completar la volatilización de los componentes de la muestra de mayor peso molecular (Morgan 1990). Al culminar este tiempo, se baja el émbolo para romper el capilar, liberando los compuestos orgánicos volátiles de la muestra en la cámara del inyector, llevándolos con el gas arrastre a la entrada de la columna.

Esta técnica de inyección ha sido empleada en el análisis de muestras biológicas, específicamente en la determinación de compuestos volátiles presentes en glándulas o hidrocarburos cuticulares de insectos, en la mayoría de los casos en hormigas, aunque existen trabajos donde se ha empleado para la determinación de la feromona sexual en lepidópteros (Attygalle *et al.* 1986; Attygalle *et al.* 1987; López *et al.* 2002; Morgan *et al.* 2003; Jungnickel *et al.* 2004; Akino 2006).

Separación e identificación de los componentes de la feromona

Cromatografía de gases (CG). En esta técnica, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. Las moléculas del analito no interactúan con la fase móvil (gaseosa), en este caso la retención del analito depende de su volatilidad y de las interacciones entre sus grupos funcionales y los de la fase estacionaria (líquida) que recubre la superficie interna de la columna.

El detector estándar utilizado para la CG, es el detector de ionización a la llama (en inglés *Flame Ionization Detector*, FID), el cual está constituido por un

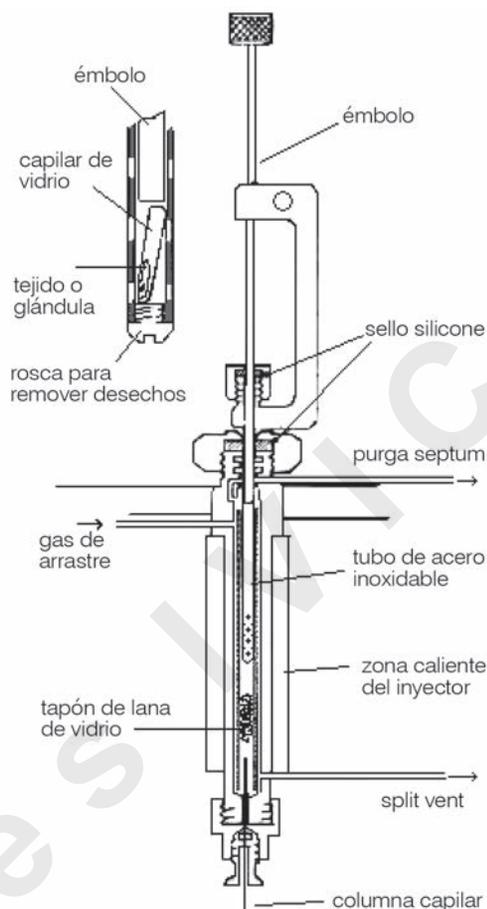


Figura 1. Esquema del inyector de muestras sólidas (Morgan 1990).

quemador, en el que el efluente de la columna se mezcla con una llama de hidrógeno y aire. La mayoría de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de una llama de hidrógeno y aire, producen carbocationes y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la misma. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre el extremo del quemador y un electrodo conductor situado por encima de la llama, la corriente que resulta se dirige para su medida hacia un amplificador y se registra la señal generada en función del tiempo (Skoog & Leary 1994). El FID responde al número de átomos de carbono que llegan al detector por unidad de tiempo, es un detector sensible a la masa.

Preferiblemente, la separación de los constituyentes de la muestra debería proceder sin previas modificaciones químicas; sin embargo, en algunos casos, para obtener mayor información sobre la estructura del compuesto desconocido, se realizan microreacciones que cambian las características de los componentes de la mezcla feromonal o de una fracción de ésta.

La mayoría de los métodos analíticos requieren que los compuestos posean cierto grado de pureza para que los resultados obtenidos sean confiables, por ello, el acoplamiento de la CG con diferentes tipos de detectores permite que se obtenga mayor información, directamente de cada componente de la muestra. En el estudio de semioquímicos en insectos, son muy útiles los acoplamientos de CG con Espectrometría de Masas (EM) y Electroantenografía (EAG), los cuales se detallan a continuación.

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Con la técnica de espectrometría de masas (EM) un compuesto o una mezcla de compuestos son ionizados y fragmentados como consecuencia del bombardeo de electrones; los iones resultantes son separados y analizados de acuerdo a la relación masa/carga (m/z), y la abundancia relativa de cada fragmento es registrado como un espectro.

En el área de la ecología química, la EM se emplea frecuentemente en la elucidación de compuestos. Por lo general, se contrasta el espectro obtenido del compuesto con una librería de espectros y patrones sintéticos. La información dada por esta técnica es complementada con los índices de retención, microrreacciones, u otras técnicas instrumentales. Finalmente, es necesario validar la actividad de la estructura química elucidada mediante un bioensayo.

Índices de Retención. El término de índices de retención, introducido por Kováts (1958), expresa la retención de un compuesto con respecto a sus homólogos n -alcanos examinados bajo las mismas condiciones experimentales. El índice de retención de un compuesto en particular, es definido como el número de carbonos por 100 de un n -alcano hipotético que genera exactamente el mismo valor de retención del compuesto de interés medido en condiciones idénticas.

En el análisis de semioquímicos de insectos por CG se utilizan programas de temperaturas, con una o más rampas de calentamiento, por esto nos interesa en particular el índice de retención con temperatura programada (I_X^T) (ecuación 1), ideado por Kováts a partir de la ecuación del índice de retención (I_X) (ecuación 2).

$$I_X^T = 100 \left(n + \frac{tr_X - tr_n}{tr_{n+1} - tr_n} \right) \quad (1)$$

$$I_X = 100n + 100 \frac{\log tr_X - \log tr_n}{\log tr_{n+1} - \log tr_n} \quad (2)$$

donde n es el número de átomos de carbono del n -alcano, tr_X , tr_n y tr_{n+1} son los tiempos de retención del compuesto de interés, del n -alcano y del $(n+1)$ -alcano, respectivamente. El índice de retención con temperatura programada (I^T), es un valor que puede usarse para reportar e intercambiar información, pero es necesario que al reportar I^T se especifiquen las condiciones en las cuales se realizó el análisis.

Métodos para determinar la actividad electrofisiológica y el efecto en el comportamiento

Una vez aislado, separado e identificado un compuesto o grupo de ellos es necesario establecer cuáles de ellos constituyen la feromona de la especie en estudio. Para ello, se debe demostrar que el o los compuestos emitidos por el organismo, generan una respuesta biológica en el receptor, la cual se desea esté limitada a la especie en cuestión, con la posibilidad que se extienda a un pequeño número de especies del mismo género. La actividad biológica del o los compuestos de interés se evalúa mediante métodos electrofisiológicos y bioensayos de comportamiento de los individuos ante los mismos compuestos. En algunos casos se realizan los bioensayos con el compuesto natural, cuando se desea probar el estímulo y su naturaleza; o con el compuesto sintético para determinar la actividad del análogo químico.

Métodos electrofisiológicos

La electroantenografía es una de las técnicas utilizadas para evaluar la actividad biológica de compuestos emitidos por insectos o plantas, en ésta las antenas de los insectos que presentan células sensoriales a los compuestos químicos se usan como un detector que permite determinar la actividad biológica. Fue originalmente desarrollada por Schneider (1969) y se fundamenta en que las antenas poseen células receptoras, capaces de captar una o varias moléculas químicas de estímulo, convirtiéndolas en impulsos eléctricos que se transmiten por el sistema nervioso hasta generar una señal eléctrica que será registrada por un instrumento adecuado. Un electroanténografo consta básicamente de electrodos, un amplificador y un dispositivo registrador (Bjostad 2000).

Sobre la antena se encuentran ubicadas estructuras olfativas denominadas sensilias, las cuales constituyen la

mayor parte de los órganos sensoriales localizado sobre la antena (Schneider 1969). Una sensilia es una pieza especializada de cutícula, la parte externa de la misma es penetrada por un poro, y cada poro continúa con túbulos cuticulares que penetran las partes internas de la cutícula alcanzando el lumen cercano a la membrana celular de la dendrita de la célula receptora (Schneider 1969).

Las moléculas de olor son pequeñas y la información que llevan consigo debe alcanzar los receptores olfativos con la finalidad de ser traducidas a actividades neuronales. Sin embargo, los receptores olfativos se encuentran localizados sobre las dendritas, las cuales se encuentran rodeadas de linfa; por lo tanto existen unas proteínas de enlace (PE) que se encargan de transportar estas moléculas de olor a los receptores olfativos correspondientes.

Arn *et al.* (1975) realizaron el primer acoplamiento directo de CG y el detector electroantegráfico (DEA), donde el efluente CG pasaba continuamente sobre la antena. Utilizaron una columna capilar de vidrio de alta resolución donde los anchos de pico son sólo de unos pocos segundos (15 s o menos). Entonces, los componentes de la muestra alcanzaban la antena con un agudo aumento en la concentración o como pulsos. Los receptores olfativos de la antena no se saturaban en estas condiciones. Este sistema toma ventaja de la alta resolución de la CG y a su vez, la extrema sensibilidad y selectividad de los receptores olfativos de la antena para la detección de los componentes de la feromona.

En los análisis por CG-DEA, el efluente de la columna cromatográfica es dividido en dos vías; una es dirigida al detector estándar, usualmente un FID, y el otro a la interfase cuya salida se dirige a la antena del insecto que se encuentra fuera del horno del CG. Para prevenir la condensación de las fracciones cromatográficas en la interfase, esta zona del equipo se mantiene a la temperatura máxima establecida por el programa de temperatura utilizado en el cromatógrafo para el análisis. Después de abandonar la interfase caliente, el efluente es mezclado con una corriente de aire filtrada y humedecida, dirigida hacia la antena, como en el arreglo simple EAG descrito anteriormente. El elemento sensorial del DEA lo constituye una antena desecada del insecto, de la cual los últimos segmentos distales han sido previamente removidos. La interpretación adecuada de los resultados CG-DEA requiere que los cambios de voltaje generados por la estimulación química de la antena puedan ser distinguidos del ruido de fondo que surge inevitablemente del montaje de la antena y de los dispositivos asociados al CG-DEA (Cork *et al.* 1990).

Olfatómetros

La evaluación de las respuestas comportamentales de los individuos ante uno o más determinados semioquímicos se realiza mediante bioensayos, utilizando olfatómetros, los cuales son dispositivos que se fundamentan en la elección libre de los insectos de dirigirse hacia una fuente de olor. En los diseños de olfatómetros se pueden diferenciar dos tipos: los de flujo de aire y los de aire estático. Los primeros se usan en estudios encaminados a la detección y medición de respuestas de atracción de insectos a señales olfativas emitidas a largas y medianas distancias, ya que permiten evaluar conductas de anemotaxis desencadenadas por aromas contenidos en una corriente de aire. Por su parte, los olfatómetros de aire estático se usan para medir respuestas quimiotáctiles u olfativas a cortas distancias o en situaciones en donde las señales químicas se difunden en el espacio sin ser transportadas por una corriente de aire. Los olfatómetros de flujo de aire requieren de un sistema que permita la circulación continua de aire dentro del dispositivo. Los diseños para este tipo de olfatómetro son muy diversos; sin embargo, pueden diferenciarse tres modelos básicos: 1) túnel de viento, 2) laberinto en forma de «Y», y 3) de cuatro vías (López-Ávila & Rincón 2006).

Por otro lado, algunos estudios comprueban directamente en el campo la actividad de los semioquímicos sintéticos mediante trampas cebadas con diferentes concentraciones y proporciones de los compuestos identificados como posibles constituyentes del semioquímico en estudio. En el caso particular del estudio de la feromona sexual de *H. metabus* no se evaluó la actividad etológica de los compuestos propuestos como constituyentes de la feromona, debido a que una vez realizado el aislamiento, separación e identificación de éstos, las poblaciones de esta polilla disminuyeron a tal magnitud que no fue posible disponer de insectos para realizar los bioensayos olfatométricos correspondientes.

En este capítulo se presentan los resultados más recientes en cuanto a la identificación de la feromona sexual de la polilla *H. metabus*, a partir de la aplicación de técnicas analíticas y electrofisiológicas realizadas con material biológico recolectado entre 2005 y 2008, en los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro (Venezuela). Además, se ha incluido una breve descripción de las técnicas utilizadas en ecología química para el aislamiento, separación e identificación de semioquímicos.

DESCRIPCIÓN DE MÉTODOS

Recolección del material biológico

Las inspecciones periódicas en las zonas de mangle del nororiente de Venezuela permitieron recolectar pupas y larvas de *H. metabus* directamente de la planta hospedera (*Rhizophora mangle* L), durante diferentes meses de los años 2005, 2006 y 2008. Para facilitar el análisis de las muestras, las áreas de recolecta se dividieron en tres zonas: zona S, que comprende a las localidades de caño Ajíes, caño Mare-Mare, El Paujil, Turuépano, Río Chiquito, Irapa y Yaguaraparo, en el estado Sucre; zona D, los caños Angosturita e Iburuina, en el estado Delta Amacuro; y zona M, Morichal, en el estado Monagas. Las pupas recolectadas en el campo se trasladaron hasta el laboratorio y se conservaron en un cuarto con ciclo de luz invertido de 12:12 (L:O), a una temperatura promedio de 27 °C y humedad relativa promedio de 60 %. Para facilitar el seguimiento de la emergencia de los adultos y evitar el contacto con las setas urticantes de las hembras de *H. metabus*, las pupas se colocaron individualmente en bolsas plásticas transparentes, estériles e infladas. Los adultos recién emergidos se separaron por sexo, para usarlos en la preparación de extractos o en ensayos electroantenográficos.

Preparación de extractos

La hembra de esta especie presenta en la porción distal del abdomen, es decir, en los dos últimos segmentos abdominales, una estructura tubular donde se encuentra la glándula productora de la feromona sexual. Durante el comportamiento de llamado, esta estructura es proyectada en forma telescópica. (Fornés & Hernández 2000). Durante el periodo correspondiente al comportamiento de llamado de las hembras, se prepararon los extractos disecando los últimos segmentos abdominales de hembras y machos de *H. metabus* en el interior de una cámara aislante formada por una estructura metálica forrada en plástico transparente, que evitaba la dispersión y contacto con las setas urticantes de las hembras adultas. En cada extracto fueron utilizados los segmentos abdominales disecados de 50 individuos, los cuales se colocaron en un vial con sol-

vente (100 µl *n*-hexano), por 20 min. El líquido extraído y los lavados sucesivos se trasvasaron a un vial donde se concentró con una corriente suave de N₂ y se almacenó a -10 °C hasta el momento del análisis. De acuerdo a la disponibilidad del material biológico, para cada zona y periodo estudiado se prepararon tres extractos de segmentos abdominales de hembras e igual número para los machos.

