

**CAMBIOS MORFOLÓGICOS PRODUCIDOS POR EL PARASITISMO DE
Strelkovimermis spiculatus (NEMATODA, MERMITHIDAE) EN LARVAS DEL
MOSQUITO *Culex pipiens* (DIPTERA, CULICIDAE)**

**MORPHOLOGICAL CHANGES CAUSED BY PARASITISM OF *Strelkovimermis spiculatus*
(NEMATODA, MERMITHIDAE) IN *Culex pipiens* MOSQUITO LARVAE (DIPTERA, CULICIDAE)**

Guillermo REBOREDO^{1,2,3}; Sandra GONZÁLEZ^{2,3,4}; José Matías RUSCONI^{2,3,5}; Nora Beatriz CAMINO^{2,3,6}

1. Profesional de Apoyo CONICET. 2. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. 3. Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, CEPAVE - CONICET, Universidad Nacional de La Plata. 4. Profesional de Apoyo CIC. 5. Becario CIC. 6. Investigador CIC.

RESUMEN.

El presente estudio evalúa el efecto del parasitismo de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda, Mermithidae), sobre larvas del mosquito *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera, Culicidae) a nivel histopatológico. Debido a la presencia del nemátodo que se evidencia por sus estructuras tales como los homocitos, esticocitos, cuerdas longitudinales y trofosoma, se observó una alteración principalmente a nivel del epitelio intestinal, el cuerpo graso y la musculatura de la larva.

Palabras claves: histopatología, nemátodo, parásito, larvas de mosquitos.

ABSTRACT.

This study reports the effect of parasitism of the mermithid *Strelkovimermis spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda, Mermithidae) parasitizing larvae of the mosquito *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 (Diptera, Culicidae) at histopathological level. Due to the presence of nematode, evidenced by their structures such as longitudinal chords and trophosome, we observed changes mainly at the intestinal epithelium, fat body and muscle of the larva.

Keywords: histopathology, nematode, parasite, mosquito larvae.

Recibido noviembre 27, 2014 - Aceptado marzo 17, 2016

* **Correspondencia de autor:** Nora Camino. Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores CEPAVE, CCT, UNLP. Calle 120s/n 61 y 62. (CP 1900). La Plata, Buenos Aires, Argentina. e-mail: nemainst@cepave.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los mermítidos son nemátodos que parasitan a insectos. Presentan una etapa de vida libre y otra de vida parásita. A partir del huevo eclosiona una forma infectante que penetra a través de la cutícula al hemocele del hospedador. Luego de desarrollarse y madurar emerge un juvenil que muda a adulto en el sustrato, donde se realiza la cópula y puesta de huevos. En este proceso de liberación de los juveniles, el insecto muere. En el caso de culícidos es importante ya que incluye numerosas especies vectoras de enfermedades como filariasis, malaria, encefalitis, fiebre amarilla y dengue en áreas urbanas y rurales de la Argentina, convirtiendo a los mermítidos en un importante agente de control biológico (1-4).

Los estudios referentes al daño que provoca el parasitismo de mermítidos en larvas de culícidos se refieren exclusivamente, como consecuencia de la presencia del mismo, a la muerte del hospedador (5-8); pero no existen estudios referidos al daño histológico que provocan los nemátodos mermítidos sobre los tejidos de las larvas de *Culex pipiens* Linnaeus, 1758. La mayoría de los trabajos versan sobre bacterias patógenas (*Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 y *B. sphaericus* Neider & Meyer, 1904) en larvas de mosquitos, donde se ve afectado principalmente el tubo digestivo por las toxinas bacteriales, las cuales causan varios tipos de daño en las células del epitelio intestinal, como la vacuolización citoplasmática, la alteración de las microvellosidades, el aumento de la actividad secretora y la extrusión de las vesículas celulares con material intracitoplasmático, lo cual conlleva finalmente a la muerte celular (9, 10, 11). También se estudiaron los cambios histopatológicos causados por los extractos vegetales de semillas y hojas de ciertas plantas con excelentes propiedades insectici-

das que afectan a la fecundidad y a la fertilidad de los mosquitos (12-15).