Preparación de muestras sólidas

Las recolectas de material biológico en la localidad de Morichal, Edo. Monagas, en mayo del 2008, fueron de pocos ejemplares, por lo cual no fue posible preparar extractos masivos, y se utilizó el método de muestra sólida para el aislamiento de la feromona (Morgan 1990). Durante el periodo de llamado de la hembra se disecó el último segmento abdominal del adulto y se introdujo en un capilar de vidrio blando, sellado previamente por uno de sus lados. Luego de introducida la muestra, el otro extremo del capilar se selló con una microllama. Los capilares con las muestras se almacenaron a -15 °C hasta momento del análisis.

Análisis de las muestras

Cromatografía de Gases - Detector de Ionización a la Llama (CG-FID). Los extractos de los últimos segmentos abdominales de hembras y machos de *H. metabus* se analizaron en un cromatógrafo de gases con un detector de ionización a la llama. En este análisis se utilizaron tres tipos de columnas con fases estacionarias de diferente polaridad, y con programas de temperatura distintos (Tabla 1). Con la finalidad

Tabla 1. Columnas cromatográficas y programas de temperaturas utilizados en el análisis de extractos en *n*-hexano de *Hylesia metabus* mediante CG-FID.

Características de la columna cromatográfica	Temperaturas del inyector y detector	Programa de temperatura
DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,18 mm di., 0,25 µm de espesor de la fase)	280 °C	50 °C x 2 min x 12 °C/min x 146 °C x 0 min x 3 °C/min x 280 °C x 15 min
DB-23 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm di., 0,25 µm de espesor de la fase)	250 °C	50 °C x 2 min x 25 °C/min x 130 °C x 0 min x 3 °C/min x 250 °C x 10 min
DB-210 (J&W Scientific, 30 m x 0,18 mm di., 0,25 µm de espesor de la fase)	240 °C	50 °C x 4 min x 12 °C/min x 130 °C x 0 min x 3 °C/min x 240 °C x 10 min

de determinar los índices de retención (IR) de las señales observadas en los cromatogramas de los extractos de hembras, ausentes en los correspondientes de los machos, se inyectaron en las mismas condiciones cromatográficas, patrones de *n*-alcanos desde C₆-C₄₀.

Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (CG-EM). A fin de garantizar que los componentes de la feromona se encuentren entre los límites de detección del CG-EM, se prepararon extractos masivos de los últimos segmentos abdominales, trasvasando cada uno de los extractos (50 segmentos/extracto) del mismo sexo, pertenecientes a la misma recolecta, a un mismo vial, y luego, la mezcla se concentró con una corriente suave de N₂ hasta alcanzar un volumen aproximado de 10 µl. Estos extractos masivos de hembras y machos se analizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (70eV), equipado con una columna HP-1 (Hewlett-Packard, 30 m x 0,25 mm Ø interno, 0,25 µm de espesor de la fase no polar), usando helio como gas de arrastre. Los patrones de *n*-alcanos desde C₆-C₄₀ se inyectaron en las mismas condiciones cromatográficas. Los cromatogramas de los extractos de hembras y machos fueron comparados y se calcularon los índices de retención (IR) de las señales exclusivas de hembras. La identificación de los compuestos correspondientes a las señales cromatográficas exclusivas de hembras de *H. metabus*, está fundamentada en los índices de retención (IR), en el análisis de los espectros de masas de los compuestos naturales y en la comparación de éstos con espectros de la biblioteca de espectros Wiley275.

Para el análisis de las muestras sólidas, el capilar se introdujo en el inyector Keele. Una vez estabilizada la presión del gas de arrastre en el inyector, el capilar es roto, permitiendo la volatilización de los analitos de la muestra, y su introducción a la columna mediante el gas de arrastre. Las muestras sólidas de los últimos segmentos abdominales también se analizaron en el mismo cromatógrafo de gases acoplado con el espectrómetro de masas pero equipado con una columna DB-5 cuyas características y programa de temperatura se encuentra detallados en la Tabla 1.

Una vez propuestos el o los compuestos que posiblemente constituyen la feromona sexual de *H. metabus*, se adquirieron o se sintetizaron patrones de los mismos. Luego, las soluciones patrones de los posibles constituyentes de la feromona fueron analizados por

CG-EM, empleando las columnas y programas de temperatura señalados en la Tabla 1, con la finalidad de determinar los índices de retención de cada uno de los compuestos y compararlos con los IR de los compuestos exclusivos de hembras presentes tanto en los extractos, como en las muestras sólidas.

Electroantenografía

Montaje de la antena. Una antena de cada individuo (hembra o macho) se disecó de la cabeza del adulto de *H. metabus*, luego se cortó el ápice de la misma y se insertaron ambos extremos en el gel conductor (Spectra 360), el cual recubría a los electrodos de oro y plata. Los electrodos con la antena se colocaron en el centro del orificio del tubo de liberación de muestra por el cual circulaba un flujo de aire húmedo y continuo que impedía la desecación de los receptores del referido apéndice cefálico.

Análisis electroantenográficos. Con los parámetros EAG optimizados se evaluaron los extractos de los últimos segmentos abdominales de machos y hembras ante las antenas de ambos sexos. También, compuestos propuestos como posibles constituyentes de la feromona sexual de *H. metabus* fueron evaluados electroantenográficamente a diferentes concentraciones, ante antenas de adultos recolectados en la zona S, específicamente en El Paujil, estado Sucre (enero, 2007).

Optimización de condiciones electroantenográficas. La utilidad de la electroantenografía depende de la calidad de la señal de la antena cuando es estimulada, por lo tanto la optimización de las condiciones de análisis es fundamental para distinguir la respuesta EAG del ruido del equipo e identificar que la deflexión del voltaje es debida a un estímulo químico, y no a uno mecánico o eléctrico. Para seleccionar las condiciones que maximicen la señal EAG de antenas de machos evaluadas ante los extractos de los últimos segmentos abdominales de hembras en relación al *n*-hexano, se evaluaron los siguientes parámetros: velocidad y duración del pulso de aire de aplicación del estímulo. Estos pulsos se suministraron mediante un dispositivo controlado electrónicamente. Cada antena fue sometida a los tratamientos (*n*-hexano y extracto en *n*-hexano) y los estímulos se evaluaron al azar con intervalos de reposo entre las aplicaciones.

Un µl del extracto u otro estímulo fue agregado sobre un trozo de papel de filtro (Whatman N° 1),

que posteriormente, se colocó en el interior de una pipeta Pasteur. Al momento de aplicar el pulso de aire del estímulo, la punta de la pipeta se insertó en el orificio presente en el tubo de liberación de muestra. Las

señales generadas por las antenas fueron registradas por un amplificador de alta impedancia (IDAC232, Syntech®, The Netherlands) y procesadas mediante el Software Syntech®.

DESCRIPCIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

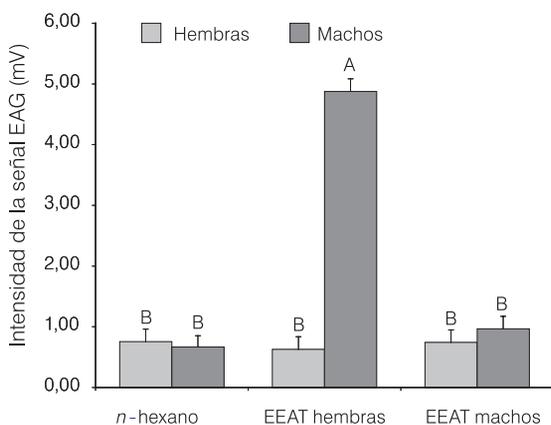


Figura 2. Promedio \pm error estándar de la intensidad de las señales electroantenográficas (EAG) de machos y hembras de *Hylesia metabus* ($n = 20$ antenas) ante hexano (control), extractos de los últimos segmentos abdominales de hembras y de machos de la misma especie. Letras distintas (A, B) indican diferencias significativas (Prueba Tukey, $P = 0,001$).

Los resultados de los análisis químicos y estudios electroantenográficos indican la existencia de una feromona sexual emitida por la hembra y percibida por el macho. Esto fue sugerido previamente por Fornés (1998), al estudiar el comportamiento de adultos de *H. metabus* en un túnel de viento, utilizando como estímulos individuos vivos de ambos sexos, encontró que los machos eran atraídos por las hembras vírgenes. Las antenas de machos de *H. metabus* al ser estimuladas con extractos de hembras presentaron una respuesta EAG promedio de mayor intensidad y estadísticamente diferente a las respuestas de los machos ante *n*-hexano y extractos de machos, y a las respuestas EAG de las hembras ante todos los tratamientos (Figura 2; prueba de Tukey, $F = 4,878$, $p < 0,001$).

Además, la actividad electroantenográfica de los extractos de segmentos abdominales confirma que la técnica de microextracción con solvente es efectiva en el aislamiento

de los componentes de la feromona sexual de esta especie. Es así que, las señales cromatográficas exclusivas de los extractos de los últimos segmentos abdominales de hembras de *H. metabus* posiblemente corresponden a los componentes de la feromona sexual de esta especie. Estas señales fueron similares entre la zona D y la zona S, y solamente fue posible apreciar señales con diferentes IR en los análisis por CG-FID usando la columna DB-5 (Tabla 2). Además, se observó una señal exclusiva de hembra en el rango de IR 2053-2057, que coincide para tres de los periodos en estudio: zona D (septiembre-2005 y enero-2006) y zona S (febrero-2006). En el análisis de los extractos mediante CG-FID, equipado con las otras dos columnas (DB-23 y DB-210), las señales exclusivas de hembras de *H. metabus*, coincidieron para las zonas y los periodos estudiados: zona D (enero-2006) y zona

Tabla 2. Índices de retención promedio (IR \pm DE) de señales cromatográficas exclusivas de hembras de *H. metabus* obtenidos del análisis por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización a la Llama (CG-FID) y Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas (CG-EM), de los extractos de los últimos segmentos abdominales y de muestras sólidas de *Hylesia metabus* recolectadas en las zonas D, S y M.

Técnica	Columna	Zonas			
		D** (septiembre-2005)	D** (enero-2006)	S* (febrero-2006)	M*** (mayo-2008)
GC-FID	DB-5	2056 \pm 2a	2053 \pm 2a	2057 \pm 4a	
		2288 \pm 2b	2286 \pm 3b	2227 \pm 3	2405 \pm 2
	DB-23		2640 \pm 1c	2638 \pm 1c	
GC-MS	DB-210		2289 \pm 3e	2293 \pm 1e	
	HP - 1		2093 \pm 2f	2092 \pm 2f	
	DB-5		2268 \pm 2g	2267 \pm 4g	2291 \pm 1b

* Zona D: Caño Angosturita y Caño Iburuina (Edo. Delta Amacuro).

** Zona S: Caño Ajjes, caño Mare-Mare, Paujil, Turuepano, Río Chiquito, Irapa, Yaguaraparo y Mapire (Edo. Sucre).

*** Zona M: Morichal (Edo. Monagas).

Índices de retención con la misma letra son similares.

S (febrero-2006) (Tabla 2). En los análisis por CG-EM, los cromatogramas de los extractos de hembras presentaron dos señales exclusivas de hembras; señal A y señal B, con índices 2093 ± 2 y 2268 ± 2 , para muestras colectadas en la zona D (enero-2006) y 2092 ± 2 y 2268 ± 2 , en las muestras de la zona S (febrero-2006) (Tabla 2).

En la composición y proporción de los compuestos químicos que constituyen la feromona sexual de los lepidópteros existen dos tipos de variación geográfica intraespecífica: a) la monomórfica cuando poblaciones aisladas geográficamente de una especie usan los mismos compuestos pero en diferente proporción, y b) variación polimórfica cuando diferentes poblaciones presentan compuestos diferentes en la composición de sus feromonas (Löfstedt 1990). En el estudio de la feromona sexual de las poblaciones de *H. metabus* de la zona D y zona S,

sólo se presentaron diferencias en las señales exclusivas de hembras en los análisis de extractos mediante CG-FID equipado con la columna DB-5, y estas diferencias no están presentes en los análisis realizados con diferentes columnas cromatográficas en el CG-FID, y en CG-EM equipado con la columna HP-1. Por lo tanto, no es posible afirmar si se presenta o no el fenómeno de la variación polimórfica. Además, la relación de áreas entre las señales A y B es 1:9, en la zona D (enero-2006) y en la zona S (febrero-2006), lo que supone una proporción similar entre los posibles componentes químicos de la feromona; por lo cual, no existe evidencia de una variación monomórfica. En tal sentido, los resultados de este trabajo no permiten establecer si existe una variación en la composición y proporción de los compuestos químicos de la feromona sexual de *H. metabus*, que permita determinar la presencia de varias especies del género en las áreas de estudio.

Los espectros de masas de los picos cromatográficos exclusivos en los extractos de la zona S, no ofrecie-

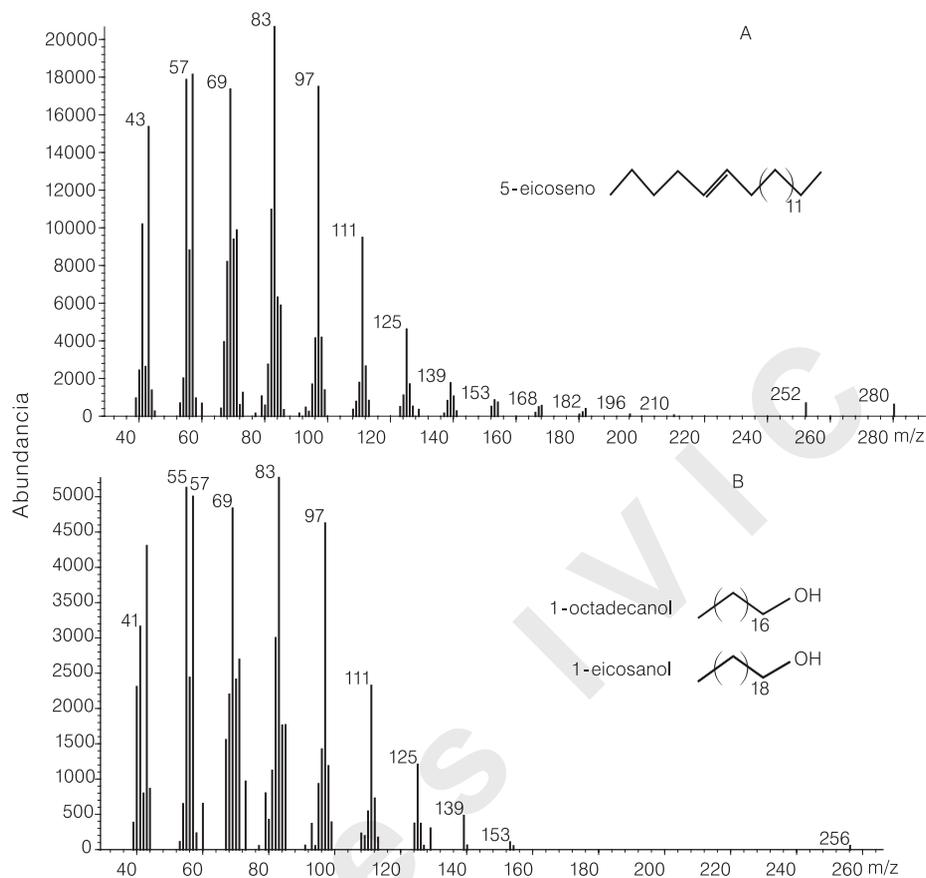


Figura 3. (A) Espectro de masas de la señal cromatográfica B1 ($tr = 30,853 - 30,918$ min). El espectro del compuesto B1 presenta mayor semejanza con 5-eicoseno (99 %), según la librería de espectros Wiley275. (B) Espectro de masas de la señal cromatográfica B2 ($tr = 30,993 - 31,047$ min). El espectro del compuesto B2 presenta mayor semejanza con 1-eicosanol y 1-octadecanol (95 %), según la librería Wiley275.

ron suficiente información para proponer estructuras de posibles compuestos. En los extractos de la zona D, la señal etiquetada como A, corresponde según la biblioteca de espectros Wiley275, al compuesto heneicosano (con 95 % de semejanza entre espectros). En cuanto a la señal B, se comprobó mediante el análisis de pureza de pico (Software MSD Productivity ChemStation) que corresponde a la coelución de dos compuestos, B1 y B2.

El espectro de masas del compuesto B1 (Figura 3A) coincidió con el del 5-eicoseno, con un 99 % de semejanza entre estos. Se observaron los iones con m/z característicos de compuestos que presentan dobles enlaces, fragmentos del tipo $C_nH_{2n}^+$; por eliminación de fragmentos de $C_mH_{2m}^+$ ocurrida por diversos mecanismos. Por ejemplo, este es el caso de los iones: $C_{18}H_{36}^+$ (m/z 252) por pérdida $C_2H_2^+$, $C_{15}H_{30}^+$ (m/z 210), $C_{14}H_{28}^+$ (m/z 196) y $C_{12}H_{24}^+$ (m/z 168).

Por otra parte, el espectro de masas del compuesto B2 (Figura 3B) es similar a los del 1-eicosanol y 1-o-

Tabla 3. Índices de retención de estándares comerciales o sintetizados de los posibles compuestos correspondientes a las señales exclusivas de hembras, obtenidos a partir del análisis por CG-EM de extractos de los últimos segmentos abdominales de hembras de *Hylesia metabus*.

Compuesto	Columna CG			
	HP-1	DB-210	DB-23	DB-5
heneicosano	2099	2102	2104	2103
1-eicosanol	2265	2491	2809	2291
1-octadecanol	2063	2288	2585	2090
5-eicoseno	1981	1993	2030	1989

tadecanol, con 95 % de semejanza entre estos, para ambos casos. En este espectro no se observó el ión m/z correspondiente al ión molecular, de ninguno de los dos compuestos propuestos. En caso, de ser el compuesto eicosanol, el ión m/z 256 correspondería a la pérdida de C_2H_2O . Sin embargo, no es posible distinguir solamente con el espectro, cual de los dos compuestos corresponde a B2. Por otra parte, en los análisis mediante la técnica de muestras sólidas de segmentos abdominales correspondiente a la zona M se obtuvo un compuesto exclusivo de hembra ($IR=2291\pm 1$) que coincide con el 1-eicosanol, etiquetado como una de las alternativas del compuesto B2 presente en los extractos de hembras recolectadas en la zona D (Tabla 2).

Posteriormente, a partir de los patrones sintéticos de los compuestos 1-octadecanol, 1-eicosanol y heneicosano disponibles comercialmente y 5-eicoseno sintetizado en el laboratorio, se determinaron los índices de retención de estos compuestos en cada uno de los sistemas cromatográficos en los cuales fueron analizadas las muestras de *H. metabus* (Tabla 3). Dado que los índices de retención del heneicosano y 5-eicoseno no coincidieron con ninguno de los IR determinados para señales cromatográficas exclusivas de hembras, y como se demuestra más adelante, tampoco tuvieron actividad electroantenográfica cuando antenas de machos de *H. metabus* fueron estimuladas con los mismos, por tal motivo fueron descartados como posibles constituyentes de la feromona sexual de *H. metabus*.

En cuanto a los otros compuestos, el índice de retención del 1-eicosanol en la columna DB-5 ($IR=2291$) coincide con la señal exclusiva de hembras, obtenida en el análisis de CG-FID y CG-EM utilizando la técnica de las muestras sólidas de la zona M, y con una de las señales observadas en los extractos de los últimos seg-

mentos abdominales de hembras de la zona D (septiembre-2005 y enero-2006) (Tabla 2). El índice de retención del 1-eicosanol en la columna DB-23 ($IR=2809$) concuerda con una de las señales exclusivas de los extractos de segmentos abdominales de hembras provenientes de las zonas D ($IR=2808\pm 1$) y S ($IR=2806\pm 1$) (Tabla 2). De manera similar en los análisis por CG-EM con columna HP-1, las muestras de las zonas D y S presentan una señal con índice similar al 1-eicosanol ($IR=2265$).

Además, se construyó una biblioteca de espectros con los patrones sintéticos de 1-eicosanol, 1-octadecanol y 5-eicoseno, y mediante comparación con el *software* AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) de los espectros de los compuestos naturales presentes en los extractos de hembras con los sintéticos, se identifica a la señal B, como 1-eicosanol. Por otro lado, considerando que en los análisis cromatográficos con la columna DB-210, el 1-octadecanol presentó un IR similar a las señales exclusivas de hembras, específicamente las correspondientes a la zonas D (enero-06; $IR=2289\pm 3$) y S (febrero-06; $IR=2293\pm 1$) (Tablas 2 y 3); proponemos al 1-eicosanol y 1-octadecanol como posibles constituyentes de la feromona sexual de *H. metabus*.

La actividad electroantenográfica, es una evidencia más para afirmar que la feromona sexual de *H. metabus* está constituida principalmente por la mezcla de 1-octadecanol y 1-eicosanol. En los individuos de la zona S recolectados en enero 2007, el 1-octadecanol (Kruskal-Wallis; $p < 0,0001$) y el 1-eicosanol (Kruskal-Wallis, $p = 0,0002$) generaron deflexiones de voltaje significativas en comparación con las producidas por el aire y el *n*-hexano; es decir, estos compuestos presentaron mayor actividad electrofisiológica ante las antenas de los machos (Figura 4).

En Lepidoptera, el 1-eicosanol sólo ha sido reportado anteriormente como componente de la feromona de *Lobesia botrana* (Tortricidae) (Witzgall *et al.* 2005), mezclado con el 1-octadecanol, siendo este último uno de los componentes de la feromona sexual de nueve especies de lepidópteros, distribuidos entre las familias Tortricidae, Noctuidae, Pyralidae, Sesiidae y Geometridae. En la subfamilia Hemileucinae, la cual agrupa al género *Hylesia*, los alcoholes identificados como componentes de feromonas han sido *E*-10, *Z*-12-hexadecadien-1-ol; *E*-10, *E*-12-hexadecadien-1-ol; *E*-11-hexadecanol y, sin insaturaciones, el único alcohol reportado es el 1-hexadecanol. Recientemente, McElfresh & Millar (2008) reportaron la feromona sexual más compleja descrita

BIBLIOGRAFÍA

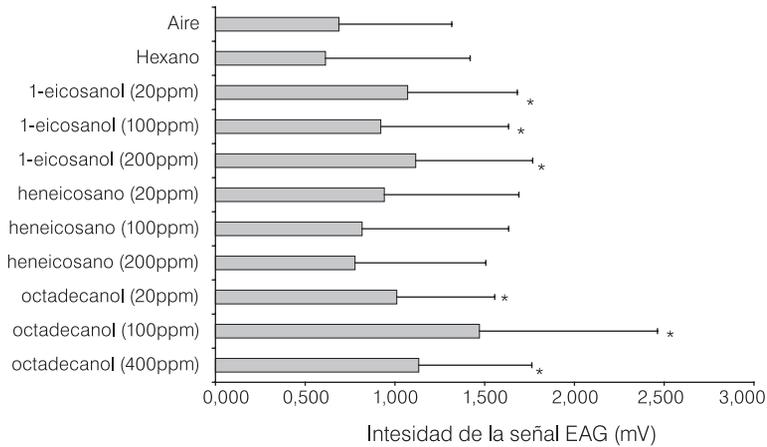


Figura 4. Promedio \pm error estándar de la intensidad de las señales electroantagráficas (EAG) de antenas de machos de *Hylesia metabus* (n = 30 antenas) recolectados en El Paujil, Edo. Sucre; al ser estimuladas con *n*-hexano y aire (control), 1-eicosanol y heneicosano a 20, 100 y 200 ppm, y 1-octadecanol a 20, 100 y 400 ppm. * = diferencias significativas respecto a los tratamientos control (Prueba Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

hasta el momento para la subfamilia Hemileucinae, con cinco compuestos en la mezcla, *E*-10, *Z*-12-hexadecadienil acetato; *E*-10, *E*-12-hexadecadienil acetato; *E*-10, *Z*-12-hexadecadien-1-ol y *E*-10, *Z*-12-hexadecadienal. En el caso de *H. metabus* solamente podemos proponer el 1-octadecanol y 1-eicosanol como posibles constituyentes de su feromona sexual, lo cual se constituye en el primer reporte de estos compuestos como componentes de la feromona sexual para satúrnidos.

Aún es necesario evaluar la atracción de estos compuestos en bioensayos de túnel de viento (olfatometría) y de campo mediante trampas cebadas con los compuestos propuestos, prueba final para establecer estos compuestos como feromona sexual de esta especie y así poder determinar sus proporciones en la mezcla. Esto no ha sido posible pues las fluctuaciones en las poblaciones de *H. metabus* no han permitido recolectar material biológico en los años posteriores a la recolecta de Morichal, en mayo de 2008.

Los estudios realizados con especímenes de *Hylesia metabus* de los estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro indican a los compuestos 1-octadecanol y 1-eicosanol como posibles constituyentes de la feromona sexual de esta especie. Por otra parte, estudios recientes de genética de poblaciones y análisis filogenético de los cromosomas e isoenzimas de larvas (ALP, GOT, EST) y del ADN mitocondrial (COI y 12S) de adultos, y los del presente trabajo confirman que *H. metabus* es una especie monofilética con bajo grado de polimorfismo genético (ver páginas 33-44).

Ahmadi A & GA McClellan (1985) Mosquito-mediated attraction of female mosquitoes to a host. *Physiological Entomology* 10:251-255.

Akino T (2006) Cuticular hydrocarbons of *Formica truncorum* (Hymenoptera: Formicidae) Description of new very long chained hydrocarbon components. *Applied Entomology and Zoology* 41:667-677.

Arn H, Städler E & S Rauscher (1975) The Electroantennographic Detector – a Selective and Sensitive Tool in the Gas Chromatographic Analysis of Insect pheromones. *Zeitschrift für Naturforschung* 30C:722-725.

Arocha-Piñango CL & M Layrisse (1969) Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. *The Lancet* 239:810-812

Attygalle A, Schwarz J, Vostrowsky O & H Bestmann (1986) Individual variation in the sex pheromone components of the false sodling moth, *Cryptophlebia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Zeitschrift für Naturforschung* 41C:1077-1081.

Attygalle A, Herrig M, Vostrowsky O & H Bestmann (1987) Technique for injecting intact glands for analysis of sex pheromones of Lepidoptera by capillary Gas Chromatography: Reinvestigation of Pheromone Complex of *Mamestra brassicae*. *Journal of Chemical Ecology* 13:1299-1311.

Bartelt RJ, Weisleder D, & RD Plattner (1990) Synthesis of nitidulid beetle pheromones: alkyl-branched tetraene hydrocarbons. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38: 2192-2196.

Bastidas R & Y Zavala (1995) *Principios de entomología agrícola*. Ediciones Sol de Barro. UNEFM. Venezuela. 398 pp.

Bates HM (1863) *The Naturalist on the River Amazon*. 2 vols. John Murray, London. ix + 351pp., vi + 423pp.

Belt T (1874) *The Naturalist in Nicaragua*. John Murray, London. xvi + 403 pp.

Benvenuti LA, Cardoso JL & RH Moraes (1998) Cutaneous leucocytoclastic vasculitis from contact with *Hylesia* moths (Lepidoptera: Saturniidae). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92:428-429.

Bestmann HJ, Attygalle AB, Schwarz J, Wolfgang G, Vostrowsky O & I Tomida (1989) Pheromones identification and synthesis of female sex pheromone of eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). *Tetrahedron Letters* 22:2911-2914.

Biery TL (1977) *Venomous Arthropod Handbook*. U.S. Government Printing Office, Washington. AFP-161-43. 40 p.

Birch MC (1974) Aphrodisiac pheromones in insects. En: *Pheromones* (ed. M. C. Birch), North Holland, Amsterdam. 115-134 pp.

Birch MC & KF Haines (1982) *Insect Pheromones*. Studies in Biology, No 147. Edward Arnold Ltd., London. 60 pp.