En el presente estudio se propone evaluar el efecto del parasitismo de *S. spiculatus* Poinar & Camino, 1986 (Nematoda, Mermithidae) sobre larvas del mosquito *C. pipiens* a nivel histopatológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Las larvas del mosquito *C. pipiens* se obtuvieron a partir de una colonia experimental desarrollada y mantenida en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE). Las larvas de mosquito fueron criadas a $27^{\circ}\text{C} \pm 2$, en 70% de humedad ambiental y a un fotoperíodo de 12:12 (L:O), en bandejas con agua corriente declorinada y alimentadas con alimento en polvo para peces alevinos marca Tetra®. Los machos adultos se mantuvieron en jaulas con algodón embebido en una solución de 10% de azúcar y las hembras fecundadas fueron alimentadas sobre *Gallus* sp. (Aves, Galliformes, Phasianidae).

Nemátodos

Se utilizó el mermítido *S. spiculatus* mantenido en el CEPAVE. En el laboratorio se mantiene la especie de nemátodo según los procedimientos descritos por Camino y Reboredo (1). Las larvas del segundo estadio fueron expuestas a rangos de 5:1 forma infectante: hospedador, en unos recipientes de plástico con 500 ml de agua corriente declorinada a temperatura ambiente (20°C). Las formas infectantes se obtuvieron inundando con agua corriente declorinada los cultivos con arena. Al cabo de 5 días las larvas alcanzaron el tercer estadio temprano y antes que el mermítido emergiera se las fijó en formol al 4%.