- Bjostad L (2000) Electrophysiological methods. En: *Methods in Chemical Ecology. Chemical Methods*. Jocelyn G. Millar & Kenneth F. Haynes (Eds.) 2.^a edición, USA, pp. 340-365.
- Borror D, Triplehorn J & C Johnson (1992) *An Introduction to the Study of Insects*. Sixth Edition College Publishing. USA. 885 pp.
- Brown W (1989) Localization, morphology and histology of the sex pheromone gland of the female *Asura conferta* (Walker) (Lepidoptera: Arctiidae). *Folia Morphologica* 37: 415-420.
- Butenandt A (1959) Geschlechtsspezifische Lockstoffe der Schmetterlinge. *Max-Planck Jahrbuch* 23-32.
- Cardet RT & W Bell (1995) *Chemical Ecology of Insects*. Chapman y Hall. 364 pp.
- Casalá A, Bianchi C, Sánchez Navarro JV, Bianchi O & R Balsa (1967) Granuloma de las manos por nidos de lepidópteros (*Hylesia nigricans*). *Archivos Argentinos de Dermatología*, 17:307-314.
- Clavijo S (1993) Fundamentos de manejo de plagas. UCV. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela. 210 pp.
- Cork A, Beevor PS, Gorgh AJE & DE Hall (1990) Gas chromatography linked to electroantennography: a versatile technique for identifying insect semiochemicals. En: *Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones*. A. R. McCaffery & I. D. Wilson (Eds.), Plenum Press, New York, pp. 271-274.
- Couppié P, Marty C, Sainte-Marie D & R Pradinaud (1998). Poisonous caterpillars in French Guyana. 5 cases. *Annales de Dermatologie et de Venereologie* 125:489-491.
- Dethier VG, Brow IB & GN Smith (1960) The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *Journal of Economic Entomology* 53:134-136.
- de Roodt AR, Salomón OD & TA Orduna (2000) Accidentes por lepidópteros con especial referencia a *Lonomia* sp. *Medicina* 60:964-972.
- Dinehart SM, Archer ME, Wolf JE Jr, McGavran M H, Reitz C & EB Smith (1985) Caripito itch: dermatitis from contact with *Hylesia* moths. *Journal of American Academy of Dermatology* 13:743-747.
- Dinehart SM, Jorizzo JL, Soter NA, Noppakun N, Voss WR, Hokanson JA & EB Smith (1987) Evidence for histamine in the urticating hairs of *Hylesia* moths. *Journal of Investigative Dermatology* 88:691-693.
- Ducombs G, Lamy M, Michel M, Pradinaud R, Jamet P, Vincendeau P, Maleville J & L Texier (1983) La papillonite de Guyane Française. Etude clinique et épidémiologique. *Annales de Dermatologie et de Venereologie* 110:809-816.
- El-Sayed AM (2005) The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. <<http://www.pherobase.com>, 15-06-2010.
- Fernández G, Morales E, Beutelspacher C, Villanueva A, Ruiz C & HC Stetler (1992) Epidemic dermatitis due to contact with a moth in Cozumel, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46:560-563.
- Fornés LV (1998) Aspectos de la biología y comportamiento sexual de *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae). Tesis de Grado. Universidad Simón Bolívar. División de Biología. Sartenejas, Venezuela. 121 pp.
- Fornés L & J Hernández (2000) Algunos aspectos de la biología de *Hylesia metabus* (Cramer, 1775) (Lepidoptera: Saturniidae). *Boletín de Entomología Venezolana* 15:127-145.
- Glasser CM, Cardoso JL, Bruno GC, Domingos M de F, Moraes RH & RM Ciaravolo (1993) Surtos epidémicos de dermatite causada por mariposas do gênero *Hylesia* (Lepidoptera: Hemileucinae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Saúde Pública* 27:217-220.
- Grosshans EM & R Pradinaud (1979) Dermatologie in Französisch-Guayana. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und Verwandte Gebiete* 30:443-445.
- Gullan PJ & PS Craston (1994) *The Insects. An Outline of Entomology*. Chapman & Hall, New York. 491 pp.
- Gupta BD (1978) Morphology and histology of the female sex pheromone gland of spotted bollworm, *Earias fabia* (Stoll) (Lepidoptera: Noctuidae-Erastrinae). *Folia Morphologica*, 27:215-219.
- <http://www.Conabio.gob.mx/remib/doctos/checklist/73-1.html>. *Citheronia lobesis* nueva plaga del guayabo *Psidium guajava*. 08-05-2008.
- <http://janzen.sas.upenn.edu/caterpillars/dblinks/cklistad.losso?herbsp=Hylesia%20adalina>. 28-07-2009.
- <http://www.funet.fi/pub/sci/bio/life/insecta/lepidoptera/ditrysia/bombycoidea/saturniidae/hemileucinae/hylesia/> Mavicane - Catálogo Multilingüe de Búsqueda. 05-09-2000.
- Henderson HE, Warren OP, Augustyn BV, Burger DF, Schneider A, Boshoff PR, Spies H & H Geertsema (1973) Isolation and structure of the sex-pheromone of the moth. *Nudaurelia cytherea cytherea*. *Journal of Insect Physiology* 19:1257-1264.
- Howse PE (1990) *Communications in Social Insects*. Published by The Central Association of bee-keepers, London 12 pp.
- Howse P, Stevens I & O Jones (1998) Pest Monitoring. En: *Insect Pheromones and Their Use in Pest Management*. Chapman & Hall, First Edition, UK, pp. 1-32.
- James DG, Bartelt RJ & RJ Faulder (1994) Attraction of *Carpophilus* spp. (Coleoptera: Nitidulidae) to synthetic aggregation pheromones and host-related coattractants in Australian stone fruit orchards: Beetle phenology and pheromone dose studies. *Journal of Chemical Ecology*, 20:2805-2819.
- James D, Cossé A, Wright L & J Pérez (2001) Pheromone trapping of *Synanthedon tipuliformis* (Lepidoptera: Sesiidae) in Washington red currants. *Environmental Entomology* 30:663-666.
- Johnson DT, Lewis BA & JW Snow (1991) Control of grape root borer (Lepidoptera: Sesiidae) by mating disruption with two synthetic sex pheromone compounds. *Environmental Entomology* 20:930-934.
- Jörg, ME (1969) Nódulo inflamatorio subcutáneo por espículas de *Hylesia fulviventris* (Lepidoptera). *Boletín Chileno de Parasitología* 24:146-150.

- Jungnickel H, da Costa A, Tentschert J, Patricio E, Imperatriz-Fonseca V, Drijfhout F & E Morgan (2004) Chemical basis for inter-colonial aggression in the stingless bee, *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Physiology* 50:761-766.
- Katsoyannos B, Kouloussis N & A Bassiliou (1992) Monitoring populations of the almond seed wasp, *Eurytoma amygdali*, with sex pheromone traps and other means, and optimal timing of chemical control. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 62:9-16.
- Knight AL & JE Turner (1999) Mating disruption of *Pandemis* spp. (Lep: Tortricidae). *Environmental Entomology* 28:81-87.
- Kochansky J, Tette J, Taschenberg E, Cardé R, Kaissling K E & WL Roelofs (1975) Sex pheromone of the *Antheraea polyphemus*. *Journal of Insect Physiology* 21:1977-1983.
- Kováts E (1958) Gas-chromatographische Charakterisierung Organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta* 41:1915-1932.
- Kurdna O (1986) Aspects of the conservation of butterflies in Europe. En: *Butterflies of Europe*. Kurdna, O. Editor. Wiesbaden: Aula-Verlag, pp 8-323.
- Lamy M & W Werno (1989) Le papillon du Bombyx «Cul brun» *Euproctis chryorrhoea* L. (Lépidoptères) responsable de papillonite en France: interprétation biologique. Comptes Rendus De l'Académie Des Sciences. Serie III, *Science de la Vie* 309:605-610.
- Law JH & FE Regnier (1971) Pheromones. *Annual Review of Biochemistry* 40:533-548.
- Lewis AT (1984) The elements and frontier in insect communication. En: *Insect Communication*. Edited by T. Lewis, Academic Press, London, pp 1-27.
- Löfstedt C (1990) Population variation and genetic control of pheromone communication systems in moths. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 54:199-218.
- López-Ávila A & DF Rincón (2006) Diseño de un olfatómetro de flujo de aire para medir respuestas olfativas de insectos de tamaño mediano y pequeño. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7:61-65.
- López C, Patricio E, Maile R & E Morgan (2002) Secretions of stingless bees: cephalic secretions of two Frieseomelitta species. *Journal of Insect Physiology* 48:53-458.
- McElfresh J & J Millar (1999a) Sex pheromone of the common sheep moth, *Hemileuca eglanterina*, from the San Gabriel Mountains of California. *Journal of Chemical Ecology*, 25:687-709.
- McElfresh J & J Millar (1999b) Sex pheromone of Nuttall's sheep moth, *Hemileuca nuttalli*, from the eastern Sierra Nevada Mountains of California. *Journal of Chemical Ecology* 25:711-726.
- McElfresh J & J Millar (1999c) Sex pheromone of saturniid moth, *Coloradia velda*. *Journal of Chemical Ecology* 25:1067-1078.
- McElfresh J, Chen X, Ross D J Millar (2001a) Sex pheromone blend of the Pandora moth *Coloradia* (Lepidoptera: Saturniidae), an outbreak pest in pine forests (Pinaceae). *Canadian Entomology* 132:1-13.
- McElfresh J, Millar AJ & D Rubinoff (2001b) (E4, Z9) Tetradecadienal, a sex pheromone for three North American moth species in the genus *Saturnia*. *Journal of Chemical Ecology* 25:711-726.
- McElfresh J, Hammond A & J Millar (2001c) Sex Pheromone Components of the Buck Moth *Hemileuca maia*. *Journal of Chemical Ecology* 27:1409-1422.
- McElfresh J S & J Millar (2008) Sex Pheromone of the Saturniid Moth, *Hemileuca burnsi*, from the Western Mojave Desert of California. *Journal of Chemical Ecology* 34:1115-1124.
- Morgan E (1990) Preparation of small-scale samples from insects for chromatography. *Analytica Chimica Acta* 236: 227-235
- Morgan ED (2004) *Biosynthesis in Insects*. RSC, Cambridge. 199 pp.
- Morgan E, Jungnickel H, Keegans S, Do Nascimento R, Billen J, Gobin B & F Ito (2003) Comparative survey of Abdominal Gland Secretions of the ant Subfamily Ponerinae. *Journal of Chemical Ecology* 29:95-114.
- Nordlund DA & WJ Lewis (1976) Terminology of chemical releasing stimuli in intra-specific and inter-specific interactions. *Journal of Chemical Ecology* 2:211-220.
- Norris KR (1990) General Biology. En: *The Insects of Australia*. Neumann, I. D. et al. Editors. New York: Cornell University Press 1:68-108.
- Osborn F (2002) Primer reporte de un microsporidio parasítico en larvas de *Hylesia metabus* Cramer, 1775 (Lepidoptera: Saturniidae) *Entomotropica* 17:185-188.
- Osborn F, Moltaban L & JC Gutiérrez (2001) Crecimiento y sobrevivencia de larvas de *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) alimentadas con cuatro diferentes plantas hospedadoras. *Saber* 31:14-22.
- Osborn F, Berlioz L, Vitelli-Flores J, Monsalve W, Dorta B & V Rodríguez Lemoine (2002) Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 80:7-12.
- Percy J & J Weatherston (1974) Gland structure pheromone production in insects. En: M. Bish. *Pheromones*. Elsevier, North Holland, Amsterdam. pp. 11-34.
- Pheronet (2004) Pherolist, Lepidoptera. <http://www.nysaes.cornell.edu/fst/faculty/acree/pheronet/>. 28-11-2010
- Pfeiffer DG & JC Killian (1999) Dogwood borer (Lepidoptera: Sesiidae) flight activity and an attempt to control damage in Gala apples using mating disruption. *Journal of Entomological Science* 34:210-218.
- Price PW (1997) *Insect Ecology*. New York: John Wiley & Sons. pp. 15-22.
- Rodríguez-Acosta A, Rubiano H, Reyes M & CT Fernández (1998) Dermatitis caused by *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Hemileucidae) in the Costal region of the State of Delta Amacuro, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 50:215-217.
- Roth LM & T Eisner (1962) Chemical defenses of arthropods. *Annual Review of Entomology* 7:107-136.
- Rothschild J, Reichstein T, von Euw J, Aplin R & RRM Herman (1970) Toxic lepidoptera. *Toxicon* 8:293-299.

- Salomón OD, Simón D, Rimoldi JC, Villaruel M, Pérez O, Pérez R & H Marchan (2005) Lepidopterismo por *Hylesia nigricans* (Mariposa negra). Investigación y acción preventiva en Buenos Aires. *Medicina* 65:241-246.
- Schneider D (1969) Insect olfaction: Deciphering system for chemical messages. *Science* 163:1031-1037.
- Shorey HH (1973) Behavioral responses to insect pheromones. *Annual Review of Entomology* 18:349-380.
- Scoble MJ (1992) *The Lepidoptera. Form, Function and Diversity*. New York: Oxford University Press. 404 pp.
- Skoog D A & J Leary (1994) *Análisis Instrumental*. Cuarta edición, Mc Graw Hill, 935 pp.
- Vilela, E & TM Della-Lucia (1987) *Feromonios de insetos (biología, química, e emprego no manejo do pragas)*. Imprensa Universitaria. Universidade Federal de Viçosa. 155 pp.
- Wirtz RA (1984) Allergic and toxic reactions to non-stinging arthropods. *Annual Review of Entomology* 29:47-69.
- Witzgall P, Tasin M, Buser HR, Wegner-Kiß G, Marco Mancebo VS, Ioriatti C, Bäckman, AC, Bengtsson M, Lehmann L & L Franck (2005) New Pheromone Components of the Grapevine Moth *Lobesia botrana*. *Journal of Chemical Ecology* 31:2923-2932.
- Worth RA (1994) Greatest Host Range. En: *University of Florida Book of Insect Records*. Gainesville: University of Florida. 49-51 pp.
- Zaias N, Ioannides G & D Taplin (1969) Dermatitis from contact with moths (genus *Hylesia*). *Journal of American Medical Association* 207:525-527.
- Zarbin P, Lorini L, Ambrogi B, Vidal D & E Lima (2007) Sex Pheromone of *Lonomia obliqua*: Daily Rhythm of Production, Identification, and Synthesis. *Journal of Chemical Ecology* 33:555-565.

Apéndices

Ediciones IVIC

Apéndice I. El sistema taxonómico de Jacob Hübner y la creación del género *Hylesia*

El sistema de clasificación de los lepidópteros que Hübner utiliza en el *Verzeichniss* es una versión madurada y estabilizada de otros que él mismo había ensayado anteriormente. Básicamente subdivide el orden Lepidoptera en seis categorías inferiores, cuyos nombres en latín (y alemán) son los siguientes: *Phalanx* (Horde), *Tribus* (Rotte),

Stirps (Stamm), *Familia* (Familie), *Coitus* (Verein) y *Genus* (Gattung). En términos modernos, estas categorías corresponderían cada una, respectivamente y en ese orden, a: Suborden/Superfamilia, Familia, Subfamilia, Tribu, Género y Especie. Así, clasifica al género *Hylesia* en el siguiente esquema resumido:

Phalanx: Phalaenae
Tribus: Verae
Stirps: Lachneides
Familia: Vulgares
Coitus: Hylesiae
Genera: *Hylesia Phadina* Cram. 395. F.
H. Boarmia. Obsoleta Cram. 304. C.
H. Orasia Cram. 395. D.
H. Canitia Cram. 304. D.

Y el género *Antarctia* (ahora considerado un sinónimo de *Hylesia*), como sigue:

Phalanx: Phalaenae
Tribus: Verae
Stirps: Trichodae
Familia: Hebescentes
Coitus: Antarcticae
Genera: *Antarctia Brunnea*.
A. Fusca Cram. 307. G.
A. Metabus Cram. 74. D.
A. Flava. Flavata Cram. 307. C.

Apéndice II. Algunos datos sobre Mayeul Grisol

Mayeul Grisol, nació en Francia (1855?), y murió en Venezuela (1937?). Debió haber llegado a Caracas en 1881, desempeñándose como coleccionista de animales y plantas, y como funcionario público (quizá educador, y más tarde empleado de algún ministerio). Fue oficial de la Academia de Bellas Artes de Francia, con afiliación a sociedades entomológicas de Francia y otros países de Europa y reconocimiento como representante del Museo Nacional de Historia Natural (París). Residió en Venezuela alrededor de cincuenta años, durante los cuales recopiló mucha información sobre la fauna venezolana. Recorrió y exploró parte del país recolectando muestras biológicas que debió acopiar en una vasta colección privada, además de vender una parte a coleccionistas y museos europeos y estadounidenses. Junto con otros dos franceses, Lèon Laglaize y F. Geay, aparece en los registros como comerciante de plumas de garzas venezolanas para satisfacer las demandas de la moda en la confección de ornamentos para sombreros en la Europa de finales del siglo XIX y principios del XX. Logró publicar algunas notas entomológicas en el *Boletín de la Sociedad Venezolana*

de Ciencias Naturales, pero la mayor parte de sus observaciones sobre flora y fauna de Venezuela se encuentra inédita. Siete tomos manuscritos por Mayeul Grisol sobre animales venezolanos (mamíferos, aves, reptiles, artrópodos), ilustrados con bellísimas láminas a color (acuarela y témpera), han sido examinados por uno de los autores (ALV) en la sección de libros raros de la Biblioteca Nacional de Venezuela. Entre ellos se encuentran dos tomos sobre mariposas y uno sobre polillas que están fechados en 1930, con profusión de ilustraciones y notas mecanografiadas. Lamentablemente, en el caso de los insectos, sus escritos están plagados de errores de identificación y representaciones de muchas especies que no pertenecen a la fauna venezolana, aunque las notas pretendan atribuirlos al territorio venezolano; lo que hace pensar que quizá en un momento de su vida Grisol pudo haber llegado a convertirse en un mitómano. Una carpeta con sus notas de campo sobre plantas venezolanas (lista de especies recolectadas en Venezuela) se localiza en la biblioteca del Instituto Smithsonian en Washington, D. C., Estados Unidos.

Apéndice III. Lista de las especies de *Hylesia* conocidas en Venezuela

La lista de especies que a continuación se presenta, fue recopilada de fuentes bibliográficas (Dognin, 1912, 1923; Dyar, 1913; Bouvier, 1923; Draudt, 1929; Schüssler, 1934; Fleming, 1945, 1952; Orfila, 1951; Lemaire, 1972, 1980, 1985, 1988, 1996; 2002; Lamy & Lemaire, 1983; d'Abreu, 1995, 1998). En ella se reconoce la presencia en

Venezuela de 38 especies de *Hylesia* Hübner (Lepidoptera: Saturniidae). Se han resaltado en negrita los nombres de las especies que se consideran endémicas del territorio venezolano. Así mismo, se menciona(n) la(s) región(es) donde su presencia está confirmada.

- Hylesia aeneides* (Druce, 1897): Táchira, Carabobo, Aragua.
Hylesia andensis Lemaire, 1988: Barinas.
Hylesia andrei Dognin, 1923: centro-norte del país: Yaracuy, Carabobo, Aragua, Miranda, Distrito Capital (endémico).
Hylesia annulata Schaus, 1911: Barinas, Miranda, Bolívar.
Hylesia ascodex Dyar, 1913: Amazonas.
Hylesia bouvereti Dognin, 1889: Andes (Táchira, Mérida) y cordillera de la Costa (Distrito Capital).
Hylesia canitia (Cramer, [1780]): Bolívar, Amazonas.
Hylesia cedomnibus Dyar, 1913: Bolívar, Delta Amacuro.
Hylesia composita Dognin 1912: Andes de la cordillera de Mérida (endémico).
Hylesia coex Dyar, 1913: centro-norte: Distrito Capital, Carabobo y Yaracuy.
Hylesia cottica Schaus, 1932: Miranda, Bolívar, Amazonas.
Hylesia dalina Schaus, 1911: Zulia (Perijá), Andes: Táchira, centro-norte del país: Yaracuy, Carabobo, Aragua, Miranda.
Hylesia ebalus (Cramer, [1775]): Andes de Trujillo, centro-norte (Aragua, Distrito Capital), Monagas, Bolívar, Amazonas.
Hylesia fallaciosus Lemaire, 2002: Gran Sabana, Bolívar (endémico).
Hylesia gigantex orbana Schaus, 1932: Amazonas.
Hylesia gyrex Dyar, 1913: Delta Amacuro.
Hylesia haxairei Lemaire, 1988: Bolívar.
Hylesia index Dyar, 1913: Yaracuy.
Hylesia indurata Dyar, 1910: centro-norte: Miranda, Bolívar, Amazonas.
Hylesia melanostigma Herrich-Schäffer, [1855]: Delta Amacuro, Bolívar, Amazonas.
Hylesia metabus (Cramer, [1775]): Yaracuy, Carabobo, Miranda, Distrito Capital, Sucre, Monagas, Delta Amacuro, Bolívar, Amazonas.
Hylesia moronensis Lemaire, 1973: Bolívar.
Hylesia mortifex Dyar, 1913: centro-norte: Distrito Capital, Aragua, Yaracuy (endémico).
Hylesia murex Dyar, 1913: Bolívar y Amazonas.
Hylesia nanus (Walker, 1855): Zulia (Perijá) y Bolívar (Gran Sabana).
Hylesia pallidex Dognin, 1923: Bolívar.
Hylesia pauper Dyar, 1913: Bolívar.
Hylesia praeda praeda Dognin, 1901: Táchira, Yaracuy, Carabobo.
Hylesia rex Dyar, 1913: Delta Amacuro, Bolívar y Amazonas.
Hylesia rosácea thaumex Draudt, 1929: Bolívar y Amazonas.
Hylesia roseata Dognin, 1914: Andes de Táchira.
Hylesia santaelenensis Lemaire, 1988: Bolívar (región El Dorado-Santa Elena de Guairén).
Hylesia subcottica Lemaire, 2002: Yaracuy.
Hylesia tapabex Dyar, 1913: centro-norte: Yaracuy, Aragua, Miranda, Distrito Capital y Apure.
Hylesia tapareba Dyar, 1913: Bolívar.
Hylesia teratex Draudt, 1929: Bolívar y Amazonas.
Hylesia umbreata Schaus, 1911: centro-norte del país: Yaracuy, Carabobo, Distrito Capital y Bolívar.
Hylesia venezuelensis Lemaire, 2002: cordillera de la Costa (Aragua, Carabobo) (endémico).

Apéndice IV. Aislamiento de células peritoneales e interacción con HM-PT60

Para el aislamiento de las células peritoneales se utilizaron ratones balb/c (25,00-30,00 g) los cuales se sacrificaron mediante decapitación, luego de una anestesia profunda con éter, para evitar la contaminación con eritrocitos (Freyria *et al.* 1991). Para el aislamiento de las células peritoneales, macrófagos y mastocitos residentes, se empleó el método descrito por Silverman *et al.* (2000), con algunas modificaciones. Se inocularon 4 ml de medio MC en la cavidad abdominal, para lavarla y estabilizar las mencionadas células, a continuación el abdomen se masajeó cinco veces, en un lapso de 2 minutos. Luego usando una jeringa con aguja calibre 18, se extrajo la mezcla de medio MC y líquido peritoneal, se centrifugó a 100 g durante 7 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en un volumen final de 1 ml usando medio MC. Las células resuspendidas se colocaron en 4 ml de una solución de albúmina sérica bovina al 38 % y se permitió equilibrar en hielo durante 30 minutos para luego centrifugar a 1400 g durante 30 min a 4 °C. Los mastocitos entran en la albúmina y las demás células permanecen en la interfase albúmina-medio MC. Los leucocitos de la interfase se lavaron tres veces con medio MC, el porcentaje de macrófago fue de 90 % y se resuspendieron a una concentración final de 5×10^5 células/ml en medio DMEN. Los mastocitos se separaron de la

albúmina mediante dilución 1:10 con medio MC y centrifugación a 100 g durante 7 minutos a 4 °C, finalmente se resuspendieron a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/ml en medio MC. El medio MC tiene la siguiente composición: NaCl 150,00 mM, KCl 3,70 mM, Na_2HPO_4 3,00 mM, glucosa 5,60 mM, CaCl_2 0,90 mM, 0,10 % BSA (Fracción V, Sigma), gelatina 0,10 % y heparina 2 U/ml

Con las suspensiones se prepararon monocapas de mastocitos y macrófagos en cubreobjetos: se colocó un volumen de 50 μl de la suspensión de células en un cubreobjeto de 22 x 22 mm y se mantuvieron en una cámara húmeda durante 10 minutos, las monocapas de macrófagos se lavaron y mantuvieron con medio DMEN y las de monocitos con medio MC; posteriormente se incubaron con HM-PT60 a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ disuelto en medio DMEN o MC durante 1 min, 5 min, 15 min y 1 h. Luego, se lavaron con el medio DMEN o MC y se fijaron durante 10 min en acetona fría a -20 °C, se secaron al aire y se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento por métodos inmunohistoquímicos (apéndice III). Otros grupos de monocapas, de macrófagos y mastocitos, se incubaron con HM-PT60 a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se fotografiaron usando microscopía de contraste de fases a 1, 5, 15 minutos y 1 hora para hacer un registro de los cambios morfológicos inducidos por la toxina.

Apéndice V. Estudios histopatológicos

La fijación de los especímenes utilizados para el estudio histopatológico de la piel y de los órganos internos fue mediante perfusión cardiaca, usando formaldehído al 4 % (p/v) en tampón fosfato a 66,7 mM (pH 7,4). Después de la perfusión se removieron las aurículas, el hígado, el corazón y el bazo, y la fijación se completó por inmersión en el mismo fijador durante 12 horas a temperatura ambiente; luego se lavaron con solución salina, NaCl al 0,9 % (p/v), y se preservaron en etanol al 70 % (v/v). Las aurículas se cortaron y se tomaron muestras de tejidos del sitio de infiltración además de sitios no infiltrados de las aurículas próximas a la inserción craneal de las mismas (zona distal). Las muestras de las aurículas y los órganos internos (corazón, hígado y bazo) se deshidrataron en una serie de etanol con concentraciones progresivas hasta etanol absoluto, 70 %, 80 %, 95 %, 100 %, con dos cambios de una hora para cada concentración. Luego se aclararon en xilol; tres cambios de 5 minutos cada uno y se infiltraron en Paraplast[®], cuatro cambios de una hora cada uno. Se obtuvieron secciones de 5 μm .

El estudio morfométrico, de los pulmones requiere un procesamiento especial; existen muchos métodos descritos en la literatura, sin embargo el método de Reinhardt *et al.* (2005) es uno de los más versátiles. A continuación se describirá brevemente este método de estudio histológico y de análisis de la morfología del tejido pulmonar.

Luego de la perfusión con formaldehído al 4 % (p/v) en tampón fosfato, se insufló el árbol bronquial de los pulmones mediante instilación usando el mismo fijador a 20 centímetros (la presión que se tiene al ubicar un volumen de fijador a 20 centímetros de altura con respeto a los pulmones). Se ligó la tráquea y se removieron los pulmones que se terminaron de fijar por inmersión a en el mismo fijador a base de formaldehído a 4 °C durante 16 h. Luego fueron transferidos a sacarosa al 15 % en PBS a 4 °C durante toda la noche; se lavaron con etanol al 50 % y se almacenaron en etanol al 70 %, antes de embeberlos en Paraplast[®] de la manera usual como en el caso de hígado, corazón y bazo. Se obtuvieron secciones de 4 μm de gro-

Reactivos

Los reactivos usados en todos los experimentos fueron del mayor grado de pureza disponible de Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, a menos que se especifique lo contrario.

sor y colorearon con hematoxilina (H) y eosina (E) (ver apéndice II.1) para demostrar la arquitectura del tejido y la infiltración de leucocitos.

Al usar esta metodología se deben tomar las siguientes precauciones:

- 1) La presión debe permanecer constante, otros autores usan una presión de 10 centímetros, sin embargo la presión de 20 centímetros como lo indican Reinhardt *et al.* (2005), proporciona una mejor morfología del tejido y menos distorsiones.
- 2) Los pulmones de un experimento deben ser procesados simultáneamente. De la misma manera deben cortarse, colorearse y fotografiarse en un mismo lote.

Para la morfometría se obtuvieron muestras al azar analizando al menos cinco secciones bien coloreadas de cada espécimen. La celularidad, el área ocupada por el parénquima y el espacio alveolar se calcularon mediante el proceso de manipulación de imágenes que se describe en el apéndice IV; se excluyeron en el análisis las superficies ocupadas por arterias, venas y bronquiolos, los cuales pueden introducir el artefacto de un mayor espacio alveolar, sin la correspondiente proporcionalidad al parénquima total (Magliozzi *et al.* 2003). Los resultados se expresan en porcentaje de área y se utilizaron para el análisis estadístico.