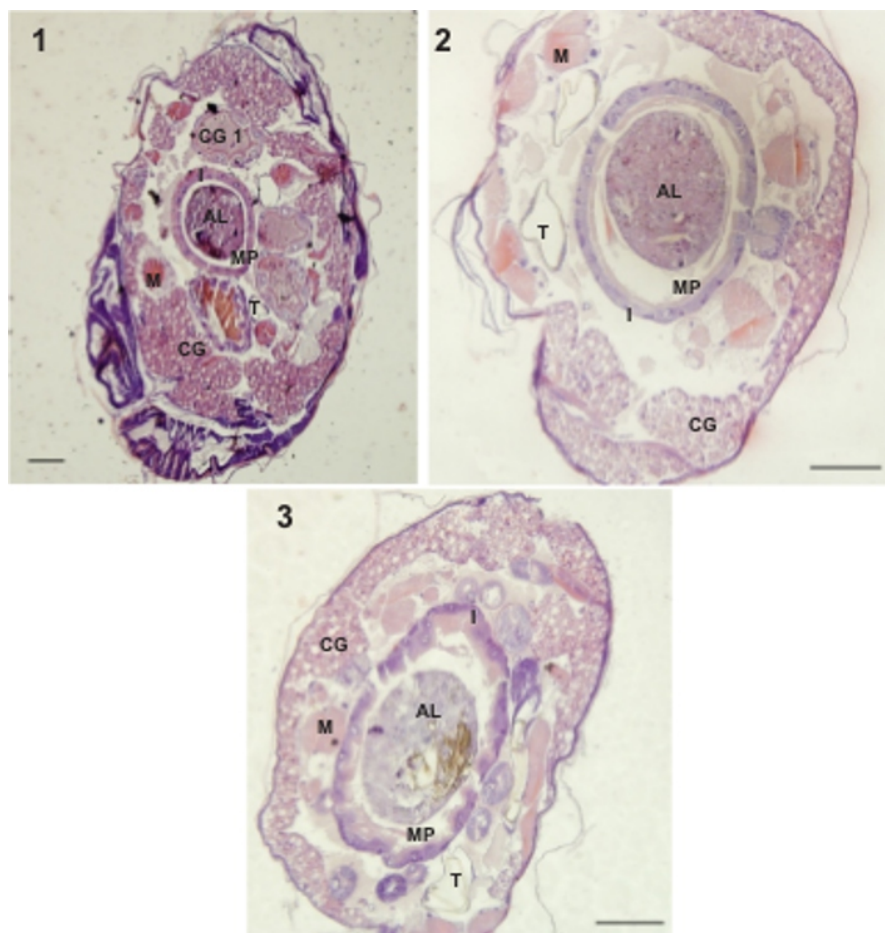
Cortes histológicos

Se realizaron cortes histológicos de larvas del tercer estadio temprano del mosquito *C. pipiens*. Las larvas parasitadas y no parasitadas se fijaron en formol al 4%, se montaron en tacos de Paraplast, los cortes fueron realizados con un micrótopo Leica RM 2125 RT y coloreados con hematoxilina-eosina. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Olympus BX 51 con cámara Olympus Dp 71.

RESULTADOS

Las larvas no parasitadas presentan una división del intestino en anterior (Fig. 1), medio (Fig. 2) y poste-

rior (Fig. 3). En el intestino anterior, el ciego gástrico se encuentra en el tórax. Se observa el alimento en el lumen intestinal, y un epitelio de células cúbicas nucleadas (Fig. 1). Las células del ciego gástrico presentan ribetes en cepillos, los límites intercelulares no están claramente definidos, y los núcleos de las células se encuentran en el centro celular. En el intestino medio las células son cúbicas y presentan ribete en cepillo como en el intestino anterior (Fig. 2), el núcleo de las células intestinales se ubica en el centro, generalmente de cromatina laxa y nucleolo central. Además, se observa la membrana peritrófica bien desarrollada. El citoplasma del epitelio del intestino medio y posterior presenta una



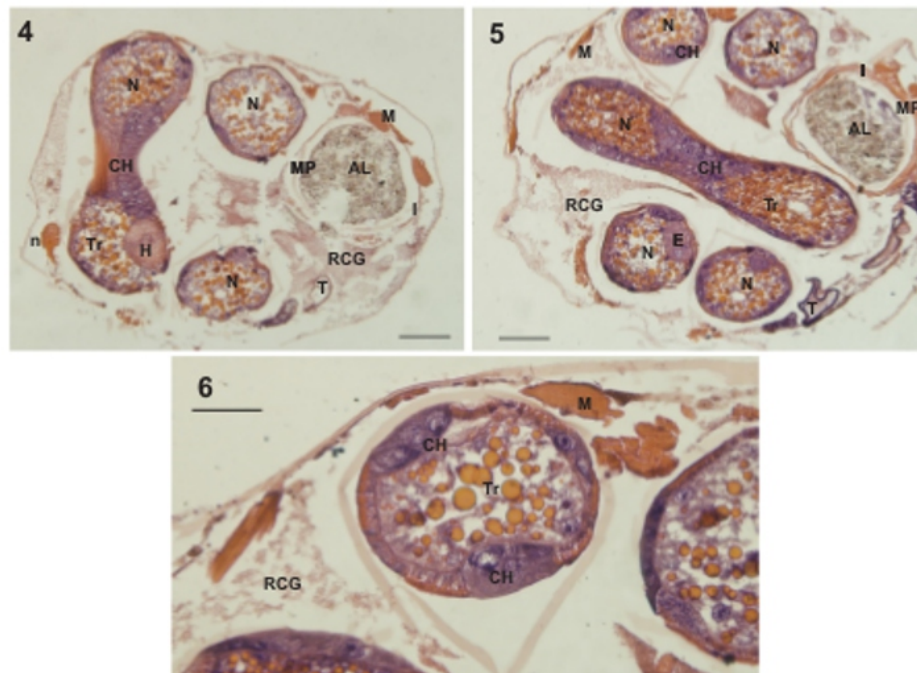
Figuras 1, 2, 3. Cortes transversales de larva del mosquito no parasitado a nivel del: 1. Intestino anterior, 2. Intestino medio y 3. Intestino posterior. Barras = 100 μ m.