Se usaron métodos convencionales de coloración; en general la tinción doble con hematoxilina (colorante nuclear) y de la eosina (colorante citoplasmático) es el método estándar; además, se utilizaron los siguientes: PAS (ácido periódico-Schiff) para detectar carbohidratos (Cook 1990) y tricrómico de Gomori como tinción general del tejido conectivo (Bradbury & Gordon 1990) (ver apéndice II.2 y II.3, respectivamente).

II.1 Tinción con Hematoxilina y Eosina

Soluciones

Hematoxilina de Harris:

Hematoxilina (CI: 75290*)	1,00 g
Etanol absoluto	10,00 ml
Agua destilada	200,00 ml
Alumbre de amonio $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	20,00 g
Óxido mercuríco HgO	0,50 g

(* CI: número asignado por la Biological Stain Commission para certificar y reconocer a un compuesto químico como colorante biológico).

Se disuelve la hematoxilina en el etanol. El alumbre debe disolverse en agua con ayuda de calor. Se añade la solución alcohólica de hematoxilina al alumbre, esta mezcla se calienta hasta ebullición lo más rápidamente posible y se añaden 0,50 g de óxido mercuríco. La mezcla se torna

púrpura oscuro y se enfría rápidamente introduciendo el recipiente que la contiene en agua fría. Al enfriarse, está lista para usar. La solución da buena tinción y se conserva por largo tiempo. Antes de usar agregarse a cada 75,00 ml de la solución 5,00 ml de ácido acético glacial y 25,00 ml de glicerol. Filtre antes de usar.

Eosina

Eosina Y (CI: 45380, < 85 % en colorante)	1,00 g
Etanol 95	25,00 ml
Agua destilada	75,00 ml

Procedimiento de Tinción

La parafina se elimina colocando la lámina en xilol durante 5 minutos. Son aconsejables otros dos baños en xilol de 5 minutos cada uno, se lava con etanol al 95 % para eliminar el xilol (tres cambios de tres minutos cada uno). Se empieza a rehidratar en etanol, descendiendo desde 80 % hasta 70 %, haciendo actuar cada uno durante 3 minutos. Lavar en agua destilada. Se colorea en hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Se lava en agua destilada y se coloca en un baño ácido (solución acuosa de ácido clorhídrico al 1 % v/v) a fin de eliminar la hematoxilina de toda la célula excepto del núcleo (30 segundos). Lavar en agua destilada y colocar en hidróxido de amonio al 0,40 % v/v preparado en agua destilada, las secciones se tornan de color azul rápidamente. Luego se lava en agua destilada, 3 cambios de 2 minutos cada uno. Colorear con eosina por 3 minutos. Lavar en agua destilada y se deshidratar empleando una serie ascendente de etanol (80 %, 95 % y absoluto), dejando actuar cada uno durante 3 minutos. Se aclara en xilol durante 5 minutos (tres cambios). Los cortes han de quedar translúcidos. Se coloca una gota de resina sintética (Permount® Fisher) sobre el corte y se coloca un cubreobjetos sin que se formen burbujas. Con esta técnica los núcleos se colorean de azul, el citoplasma de rojo; músculo, colágeno y fibras elásticas en distintas intensidades de rojo a rosado.

II.2 Tinción PAS (ácido periódico-Schiff)

La técnica PAS (*Periodic Acid-Schiff*) es utilizada para la detección de como glucoproteínas y polisacáridos ácidos y neutros; se basa en la reacción del reactivo Schiff con grupos carbonilos, los cuales son característicos de aldehídos. El reactivo de Schiff es un compuesto denominado leucobase: un compuesto coloreado, fucsina básica generalmente, que se hace incoloro por el tratamiento con ácido sulfuroso y que al reaccionar con un grupo carbonilo se hace nuevamente coloreado. Cuando las secciones de tejido se tratan con ácido periódico, la oxidación causada por este compuesto genera grupos carbonilos vecinales, 1:2 vic-glicoles, en las moléculas de polisacáridos; éstos son puestos en evidencia por el reactivo de Schiff.

Soluciones

Ácido peryódico

Cristales de ácido peryódico ······ 0,50 g
Agua destilada csp ······ 100,00 ml

Ácido clorhídrico 1 N

Ácido clorhídrico (d = 1,19 ······ 83,50 ml
Agua destilada csp ······ 1000,00 ml

Reactivo de Schiff

Reactivo de Schiff (Variante de Tomasi) (Pearse 1972): Se disuelve 1,00 g de fucsina básica (CI: 42500) en 200 ml de agua destilada hirviendo, se agita por 5 minutos y luego se enfría hasta exactamente 50 °C. Se filtra y se añaden al filtrado 20 ml de ácido clorhídrico a 1N. Enfríar a 25 °C y se agregan 1,00 g de metabisulfito de sodio (o de potasio) (Na₂S₂O₅). Esta solución se deja en la oscuridad de 14 a 24 h. Luego se adicionan 2 g de carbón activado, se agita por 1 minuto y se filtra. El filtrado se guarda en la oscuridad entre 0-4 °C. Antes del uso se debe permitir que el reactivo alcance la temperatura ambiente.

Procedimiento de Tinción

Desparafinar y rehidratar las secciones como en la técnica de hematoxilina y eosina. Como se utilizan secciones fijadas en formaldehído, este compuesto introduce grupos carbonilos durante las reacciones de fijación, por lo tanto se deben utilizar técnicas para bloquear estos grupos adicionales; se usan secciones de control las cuales son tratadas a 22 °C por 1 hora en de piridina al 15 % (v/v) disuelta en anhídrido acético para bloquear los grupos carbonilos. Lavar en agua destilada: 3 cambios de 5 min cada uno. Colocar las secciones normales y de control en ácido peryódico al 1,00 % p/v por 10 minutos. Lavar en agua destilada: 3 cambios de 5 minutos cada uno. Sumergir las secciones en el reactivo de Schiff por 10 minutos. Lavar en agua de chorro durante 10 minutos, las secciones toman un color rosado, posteriormente se lava en agua destilada por 5 minutos. Se colorea las secciones en hematoxilina de Harris de 10 segundos a 2 minutos. Lavar en agua de chorro por pocos minutos hasta que los núcleos tengan un color azul. Enjuagar en agua destilada por 2 minutos. Deshidratan en varios cambios de etanol al 95 % y varios cambios de etanol absoluto, clarificar en tres cambios de xilol y monte las secciones en una resina sintética (Permount®, Fisher).

Las sustancias conteniendo hexosas como el glucógeno, polisacáridos, retículo y membrana basal se tiñen en diferentes tonalidades de púrpura. El glucógeno se colorea de un color púrpura muy oscuro y los núcleos de azul.

II.3 Tricrómico de Gomori

Representa una simplificación de las técnicas de coloración para el tejido conectivo y una contribución importante al empleo de los ácidos de arilmetano, generalmente empleados en esta técnica y los colorantes de fibras colágenas (azul de anilina, azul de metilo, verde luz, entre otros).

Soluciones

Líquido de Bouin

Solución saturada de ácido pícrico ······ 75,00 ml
Formaldehído al 40 ······ 20,00 ml
Ácido acético ······ 5,00 ml

Se mezclan volúmenes iguales de las soluciones I y II cada vez que se vaya a usar. La hematoxilina de hierro es satisfactoria mientras el color sea negro o negro violáceo, es insatisfactoria cuando es de color marrón. Aunque la hematoxilina de férrica de Weigert es muy utilizada, recomendamos el uso de la hematoxilina férrica de Groat (1949) la cual puede ser preparada rápidamente, pues no necesita una oxidación tan prolongada como la de Weigert. Para preparar la hematoxilina de Groat se disuelve 1g de alumbre de hierro (III) en 50,00 ml de agua destilada, se agregan 0,80 ml de ácido sulfúrico concentrado, luego 50,00 ml de etanol al 95 % y se disuelve en esta mezcla 0,50 g de hematoxilina, en este orden. No es necesario filtrarla. El colorante mantiene todas sus cualidades por tres meses.

Colorante tricrómico

Cromotrope 2R (CI: 16570 ······ 0,60 g
Verde rápido (*Fast green* FCF, CI: 42053) ······ 0,30 g
Ácido acético glacial ······ 1,00 ml
Ácido fosfotúngstico ······ 0,80 g
Agua destilada csp ······ 100,00 ml

Procedimiento:

Se desparafina y rehidratan las secciones como en la técnica de hematoxilina y eosina. Colocar en la solución de Bouin por 1 hora a 56 °C en una estufa. Lavar bien en agua destilada. Colorear los núcleos con hematoxilina de Groat por 2 minutos. Lavar en agua de chorro por 3 minutos y luego enjuagar en agua destilada por 1 minuto. Colocar las secciones en el colorante tricrómico durante 15 minutos. Lavar en ácido acético al 0,50 % (v/v) por 2 minutos, si las secciones están demasiado oscuras diferencie en ácido fosfotúngstico al 0,70 % (p/v) en ácido acético al 1 % (v/v), al menos por 1 min y se observa en el microscopio hasta que alcance la tinción apropiada. Luego se enjuaga en agua destilada, deshidrata en etanol, aclara en xilol de la manera descritas para la técnica PAS y, finalmente, se montan en Permount® (Fisher). Las fibras musculares se tiñen de rojo, el colágeno de verde y los núcleos de azul a negro.

Apéndice VI. Estudios inmunohistoquímicos

III.1 Obtención de los anticuerpos

III.11 Preparación de los antisueros

Existen numerosos esquemas para la obtención de anticuerpos en animales de experimentación. La calidad del antisuero obtenido dependerá de la antigenicidad del preparado y del grado de la respuesta inmunológica que se obtenga en el animal. Para la obtención del antisuero contra las toxinas de *H. metabus* se utilizó la fracción HM-PT60, preparada de acuerdo a Lundberg *et al.* (2007) (ver páginas 69-106). El antisuero se preparó mediante el método clásico de emulsificación con adyuvantes de Freund adaptado a las toxinas de artrópodos, como lo indican Ozkan *et al.* (2006) con algunas modificaciones:

III.111 Materiales:

Antígeno purificado, adyuvante completo e incompleto de Freund, jeringas Luer-lock y conejos (*Oryctolagus cuniculus* L.) como animales de experimentación.

III.112 Emulsificación

La fracción HM-PT60 se pasó por un filtro de 0,20 µm para esterilizarlo al momento de su preparación.

1. Se colocó 1 volumen de antígeno en una jeringa Luer-lock de 1 ml, unida mediante una aguja de conexión a otra jeringa de 1 ml, donde se había colocado un volumen igual de adyuvante completo. La concentración de HM-PT60 fue de 20 µg/ml (Lundberg *et al.* 2007), la cual es una dosis subletal apropiada para la experimentación con conejos y cobayos, dosis mayores causan la muerte de los animales, antes de la segunda o tercera aplicación del antígeno con adyuvantes.
2. Se mezclaron los dos materiales (HM-PT60 y adyuvante) pasando el antígeno hacia la jeringa con el adyuvante y luego revirtiendo el orden. Se realizó esto repetidamente hasta que la mezcla se emulsificó completamente, la emulsión se consideró lista cuando tomó una apariencia lechosa.
3. Para verificar la adecuada emulsificación de la mezcla se colocó una gota de la misma sobre la superficie de un baño de agua, la gota se mantuvo intacta y no se dispersó, indicando que la emulsión estaba lista para la inoculación.

III.113 Inoculación de los animales y extracción de suero

Se utilizaron conejos blancos machos con un peso de 3,00-3,50 kg, los cuales se mantuvieron en jaulas individua-

les con acceso al agua y alimentos ad libitum de acuerdo a la reglamentación de la Comisión de Bioética de la Institución.

1. Se inocularon aproximadamente 500 µl del antígeno emulsificado (primera dosis) en la parte central del dorso de las patas traseras de los conejos, utilizando jeringas con agujas calibre 22. Se dejó transcurrir una semana antes de la siguiente dosis.
2. En la segunda semana se aplicó una segunda dosis; antígeno emulsificado se preparó usando el adyuvante incompleto y se inocularon 500 µl, intramuscularmente en los muslos.
3. Para la tercera y cuarta dosis (a tres y cuatro semanas de la primera inoculación) se inocularon 500 µl por vía intradérmica en la espalda (utilizado en la preparación del antígeno, adyuvante incompleto).
4. A la quinta semana después de la primera inoculación, se tomó una muestra de sangre de la vena marginal de la oreja y se probó la actividad del suero contra el antígeno.
5. Los animales se anestesiaron usando tiopental (Pentothal® Abbot) (30 mg/kg) y se procedió a extraer la sangre por punción cardíaca; y se aplicó un exceso del anestésico para sacrificar el animal. Para evitar la coagulación temprana sangre se recolectó en jeringas conteniendo 0,10 ml de citrato sódico al 3,20 % (p/v), por cada 100 ml.
6. La sangre, se recalcifica agregando 0,10 ml de cloruro cálcico al 3,20 % por cada 100 ml de sangre, se mezcla para iniciar la coagulación, se mantiene en reposo por 30 minutos, se centrifuga a 2000 g por 10 min para obtener el suero y se guarda a -20 °C sin usar conservantes hasta la purificación de los anticuerpos (inmunoglobulinas G).

III.12 Purificación de inmunoglobulinas G (IgG) utilizando intercambiadores de iones e inmunoblot

La separación y purificación de las IgG se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico, cuyo principio consiste en fijar todas las proteínas del suero, menos una fracción de IgG, sobre la DEAE en ciertas condiciones de pH y molaridad y eluir en seguida las IgG absorbidas aumentando la fuerza iónica del tampón.

III.121 Materiales

Para purificar las IgG se utilizó el intercambiador de aniones DEAE-celulosa: dietil-amino-etil celulosa (DE52 Whatman); columnas de cromatografía (2 x 30 cm); soluciones reguladoras de fosfato de potasio pH 8,0 a las concen-

traiones de 17,50 mM, 40 mM, 100 mM, 200 mM y 500 mM; PBS (NaCl 0,15 M en solución reguladora de fosfato a 10 mM a pH 7,4) y solución saturada de sulfato de amonio.

II.122 Procedimiento utilizado

1. Se precipitaron 20 ml de suero con sulfato de amonio a 40 % de saturación.
El sulfato de amonio en solución saturada se prepara de la siguiente manera. pesar 750 g de sulfato de amonio en un matraz de 2 litros y añadir 1 litro de agua destilada, disolver calentando, pasar a una botella, dejar enfriar y conservar a temperatura ambiente. Neutralizar si es necesario con amoníaco o con ácido sulfúrico 2 N.
2. Se resuspendió el precipitado en 5 ml de solución reguladora 17,50 mM, y se dializó contra 200 ml de esa solución toda la noche, cambiándola una vez.
3. Se depositó la preparación sobre la columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada en la solución reguladora a 17,50 mM para dejar filtrar las proteínas con esa misma solución reguladora hasta que la densidad óptica del eluido había bajado a 0,050 (consumo de 60 ml por hora).
4. Se realizaron filtraciones para cada solución reguladora de fosfato, a 40 mM, 100 mM, 200 mM y 500 mM, hasta la obtención de una densidad óptica de 0,050 para cada solución.
5. En seguida las fracciones obtenidas por cada tampón se dializaron contra PBS, se concentraron y se comprobó la actividad del anticuerpo deseado.

La afinidad de los anticuerpos se probó mediante *immunoblot* de acuerdo a Herber *et al.* (2004) con algunas modificaciones. La fracción HM-PT60 se analizó y se separó en sus componentes mediante SDS-PAGE seguido por *Western blot*. Las muestras de la fracción HM-PT60 se denaturaron en tampón de Laemmli hirviéndola por 5 minutos. Se cargaron 10 µg de proteína en pozos de un gel de poliacrilamida al 10 %. Se corrieron patrones de peso molecular para la identificación de las bandas (*Bio-Rad Precision-Plus Protein All Blue*).

Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5 % en solución salina tamponizada con borato pH 8,50 y Tween-20 al 0,05 % (STB) por 1 hora en una plataforma con agitación a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario, preparado con leche descremada al 2,50 % en STB a una concentración de 5 µg/ml, posteriormente se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (contra conejo hecho en cabra, *Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, CA) a una concentración de 6 µg IgG/ml, preparado con leche descremada al 2,50 % en STB. Las membranas se lavaron tres veces con STB y la reacción se visualizó mediante la reacción coloreada usando la oxidación

del tetracloruro de 3, 3'-diamino-bencidina por oxígeno liberado de la degradación del peróxido de hidrógeno. En la figura 34 se muestra el resultado de esta prueba, donde se observa el enlazamiento específico de los anticuerpos al veneno completo así como a la fracción HM-PT60 precipitada con cloruro de amonio al 60 %.

III.2 Métodos inmunohistoquímicos para la localización de la toxina

III.2.1 Localización de la toxina en setas libre e insertadas en la piel células peritoneales tratadas con con HM-PT60

En el caso de las láminas con setas, macrófagos peritoneales tratados con HM-PT60 y secciones de piel de la espalda de ratones tratados con setas, la fijación se hizo con acetona, la cual conserva mejor la antigenicidad, por lo tanto, sólo se rehidrataron con PBS por 5 minutos luego de fijadas y secadas al aire.

El enlazamiento inespecífico se bloqueó usando leche descremada al 5,00 % (p/v) y Triton X-100 al 0,20 % (v/v) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente, antes de la incubación con el anticuerpo primario. Las láminas, con setas, macrófagos o secciones de piel, se incubaron con el anticuerpo primario (contra *Hylesia*) a una dilución de 1:1000, preparado en el mismo medio de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las láminas se lavaron extensamente con PBS. Se realizó una incubación con el anticuerpo secundario, contra conejo, acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Abcam, Nro. de catalogo ab6825-1) preparado en PBS a una dilución de 1:1000. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad. Las láminas se lavaron con PBS: cinco lavados, de un minuto cada uno. Para las secciones de tejidos de la aurícula y de piel con espículas, los núcleos se colorearon con DAPI (4, 6'-diamino-2-fenil-indol) a una concentración de 1 µg/ml durante 10 min, luego fueron lavados con PBS durante 1 min y finalmente, se montaron en glicerol al 50 % en PBS. Para las setas, se usó una coloración de contraste con azul de Evans a 1 µg/ml en PBS durante 1 min y se montaron en glicerol al 50 % en PBS.

Las secciones del tejido de las aurículas fueron desparafinadas en xilol y luego rehidratadas a través de una serie de concentraciones decrecientes de etanol desde etanol absoluto hasta PBS (NaCl 0,15 M en solución reguladora de fosfato al 10,00 mM, pH 7,4). Luego, las láminas se sumergieron en amoníaco al 0,25 % (v/v) disuelto en etanol al 70 % (v/v) durante 1 hora con el fin de disminuir la fluorescencia inducida por el formaldehído y la autofluorescencia propia de los tejidos. Las muestras se rehidrataron nuevamente pasándolas a etanol al 50 % por 10 minutos y, posteriormente, a PBS (Baschong *et al.* 2001). La recuperación antigénica se realizó hirviendo las secciones en tampón citrato a 10 mM pH 6,0 durante 10 min (Farioli-Vecchioli *et al.* 2001), las láminas se lavaron con PBS: cinco lavados, de 1 minuto cada uno. El tratamiento con anticuerpos se realizó como en el caso de las secciones de piel así como el

de tinción de los núcleos con DAPI y montaje final en glicerol al 50 % en PBS. Las preparaciones de control para cada caso recibieron el mismo tratamiento, salvo que se incubaron sólo con el anticuerpo secundario.

Todas las preparaciones procesadas por métodos histológicos convencionales o de inmunohistoquímica se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E600 (Nippon Kogaku KK, Tokyo, Japan) y se fotografiaron digitalmente con una cámara digital Nikon Coolpix 8700. Las imágenes de 3264 x 2448 píxeles se guardaron como archivos bitmap TIFF a color de 24 bits. Las preparaciones hechas con tinciones convencionales fueron observadas usando las modalidades de microscopía de campo claro, las de inmunohistoquímica las de contraste de fases y epifluorescencia con los objetivos de 40X y 100X. Para la epifluorescencia, la iluminación se realizó usando una lámpara de mercurio de 100 W y los cubos UV-2A (330-380 nm), B-2A (450-490 nm) y G-2A (510-560 nm) para detectar los fluoróforos DAPI, FITC y azul de Evans respectivamente. La preparación de imágenes en dos canales se realizó usando el programa ImageJ (versión 1.41o), usando la función *merger* para obtener imágenes compuestas de dos o tres imágenes correspondientes a un fluoróforo cada una, DAPI, FITC o azul de Evans.

La Figura 34, representan un esquema gráfico del procesamiento de una muestra de tejido por la técnica de embebimiento en parafina y coloración por H y E, tomando como ejemplo un aurícula de un cobayo y análisis de las secciones para celularidad, lo cual se explica con mas detalle en las siguientes secciones.

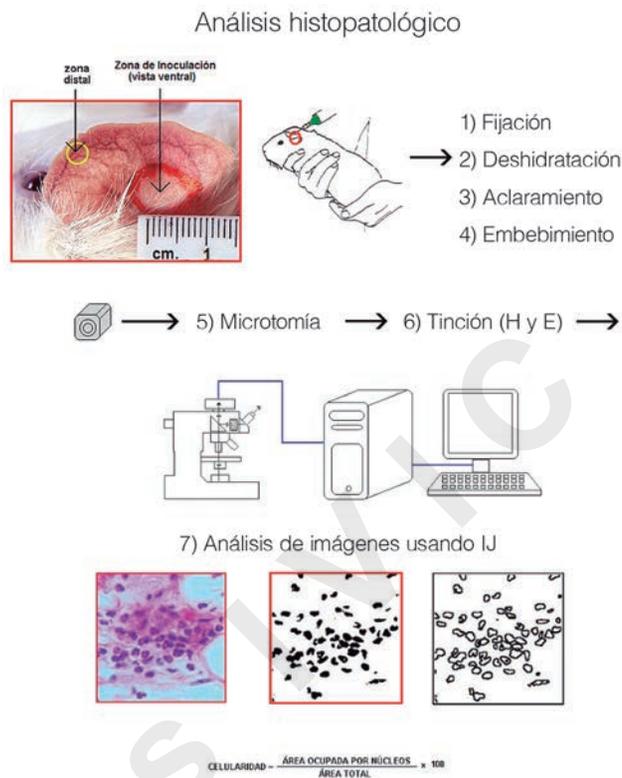


Figura 34. Representación gráfica del análisis histológico y de las imágenes de secciones de tejidos coloreados con métodos convencionales.

Apéndice VI. Análisis de imágenes

Lundberg *et al.* (2007) utilizaron el análisis de imágenes para cuantificar la respuesta inmune en un modelo de lepidopterismo con cobayos. Esta es una técnica relativamente sencilla pero poderosa en cuanto a la información que se puede extraer de una imagen. En este trabajo también se usó el análisis de imágenes para cuantificar el efecto de la toxina en los pulmones y hacer mediciones morfométricas de las setas. Por lo antes expuesto, se considera que es importante tener una descripción de esta valiosa herramienta de trabajo de gran utilidad para obtener información acerca de un proceso fisiológico.

La amplia disponibilidad de computadoras personales de bajo costo ha proclamado una revolución en las actividades de procesamiento digital de imágenes entre los científicos y la población de consumidores en general. Junto a la digitalización de imágenes analógicas (principalmente fotografías) mediante escáneres de bajo costo y la adquisición de imágenes con sensores electrónicos (primariamente a través de un dispositivo carga acoplado o CCD), los paquetes de programas amistosos para la edición de imágenes han ocasionado un dramático incremento en la capacidad para aumentar los detalles, extraer información y modificar fácilmente las propiedades de una imagen digital.

Por su parte, la microscopía óptica es un campo de rápido desarrollo, que se hace altamente dependiente de las técnicas de procesamiento digital de imágenes, tanto para propósitos de mejoramiento o de balance, así como para propósitos de rehabilitación y analíticos. Muchos de los progresos recientes en la microscopía óptica de luz transmitida de alta resolución y de fluorescencia reflejada de bajo nivel de luz en células vivas, descansan mayormente en el procesamiento digital de la imagen.

El objetivo de la captación de imágenes digitales es convertir una imagen en un arreglo de puntos discretos, los cuales contienen información específica acerca de la brillantez y pueden ser descritos por un valor de dato digital específico en una ubicación precisa; se mide la intensidad en puntos sucesivos en la imagen y forma un arreglo bidimensional con pequeños bloques rectangulares de información sobre intensidad y los datos resultantes son cuantificados para asignar un valor de brillantez específico a cada punto, que va de negro, pasando por todos los valores intermedios de grises, hasta blanco. El resultado es una representación numérica de la intensidad, la cual es comúnmente denominada elemento de imagen o píxel, para cada punto muestreado en el arreglo.

Las imágenes capturadas pueden ser visualizadas a color, puesto que los sensores vienen equipados con filtros de absorción en miniatura para rojo, verde y azul. Las imágenes a color contienen tres canales individuales: rojo, verde y azul y es conocido comúnmente como el sistema RGB (*Red, Green, Blue*), cada componente de color es procesado a una resolución equivalente a la profundidad de 8 bits, los cuales son combinados para producir píxeles de 24 bits (3 colores x 8 bits cada uno) (referido como color verdadero), aunque algunas aplicaciones pueden requerir un mayor o menor grado de resolución de color. Cuando las imágenes son cuantificadas a 8 bits (256 niveles de grises) cada píxel tiene un valor de brillantez entre 0 (negro) y 255 (blanco), para rendir un total de 256 posibles valores de salida. Un mayor número de niveles de grises representaría un mayor rango dinámico. Por ejemplo, un digitalizador de 12 bits tiene un rango dinámico de 4.096 niveles de grises.

En una imagen a 8 bits con un rango de niveles de grises 0-256, el brillo es un factor importante para obtener una información. En el caso de fotos fluorescentes la intensidad de la fluorescencia se relaciona fundamentalmente con el brillo. Lo importante de esto es que a mayor brillo mayor cantidad de fluoróforo y si la foto corresponde a la localización de un antígeno, sin amplificación de la señal fluorescente, se puede cuantificar esta señal y se puede decir en que zona de la célula hay más del antígeno usando, escalas semicuantitativas.

Para la determinación de la celularidad, el área de superficie de parénquima pulmonar y espacio alveolar, se realizaron mediciones de tipo morfométrico, las cuales se basan en un concepto fundamental en estereología: conociendo el área de superficie de un elemento en una sección se puede conocer el volumen de dicho componente en una serie de secciones de un mismo grosor.

Para hacer las determinaciones morfométricas y mediciones en imágenes digitales se usó el programa de libre acceso ImageJ, versión 1.41o, (National Institute of Health, Bethesda, MD), como se ha descrito previamente (Johansson *et al.* 2001; Gao *et al.* 2002; Lundberg *et al.* 2007). ImageJ

Análisis de imágenes usando ImageJ

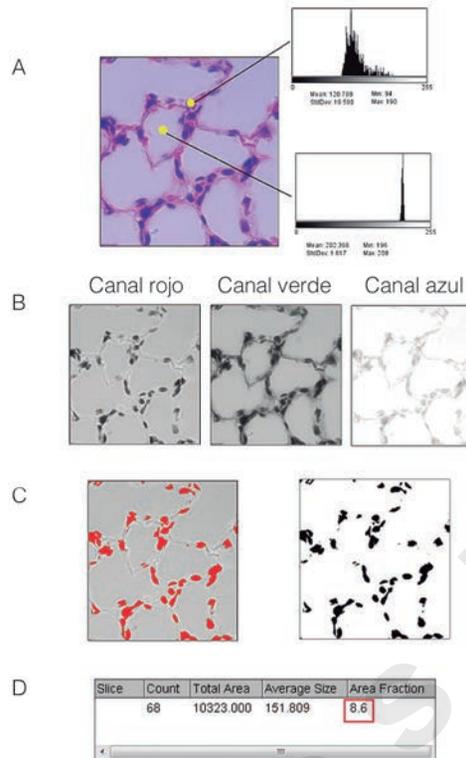


Figura 35. Técnica de análisis de imágenes. A) Se indica la diferencia por rango de niveles de grises que se logra en las imágenes de secciones de tejido, coloreados con la técnica de hematoxilina y eosina. B) Separación por filtros de colores de las distintas zonas en la imagen que corresponden a núcleos o parénquima. C) Se indica la selección de imágenes correspondientes a núcleos usando la exclusión por umbrales de niveles de grises, indicado en rojo. Se muestra las zonas seleccionadas correspondientes a núcleos, en negro. D) Ventana de resultados, usando ImageJ en la que se señalan las variables de interés, en este caso la fracción de área, recuadro rojo, que ocupan los núcleos.

es un *software* en Java de dominio público, el cual es de amplio uso entre la comunidad científica y presenta una gran versatilidad pues contiene subprogramas para realizar mediciones morfométricas y de análisis de imágenes y es independiente del sistema operativo (Abramoff *et al.* 2004; Collins 2007; Swedlow & Kevin 2009).