AL: alimento en el lumen intestinal, CG: cuerpo graso, CG1: ciego gástrico, I: intestino, M: músculo, MP: membrana peritrófica, T: tráquea.

tinción similar y es más basófilo que en las células del intestino anterior. El intestino anterior y el intestino medio se encuentran entre los segmentos abdominales I y III. El intestino posterior se distingue fácilmente por su epitelio con células hipertrofiadas (Fig. 3) y comienza entre los segmentos abdominales IV y V. El citoplasma de las células del epitelio de este intestino es basófilo. Las células son cúbicas bajas y tienen los núcleos con cromatina laxa, y evidentes nucleolos. Las células del epitelio intestinal no están en contacto directo con el alimento, están separadas por una membrana cuticular acelular llamada membrana peritrófica (Figs. 1, 2 y 3), que compartimenta el intestino en un espacio ectoperitrófico y otro endoperitrófico. Otro tejido es el cuerpo graso bien desarrollado formado por adipocitos que se ubican contra la pared del cuerpo. La musculatura se encuentra formada por fibras musculares estriadas agrupadas en paquetes. Además, podemos observar la

red traqueal bien desarrollada.

Se compararon las estructuras presentes en ambos casos (larvas de mosquito no parasitadas y parasitadas), observándose el tubo digestivo con el ciego gástrico, el cuerpo graso, la musculatura y la red traqueal. Encontramos que la forma parasitada presenta el cuerpo graso reducido (Figs. 4 y 5), quedando sólo restos de los adipocitos. Presenta una reducción significativa de la musculatura y el tubo digestivo con una atrofia del epitelio en toda su longitud, quedando solamente la membrana peritrófica (Figs. 4 y 5). El parásito ocupa casi la totalidad de la cavidad corporal. Se evidencian estructuras propias de larvas de nemátodos, como son los homocitos y esticocitos (células osmorreguladoras) y el trofosoma (intestino) repleto de gránulos de grasa y proteínas, cordones hipodermales longitudinales, como así también el paquete músculo cutáneo característico de los nemátodos (Fig. 6).



Figuras 4, 5, 6. Cortes transversales de larva del mosquito parasitada por mermíto. 4. a nivel del intestino anterior, 5: a nivel del intestino posterior, 6. Detalle del corte transversal del nemátodo dentro del corte transversal de la larva del mosquito. Barras = 4 y 5: 100 μ m, 6: 50 μ m.

AL: alimento en el lumen intestinal, CGI: ciego gástrico, CH: cuerdas hipodermales, E: esticocito, H: homocito, I: intestino, M: músculo, MP: membrana peritrófica, N: nemátodo, Ne: neurona, RCG: restos del cuerpo graso, T: tráquea, Tr: trofosoma.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El estudio histológico de las larvas de mosquito muestra un patrón similar en la morfología, sobre todo con un cuerpo graso bien desarrollado, al igual que el tubo digestivo y los paquetes musculares (16).

El efecto del parasitismo de mermítidos sobre larvas de insectos es similar para todos los hospedadores (4).

En la literatura hay escasos trabajos sobre la diferencia histológica de los inmaduros de *C. pipiens* parasitados con *S. spiculatus* con los no parasitados (3) donde se trata fundamentalmente de la reducción del cuerpo graso del insecto. Algunos tratan de mermítidos parasitando al mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (2) con *B. sphaericus*, una bacteria cuya toxina es responsable de la hipertrofia celular del epitelio intestinal; o mermítidos en tucuras *Schistocerca gregaria* Forsskål, 1775 (17), en

este caso el mermítido *Mermis nigrescens* Dujardin, 1842 altera negativamente el metabolismo proteico y causa reducción del cuerpo graso; por último Rubzov (18) sugiere que los mermítidos parásitos de simúlidos secretan enzimas que provocan la lisis de las células del cuerpo graso e intervienen en la alteración de otros tejidos, inhibiendo el normal desarrollo del hospedador. Micieli et al. (4) observaron que con la salida del nematodo la larva del mosquito quedaba prácticamente vacía sin mencionar el daño en los tejidos.