El estudio de un elemento en una imagen digital descansa en una coloración diferencial de éste con respecto a otros componentes y el fondo. En el caso del pulmón, la tinción con hematoxilina y eosina resulta en una coloración de azul para núcleos, y tonalidades de rojo para los componentes del parénquima. Las imágenes se optimizaron para distinguir los núcleos del fondo y colocar el umbral de rango de grises para abarcar exclusivamente los núcleos. En este paso se puede usar una opción bastante rápida, para separar imágenes con rangos diferentes de niveles de grises que se conoce como separar en colores, filtrar por colores, que separa la imagen en los tres colores en que está compuesta y resalta el color complementario en una imagen en niveles de grises. De esta forma obtienen tres imágenes con distintos componentes, resaltando y facilitando la selección de rangos y umbrales de niveles de grises (Figura 35). Se usa la opción umbral (*Threshold*)

la cual permite seleccionar un rango de niveles de grises en la imagen y la resalta. Para ello, se usan botones deslizantes en la ventana, pero si la imagen está bien contrastada y la opción de filtrado en RGB separa los componentes nítidamente, entonces se puede activar la opción umbral, la cual se selecciona automáticamente. Luego de resaltar los elementos de la imagen que nos interesan se marca la opción analizar en la cual, se han indicado las variables que interesan medir y se activa. Al final, tenemos un cuadro de resultados que indica la fracción de área, en porcentaje, que ocupan los núcleos o grupos de núcleos en esa zona del tejido (Figura 35), el cual se toma como un indicador del número de células nucleadas; ese valor se denomina la celularidad y permite cuantificar la infiltración de leucocitos en tejidos expuestos a antígenos. Este mismo principio y procedimiento de la separación de elementos de interés usando umbrales para definir rangos de niveles de grises, se realizó para el parénquima y el espacio alveolar.

Finalmente hay que acotar que el poder del procesamiento digital para extraer información de imágenes de poco contraste y con mucho ruido, y el mejoramiento de la apariencia de éstas, ha llevado a confiar los programas de procesamiento, en lugar de ajustar y usar de manera óptima el microcopio o el sensor electrónico de las cámaras. Invariablemente, una imagen óptica de alta calidad, libre de aberraciones, destellos, ralladuras y artefactos rinde una imagen digital superior. El ajuste cuidadoso y calibración apropiada del sensor electrónico produce a una imagen digital de mayor calidad que permite utilizar el mayor rango dinámico del sistema de procesamiento digital. Pensando aún que muchos de los algoritmos de procesamiento de imágenes digitales son extremadamente poderosos, el usuario

promedio frecuentemente aplica operaciones sin conocer los principios detrás de éstas. Las imágenes que resultan de las manipulaciones descuidadas a menudo son dañadas severamente o comprometidas con respecto a aquellas que pueden producirse si el poder y la versatilidad de los programas de procesamiento digital.

A continuación se dan algunas referencias que pueden guiar al lector en la preparación, análisis de imágenes y algunas consideraciones acerca del tratamiento de las imágenes digitales: Bard *et al.* (2003), Brown (2007), Chen & Farese (2002), Gao *et al.* (2002), Johansson *et al.* (2001), McNamara (2005), Manoonkitiwongsa *et al.* (2001), Regitnig *et al.* (2003), Rossner (2002), Rossner & Yamada (2004) Santinelli *et al.* (2002) y finalmente Vermeer & Bastiaens (2008).

Autores

Arrivillaga, Jazzmin

jarrivillaga@usb.ve

Licenciada en Biología. Universidad Central de Venezuela (UCV), Venezuela. M.Sc. Entomología Médica, Ph. D. Entomología (UCV), Venezuela. Profesor Asociado, Universidad Simón Bolívar (USB). Dirección: USB, Departamento de Estudios Ambientales, Laboratorio de Genética de Poblaciones, Ecología Molecular de Insectos, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

Buscema, Ignacio

ibuscema@usb.ve

Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, Universidad del Zulia (LUZ). Ayudante de Investigación, Departamento de Tecnologías, Procesos Biológicos y Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar. (USB). Dirección: Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

Cequea, Hernán

hcequea@cantv.net

Licenciado en Biología. Universidad de Oriente (UDO), Venezuela. M.Sc. y Ph.D. Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, UDO. Venezuela. Profesor Titular de Citogenética, UDO. Dirección: Edificio AGUAMARINA, Piso 1, Apto. 1. Calle Bonpland, Cumaná, Edo. Sucre 6101, Venezuela.

Díaz, Sandra

andreinacumana@yahoo.es

Licenciada en Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Dirección: Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Dorta, Blas

blas.dorta@ciens.ucv.ve

Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Doctor en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina. Profesor Titular, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias UCV, Venezuela. Dirección: Instituto de Biología Experimental (IBE), Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas 1041, Venezuela.

Gajardo, Roxana

roxana.gajardo@ciens.ucv.ve

Licenciada en Biología, Universidad Simón Bolívar (USB), Venezuela. Estudiante de Doctorado en Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Venezuela. Profesora, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias UCV, Venezuela. Dirección: Instituto de Biología Experimental (IBE), Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas 1041, Venezuela.

Gámez, Ricardo

rgamez@hotmail.com

Licenciado en Biología, Universidad de Carabobo. Dirección: Universidad de Carabobo, Ciudad Universitaria-Campus Bárbula, antiguo Decanato de Educación Lado B, Avenida Bolívar Norte, Valencia estado Carabobo, Zona Postal 2005, Venezuela.

González, Luis Javier
luis.javier@cigb.edu.cu

Doctor en Ciencias Químicas, Investigador Titular, Profesor Titular Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Facultad de Química, UH. CIGB, La Habana, Cuba. Dirección: Calle #31 e/158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad Habana, Código Postal 10600, PO Box 6162, Cuba.

Guzmán, Tivardys
tivardg@hotmail.com

Licenciada en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Apartado postal 6101, Cumaná, Venezuela.

Hernández E., José V.
jnandez@usb.ve

Ing. Agrónomo Universidad Central de Venezuela (UCV). Dr. En Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar (USB). Profesor Titular (USB). Dirección: Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología de Organismos, Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edificio Física y Electrónica I, Piso 1, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

Herrera, Melfran
melfran@gmail.com

Licenciado en Biología, Universidad de Oriente (UDO), Venezuela. Estudiante de la Maestría en Entomología en Salud Pública, Facultad de Zoología Agrícola, Universidad Central de Venezuela (UCV). Coordinador de Vigilancia Entomológica, Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Endemias, Fundasalud, estado Sucre, Venezuela. Dirección: Av. Principal de Canchunchú, Edif. Malariología, Carúpano, estado Sucre, Venezuela.

Herrera-Malaver, Beatriz
bherreram@gmail.com

Licenciada en Química, Universidad Simón Bolívar (USB). Dirección: Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edificio Física y Electrónica I, Piso 1. USB Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

León, Evelyn
eleon@ivic.gob.ve

Técnico Superior Universitario, Institución donde las obtuvo: Instituto Universitario de Tecnología de la Región Central «Dr. Federico Rivero Palacio». Dirección: Unidad de Proteómica, Centro de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

Liendo-Barandiaran, Carmen V.
curruchita@gmail.com

Licenciada en Química, Universidad Simón Bolívar (USB). Dirección: Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edificio Física y Electrónica I, Piso 1. USB, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

Lundberg, Ulf
ulundber@ivic.gob.ve

Médico Cirujano, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia. Dirección: Centro de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 20632, Caracas 1020A, Caracas, Venezuela.

Martínez, Juan E.
juaneudes22@gmail.com

Geógrafo. Universidad Central de Venezuela (UCV) Licenciado en Geografía (UCV). Asistente de Investigación, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV, Caracas, Venezuela: Av. Los Ilustres, Facultad de Ciencias, UCV, Apdo. 47048.

Méndez, Franklin
femendez@ivic.gob.ve

Técnico Superior Universitario en Procesos Químicos, Instituto Universitario de Tecnología Dr. Federico Rivero Palacio. Dirección: Laboratorio de Estructura Supramolecular, Centro de Biología Estructural, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

Muñoz, Finordys
finord@hotmail.com

Licenciada en Bioanálisis. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre. Apartado postal 6101, Cumaná, Venezuela.

Navarro, Juan Carlos
juan.navarro@ciens.ucv.ve.

Licenciado en Biología Universidad Central de Venezuela (UCV). Ph. D. en Entomología Universidad Central de Venezuela/University of Texas at Galveston, EE. UU. Profesor Titular-Investigador, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV, Dirección: Av. Los Ilustres, Facultad de Ciencias, UCV, Apartado 47048, Caracas, Venezuela.

Osborn, Frances
fosborn2001@gmail.com

Bióloga, BSc., Southampton University, Inglaterra, Ph.D., Universidad Simón Bolívar (USB), Caracas, Venezuela. Dirección: Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Pavone, Domenico
fpavone@uc.edu.ve

Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Venezuela. Magister Scientiarum en Agronomía, Facultad de Agronomía, UCV. Estudiante de Doctorado en Biología Celular, Facultad de Ciencias, UCV. Profesor, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo, Venezuela. Dirección: Campus de Barbula, municipio Naguanagua, estado Carabobo, Venezuela.

Piñango, José E.
insectario.jr@gmail.com

Licenciado en Biología, mención Ecología, Universidad Central de Venezuela (UCV). Insectario del Zoológico El Pinar, Corporación de Servicios del Distrito Capital, Caracas. Dirección postal: Zoológico El Pinar, El Paraíso, Caracas.

Ramírez, Gregorio
gregorioram@gmail.com

Licenciado en Informática, Facultad de Ciencias, Universidad de Oriente, Venezuela. Asesor Experto, Unidad de Misión Árbol, Ministerio del Poder Popular para el Ambiente. Dirección: Av. Principal Cancamure, Frente al Polideportivo Félix «Lalito» Velásquez, Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Rodríguez, Jessica
jnrmr@gmail.com

Licenciada en Bioanálisis, Universidad de Oriente Núcleo de Sucre (UDO), Venezuela. M.Sc. en Biología Aplicada Mención Microbiología Aplicada (UDO). Profesora de Parasitología, Departamento de Bioanálisis (UDO). Dirección: Postgrado en Biología Aplicada, casa N° 13, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, estado Sucre, Venezuela.

Rodríguez-Lemoine, Vidal
vrodriguezlemoine@gmail.com

Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV). Ph. D. en Microbiología y Genética, Universidad de Londres, Inglaterra. Director Científico del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM). Universidad Central de Venezuela, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV, Venezuela. Profesor Titular de la UCV hasta 2002. Dirección: Instituto de Biología Experimental (IBE), Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas 1041, Venezuela.

Sainz-Borgo, Cristina
cristinasainzb@gmail.com

Licenciada en Biología. Universidad Central de Venezuela (UCV), Ph. D. en Ciencias Biológicas, Universidad Simón Bolívar (USB). Dirección: Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología de Organismos, Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edificio Física y Electrónica I, Piso 1, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

Salazar, Víctor
vsalazar@ivic.gob.ve

Licenciado en Biología, Universidad de Oriente (UDO). M.Sc. en Ecotoxicología (UDO). Dirección: Servicio de Microscopía de Luz, Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Apartado 20632, Caracas 1020A, Venezuela.

Támbara Hernández, Yanet
yanet.tambara@cigb.edu.cu

Licenciada en Radioquímica/Investigador Auxiliar, Instituto Superior de Ciencias y Tecnologías Nucleares, La Habana, Cuba. Dirección: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) Dirección: Calle #31 e/158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad Habana, Código Postal 10600, P.O. Box 6162, Cuba.

Tovar, María
mtovarsanchez@yahoo.com

Bioanalista, Universidad de Oriente Núcleo de Sucre (UDO), Venezuela. M.Sc. en Biología Aplicada Mención Ecotoxicología y Ecología Ambiental (UDO-Sucre), Venezuela. Profesora. Departamento de Enfermería, (UDO-Sucre). Dirección: Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Apdo. 245, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, estado Sucre, Venezuela.

Urdaneta, Neudo
urdanet@usb.ve

Químico Orgánico, MSc. Universidad Estatal de Jarkov, Máximo Gorki (República de Ucrania) y Ph. D., Instituto de Química Orgánica, N.D. Zelinski, Academia de Ciencias de Rusia, Moscú, República Federada de Rusia. Profesor Titular, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar (USB). Dirección: Valle de Sartenejas, Carretera Hoyo de la Puerta, Edif. Q y P, Apartado postal 89000, Baruta-Caracas 1080A, Venezuela.

Velásquez, Diony
dionevelazquez@yahoo.com

Técnico Superior Universitario, Instituto Tecnológico de Carúpano, Carúpano, estado Sucre, Venezuela. Dirección: Universidad Simón Bolívar, Laboratorio de Ecología Química del Comportamiento, Edificio Física y Electrónica I, Piso 1, Apartado 89000, Caracas 1080A, Venezuela.

Viloria, Ángel L.
aviloria@ivic.gob.ve

Licenciado en Biología, La Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela. Doctor of Philosophy (Zoology), The University of London, Reino Unido. Investigador Asociado Titular, Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Dirección: Apartado Postal 20632, Caracas 1020-A, Venezuela.

Vitelli, Juana
cvcm@ciens.ucv.ve

Licenciada en Bioanálisis, Universidad Central de Venezuela (UCV). Directora adjunta del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM). Universidad Central de Venezuela, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, UCV, Venezuela. Dirección: Instituto de Biología Experimental (IBE), Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas 1041, Venezuela.

Zorrilla, Adriana
adrianazg8@yahoo.es

Biólogo. Universidad Central de Venezuela (UCV). Licenciada en Biología UCV. Asistente de Investigación, Instituto de Zoología y Ecología Tropical (UCV). Dirección: Av. Los Ilustres, Facultad de Ciencias, UCV, Apartado 47048, Caracas, Venezuela