El presente trabajo corresponde a un primer estudio histopatológico del nemátodo mermítido *S. spiculatus* parasitando a larvas del mosquito *C. pipiens*, por lo que contribuiría a un mejor entendimiento del modo de acción de este nemátodo usado como bioinsecticida contra larvas de culícidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camino NB, Reboredo GR (1996) Producción de *Strelkovimermis spiculatus* Poinar y Camino 1986 (Nematoda: Mermithidae). Neotrópica 42: 47-50.
2. Achinelly MF, Micieli MV (2009) Experimental releases of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) against three mosquito species in Argentina. Nematology 11: 151-154.
3. Achinelly MF, Micieli MV (2011) Optimizing laboratory production of *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) with a discussion of potential release strategies for mosquito biological control. Bioll Control 57: 31-36.
4. Micieli MV, Risso P, Achinelly MF, Villar MM, Muttis E (2012) Population dynamics between the mermithid *Strelkovimermis spiculatus* (Nematoda: Mermithidae) and the floodwater mosquito *Ochlerotatus albifasciatus* (Diptera: Culicidae) over time. Bioll Control 61: 55-63.
5. Camino NB (1985) Contribución al estudio de la familia Mermithidae (Nematoda) parásita de larvas de dípteros acuáticos. I. *Gastromermis vaginiferous* sp. n. Neotrópica 31: 143-147.
6. Camino NB (1987) Dos especies nuevas del género *Isomermis* Coman, 1953 (Nematoda: Mermithidae), parásitas de larvas de dípteros en Argentina. Rev Iber Parasitol 47: 153-158.
7. Camino NB (1989) Primer registro de culícidos (Diptera: Culicidae) parasitados por *Hydromermis* sp. (Nematoda: Mermithidae). Neotrópica 35: 67-70.
8. Poinar GO Jr (1975) Entomogenous Nematodes: A Manual and Host List of Insect-Nematode Associations. E. J. Brill, Leiden 317 pp.
9. Karch S, Coz J (1983) Histopathologie de *Culex pipiens* Linné (Diptera, Culicidae) soumis à l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide 1593-1594. Ent Med Parasitol 22: 225-230.
10. Percy J, Fast PG (1983) *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. J Invertebr Pathol 41: 86-98.
11. Cavados CFG, Majerowicz S, Chaves JQ, Araújo-Coutinho CJPC, Rabinovitch L (2004) Histopathological and ultrastructural effects of dendotoxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* in the midgut of *Simulium pertinax* larvae (Diptera, Simuliidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 493-498.
12. Schmutterer H (1990) Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Ann Rev Ent 35: 271-297.
13. Senthil Nathan S, Kalaivani K, Murugan K, Chung PG (2005) The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée), the rice leaf folder. Pest Biochem Physiol 81: 113-122.
14. Zebitz CP (1984) Effect of some crude and azadirachtin-enriched Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. Entomol Exp Appl 35: 11-16.
15. Murugan K, Babu R, Jeyabalan D, Senthil Kumar N, Sivaramkrishnan S (1996) Antipupal effect of neem oil and neem seed kernel extract against mosquito larvae of *Anopheles stephensi* (Liston). J Ent Res 20: 137-139.

16. Oliveira CD, Tadei WP, Abdalla FC (2009) Occurrence of Apocrine Secretion in the Larval Gut Epithelial Cells of *Aedes aegypti* L., *Anopheles albitalarsis* Lynch-Arribálzaga and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae): a Defense Strategy Against Infection by *Bacillus sphaericus* Neide? *Neotrop Entomol* 38: 624-631.
17. Gordon R, Webster JM (1971) *Mermis nigrescens*: Physiological relationship with its host, the adult desert locust *Schistocerca gregaria*. *Exp Parasitol* 29: 66-79
18. Rubzov IA (1972) Aquatic mermithids. Part1. Nauka, Leningrado, 254 pp.